

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Farmakokinetika hydrogelu na bázi hyaluronanu s obsahem triclosanu  
po intraperitoneálním podání malým laboratorním zvířatům

Bc. Anna Veverková

Diplomová práce

2020

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Anna Veverková**  
Osobní číslo: **C18560**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Téma práce: **Farmakokinetika hydrogelu na bázi hyaluronanu s obsahem triclosanu po intraperitoneálním podání malým laboratorním zvířatům**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

### Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši zaměřenou na charakterizaci vlastností a využití hydrogelů a hyaluronanu, dále tyraminu a triclosanu včetně jejich metod stanovení.
2. Pro sledování farmakokinetiky těchto látek po intraperitoneálním podání malým laboratorním zvířatům zoptimalizujte HPLC metodu ve spojení s fluorescenčním detektorem a/nebo elektrosprejovou hmotnostní spektrometrií s trojitým kvadrupólem.
3. Zoptimalizovanou metodu aplikujte v in vivo studii myších vzorků plazmy a tkání.

Rozsah pracovní zprávy:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Robert Jirásko, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Mgr. Martina Hermannová, Ph.D.**  
Contipro a.s., Dolní Dobrouč


Datum zadání diplomové práce: **5. února 2020**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2020**



---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

L.S.



---

**prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2020

## **Prohlašuji:**

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 6. května 2020

Bc. Anna Veverková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce Ing. Robertovi Jiráskovi, Ph.D. za ochotu, odborné vedení a cenné rady při zpracování své diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Martině Hermannové, Ph.D. nejen za odborné vedení a konzultaci při vykonávání experimentální části práce, ale především za věnovaný čas při práci v laboratoři. Děkuji také své rodině a přátelům za podporu v průběhu studia.

## **ANOTACE**

Diplomová práce se zabývá hydrogely na bázi hyaluronanu s obsahem triclosanu. První část je věnována obecné charakteristice vlastností a využití hydrogelů a hyaluronanu, dále tyraminu a triclosanu včetně jejich metod stanovení. Experimentální část je zaměřena především na vývoj metodiky a sledování farmakokinetiky těchto látek po intraperitoneálním podání malým laboratorním zvířatům. Triclosan obsažený v hydrogelu je analyzován pomocí ESI-MS/MS s trojitým kvadrupólem ve spojení s RP-HPLC, a tyramin tvořící degradační produkt hyaluronanového hydrogelu je stanoven pomocí HPLC s fluorescenčním detektorem. Optimalizovaná metoda je finálně použita pro analýzu studovaných sloučenin v *in vivo* studii myších vzorků plazmy a tkání.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

hydrogely na bázi hyaluronanu, triclosan, tyramin, hmotnostní spektrometrie

## **ANNOTATION**

The diploma thesis deals with hydrogels on the basis of hyaluronan containing triclosan. The first part is focused on the general characterization and use of hydrogels and hyaluronan, as well as tyramine and triclosan including their methods of determination. The experimental part is mainly focused on the development of methodology and monitoring of pharmacokinetics of these compounds after intraperitoneal application to small laboratory animals. Triclosan is analyzed using RP-HPLC coupled to ESI-MS/MS with triple quadrupole analyzer, while the tyramine, a degradation product of the hyaluronan hydrogel, is determined by HPLC with a fluorescence detector. The optimized method is used finally for the analysis of the studied compounds in an *in vivo* study of mouse plasma and tissue samples.

## **KEYWORDS**

hydrogels on the basis of hyaluronan, triclosan, tyramine, mass spectrometry

# Obsah

Seznam obrázků, tabulek, rovnic a grafů .....	10
Seznam použitých zkratk .....	13
Úvod .....	16
1 TEORETICKÁ ČÁST .....	17
1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie .....	18
1.1.1 Princip HPLC .....	18
1.1.2 Instrumentace HPLC .....	18
1.2 Spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií .....	20
1.2.1 Princip MS .....	20
1.2.2 Instrumentace HPLC/MS .....	20
1.2.2.1 Ionizace elektrosprejem .....	21
1.2.3 RP-HPLC/ESI-MS .....	22
1.2.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie .....	23
1.3 Hyaluronan .....	24
1.3.1 Vlastnosti HA .....	24
1.3.2 Výskyt HA .....	24
1.3.3 Využití HA .....	25
1.3.4 Modifikace HA .....	25
1.4 Hydrogely .....	27
1.4.1 Rozdělení hydrogelů .....	27
1.4.2 Využití hydrogelů .....	28
1.4.3 Hydrogely na bázi síťovaných derivátů HA .....	28
1.5 Tyramin .....	32
1.5.1 Vlastnosti a výskyt tyraminu .....	32
1.5.2 Stanovení tyraminu .....	32
1.5.3 Stanovení dityraminu .....	33

1.6	Hyaluronanové hydrogely na bázi tyraminu.....	34
1.6.1	Vlastnosti a využití HA-TYR.....	34
1.6.2	Stanovení hydrogelů na bázi tyraminu.....	35
1.7	Triclosan.....	36
1.7.1	Vlastnosti triclosanu.....	36
1.7.2	Metabolismus triclosanu.....	36
1.7.3	Stanovení triclosanu a jeho metabolitů pomocí LC/MS.....	38
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	40
2.1	Vývoj a optimalizace metody pro stanovení derivátu HA2-TYR, TCS, TCS sulfátu a TCS glukuronidu.....	41
2.1.1	Chemikálie.....	41
2.1.2	Přístroje a zařízení.....	41
2.1.3	Příprava vzorků a vnitřních standardů.....	42
2.1.4	Podmínky analýzy.....	43
2.1.5	Optimalizace úpravy vzorků.....	44
2.1.6	Optimalizace extrakčního činidla pro extrakci vzorku.....	45
2.2	<i>In Vivo</i> studie myších vzorků.....	46
2.2.1	Pracovní postup přípravy vzorků.....	46
3	Výsledky a diskuze.....	48
3.1	Optimalizace metody stanovení TCS a jeho metabolitů.....	48
3.2	Optimalizace metody stanovení $\Delta$ HA2-TYR a $\Delta$ HA2-DITYR- $\Delta$ HA2.....	50
3.3	Robustnost metody.....	55
3.3.1	Výpočet robustnosti.....	56
3.3.2	Výsledky testu robustnosti.....	57
3.4	Validace metody.....	61
3.4.1	Výsledky validace metody.....	61
3.5	Výsledky <i>in vivo</i> studie myších vzorků.....	64



3.5.1	Distribuce v myších orgánech a krvi – TCS a jeho metabolity .....	64
3.5.2	Distribuce v myších orgánech a krvi – tyraminový derivát .....	68
3.5.3	Vylučování TCS a jeho metabolitů a tyraminového derivátu .....	69
3.5.4	Distribuce v myších orgánech a krvi – souhrn .....	72
4	Závěr .....	74
5	Seznam použitých zdrojů .....	76

## Seznam obrázků, tabulek, rovnic a grafů

**Obrázek 1.** Základní schéma HPLC

**Obrázek 2.** Základní schéma HPLC/MS

**Obrázek 3.** Základní schéma QqQ

**Obrázek 4.** Struktura hyaluronanu

**Obrázek 5.** Chemická konjugace a zesítnění polymeru

**Obrázek 6.** Struktura tyraminu

**Obrázek 7.** Struktura modifikovaného derivátu HA na bázi tyraminu

**Obrázek 8.** Metoda zesíťování hydrogelu na bázi HA-TYR

**Obrázek 9.** Struktura triclosanu

**Obrázek 10.** Metabolismus triclosanu

**Obrázek 11.** Schématické znázornění produktů štěpení hydrogelu na bázi tyraminového derivátu hyaluronanu pomocí SpHyl.

**Obrázek 12.** Schématické znázornění produktů štěpení hydrogelu na bázi tyraminového derivátu hyaluronanu pomocí BTH (modře). Pro každý z produktů vznikající BTH hydrolyzou jsou také znázorněny produkty vznikající degradací enzymem SpHyl (červeně).

**Tabulka 1.** Stanovení metabolitů triclosanu pomocí LC/MS

**Tabulka 2.** Vybrané prekurzory pro stanovení hydrogelu na bázi tyraminu

**Tabulka 3.** Myši vzorky připravené v rozličném čase pro *in vivo* studii

**Tabulka 4.** Kombinace parametrů pro zhodnocení robustnosti

**Tabulka 5.** Vybrané parametry pro robustnost metody

**Tabulka 6.** Výsledky měření pro TYR derivát ( $c = 75 \mu\text{g/ml}$ ) s použitím VS

**Tabulka 7.** Výsledky měření pro TYR derivát ( $c = 15 \mu\text{g/ml}$ ) s použitím VS

**Tabulka 8.** Výsledky měření pro TYR derivát ( $c = 1 \mu\text{g/ml}$ ) s použitím VS

**Tabulka 9.** Výsledky měření pro triclosan ( $c = 3,75 \mu\text{g/ml}$ ) s použitím VS

**Tabulka 10.** Výsledky měření pro triclosan ( $c = 0,75 \mu\text{g/ml}$ ) s použitím VS

**Tabulka 11.** Výsledky měření pro triclosan ( $c = 0,050 \mu\text{g/ml}$ ) s použitím VS

**Tabulka 12.** Experimentálně zjištěná koncentrace, přesnost a relativní směrodatná odchylka TYR derivátu pro tři různé koncentrace pro měření probíhající během 3 dní

**Tabulka 13.** Experimentálně zjištěná koncentrace, přesnost a relativní směrodatná odchylka triclosanu pro tři různé koncentrace pro měření probíhající během 3 dní

**Tabulka 14.** Stabilita vzorků po dobu 14 dní při teplotě -20 °C. Vyjádřeno jako výtěžnost analytu po skladování (14 dní, -20 °C).

**Tabulka 15.** Stabilita vzorků po dobu 14 dní při teplotě -20 °C; rozmrazeno/zamrazeno – 3 cykly. Vyjádřeno jako výtěžnost analytu po uvedeném zacházení se vzorky.

**Rovnice 1.** Schéma výpočtu testu robustnosti

**Rovnice 2.** Výpočet intervalu spolehlivosti kontrastu

**Rovnice 3.** Výpočet odhadu hodnoty směrodatné odchylky

**Graf 1, 2.** Přídavek kyseliny  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  ke vzorku

**Graf 3, 4.** Optimalizace napětí kapiláry pro stanovení TCS v  $\text{ESI}^-$  režimu

**Graf 5, 6.** Optimalizace teploty sušícího plynu pro stanovení TCS v  $\text{ESI}^-$  režimu

**Graf 7, 8.** Optimalizace průtoku plynu pro stanovení TCS v  $\text{ESI}^-$  režimu

**Graf 9, 10.** Optimalizace CV pro stanovení  $\Delta\text{HA2-TYR}$  a  $\Delta\text{HA2-DITYR-}\Delta\text{HA2}$  v  $\text{ESI}^+$  režimu

**Graf 11, 12.** Optimalizace napětí na kapiláře pro stanovení  $\Delta\text{HA2-TYR}$  a  $\Delta\text{HA2-DITYR-}\Delta\text{HA2}$  v  $\text{ESI}^+$  režimu

**Graf 13, 14.** Optimalizace teploty sušícího plynu pro stanovení  $\Delta\text{HA2-TYR}$  a  $\Delta\text{HA2-DITYR-}\Delta\text{HA2}$  v  $\text{ESI}^+$  režimu

**Graf 15, 16.** Optimalizace průtoku sušícího plynu pro stanovení  $\Delta\text{HA2-TYR}$  a  $\Delta\text{HA2-DITYR-}\Delta\text{HA2}$  v  $\text{ESI}^+$  režimu

**Graf 17.** Kalibrační přímky pro TYR derivát s použitím VS

**Graf 18.** Kalibrační přímky pro triclosan s použitím VS

**Graf 19, 20.** Koncentrace TCS, TCS-S a TCS-GL v krevní plazmě v závislosti na čase

**Graf 21, 22.** Koncentrace TCS, TCS-S a TCS-GL v krevních buňkách v závislosti na čase

**Graf 23, 24.** Koncentrace TCS, TCS-S a TCS-GL v játrech v závislosti na čase

**Graf 25, 26.** Koncentrace TCS, TCS-S a TCS-GL ve slezině v závislosti na čase

**Graf 27, 28.** Koncentrace TCS, TCS-S a TCS-GL v ledvinách v závislosti na čase

**Graf 29, 30.** Koncentrace TCS, TCS-S a TCS-GL ve zbytku materiálu v závislosti na čase

**Graf 31, 32.** Koncentrace TYR derivátu ve vybraných tělních tekutinách a orgánech v závislosti na čase

**Graf 33, 34.** Koncentrace TYR derivátu ve zbytku materiálu v závislosti na čase

**Graf 35, 36.** Koncentrace TCS, TCS-S a TCS-GL ve stolici v závislosti na čase

**Graf 37, 38.** Koncentrace TCS, TCS-S a TCS-GL v moči v závislosti na čase

**Graf 39, 40.** Koncentrace TYR derivátu ve stolici a moči v závislosti na čase

**Graf 41, 42, 43.** Souhrnná distribuce TCS, TCS-S a TCS-GL

**Graf 44.** Souhrnná distribuce tyraminového derivátu

## Seznam použitých zkratek

AFFFF	Fracionace tokem v asymetrickém tokovém poli
AFM	Mikroskopie atomové síly
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosférického tlaku
BTH	Bovinní testikulární hyaluronidáza
C18	Oktadecylsilikagel
C8	Oktylsilikagel
CI	Chemická ionizace
CV	Napětí vkládané na vstupní kužel (cone voltage)
DLS	Dynamický rozptyl světla
DOSY	Dvourozměrná nukleární magnetická rezonance
DS	Stupeň substituce
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie
ECM	Extracelulární matrice
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EI	Elektronová ionizace
ESI	Ionizace elektrosprejem
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GlcA	D-glukuronová kyselina
GlcNAc	N-acetyl-D-glukosamin
HA	Kyselina hyaluronová, hyaluronan sodný
HA-TYR	Hyaluronanové hydrogely na bázi tyraminu
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC/ESI-MS	Hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií
HPLC/MS	Hmotnostní spektrometrie ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií
HPLC-MS/MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
HRP	Křenová peroxidáza
IR	Infračervená spektroskopie
IT	Iontová past

LC/fluorescence	Kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí
LC/MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MALDI	Laserová desorpce/ionizace za účasti matrice
MEPS	Mikroextrakce pomocí zabalených sorbentů
MS	Hmotnostní spektrometrie
NL	Sken neutrálních ztrát
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s normálními fázemi
PBS	Fosfátový pufr
PI	Sken iontů prekursoru
Q	Kvadrupólový analyzátor
QqQ	Trojité kvadrupól
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi
RP-HPLC/ESI-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi ve spojení s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem
RP-HPLC/ESI/MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s obrácenými fázemi
RP-HPLC-MS/MS	Vysokoúčinné kapalinové chromatografie v systému s obrácenými fázemi ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SD	Směrodatná odchylka
SEC-MALS	Vylučovací chromatografie spojená s víceúhlým rozptylem světla
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SPE	Extrakce na pevné fázi
SpHyl	Procesivní lyáza z bakterie <i>Streptococcus pneumoniae</i>
SRM	Selektivní záznam jedné nebo více iontových reakcí
$T_{1/2}$	Poločas eliminace
TCS	Triclosan
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
TOF	Analyzátor doby letu
TYR	Tyramin

UHPLC	Ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie
VS	Vnitřní standard
$\Delta$ HA2-TYR	Nenasycená modifikovaná disacharidová stavební jednotka TYR derivátu
$\Delta$ HA2-DITYR- $\Delta$ HA2	Nenasycená modifikovaná dityraminová stavební jednotka hydrogelu

## Úvod

Kyselina hyaluronová neboli hyaluronan je přirozeně se vyskytující polysacharid patřící do skupiny glykosaminoglykanů. Má mnoho fyzikálně-chemických vlastností a účastní se řady významných biologických účinků v lidském organismu. Její jedinečné viskoelastické vlastnosti jsou nápomocné pro obnovení pružnosti stárnoucí pokožky a redukci vrásek. Hydratační, regenerační a protizánětlivé schopnosti umožňují její rozličné využití zejména ve farmaceutickém, lékařském a kosmetickém oboru. Je známo mnoho chemických modifikací, kterým může být kyselina hyaluronová vystavena. V závislosti na charakteru substituce mohou mít modifikované formy různé hydrofilní/hydrofobní vlastnosti a rychlosti degradace. Některé deriváty hyaluronanu mají schopnost tvořit trojrozměrné sítě, které jsou podnětem pro vznik hydrogelů.

Hydrogely jsou definovány jako materiály tvořené ve vodě nerozpustnou sítí alespoň částečně hydrofilních polymerů. Požadovaných vlastností se dosáhne hydrofobizací polymeru nebo využitím ve vodě rozpustného derivátu polymeru nesoucího reaktivní funkční skupiny, které se mohou účastnit dalších chemických reakcí, které vedou ke vzniku trojrozměrné polymerní sítě.

Důležitou látkou s antimikrobiálními vlastnostmi, která je vázaná nekovalentně v molekule hydrogelu je triclosan (TCS). Hydrogely díky obsahu triclosanu získají nejen schopnost prodlouženého uvolňování, ale především odolnost vůči mnoha typům bakterií, neboť působí proti bakteriálnímu množení. Triclosan se dále často nachází v kosmetických výrobcích, zejména v zubních pastách, ústních vodách, mýdlech, deodorantech, ale i v přípravcích na nádoby. V lidském organismu je triclosan metabolizován a vylučován ve formě glukuronidových a sulfátových konjugátů, proto může být v těle přítomen v nezměněném i metabolizovaném stavu.

V praxi jsou velmi často využívány modifikované hydrogely založené na různé bázi. Výběrem daného derivátu jsou dosaženy požadované mechanické vlastnosti, které umožňují homogenní zapracování buněk a zformování do podoby gelu a materiál se tak stane ve vodě nerozpustným. Využívají se v kosmetice, ale zejména v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně pro přípravu tkáňových nosičů při léčbě defektů kloubní chrupavky nebo kostních tkání. Jsou nerozeznatelné od normálních, zdravých tkání jak ve struktuře, tak i funkci. Tato práce je především zaměřena na hyaluronové hydrogely na bázi tyraminu (TYR), které jsou plně biokompatibilní a biologicky odbouratelné.



# **1 TEORETICKÁ ČÁST**

## 1.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je velmi účinnou a široce používanou separační technikou téměř ve všech oblastech analytické chemie, a to zejména v klinické, farmaceutické, environmentální, průmyslové, potravinářské a soudní analýze. Tato metoda je vhodná pro polární, netěkavé a tepelně nestabilní látky. Výhodou HPLC oproti klasické LC technice je především vysoká účinnost separace a automatizace od zavedení vzorků po vyhodnocení dat a rychlost analýzy.<sup>1, 2</sup> V posledních letech je HPLC nahrazována ultra-vysokoučinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC), která pracuje za vyšších tlaků (100-150 MPa) a poskytuje ještě vyšší chromatografické rozlišení. Řada firem však stále používá HPLC z důvodu zavedených validovaných metod.

### 1.1.1 Princip HPLC

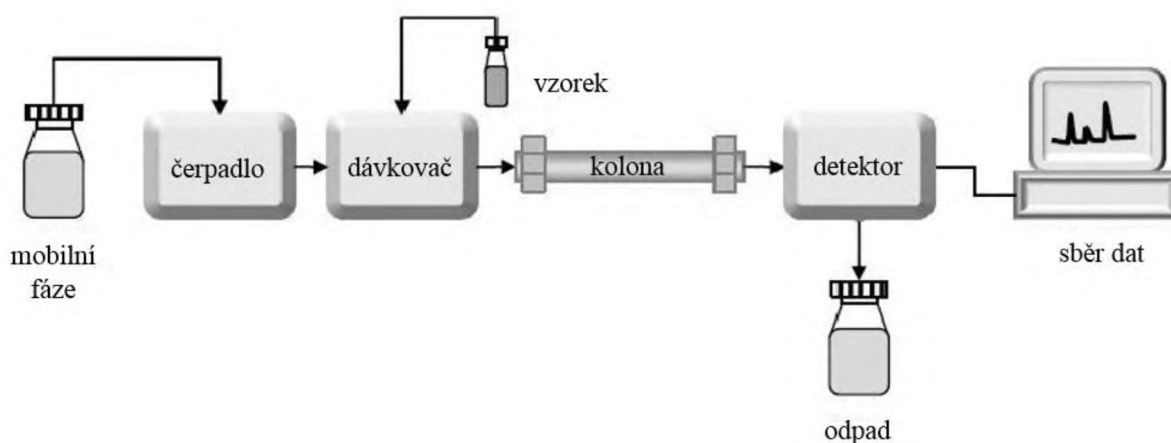
Roztok vzorku je vstřikován do chromatografické kolony, která je naplněna vhodnou stacionární fází, a přes kterou je za vysokého tlaku čerpána mobilní fáze. Princip chromatografické separace je založený na rozdílné afinitě jednotlivých komponent vzorku ke stacionární fázi, což vede k jejich rozdílné rychlosti migrace při průchodu chromatografickou kolonou ve směru toku mobilní fáze. Jednotlivé složky vzorku jsou tak separovány a následně detekovány v různých retenčních časech.<sup>1</sup>

Chromatografická separace může být provedena ve dvou systémech dle polaritě stacionární a mobilní fáze. Pokud je polarita stacionární fáze vyšší než polarita mobilní fáze, jedná se o systémy s normálními fázemi (NP-HPLC). V tomto případě mobilní fázi nejčastěji tvoří hexan, heptan či dichlormethan ve směsi s nízkým alkoholem a stacionární fází je silikagel, alumina či aminopropyl silikagel. U systémů s obrácenými fázemi (RP-HPLC) je naopak polarita mobilní fáze vyšší a nejčastěji je tvořena směsí vody a acetonitrilu či methanolu. Stacionární fází v tomto případě tvoří oktatadecylsilikagel (C18), oktylsilikagel (C8) nebo pentafluorfenyl silikagel či fenyl-hexyl silikagel.<sup>3</sup>

### 1.1.2 Instrumentace HPLC

Základem kapalinového chromatografu je chromatografická kolona. V současné praxi se používají nerezové, skleněné nebo titanové analytické kolony s délkou 5-30 cm, vnitřním průměrem 2-6 mm, plněné částicemi o průměru 3-10  $\mu\text{m}$ . Částice sorbentů menší než 2  $\mu\text{m}$  se využívají u techniky UHPLC. Kromě těchto kolon lze využít i kolon s povrchově pórovitými sférickými částicemi o velikosti 2,6  $\mu\text{m}$  s inertním pevným jádrem, na němž je tenká vrstva

pórovité aktivní stacionární fáze. Tím je umožněno ještě rychlejší a účinnější separace. Pro separace biopolymerů jsou k dispozici náplně s nepórovitými sférickými částicemi o průměru 1,5-2,5  $\mu\text{m}$  a náplně s perfúzními částicemi, které vedle difuzních pórů, stejných jako u běžných pórovitých náplní, obsahují i velmi široké průtočné póry (400-800 nm), procházející celou částicí, kde se urychluje převod látek mezi mobilní a stacionární fází. Popsány byly i separace biopolymerů na kapilárních kolonách, plněných nepórovitými sférickými částicemi s průměry menšími než 1  $\mu\text{m}$ .<sup>2</sup>



**Obrázek 1.** Základní schéma HPLC<sup>4</sup>

Pomocí vysokotlakého čerpadla je čerpána mobilní fáze do chromatografického systému. Mobilní fází je obvykle směs polárních a méně polárních rozpouštědel, jejichž příslušné složení a koncentrace se mění v závislosti na separovaném vzorku. V závislosti na řadě faktorů, včetně rozměrů kolony, velikosti částic stacionární fáze, průtoku a složení mobilní fáze mohou být generovány pracovní tlaky v rozmezí 30-60 MPa.<sup>4</sup>

Do chromatografického systému se zavádí malé množství analyzovaného vzorku do toku mobilní fáze buď autosamplerm, nebo manuálně pomocí šesticestného dávkovacího ventilu.<sup>4</sup>

Na konci chromatografického systému je umístěný detektor, který postupně detekuje rozseparované látky vzorku eluované z chromatografické kolony. Na detektory v HPLC jsou kladeny speciální nároky zahrnující vysokou citlivost, nízký šum a drift nulové linie, dále univerzálnost a malý objem detekční cely. Mezi nejčastěji používané detektory v kapalinové chromatografii patří spektrofotometrický UV-VIS, hmotnostní spektrometr, dále fluorimetrický, elektrochemický, refraktometrický a vodivostní detektor.<sup>4</sup>

## 1.2 Spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií

Výhodou spojení hmotnostní spektrometrie (MS) s kapalinovou chromatografií je umožnění separace a identifikace složité směsi látek v jedné analýze vzájemnou kombinací výhod obou technik. Výsledkem HPLC/MS analýzy je záznam intenzity vybraných  $m/z$  v čase. Lze získat spektra jak v celém rozsahu  $m/z$ , tak pouze v určitém intervalu.<sup>5</sup>

### 1.2.1 Princip MS

Princip MS spočívá na přeměně molekuly analytu na ionizovaný stav. Separace iontů vznikajících během ionizačního procesu je dosaženo na základě jejich poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ) v hmotnostním analyzátoru. Pro ionizaci a separaci iontů je k dispozici několik různých technik, což vede k mnoha různým typům hmotnostních spektrometrů.<sup>6</sup>

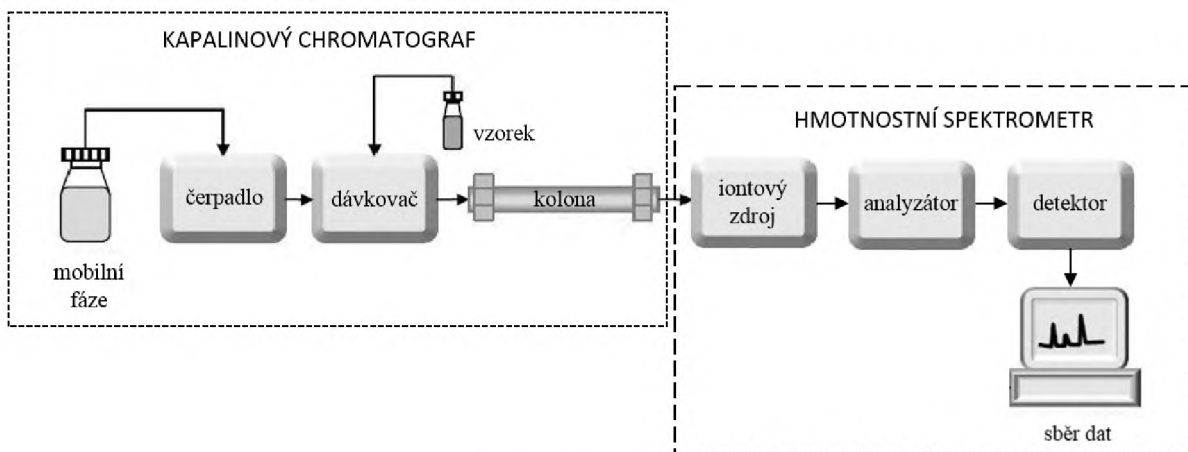
### 1.2.2 Instrumentace HPLC/MS

Hmotnostní spektrometr se skládá ze tří základních částí, a to iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Iontový zdroj slouží k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice tzv. ionizaci, která může probíhat buď za sníženého tlaku – vakua (elektronová ionizace (EI), chemická ionizace (CI), ionizace laserem za účasti matrice (MALDI)), nebo za atmosférického tlaku (ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI), fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)). Podle použitého množství vnitřní energie pro ionizaci se ionizační techniky dělí na měkké a tvrdé. Ionizační techniky (ESI, APCI, APPI) pracující za atmosférického tlaku patří mezi nejžádanější techniky pro spojení HPLC/MS. V současné době je především hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC/ESI-MS) rutinní a spolehlivou analytickou technikou s obrovským využitím zejména v oblasti chemie, biochemie, medicíny a farmacie.<sup>5</sup>

Další částí je hmotnostní analyzátor, který slouží k rozdělení iontů v plynné fázi za vysokého vakua ( $10^{-3}$ - $10^{-11}$  Pa) podle poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) na základě různých fyzikálních principů. Magnetický nebo elektrostatický analyzátor pracuje na principu zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém nebo elektrickém poli. Dále na principu různé stability oscilací iontů v dvojrozměrné nebo trojrozměrné kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí pracuje kvadrupól (Q) nebo iontová past (IT). Na principu různé doby rychlosti letu iontů pracuje analyzátor doby letu (TOF). Na principu různé frekvence harmonických oscilací iontů kolem speciálně tvarované elektrody pracuje orbitální past

(Orbitrap) a na různé frekvenci rotace při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném magnetickém a elektrickém poli pracuje iontová cyklotronová rezonance.<sup>5</sup>

Po rozdělení jsou jednotlivé ionty detekovány a dochází k určení jejich relativní intenzity.<sup>5</sup>



**Obrázek 2.** Základní schéma HPLC/MS

Dalšími důležitými částmi hmotnostního spektrometru je také vakuový systém, iontová optika sloužící k urychlení a zaostření iontů a počítač na ovládání a ladění přístroje, sběr, ukládání a zpracování dat.<sup>5</sup>

### 1.2.2.1 Ionizace elektrosprejem

ESI je nejčastěji používaná ionizační technika pro spojení HPLC/MS. Jedná se o měkkou ionizační techniku pracující za atmosférického tlaku, která se používá pro určení molekulové hmotnosti středně iontových až iontových látek, zejména peptidů, proteinů, sacharidů, nukleonových kyselin, organometalických i anorganických sloučenin. Umožňuje tvorbu vícenásobně nabitých iontů, tudíž lze ionizovat molekuly s molekulovou hmotností v řádech 100 tisíc hmotnostních jednotek.<sup>5</sup>

Základní princip ESI lze popsat pomocí tří základních kroků. Po přivedení rozpuštěného analytu kovovou kapilárou, na které je vloženo vysoké napětí (3-5 kV), a která je obvykle umístěna ortogonálně od vstupu do hmotnostního spektrometru, aby se minimalizovala kontaminace, nejprve dochází ke zmlžení roztoku vzorku na malé elektricky nabitě kapičky. Odpařováním rozpouštědla dochází ke zvýšení hustoty povrchového náboje, a při dosažení kritické hodnoty dochází k tzv. coulombické explozi, která způsobí rozpad na ještě menší kapičky s rozdělením původních nábojů. Opakováním tohoto procesu dochází k uvolnění iontů

z kapiček, které jsou následně transportovány z atmosférické oblasti do vakua, hmotnostního analyzátoru a následně na detektor.<sup>5</sup>

### 1.2.3 RP-HPLC/ESI-MS

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systému s obrácenými fázemi ve spojení s hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem (RP-HPLC/ESI-MS) patří mezi nejběžnější metody, u které polární mobilní fázi obvykle tvoří vodný methanol nebo acetonitril. Jako aditiva v mobilní fázi se používají kyselina mravenčí a octová (0,05-1 %) nebo octan a mravenčan amonný (0,5-10 mmol/l). Obsah a povaha aditiv je určující parametr pro správnou ionizaci analytu. Kyselé mobilní fáze jsou vhodné pro měření kladně nabitých iontů, naopak bazické mobilní fáze pro měření záporně nabitých iontů. Ovšem přednost mají těkavá činidla v co nejnižších koncentracích. Průtoky mobilní fáze se používají v rozmezí od 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  do 1  $\text{ml}/\text{min}$ .<sup>5</sup>

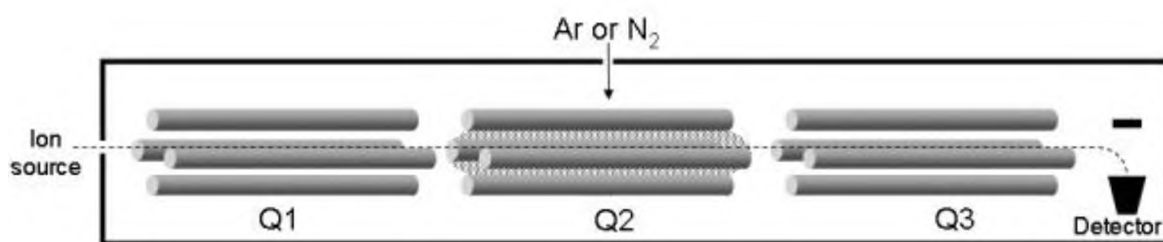
NP-HPLC jsou většinou špatně kompatibilní s ESI, lepší kompatibilitu vykazují s APCI či APPI.<sup>5</sup>

#### 1.2.3.1 Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor je oblíbený především pro svoji jednoduchost a nízkou cenu a díky tomu se velice rozšířil zejména u hmotnostních spektrometrů pro spojení se separačními technikami. Kvadrupólový analyzátor se skládá ze sady čtyř stejných kovových tyčí kruhového nebo hyperbolického průřezu délky 20-30 cm, kde na dvě protilehlé je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí a zároveň na všechny tyče je vloženo vysokofrekvenční střídavé napětí. Iont přivedený do středu osy kvadrupólu začne oscilovat. V daný časový okamžik jsou oscilace stabilní pouze pro iont s určitou hodnotou  $m/z$ , který projde kvadrupólem a dostane se na detektor, všechny ostatní ionty jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu.<sup>6</sup>

V případě kvantitativní a MS/MS analýzy se především používá tzv. trojitý kvadrupól (QqQ) (Obrázek 3). Jedná se o tři kvadrupóly spojené za sebou, kdy střední Q2 slouží jako kolizní cela se zavedeným kolizním plynem (He, N<sub>2</sub> nebo Ar), kde dochází ke kolizím vybraných iontů kvadrupólovým analyzátozem Q1 a jejich následné fragmentaci. Vzniklé fragmenty jsou analyzovány pomocí Q3 kvadrupólu. Q1 a Q3 fungují jako hromadné filtry a vhodně aplikovaným poměrem střídavého a stejnosměrného napětí je lze samostatně nastavit

pro postup (skenování) určitých iontů. Kvadrupólové analyzátoři, ať už v jednoduché či trojitě konfiguraci jsou široce používány v klinických biochemických LC/MS aplikacích.<sup>6</sup>



*Obrázek 3.* Základní schéma QqQ<sup>6</sup>

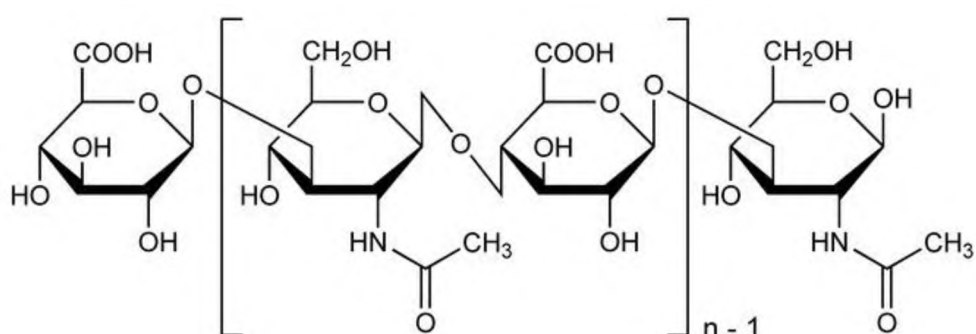
#### 1.2.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Mezi hmotnostní spektrometry umožňující MS/MS patří QqQ, IT, TOF-TOF a hybridní hmotnostní analyzátoři. Pomocí MS/MS dochází k izolaci iontů prekursoru a jejich následné fragmentaci za vzniku produktových iontů s cílem získat maximálních informací z jedné LC/MS/MS analýzy nebo zlepšit citlivost metody. MS/MS lze rozdělit na techniky umožňující fragmentaci v prostoru, kdy izolace a fragmentace probíhá v jiném místě (např. QqQ) a na techniky umožňující fragmentaci v čase (např. IT), když fragmentace a izolace probíhá v jednom místě.<sup>5</sup>

V případě trojitěho kvadrupólu se v MS/MS kvantitativní analýze využívá nejčastěji charakteristických typů skenů, a to selektivního záznamu jedné nebo více iontových reakcí (SRM), které vykazují nejvyšší selektivitu i citlivost. Časté je také použití skenů iontů prekursoru (PI) nebo skenů neutrálních ztrát (NL), které jsou ovšem vhodné pro třídy látek nebo sloučeniny obsahující stejnou funkční skupinu, poskytující stejný typ fragmentového iontu či neutrální ztráty.<sup>5</sup>

### 1.3 Hyaluronan

Hyaluronan (HA, kyselina hyaluronová) je přirozeně se vyskytující lineární polysacharid, chemicky klasifikovaný do skupiny glykosaminoglykanů. V organismu se vyskytuje ve formě sodné soli, proto je častěji nazýván hyaluronanem či hyaluronátem sodným. Skládá se ze dvou střídavě vázaných sacharidových jednotek  $\beta(1,4)$ -N-acetyl-D-glukosaminu (GlcNAc) a  $\beta(1,3)$ -D-glukuronové kyseliny (GlcA), které jsou propojené pomocí glykosidické vazby (Obrázek 4). Vyznačuje se vysokou molekulovou hmotností (3 kDa až 20 MDa), v závislosti na jejím původu. V řetězci hyaluronanu se tento jednoduchý disacharid opakuje až 10 000x ( $n = 10\,000$ ).<sup>7, 8, 9</sup>



Obrázek 4. Struktura hyaluronanu<sup>10</sup>

#### 1.3.1 Vlastnosti HA

Hyaluronan má mnoho výjimečných fyzikálně-chemických vlastností. Je všudypřítomný, neimunogenní a je přirozenou složkou extracelulární matrice (ECM) různých pojivových tkání s klíčovou funkcí při hojení ran a regeneraci těchto tkání. Dále působí protizánětlivě a netoxicky. Je snadno rozpustný ve vodném prostředí, ve kterém vytváří vysoce viskózní roztoky v závislosti na jeho molekulové hmotnosti a koncentraci. Dále se vyznačuje vysokou hydrofilitou, neboť má schopnost na sebe vázat velké množství vody prostřednictvím své polární vazby za vzniku vodíkových můstků a přispívá tak k optimální hydrataci tkáně.<sup>9</sup>

#### 1.3.2 Výskyt HA

Nachází se ve vysokých koncentracích v měkkých pojivových tkáních, včetně kůže, pupeční šňůry, placenty, chrupavky a synoviální tekutiny kloubů. Významná množství se také nacházejí v plicích, ledvinách, mozku a svalech. Také se vyskytuje jako gelová substance v očním sklovitém humoru.<sup>8</sup>



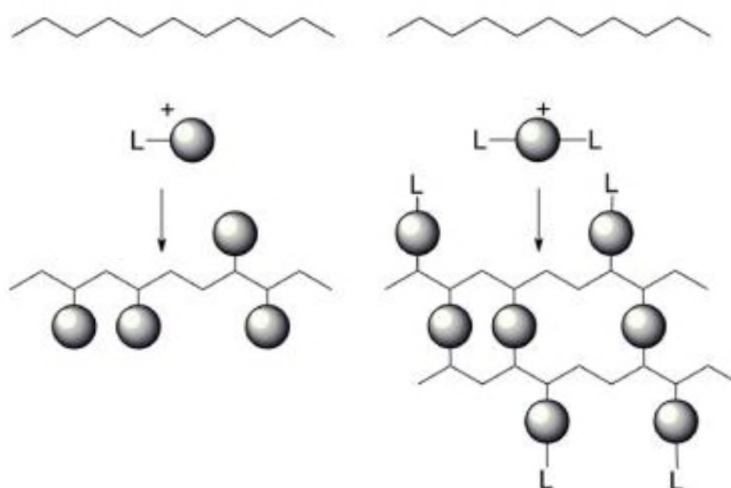
### 1.3.3 Využití HA

Vlastnosti hyaluronanu a podrobné znalosti molekulární struktury jsou velmi důležité pro efektivní aplikace, neboť má rozsáhlé využití v mnoha oborech medicíny, biomedicíny, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Žádoucím a snadno dostupným materiálem je zejména pro aplikace tkáňového inženýrství. Zastává mnoho funkcí v lidském těle a díky interakci s buněčnými receptory a dalšími molekulami ECM přispívá k mnoha biologickým a fyziologickým funkcím, včetně buněčné migrace, regulace, adheze a aktivace imunitních buněk.<sup>11, 12</sup>

### 1.3.4 Modifikace HA

Pro zlepšení mechanických vlastností, stability a prodloužení rezistence HA, dále pro posílení, modulaci nebo kontrolu terapeutického působení se zachováním příznivých biologických funkcí HA je využíváno chemických modifikací či tzv. zesíťování za vzniku hydrogelů.<sup>12</sup>

HA může být chemicky modifikována dvěma různými způsoby, a to konjugací nebo zesíťením. Obě metody jsou založeny na stejných chemických podmínkách a liší se pouze v rozsahu dané reakce. Při konjugaci je vybraná sloučenina připojena na řetězec HA jednoduchou vazbou, zatímco při síťování je vybranou sloučeninou vzájemně propojeno více řetězců HA mezi sebou, a to dvěma a více vazbami (*Obrázek 5*).<sup>13</sup>



**Obrázek 5.** Chemická konjugace (vlevo) a zesíťení (vpravo) polymeru <sup>13</sup>

Kromě toho existuje více typů zesítení, a to přímé zesítení a zesítení různých derivátů HA. Chemická modifikace HA může být provedena především na dvou dostupných funkčních místech, prvním je skupina karboxylové skupiny (-COOH) a druhým místem je hydroxylová skupina (-OH). Předpokládá se, že k reakci dochází především na hydroxylové skupině C6 *N*-acetylglukosaminové části HA kvůli lepší přístupnosti činidel. Dalším dostupným místem pro modifikaci však může být i přímo *N*-acetylová skupina HA (-NHCOCH<sub>3</sub>) (*Obrázek 4*).<sup>13</sup>

Pro zesíťování nebo konjugaci HA bylo popsáno několik metod. Nejčastěji se reakce provádí ve vodném prostředí, ovšem některé je třeba provádět v organických rozpouštědlech (dimethylformamid, dimethylsulfoxid), a to z důvodu používaných činidel, která jsou citlivá na hydrolýzu. V tomto případě však ale musí být nativní HA ve formě sodné soli nejprve přeměněna na svou kyselou formu nebo na tetrabutylamoniovou sůl, aby se rozpustila v organických rozpouštědlech.<sup>13</sup>

Mezi nejpoužívanější modifikace karboxylové skupiny patří amidace, kondenzace či esterifikace. Síťování hydroxylových skupin lze provést éterifikací, poloacetalovou vazbou, esterifikací či karbamátovou vazbou, ale i oxidací. *N*-acetylovou skupinu lze modifikovat pomocí deacetylace za vzniku aminoskupiny, která může dále reagovat za vzniku amidové vazby.<sup>13</sup>

## 1.4 Hydrogely

Hydrogely jsou materiály tvořené ve vodě nerozpustnou sítí alespoň částečně hydrofilních polymerů. Tyto polymery jsou obvykle měkké a elastické díky své termodynamické kompatibilitě s vodou. Požadovaných vlastností se dosáhne hydrofobizací polymeru nebo využitím ve vodě rozpustného derivátu polymeru s reaktivními funkčními skupinami, které se mohou účastnit dalších chemických reakcí vedoucích ke vzniku trojrozměrné polymerní sítě (viz kapitola 1.3.4). Zesíťovaná sktruktura hydrogelů je tvořena silnými chemickými vazbami, kovalentního a iontového charakteru.<sup>9</sup>

### 1.4.1 Rozdělení hydrogelů

Struktura a vlastnosti specifického hydrogelu jsou mimořádně důležité při výběru materiálu pro konkrétní aplikace, závisí na výchozích monomerech a makromerech, metodách syntézy a výroby, podmínkách rozpouštědla a degradace. Hydrogely lze klasifikovat na základě různých vlastností, vše záleží na připojené skupině začleněné do struktury gelu.<sup>14</sup>

Hydrogely mohou být klasifikovány na základě metody přípravy jako:

- *homopolymerní hydrogely* – složeny z jednoho typu hydrofilního monomeru
- *kopolymerní hydrogely* – vyrobeny ze dvou typů monomerů, alespoň jednoho hydrofilního
- *multipolymerní hydrogely* – pokud jsou přítomny více než tři typy monomerů
- *interpenetrační polymerní sítě* – připraveny bobtnáním sítě polymeru v monomeru, aby se vytvořila vzájemně se prolínající síť

Dále na základě iontových nábojů jako:

- *neutrální hydrogely*
- *aniontové hydrogely*
- *kationtové hydrogely*
- *amfolytické hydrogely* – na stejném hydrogelu přítomny oba náboje

Také na základě reálné struktury jako:

- *amorfní hydrogely* – jsou-li řetězce náhodně uspořádány
- *semikrystalické hydrogely* – jsou-li přítomny husté oblasti uspořádaných makromolekul neboli krystalitů

- *hydrogelem vázané hydrogelové struktury*
- *supermolekulární síťové struktury a hydrokoloidní agregáty*

A na základě povahy jejich zesílení jako:

- *chemické hydrogely* – když jsou zesíťeny kovalentními vazbami
- *fyzikální hydrogely* – když jsou vázány sekundárními slabými vazbami, jako jsou Van der Waalsovy a elektrostatické interakce nebo vodíkové vazby<sup>15</sup>

### 1.4.2 Využití hydrogelů

Hydrogely díky své jedinečné biokompatibilitě, flexibilním metodám syntézy a žádoucím fyzikálním vlastnostem materiálu nacházejí uplatnění v mnoha biomedicínských aplikacích či v regenerativní medicíně.<sup>16</sup> Široké uplatnění mají díky schopnosti zadržet velké množství vody, ale také díky své měkké a gumovité konzistenci a podobnosti živým tkáním. Dále vykazují minimální tendenci k adsorpci proteinů z tělesných tekutin kvůli jejich nízkému mezifázovému napětí.<sup>14</sup>

### 1.4.3 Hydrogely na bázi síťovaných derivátů HA

V praxi jsou velmi často využívány modifikované hydrogely založené na různé bázi. K přípravě hydrogelu se používá hyaluronan modifikovaný navázáním daného ligandu, který je navázán na polysacharid prostřednictvím tzv. *spaceru*. Vhodné ligandy obsahují ve své struktuře fenolická a heterofenolická jádra, kovalentně vázaná k základnímu řetězci polysacharidu. Zavedením *spaceru* se zvětšuje vzdálenost reaktivního aromatického centra od základního řetězce polymeru, a tím se zlepšuje jeho přístupnost pro interakci s enzymem, což zásadním způsobem ovlivňuje průběh síťovací reakce a vlastnost vzniklého hydrogelu. Přítomnost tohoto *spaceru* ve struktuře derivátu HA vede díky jeho flexibilitě k navýšení elasticity. Zavedením i poměrně krátkého *spaceru* má za následek již při nízkém stupni substituce výrazné zvýšení houževnatosti výsledného hydrogelu.<sup>9</sup>

#### 1.4.3.1 Vlastnosti hydrogelů na bázi derivátů HA

Hyaluronanové hydrogely jsou plně biokompatibilní, biologicky odbouratelné a nezpůsobují cytotoxickou reakci.<sup>17</sup> Dále vedou ke zvýšení elasticity, tuhosti a houževnatosti výsledného hydrogelu se zachováním fyzikálních a biologických vlastností původního polymeru.<sup>9</sup> Výběr derivátu vede k požadované mechanické vlastnosti, neboť vše je ovlivňováno

jak chemickou strukturou polymeru a jeho koncentrací, tak stupněm zesíťení, ale i typy síťovacích činidel a jejich použitých množství. Aby se dosáhlo požadovaného biomedicínského výkonu, musí hydrogely vykazovat přesné viskoelastické, bobtnavé a degradační vlastnosti.<sup>9,17</sup>

#### **1.4.3.2 Využití hydrogelů na bázi derivátů HA**

Na základě fyzikálně-chemické a biologické reakce se hydrogely na bázi polysacharidů využívají především v oblasti tkáňového inženýrství, kosmetiky, medicíny, biomedicíny a regenerativní medicíny. Zejména ve tkáňovém inženýrství se využívá hydrogel jako základní materiál pro tvorbu tkáňových nosičů – *scaffoldů*, které nacházejí uplatnění v oblasti léčby kloubních a kostních defektů<sup>9</sup> a pokouší se tak poskytnout biokompatibilní mechanickou podporu pro trojrozměrný růst a plně nahrazují zdravé tkáně jak ve své struktuře, tak i funkci. V ideálním případě *scaffold* usnadňuje tento proces poskytováním vhodných signálů buněčné adheze a diferenciaci, což umožňuje udržovat fenotyp buněk a podporovat syntézu nativní ECM.<sup>12</sup> Dále se hydrogely na bázi derivátů HA využívají pro dodávání biologicky aktivních látek, a to růstových faktorů a léčiv. Také se uplatňují jako krytí pro hojení ran, biodegradabilní bariéra bránící vzniku pooperačních srůstů či k augmentaci měkkých tkání a výplně tkáňových defektů.<sup>9</sup>

Konjugace proteinových léčiv na hydrogely na bázi HA derivátů se využívá nejen pro lepší transport léků na cílové místo, ale i ke zvýšení jejich terapeutického účinku. Cílem této techniky je vytvořit tzv. proléčivo kovalentním navázáním léčiva na HA. Lék je uvolňován, jakmile je kovalentní vazba v organismu rozložena.<sup>13</sup> Zásadní je rychlá tvorba hydrogelové sítě, čímž se zvyšuje účinnost zapouzdření proteinového léčiva a minimalizuje nekontrolovatelná difúze po jeho podání.<sup>18</sup>

#### **1.4.3.3 Stanovení a charakterizace hydrogelů na bázi derivátů HA**

Hydrogely na bázi derivátů HA lze určovat na základě strukturální charakterizace (NMR, IR, kalorimetrická testovací metoda), morfologie (SEM, TEM, AFM, DLS) a fyzikální charakterizace (stupeň bobtnání, kompresní test, DSC, SEC-MALS, AFFFF).<sup>13</sup>

##### **1.4.3.3.1 Nukleární magnetická rezonance**

Jednorozměrná nukleární magnetická rezonance (<sup>1</sup>H NMR) je nezbytnou metodou pro charakterizaci derivátů HA. Pomocí NMR spekter lze kvantifikovat a charakterizovat chemickou strukturu a stanovit stupeň substituce (DS). Tato metoda však neposkytuje

informace o kovalentním propojení, zatímco dvourozměrná NMR (DOSY) umožňuje rozlišit molekuly vázané na HA od molekul, které nejsou kovalentně spojené.<sup>13</sup>

#### **1.4.3.3.2 Infračervená spektroskopie**

Další běžnou a komplementární charakterizační technikou používanou pro stanovení derivátů HA je infračervená spektroskopie (IR), zejména však infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR). Metoda umožňuje pozorovat přítomnost absorpčních pásů nově vytvořených vazeb během modifikace oproti čisté HA. Neumožňuje však přesnou kvantifikaci stupně modifikace.<sup>13</sup>

#### **1.4.3.3.3 Kalorimetrická testovací metoda**

Kalorimetrická testovací metoda zahrnuje kvantifikaci primárního aminu pomocí ninhydrinového testu. Jedná se o rychlý test, který snadno určuje, zda primární aminoskupiny detekovatelné pomocí NMR jsou kovalentně navázány na HA, či jsou volně v roztoku.<sup>13</sup>

#### **1.4.3.3.4 Mikroskopické metody**

Pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) a transmisní elektronové mikroskopie (TEM) lze charakterizovat strukturu vzorku, zejména povrchové vlastnosti včetně určení distribuce velikosti částic. Výhodou je jejich velká hloubka ostrosti, která vyjadřuje schopnost objektivu zobrazit ostře několik rovin pozorovaného objektu současně. Před samotnou analýzou je ovšem nutné hydrogel nejprve lyofilizovat.<sup>13</sup>

Další mikroskopickou metodou použitelnou pro charakterizaci derivátů HA je mikroskopie atomové síly (AFM), která na rozdíl od předchozích dvou technik může poskytnout informace o morfologii ve vodném prostředí.<sup>13</sup>

#### **1.4.3.3.5 Dynamický rozptyl světla**

Měřením dynamického rozptylu světla (DLS) jsou poskytovány informace o hydrodynamickém chování mikročástic či nanočástic HA v roztoku a umožňuje tak určení distribuce průměru a velikosti jejich částic.<sup>13</sup>

#### **1.4.3.3.6 Měření stupně bobtnání v roztoku**

Bobtnající vlastnosti zesíťovaných hydrogelů na bázi derivátů HA jsou založeny na základě schopnosti zadržovat vodu. Metoda se používá pro srovnání hustot zesíťení

hydrogelů HA vytvořených pomocí různých síťovacích činidel. Vysoké hodnoty poměru bobtnání odpovídají nízké hustotě zesílení, neboť čím hustší je hydrogelová síť, tím nižší je absorpční kapacita a poměr bobtnání. Mezi neúčinnější síťovací činidla patří glutaraldehyd a divinylsulfon. Dále bylo zaznamenáno, že poměr bobtnání se snižuje se zvyšujícím se množstvím síťovadla, polyethylenglykol diakrylátu.<sup>13</sup>

Ke stanovení hustoty zesílení HA hydrogelů se používá kompresní test, a to tak, že hydrogely jsou stlačovány definovanou počáteční silou a kompresní rychlostí. Výsledky dostaneme v souladu s poměrem bobtnání, tudíž zvýšení množství síťovacího činidla snižuje i hustotu zesílení.<sup>13</sup>

K charakterizaci tepelného chování derivátů HA nebo hydrogelů HA se používá diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC), která poskytuje informace o jejich hydratačních vlastnostech.<sup>13</sup>

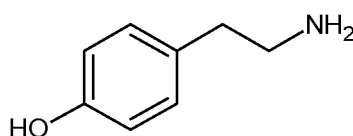
#### **1.4.3.3.7 Měření molekulové hmotnosti**

Běžným způsobem stanovení molekulové hmotnosti modifikovaných polymerů je chromatografická vylučovací chromatografie spojená s víceúhlým rozptylem světla (SEC-MALS). K výpočtu molekulové hmotnosti je zapotřebí vyjádření konstanty, tzv. specifického inkrementu indexu lomu ( $dn/dc$ ) polymeru.  $Dn/dc$  hodnoty pro nativní HA se obvykle pohybují v rozmezí 1,432-1,670 ml/g v závislosti na použitých parametrech přístroje, rozpouštědla a měření.<sup>13</sup>

Další metodou pro měření molekulové hmotnosti HA je frakcionace tokem v asymetrickém tokovém poli (AFFFF). Používá se k měření molekulové hmotnosti a distribuci molekulové hmotnosti v různých časových bodech síťovací reakce.<sup>13</sup>

## 1.5 Tyramin

Tyramin je přirozeně se vyskytující aromatický biogenní amin obsahující hydroxylovou a aminovou funkční skupinu (*Obrázek 6*). Chemicky známý také jako 4-hydroxy-fenylethylamin.<sup>19</sup> TYR je jeden z nejdůležitějších produktů aminokyselin fungující jako prekurzor katecholaminů, melaninu, hormonů štítné žlázy a několika opiátových peptidů.<sup>20</sup> Používá se pro výrobu hyaluronanových hydrogelů, které se vyrábějí dvoustupňovou enzymatickou síťovací metodou.<sup>12</sup>



*Obrázek 6.* Struktura tyraminu<sup>19</sup>

### 1.5.1 Vlastnosti a výskyt tyraminu

Velký význam je kladen na přítomnost biogenních aminů v potravinách a nápojích, kde se přirozeně vytvářejí během fermentačních procesů z aminokyselin. Ovšem velký příjem TYR může způsobit zvýšení systolického krevního tlaku. Biogenní aminy jsou charakterizovány vazomotorními a psychoaktivními vlastnostmi, díky nimž mohou interagovat s lidským metabolismem.<sup>21</sup>

### 1.5.2 Stanovení tyraminu

TYR se stanovuje pomocí metody kapalinové chromatografie ve spojení s fluorescenční detekcí (LC/fluorescence), dále pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC/MS). Stanovení se provádí především ve vzorku lidské moči<sup>20</sup>, ale i v biologických tkáních. Nejpoužívanějšími úpravami vzorků před analýzou jsou extrakce kapalina-kapalina, extrakce na pevné fázi (SPE), online SPE nebo mikroextrakce pomocí zabalených sorbentů (MEPS). Pro zvýšení citlivosti metody se často používá derivatizačního kroku.<sup>21</sup>

#### 1.5.2.1 LC/fluorescence

LC/fluorescence je založená na intramolekulární fluorescenční derivatizaci pyrenovým činidlem. Výsledné deriváty poskytují fluorescenci v oblasti vlnových délek 440-520 nm, které jsou podstatně vyšší ve srovnání se samotnými nederivatizovanými monomery.<sup>20</sup> Samostatný



tyramin díky své hydroxyfenylové skupině absorbuje UV záření s absorpčním maximem 275 nm.<sup>12</sup> Po derivatizaci následuje kapalinová chromatografie s obrácenými fázemi za podmínek izokratické eluce. Jako mobilní fáze se používá směs acetonitrilu, vody a kyseliny octové.<sup>20</sup>

#### **1.5.2.2 LC/MS**

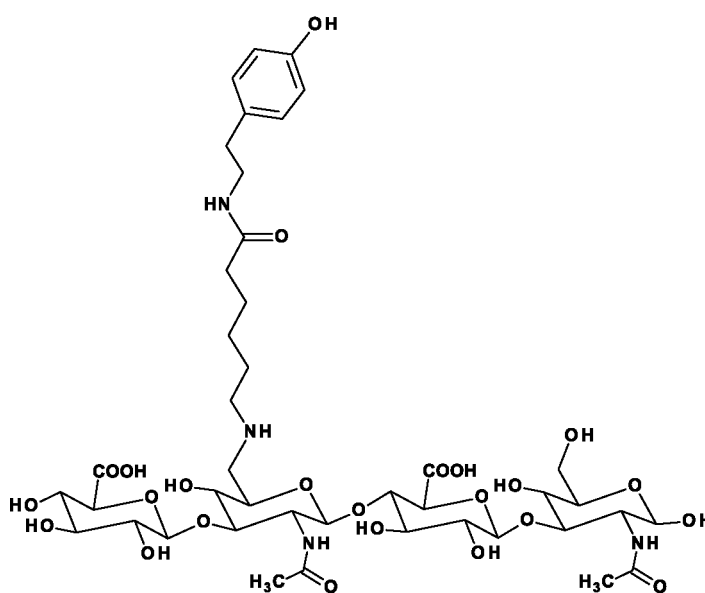
LC/MS je metoda citlivá a vysoce spolehlivá. Ke stanovení se využívá jak hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací s nastavením pro záznam záporných iontů<sup>20</sup>, tak i hmotnostní spektrometrie s chemickou ionizací za atmosférického tlaku. Spojením vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS/MS) lze současně stanovit 16 biogenních aminů v moči včetně tyraminu bez potřeby derivatizace. V případě vysokoúčinné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (RP-HPLC-MS/MS) je nejčastěji použita stacionární fáze C18 a mobilní fáze složená ze směsi kyseliny octové, methanolu a vody.<sup>21</sup>

#### **1.5.3 Stanovení dityraminu**

Stanovení se provádí pomocí fluorescenčního spektrofotometru. Na rozdíl od tyraminu po vystavení UV světlu fluoreskuje zesítený dityramin modrozeleně. Hyaluronové hydrogely na bázi tyraminu vykazují excitační maximum při 285 nm a emisní maximum při 415 nm. Stanovení se provádí pomocí spektrofotometru.<sup>12</sup>

## 1.6 Hyaluronanové hydrogely na bázi tyraminu

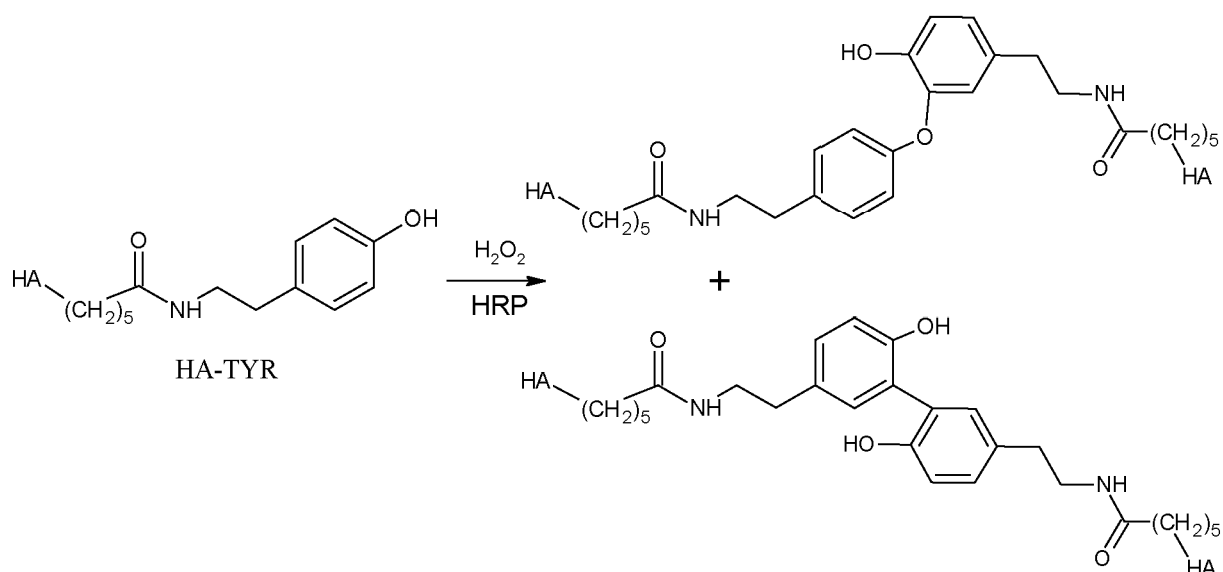
Jedná se o hydrogelové systémy složené z konjugátů kyseliny hyaluronové (Obrázek 4) a TYR (HA-TYR) (Obrázek 6), obsahující 4 sacharidové jednotky HA s navázaným TYR na *N*-acetyl-D-glukosamin (Obrázek 7). V této práci se budeme zabývat pouze tímto definovaným systémem, ale lze se také setkat s různými velikostmi a typy modifikovaného oligosacharidu, např. systém obsahující 6 sacharidových jednotek + TYR, ale i 8 sacharidových jednotek + TYR atd.



Obrázek 7. Struktura modifikovaného derivátu HA na bázi tyraminu<sup>8</sup>

### 1.6.1 Vlastnosti a využití HA-TYR

Snadno vytvářejí trojrozměrné kovalentní sítě *in situ*, kde je kopulace katalyzována křenuvou peroxidázou (HRP) a jako oxidační činidlo se používá peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) (Obrázek 8). Na rozdíl od jiných metod přípravy hydrogelů na bázi HA je pro vytvoření stabilních konstruktů vyžadována relativně nízká substituce tyraminem, takže většina HA disacharidů zůstává nezměněna. Mechanismus zesíťování umožňuje nezávislé ladění mechanických vlastností a rychlosti gelace změnou koncentrace  $H_2O_2$  a HRP. Kromě toho jsou podmínky zesíťování mírné, netoxické a neinterferují se životně důležitými buněčnými procesy.<sup>22</sup>



**Obrázek 8.** Metoda zesíťování hydrogelu na bázi HA-TYR<sup>13</sup>

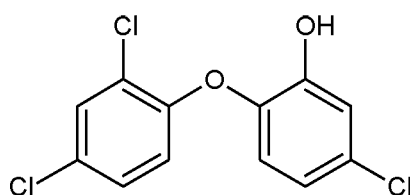
HA-TYR hydrogely jsou snadno injektovatelné, biokompatibilní a biologicky rozložitelné.<sup>22</sup> Odolávají oxidačnímu prostředí *in vitro*, protože reaktivní druhy kyslíku aktivují HRP, který je zodpovědný za tvorbu nových zesíťujících vazeb.<sup>8</sup> Využití HA-TYR je především v oblasti tkáňového inženýrství, z důvodu biokompatibility a přilnavosti v povrchu tkáně (viz kapitola 1.4.3.2).

### 1.6.2 Stanovení hydrogelů na bázi tyraminu

Modifikované HA jednotky lze oddělit od odpovídajících nemodifikovaných jednotek různými chromatografickými technikami. Ovšem pro získání podrobného popisu modifikovaného derivátu HA je třeba depolymerizovat její strukturu na oligosacharidy a provést jejich analýzu zejména pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací ve spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s obrácenými fázemi (RP-HPLC/ESI/MS/MS) (viz kapitola 1.2.3 a 1.2.4).<sup>8</sup>

## 1.7 Triclosan

Triclosan je chlorovaná organická sloučenina s molární hmotností 289,54 g/mol obsahující hydroxylovou a etherovou funkční skupinu (Obrázek 9). Chemicky známý také jako 2,4,4'-trichlor-2'-hydroxydifenylether, patří do skupiny 2-hydroxydifenyletherů.<sup>23</sup> Jedná se o syntetické, v tucích rozpustné a vysoce účinné antimikrobiální činidlo. Široké využití má především ve farmaceutických výrobcích a produktech pro osobní péči, jako jsou zubní pasty, ústní vody, antiseptická mýdla.<sup>24</sup>



Obrázek 9. Struktura triclosanu

### 1.7.1 Vlastnosti triclosanu

Triclosan je prakticky nerozpustný ve vodě, středně rozpustný v alkalických roztocích a snadno rozpustný ve většině nepolárních organických rozpouštědlech. V pevném skupenství vykazuje relativně dobrou tepelnou stabilitu v rozmezí teplot 150-200°C. Triclosan je velice účinný již v nízkých koncentracích proti širokému spektru gramnegativních a grampozitivních bakterií, mykobakterií, anaerobních bakterií a hub.<sup>25</sup>

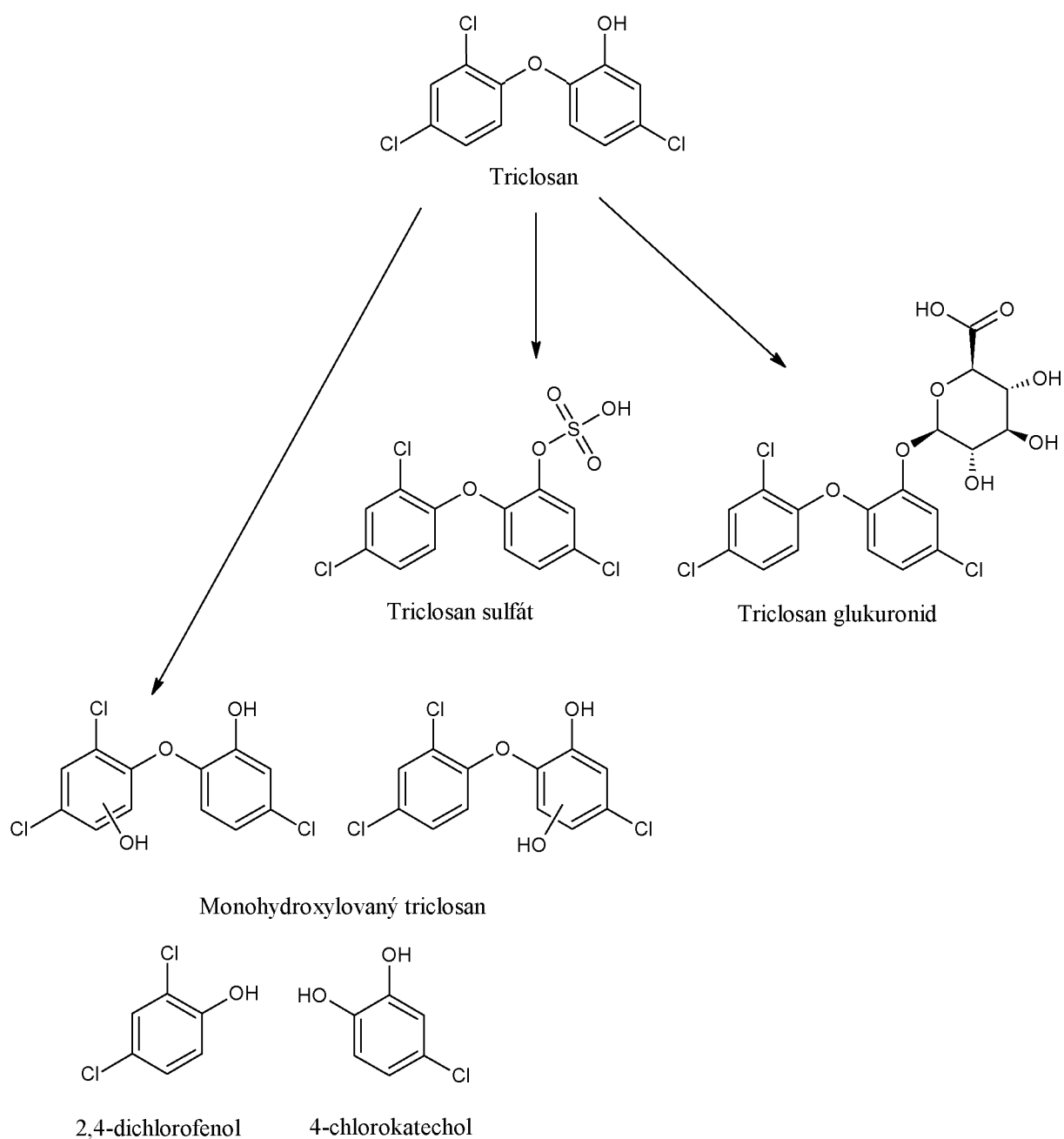
Dále nejsou k dispozici žádné prokázané studie týkající se údajů karcinogenity triclosanu po lokální aplikaci,<sup>26</sup> nicméně některé *in vitro* studie na potkanech a lidském materiálu ukázaly, že i nízké koncentrace mohou narušit metabolické systémy a hormonální homeostázu.

### 1.7.2 Metabolismus triclosanu

Triclosan se snadno absorbuje kůží potkanů, morčat a myši. *In vitro* studie prokazují rychlejší a rozsáhlejší proniknutí triclosanu potkaní kůži oproti kůži lidské. Po perorálním podání je triclosan snadno a široce distribuován do orgánů a tkání. Nejvyšší hladiny jsou pozorovány ve žlučníku, játrech, tělesném tuku, plicích a ledvinách, naopak nejnižší hladiny jsou detekovány v mozku.<sup>26</sup>

Po absorpci je triclosan snadno metabolizován na sulfátové a glukuronidové konjugáty (Obrázek 10), kromě toho lze pozorovat i aromatickou hydroxylaci a štěpení etherové vazby triclosanu a tím tak vznik monohydroxylovaného triclosanu, 2,4-dichlorfenolu

a 4-chlorokatecholu. Dále může být snadno fotodegradován na dichlorodibenzo-p-dioxin působením tepla a UV zářením.<sup>26, 27</sup>



**Obrázek 10.** Metabolismus triclosanu<sup>27</sup>

Metabolity triclosanu jsou vylučovány stolicí a močí. Poločas eliminace triclosanu v plazmě se pohybuje přibližně 8-12 h u myši, 10-15 h u potkanů. Dle prokázaných studií se triclosan v těle neukládá, jak po jednorázovém, tak po opakovaném podání.<sup>26</sup>

### 1.7.3 Stanovení triclosanu a jeho metabolitů pomocí LC/MS

Ke stanovení triclosanu v biologických vzorcích se používá kapalinová chromatografie v HPLC nebo UHPLC konfiguraci ve spojení s hmotnostní spektrometrií s ESI nebo APCI ionizací.<sup>24, 28</sup> Pro stanovení triclosanových metabolitů se může využívat fragmentace ve zdroji, a to převážně APCI. Aplikace vyšší energie při ionizaci vede k výrazné fragmentaci vznikajících iontů, což umožňuje strukturální identifikaci triclosanu a jeho metabolitů.<sup>24</sup> Pro získání více strukturálních informací je možné měřit MS/MS spektra.<sup>29</sup>

**Tabulka 1.** Stanovení metabolitů triclosanu pomocí LC/MS

Lit.	Mobilní fáze	Kolona	Metabolizace triclosanu	MS podmínky	Úprava vzorku
<sup>24</sup>	A: voda, 0,5 % CH <sub>3</sub> COOH a 5 mM HCOONH <sub>4</sub> ; B: acetonitril, 0,5 % CH <sub>3</sub> COOH a 5 mM HCOONH <sub>4</sub>	Waters X-terra MS-C8 (100 x 2,1 mm, 3,5 μm)	hydroxylace, sulfatace, glukuronidace a acetylcystein konjugace	APCI-MS, ESI-MS; přímá infuze 5 mg/ml triclosanu v acetonitrilu, průtok 10 ml/min; He jako kolizní plyn	extrakce biologického vzorku pomocí SPE
<sup>29</sup>	A: methanol B: voda	Chromolith Performance RP-18 (100 x 4,6 mm; Merck KGaA)	sulfatace, glukuronidace	APCI-MS	extrakce biologického vzorku pomocí SPE (online SPE-HPLC)
<sup>28</sup>	A: voda B: methanol	Waters BEH C18 (2,1 mm x 50 mm, 1,7 μm)	hydroxylace, sulfatace a glukuronidace	ESI-MS; SRM skenování	ke vzorku plazmy přidáno 400 μl ethylacetátu a 6 μl standardu -> úprava pH na 2,5 pomocí HCOOH -> centrifugace -> filtrace pomocí PTFE

Lit.	Mobilní fáze	Kolona	Metabolizace triclosanu	MS podmínky	Úprava vzorku
<sup>26</sup>	A: acetonitril; B: 50 mM octan amonný	Luna C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm)	sulfatace a glukuronidace	frakcionace pomocí HPLC s následnou UPLC-ESI-MS/MS jednotlivých frakcí; Ar jako kolizní plyn	homogenizace tkání a výkalů, dále přidán ledový acetonitril; pro plazmu a moč pouze přídavek ledového acetonitrilu -> centrifugace
<sup>30</sup>	A: 0,1 % vodný roztok kyseliny mravenčí B: acetonitril	Acquity UPLC HSS T3 (50 mm x 2,1 mm, 1,8 µm)	sulfatace a glukuronidace	ESI-MS; MRM skenování; Ar jako kolizní plyn	enzymatická hydrolyza, derivatizace pentafluorbenzylbromidem, extrakce kapalina-kapalina

## **2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**



## 2.1 Vývoj a optimalizace metody pro stanovení derivátu HA2-TYR, TCS, TCS sulfátu a TCS glukuronidu

### 2.1.1 Chemikálie

Na přípravu mobilní fáze byla použita kyselina mravenčí (čistota  $\geq 95\%$ ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), methanol (LC-MS čistota; Fisher Chemical, Loughborough, UK) a redestilovaná voda. Na úpravu a extrakci vzorků byl použit deuterovaný borohydrid sodný ( $\text{NaBD}_4$ ) (Sigma-Aldrich), chloroform (Chloroform G.R. Stabil with Amylene, čistota P.A.; Lach-Ner, s.r.o, Neratovice, ČR), kyselina octová a trichloroctová (Sigma-Aldrich) a methanol (for HPLC – Isocratic Grade; VWR Chemicals, BDH<sup>®</sup>, Rue Carnot, Francie).

Pro analytickou optimalizaci metod a měření studovaných vzorků byly použity následující standardy: Triclosan ( $^{13}\text{C}_{12}$ , 99 %) v MTBE (Cambridge Isotope Laboratories, Inc. MA, USA), který byl rozpuštěn v 50 % MeOH (5  $\mu\text{g/ml}$ ); Triclosan O-Sulfate Sodium Salt a Triclosan O-Beta-D-Glucuronide Sodium Salt (Toronto Research Chemicals, Inc. Toronto, Canada), které byly rozpuštěny v 50 % MeOH (20  $\mu\text{g/ml}$ ); standardy tyraminu TYR-52 a TYR-53 rozpuštěné v octanovém pufru (20  $\mu\text{g/ml}$ ).

Hyaluronový hydrogel na bázi tyraminu bez obsahu triclosanu a hyaluronový hydrogel na bázi tyraminu s obsahem triclosanu byl poskytnut společností Contipro, s.r.o. (Dolní Dobrouč, Česká republika). K degradaci hyaluronových hydrogelů byl použit enzym, procesivní lyáza z bakterie *Streptococcus pneumoniae* (SpHyl) a enzym hyaluronát 4-glykanohydroláza (bovinní testikulární hyaluronidáza, BTH, Sigma-Aldrich).

### 2.1.2 Přístroje a zařízení

Pro optimalizaci metody ke stanovení tyraminu a dityraminu byl používán chromatografický systém Shimadzu HPLC vybavený UV a fluorescenčním detektorem (RF-10A XL; Shimadzu, Japonsko). Vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí programu Shimadzu LabSolutions.

Xevo TQ-XS hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem ve spojení s kapalinovou chromatografií (Waters, Milford, MA, USA) byl používán pro hmotnostní spektrometrické analýzy TCS a produktů rozkladu vzniklých štěpením HA derivátu na bázi tyraminu po enzymatickém štěpení. Pro vyhodnocení výsledků měření byl používán software MassLynx Xevo (Waters). Separace látek byla provedena na chromatografické koloně Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 (2,1 x 50 mm; 1,7  $\mu\text{m}$ ).

Pro přípravu vzorků byl používán homogenizátor tkání PRECELLYS 24-Dual (Bertin Technologies), homogenizátor TissueLyser II (Qiagen, Hilden, Německo<sup>®</sup>) pro fyziologickou homogenizaci, temperovaná třepačka (NB-205 S, N-Biotek), multikapacitní vortex s digitálním kontrolním panelem a časovačem Benchmixer XL Multi-tube vortex (Benchmark Scientific, Savreille, NJ, USA), minitřepačka s dotykovým chodem Vortex Lab Dancer (IKA), centrifuga (D2012, Scilogex). Dále byly používány analytické váhy (XSE204, Mettler Toledo), pH metr (PC 8 + DHS<sup>®</sup>, XS), mikropipety s nastavitelným objemem a další drobné laboratorní vybavení.

### 2.1.3 Příprava vzorků a vnitřních standardů

#### 2.1.3.1 Příprava vzorků pro optimalizaci

Ke stanovení TYR derivátu/hydrogelu a TCS bylo připraveno celkem 9 vzorků. První vzorek **S1** (1 mg/ml) obsahoval hydrogel bez obsahu TCS (531,3 mg) rozpuštěný v 0,01 M pufru octanu sodného obsahující 0,03 M chlorid sodný (10,09 ml; pH 5,4). Ke vzorku byl přidán enzym BTH (1,89 ml; 300 IU/mg). Druhý vzorek **S2** obsahoval hydrogel bez obsahu TCS (527 mg) rozpuštěný v 0,01 M pufru octanu sodného obsahující 0,03 M chlorid sodný (10,09 ml; pH 5,4). Ke vzorku byl přidán enzym SpHyl (158,1  $\mu$ l; 15  $\mu$ l/mg). Enzymatické štěpení (digesce) u obou vzorků bylo provedeno při teplotě 37 °C po dobu 17 hodin. Třetí vzorek **S3** byl připraven odebráním 2 ml z S1 a bylo k němu přidáno 45  $\mu$ l enzymu SpHylu. Vzorek byl enzymaticky štěpen po dobu 17 hodin. Čtvrtý a pátý vzorek **S4**, **S5** byl připraven navážením TYR (15 mg; TYR-52; DS = 2,3 %;  $M_w$  = 280 kDa) a rozpuštěním ve stejném pufru jako předchozí vzorky (15 ml). **S4** byl štěpen s využitím BTH (2,57 mg; 300 IU/mg) a **S5** přidavkem SpHylu (225  $\mu$ l; 15  $\mu$ l/mg). Enzymatická digesce u obou vzorků byla provedena při teplotě 37 °C po dobu 17 hodin. Stejně tak byl připraven vzorek **S9**, navážením TYR (15 mg; TYR-53; DS = 2,3 %;  $M_w$  = 281 kDa), rozpuštěním v pufru (15 ml) a štěpením přidavkem SpHylu (225  $\mu$ l; 15  $\mu$ l/mg). Enzymatická digesce byla také provedena při teplotě 37 °C po dobu 17 hodin. Vzorky **S6** a **S7** byly připraveny z hydrogelu s obsahem TCS, který byl následně podáván intraperitoneálně myším pro *in vivo* studii. Navážené množství hydrogelu (302,9 mg) bylo rozpuštěno v 0,01 M pufru octanu sodného obsahující 0,03 M chlorid sodný (5,755 ml; pH 5,4). Ke vzorku **S6** byl přidán enzym BTH (1,037 mg; 300 IU/mg) a ke vzorku **S7** byl přidán enzym SpHyl (90,87  $\mu$ l; 15  $\mu$ l/mg). Enzymatické štěpení u obou vzorků bylo provedeno při teplotě 37 °C po dobu 17 hodin. Odebráním 2 ml vzorku **S6** a přidáním 45  $\mu$ l SpHylu

a následném štěpení při stejných podmínkách jako u předchozích vzorků byl připraven vzorek **S8**.

### **2.1.3.2 Příprava vnitřního standardu**

Pro přípravu vnitřního standardu (VS) (TYR-52, TYR-53) pro stanovení tyraminu byl vzorek **S5 (S9)** (150 µl) zredukován deuterovaným borohydridem sodným (NaBD<sub>4</sub>; 1 mg). Reakční směs byla míchána po dobu 2 h při 20 °C. Poté byla ke směsi přidána kyselina octová (10 µl) a směs byla dále míchána 20 min při 20 °C.

### **2.1.3.3 Příprava vnitřního standardu TCS**

Vnitřní standard TCS byl připravený naředěním 50 % MeOH na koncentraci 5 µg/ml. Bez dalších úprav byl dále používán v rámci celé analýzy.

## **2.1.4 Podmínky analýzy**

### **2.1.4.1 Měření na LC/fluorescence**

Vzorky **S1-S5** (100 µg/ml) a standard čistého tyraminu (10 µg/ml) byly namíchány do roztoku 10 mM octanu amonného a acetonitrilu v poměru 8:2. Měření probíhalo na chromatografickém systému Acquity HPLC s fluorescenčním detektorem. Jako mobilní fáze byl použit roztok 10 mM octanu amonného (A) a methanolu (B), průtok mobilní fáze byl 1 ml/min a teplota kolony 40 °C. Separace probíhala na koloně Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 (2,1 x 50 mm; 1,7 µm). Byly nastaveny 3 metody s různými gradienty a stupni citlivosti. Dále bylo nastaveno excitační maximum tyraminu (275 nm), excitační maximum dityraminu (285 nm) a emisní maximum obou látek (415 nm).

Pro optimalizovanou finální metodu analýzy derivátu na bázi tyraminu byl nastaven následující gradient: 0 minut – 10 % B; 4 minuty – 70 % B; 4,5 minuty – 70 % B; 4,6 minut – 10 % B. Celková doba analýzy byla 5,1 minut.

### **2.1.4.2 Měření na LC/MS/MS**

Pro tento účel byl používán chromatografický systém Acquity UPLC ve spojení s hmotnostním spektrometrem s ionizací elektrosprejem Xevo TQ-XS s trojitým kvadrupólem (Waters, Wilmslow, UK). Pro separaci byla použita kolona Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 (2,1 x 50 mm; 1,7 µm). Pro stanovení hydrogelu na bázi tyraminu byla mobilní fáze složena z 0,1 %

kyseliny mravenčí (A) a methanolu (B) s nastaveným průtokem mobilní fáze 0,4 ml/min a teplotou kolony 40 °C. Byl nastaven již optimalizovaný gradient 0 minut – 10 % B; 4 minuty – 70 % B; 4,5 minuty – 70 % B; 4,6 minut – 10 % B. Celková doba analýzy byla 5,1 minut.

Pro stanovení hydrogelu na bázi tyraminu byly vybrány prekurzory (*Tabulka 2*) se snímáním jak v režimu kladných iontů (ESI<sup>+</sup>), tak i v režimu záporných iontů (ESI<sup>-</sup>).

**Tabulka 2.** Vybrané prekurzory pro stanovení hydrogelu na bázi tyraminu – modifikovaná nenasyčená disacharidová stavební jednotka TYR derivátu ( $\Delta$ HA2-TYR) a nenasyčená dityraminová modifikovaná stavební jednotka hydrogelu ( $\Delta$ HA2-DITYR- $\Delta$ HA2)

ESI <sup>+</sup>	<i>m/z</i>	ESI <sup>-</sup>	<i>m/z</i>
$[(\Delta\text{HA2-TYR})+\text{H}]^+$	612,3	$[(\Delta\text{HA2-TYR})-\text{H}]^-$	610,3
$[(\Delta\text{HA2-DITYR-}\Delta\text{HA2})+\text{Na}]^+$	1243,5	$[(\Delta\text{HA2-DITYR-}\Delta\text{HA2})-2\text{H}+\text{Na}]^-$	1241,5
$[(\Delta\text{HA2-DITYR-}\Delta\text{HA2})+\text{H}]^+$	1221,5	$[(\Delta\text{HA2-DITYR-}\Delta\text{HA2})-\text{H}]^-$	1219,5
$[(\Delta\text{HA2-DITYR-}\Delta\text{HA2})+2\text{H}]^{2+}$	611,35	$[(\Delta\text{HA2-DITYR-}\Delta\text{HA2})-2\text{H}]^{2-}$	609,33

Pro optimalizaci TCS byly použity vzorky standardu TCS o koncentracích 0,33 a 0,05  $\mu\text{l/ml}$  (*Graf 3 až 8*). Separace probíhala na koloně Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 (2,1 x 50 mm; 1,7  $\mu\text{m}$ ) při 40 °C. Mobilní fází byla destilovaná voda (A) – methanol (B) s použitým gradientem 0 minut - 50 % B, 4 minuty – 95 % B, 4,5 minuty – 50 % B a 5 minut – 50 % B. Celková doba analýzy byla 5 minut.

### 2.1.5 Optimalizace úpravy vzorků

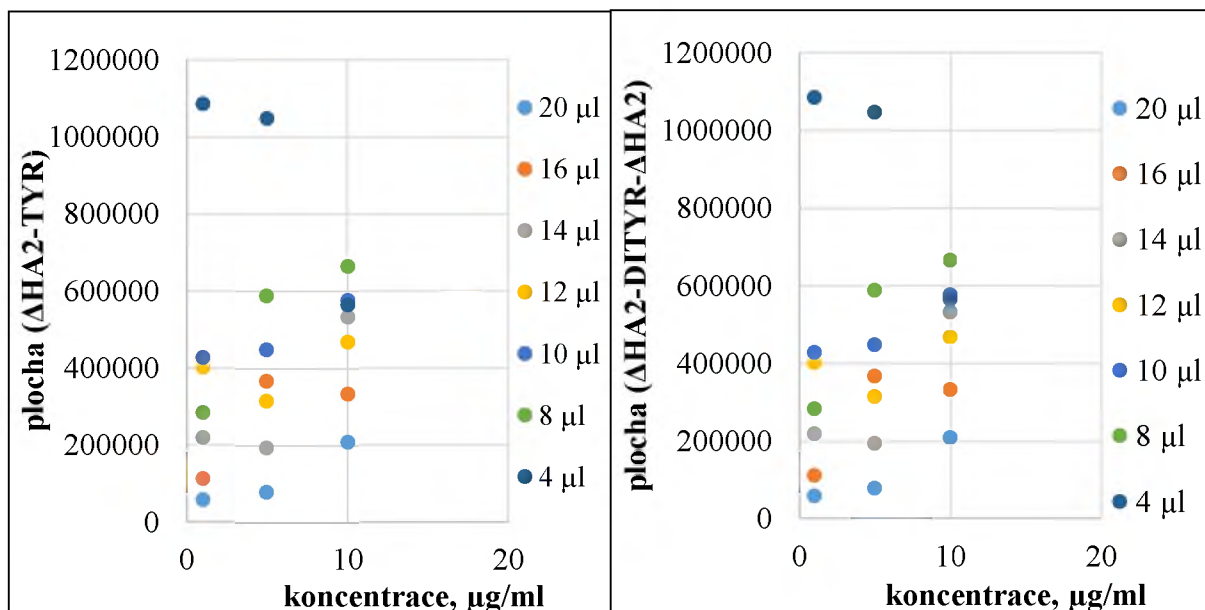
K jednotlivým vzorkům (100  $\mu\text{l}$ ) byly přidávány vnitřní standardy pro stanovení tyraminu (20  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{l}$ ) a triclosanu (5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{l}$ ). Vzorky se dále upravovaly přidávkem kyseliny  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (4  $\mu\text{l}$ ) a extrahovaly směsí  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (3:1; 1 ml). Před odběrem do jednotlivých vialek pro měření byly třepány (3 min) a centrifugovány (5 min, 140 x 100 rpm). Vzorky vodné fáze (pro stanovení derivátu) a vzorky organické fáze (pro stanovení TCS) byly odebrány a změřeny na LC/MS/MS Xevo TQ-XS.

Dále byla připravována kalibrační řada v rozmezí koncentrací 0,05 až 100  $\mu\text{g/ml}$  hydrogelu s obsahem TCS (**S7**) (*Graf 17*). Tento hydrogel obsahoval 20 mg/ml HA a 1 mg/ml TCS, tudíž pro výpočet koncentrací TCS se byla používána kalibrační řada s 20x nižšími koncentracemi, a to v rozmezí 0,0025 až 5  $\mu\text{g/ml}$  (*Graf 18*).

### 2.1.5.1 Přídavek kyselin ke vzorku

Pro optimalizaci přídavku kyseliny byly ke vzorku plazmy (100  $\mu$ l) s obsahem vzorku S2 o koncentracích 10, 5 a 1  $\mu$ g/ml přidány objemy kyseliny  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{HNO}_3$ , a  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (4, 8, 10, 12, 14, 16 a 20  $\mu$ l). Z výsledků chromatografů bylo zjištěno, že nejlépe se jevil přídavek kyseliny  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  (4  $\mu$ l) (*Graf 1, 2*).

*Graf 1, 2.* Přídavek kyseliny  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  ke vzorku



### 2.1.6 Optimalizace extrakčního činidla pro extrakci vzorku

Vzorky byly extrahovány metodou extrakce kapalina-kapalina. Pro optimalizaci byla použita různá extrakční činidla pro vysrážení proteinu, a to n-hexan/acetone (1000  $\mu$ l; 9:1), MeOH/dichlormethan (1000  $\mu$ l; 1:1),  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1000  $\mu$ l; 3:1), dále ethylacetát (1000  $\mu$ l) a acetonitril (1000  $\mu$ l). Nejvyšší extrakční účinnost pro TCS ( $91 \pm 4$ ) % byla dosažena s použitím extrakčního činidla  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (1000  $\mu$ l; 3:1). Pro ostatní extrakční činidla se účinnost extrakce TCS pohybovala v rozmezí od ( $57 \pm 6$ ) % (n-hexan/acetone) do ( $83 \pm 5$ ) % (MeOH/dichlormethan). Pro HA-TYR byla nejnižší extrakční účinnost dosažena také pomocí směsi n-hexan/acetone ( $62 \pm 7$ ) %. Naopak nejvyšší účinnost extrakce pro HA-TYR byla dosažena acetonitrilem ( $92 \pm 6$ ) % a následovaná směsí  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  ( $88 \pm 3$ ) %. Směs  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  byla zvolena jako nejúčinnější pro oba typy analytů.

## 2.2 *In Vivo* studie myších vzorků

Optimalizovaná metoda byla použita pro analýzu studovaných sloučenin v biologických vzorcích. Jednalo se o 30 vzorků myši, do jejichž břišní dutiny (intraperitoneálně) bylo jednorázově aplikováno 250  $\mu$ l hydrogelu HA-TYR s obsahem triclosanu. Následně byly myši umístěny jednotlivě do metabolických klecí, poté byly usmrceny a následně byly zpracovány jednotlivé vzorky myších tělních tekutin, orgánů a dalších biologických materiálů (*Tabulka 3*). Odběry vzorků byly prováděny v následujících intervalech: 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 5; 7; 10; 15 a 30 den. V rámci diplomové práce byly analyzovány a vyhodnoceny všechny odebrané vzorky. Výsledky jsou uvedeny pouze pro orgány/tkáně/tělní tekutiny nejvíce zasažené aplikovanými látkami.

**Tabulka 3.** Myší vzorky připravené v rozličném čase pro *in vivo* studii

Plasma (PL)	Obsah žaludku (ST*)
Krevní buňky (B)	Tenké střevo (SI)
Játra (L)	Obsah tenkého střeva (SI*)
Slezina (S)	Tlusté střevo (LI)
Ledviny (K)	Obsah tlustého střeva (LI*)
Plíce (LU)	Slepé střevo (A)
Srdce (H)	Obsah slepého střeva (A*)
Mozek (BR)	Chrupavka (C)
Břišní tuk (F)	Štítná žláza (TG)
Moč (U)	Kolenní klouby (KJ)
Žluč (BL)	Zbytek aplikovaného materiálu (T)
Žaludek (ST)	Exkrementy

### 2.2.1 Pracovní postup přípravy vzorků

Vzorky orgánů byly naváženy na analytických vahách do homogenizačních zkumavek (4 ml). Dále byl přidán 100 mM fosfátový pufr (PBS) s přidavkem kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) (pH 7,4) na výslednou koncentraci 100 mg/ml a poté byly vzorky homogenizovány pomocí homogenizátoru tkání PRECELLYS 24-Dual (Bertin Technologies). Výjimkou byla chrupavka a štítná žláza, u kterých byla provedena fyziologická homogenizace na homogenizátoru TissueLyser II (Qiagen®). Z takto připravených homogenátů bylo odebráno 100  $\mu$ l a byla provedena enzymatická digesce (30 min, 37 °C) s enzymem SpHyl (10  $\mu$ l). Následně byl přidán vnitřní standard TCS (5  $\mu$ g/ml; 10  $\mu$ l) a vnitřní standard TYR (20  $\mu$ g/ml; 10  $\mu$ l) a poté byla provedena úprava a extrakce vzorku (*viz kapitola 2.1.5*). Ke každé

sérii měření vzorků jednotlivých orgánů byla připravena kalibrační řada v rozmezí koncentrací 0,05 až 100 µg/ml.

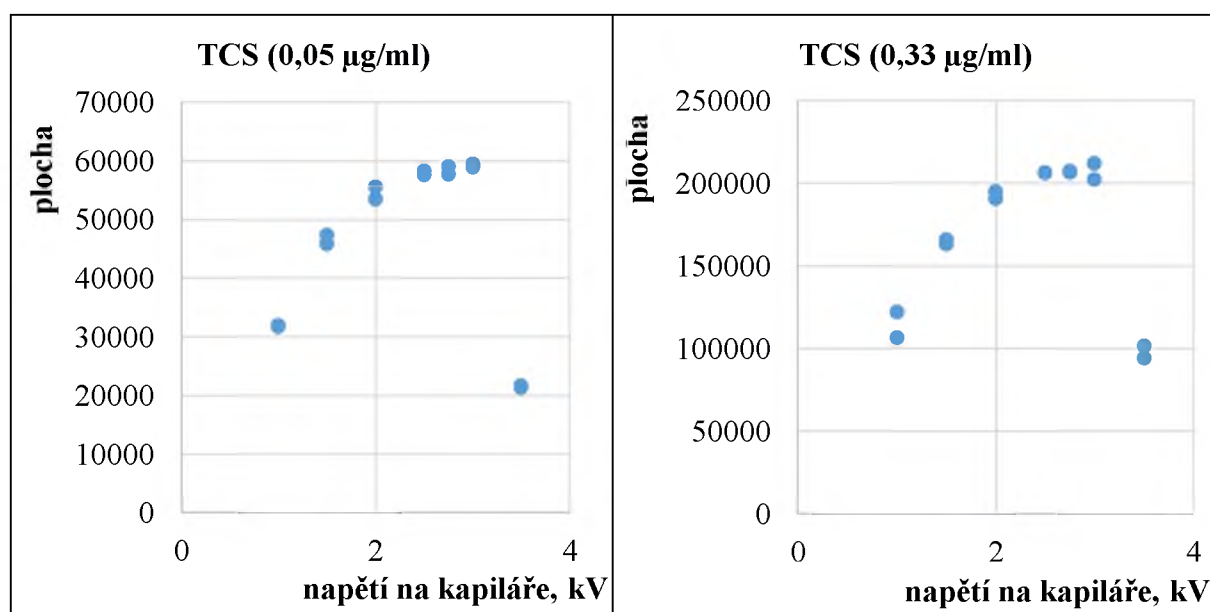
Ze vzorků plazmy a krevních buněk bylo odebráno 100 µl a byla provedena enzymatická digesce (30 min, 37 °C) s enzymem SpHyl (10 µl). Následně byl přidán vnitřní standard TCS (5 µg/ml; 10 µl) a vnitřní standard TYR (20 µg/ml; 10 µl) a poté byla provedena úprava a extrakce vzorku (*viz kapitola 2.1.5*). Vzorky moče a žluče byly nejprve 10x zředěny a poté byly upravovány stejným způsobem.

### 3 Výsledky a diskuze

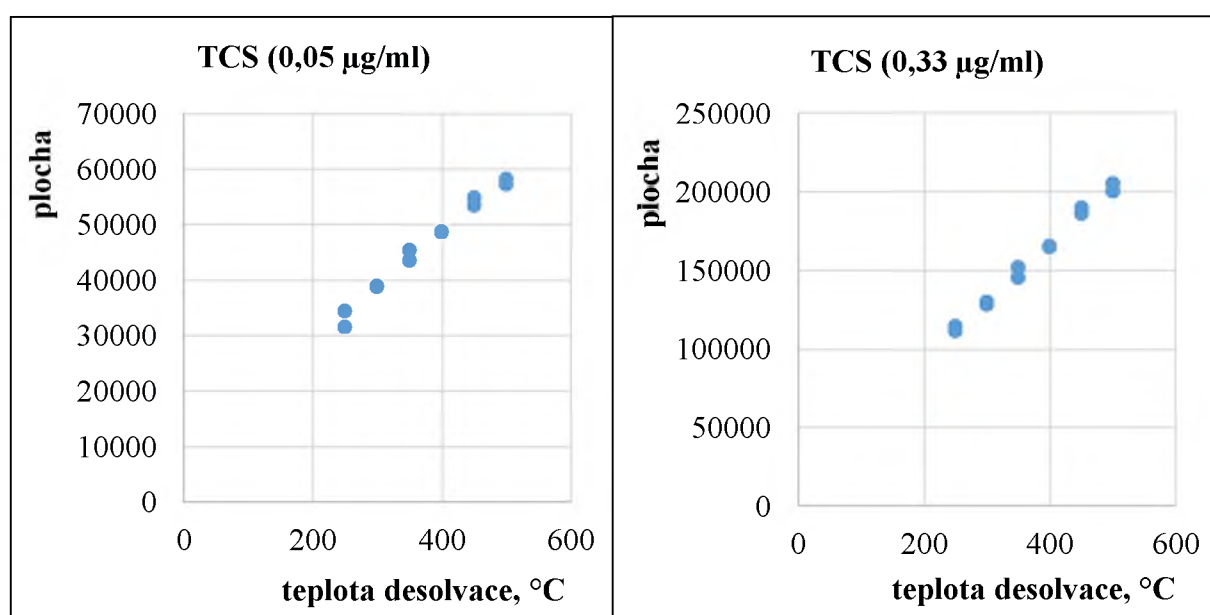
#### 3.1 Optimalizace metody stanovení TCS a jeho metabolitů

Pro optimalizaci TCS byly použity vzorky standardu TCS o koncentracích 0,33 a 0,05  $\mu\text{l/ml}$  (Graf 3 až 8). Optimalizováno bylo napětí kapiláry v rozsahu 1 až 3,5 kV, dále teplota desolvace v rozsahu teplot 250 až 500  $^{\circ}\text{C}$  a průtok plynu v rozsahu 750 až 1200 L/Hr.

Graf 3, 4. Optimalizace napětí kapiláry pro stanovení TCS v ESI<sup>-</sup> režimu

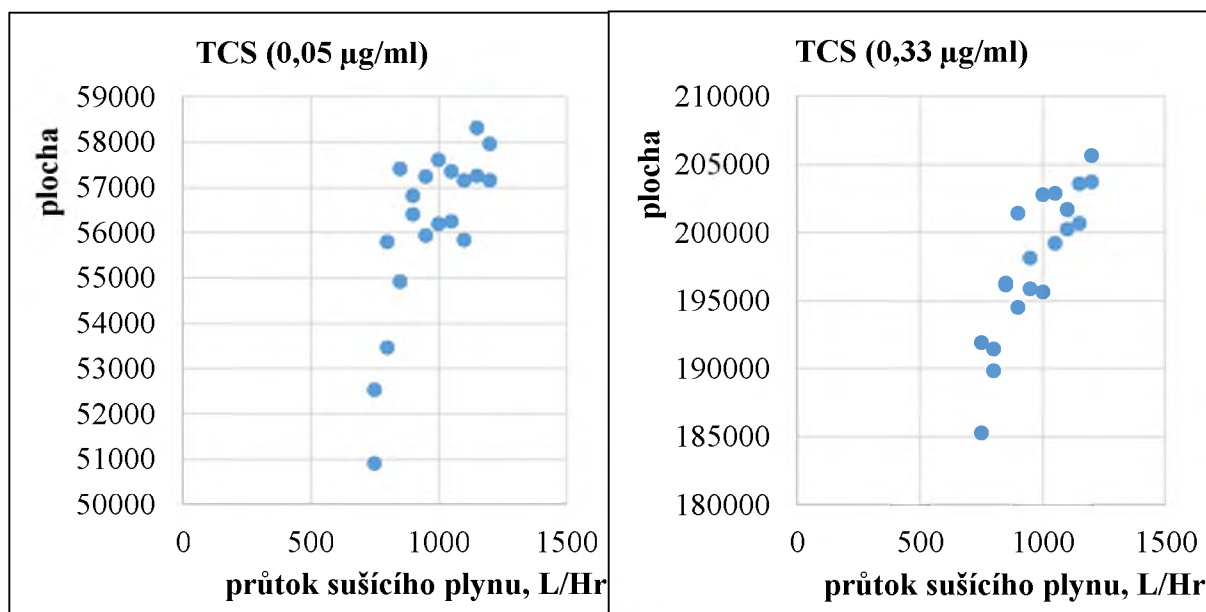


Graf 5, 6. Optimalizace teploty sušícího plynu pro stanovení TCS v ESI<sup>-</sup> režimu





**Graf 7, 8.** Optimalizace průtoku plynu pro stanovení TCS v ESI<sup>-</sup> režimu



Triclosan byl separován v retenčním čase 4,06 min. Pro optimalizovanou finální metodu pro stanovení TCS byly na základě získaných výsledků (*Graf 3 až 8*) s ohledem na maximální citlivost použity následující podmínky: napětí na kapiláře 2,75 kV, teplota sušícího plynu 500 °C s průtokem 1200 L/Hr.

Dále byly nastaveny následující MRM přechody v režimu pro snímání záporně nabitých iontů: prekurzorový iont o hodnotě  $m/z$  287,11 odpovídající deprotonované molekule TCS, produktový iont o hodnotě  $m/z$  34,89 při kolizní energii 4 eV a napětí vloženého na vstupní kužel (cone voltage, CV) 24 V a produktový iont o hodnotě  $m/z$  141,98 při kolizní energii 34 eV a CV 16 V. V případě vnitřního standardu TCS odpovídal iont prekurzoru deprotonované molekule o hodnotě  $m/z$  299,11 a produktové ionty byly nastaveny na hodnotu  $m/z$  34,89 při kolizní energii 4 eV a CV 24 V a  $m/z$  147,98 při kolizní energii 34 eV a CV 16 V. Pro TCS sulfát byl nastaven iont prekurzoru deprotonované molekuly na hodnotu  $m/z$  367,03 a produktové ionty byly nastaveny na hodnotu  $m/z$  34,89 při kolizní energii 16 eV a CV 24 V a  $m/z$  286,94 při kolizní energii 14 eV a CV 24 V. Prekurzorový iont o hodnotě  $m/z$  463,09 odpovídal deprotonované molekule TCS glukuronidu, dále s nastavenými produktovými ionty na hodnotu  $m/z$  112,94 při kolizní energii 14 eV a CV 30 V a  $m/z$  286,09 při kolizní energii 14 eV a CV 30 V.

### 3.2 Optimalizace metody stanovení $\Delta$ HA2-TYR a $\Delta$ HA2-DITYR- $\Delta$ HA2

Tyraminový derivát hyaluronanu (HA-TYR) a z něj vytvořený hydrogel je vysoko molekulární látka ( $M_w$  derivátu = 280 kDa). Jeho analýza v polymerním stavu pomocí hmotnostní spektrometrie je prakticky nemožná. Ke strukturální charakterizaci tyraminového derivátu i hydrogelu se dříve používala bovinní testikulární hyaluronidáza (BTH).<sup>8</sup> BTH vytváří sérii nasycených, nativních a tyramin-modifikovaných oligosacharidů hyaluronanu s různou délkou oligosacharidového řetězce (od tetrasacharidu až po dodekasacharid), přičemž hlavním produktem je tyraminem modifikovaný hexasacharid HA. Kromě strukturální charakterizace HA-TYR, je v literatuře popsána i kvantitativní analýza modifikovaného hyaluronanu ve vzorcích z *in vivo* studie.<sup>31</sup> K tomuto účelu autoři použili enzym SpHyl, tzv. hyaluronan lyázu, štěpící modifikovaný hyaluronan na nenasycené nativní disacharidy ( $\Delta$ HA2) a nenasycené modifikované disacharidy ( $\Delta$ HA2-C18:1). Pro štěpení tyraminového derivátu ani hydrogelu nebyl tento enzym prozatím použitý.

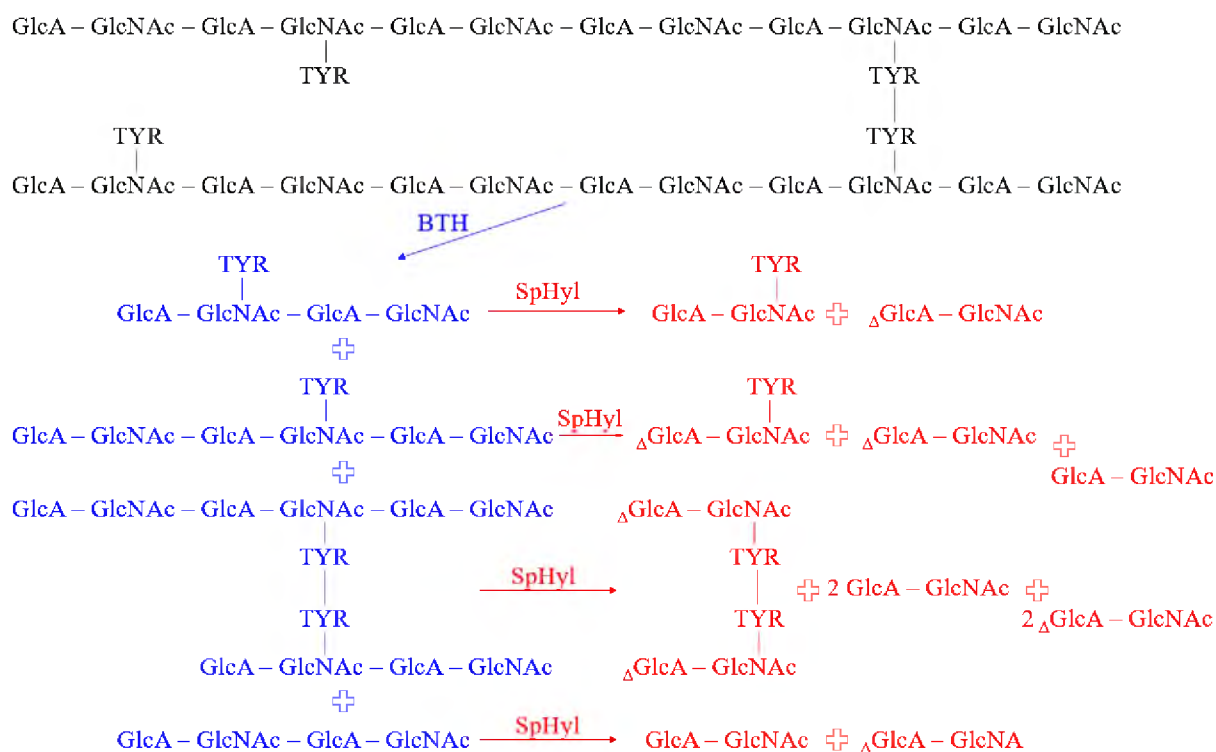
V této diplomové práci bylo ke kvantitativnímu stanovení tyraminového derivátu/hydrogelu na počátku testováno použití BTH (vzorky – S1-hydrogel bez TCS, S4-TYR derivát, S6-hydrogel s obsahem TCS) i SpHyl (vzorky – S2-hydrogel bez TCS, S5 a S9-TYR derivát, S7-hydrogel s obsahem TCS), či jejich kombinace (vzorek S3 a S8, hydrogel bez i s obsahem TCS).

Produkty rozkladu po BTH degradaci byly tvořeny nasycenými nemodifikovanými oligosacharidy (HA4 a HA6), nasycenými tyramin-modifikovanými oligosacharidy (HA4-TYR, HA6-TYR, HA8-TYR a HA10-TYR) a v případě hydrogelu i (HA4-DITYR-HA4, HA6-DITYR-HA6, HA8-DITYR-HA8, ale i kombinace různě dlouhých oligosacharidů HA6-DITYR-HA8, a delší DITYR-modifikované oligosacharidy). V podstatě lze shrnout, že byly detekovány ty samé produkty rozkladu jako v minulosti,<sup>8</sup> i když doba enzymatické degradace byla téměř dvojnásobná. Enzymatická degradace pomocí BTH nebyla negativně ovlivněna přítomností TCS.

Produkty rozkladu tyraminového derivátu pomocí SpHyl byly identifikovány jako  $\Delta$ HA2 a  $\Delta$ HA2-TYR. U SpHyl enzymatického hydrolyzátu hydrogelu byl kromě předchozích látek ( $\Delta$ HA2 a  $\Delta$ HA2-TYR) detekován také zesítený  $\Delta$ HA2-DITYR- $\Delta$ HA2. Vyšší tyramin-modifikované oligosacharidy nebyly v hydrolyzátu přítomny, tj. modifikace tyraminem v poloze C6 na *N*-acetyl-D-glukosaminu nepřekáží enzymatické hydrolyze.

Kombinace dvou enzymů (BTH a následně SpHyl) nepřinesla další výhodu. Kromě produktů popsaných v předchozím odstavci ( $\Delta$ HA2,  $\Delta$ HA2-TYR a  $\Delta$ HA2-DITYR- $\Delta$ HA2) byly

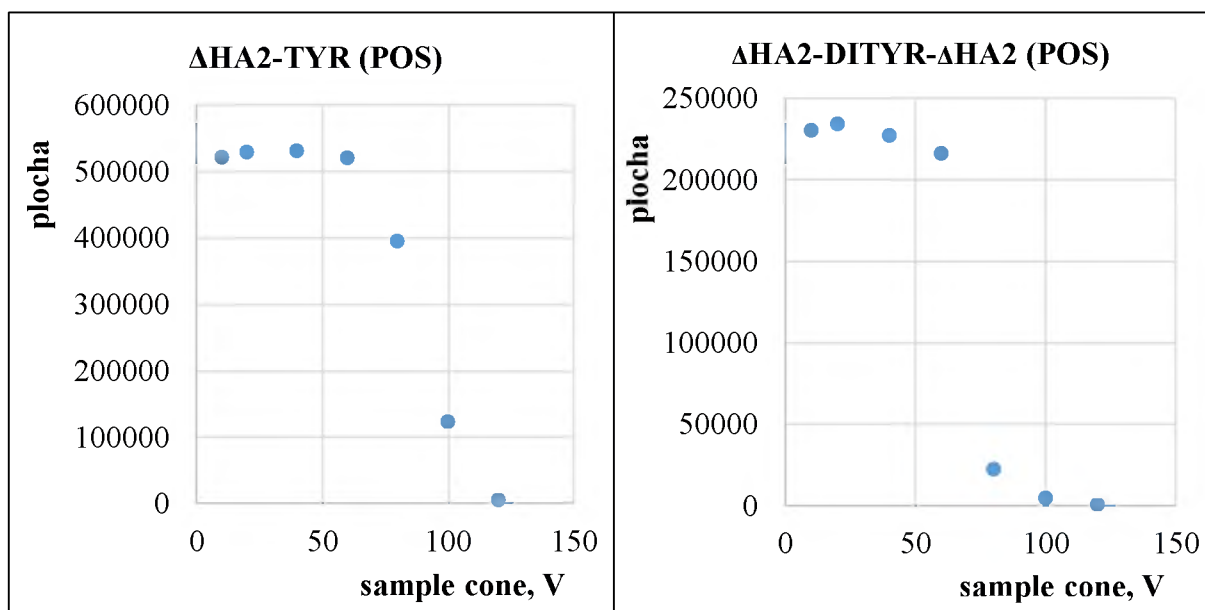




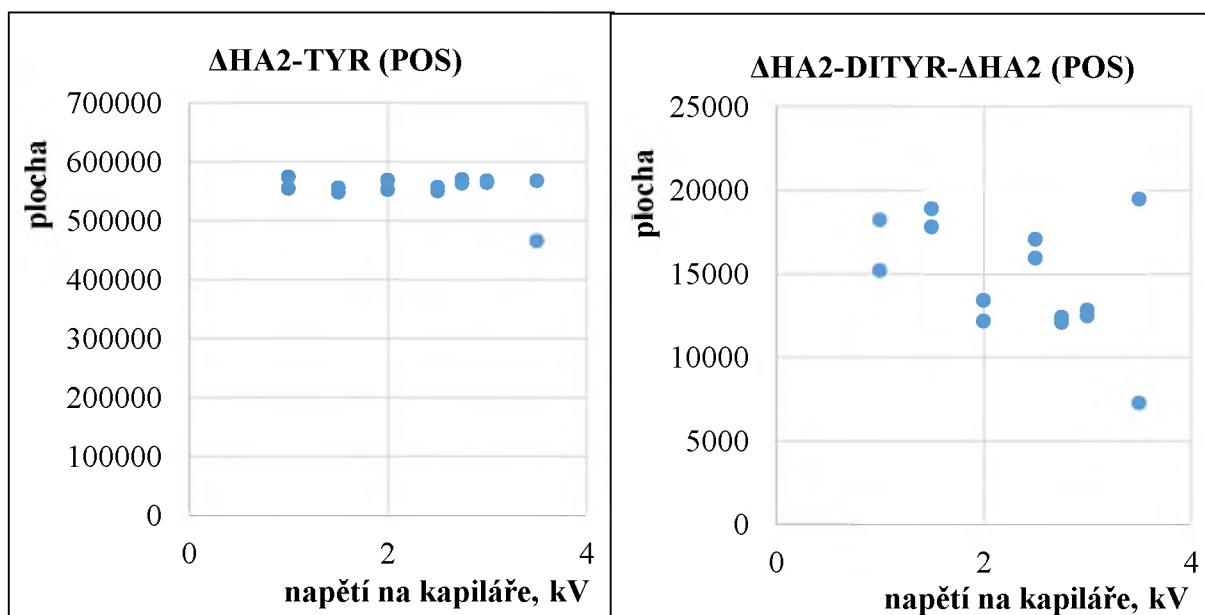
**Obrázek 12.** Schématické znázornění produktů štěpení hydrogelu na bázi tyraminového derivátu hyaluronanu pomocí BTH (modře). Pro každý z produktů vznikající BTH hydrolyzou jsou také znázorněny produkty vznikající degradací enzymem SpHyl (červeně). GlcA je kyselina glukuronová, GlcNAc je *N*-acetyl-D-glukosamin, TYR je modifikace tyraminem s linkerem a  $\Delta$  značí nenasycený charakter kyseliny glukuronové (dvojná vazba se nachází mezi uhlíky C4 a C5).

Pro sledování látek *in vivo* je nutné zvolit takovou přípravu vzorku, aby produkty rozkladu byly co možná nejuniformnější. V opačném případě bude signál analytu rozštěpen na vícero látek, což se odrazí v nárůstu limitů detekce i kvantifikace. Kromě toho limity detekce a kvantifikace oligosacharidů hyaluronanu rostou s rostoucí délkou oligosacharidového řetězce (*osobní sdělení M. Hermannová*). Vzhledem k tomu byl k další analýze používán pouze enzym SpHyl. Ke kvantifikaci byly vybrány tyraminem modifikované nenasycené disacharidy, které jsou charakteristické pro derivát/hydrogel ( $\Delta$ HA2-TYR/ $\Delta$ HA2-DITYR- $\Delta$ HA2). Pro oba analyty byly optimalizovány následující podmínky: CV v rozmezí 10 až 140 V, kolizní energie v rozmezí 0 až 6 eV, napětí na kapiláře v rozmezí 1 až 3,5 kV, teplota sušícího plynu v rozmezí 250 až 500 °C a průtok sušícího plynu v rozmezí 750 až 1200 L/Hr. Pro optimalizaci byly měřeny spektra jak v kladném (ESI<sup>+</sup>), tak v záporném režimu záznamu iontů (ESI<sup>-</sup>). Hmotnostní spektra vykazovaly lepší hodnoty se snímáním v ESI<sup>+</sup> režimu. Pro měření byly použity vzorky **S2** o koncentraci 1  $\mu$ g/ml a **S5** o koncentraci 100  $\mu$ g/ml.

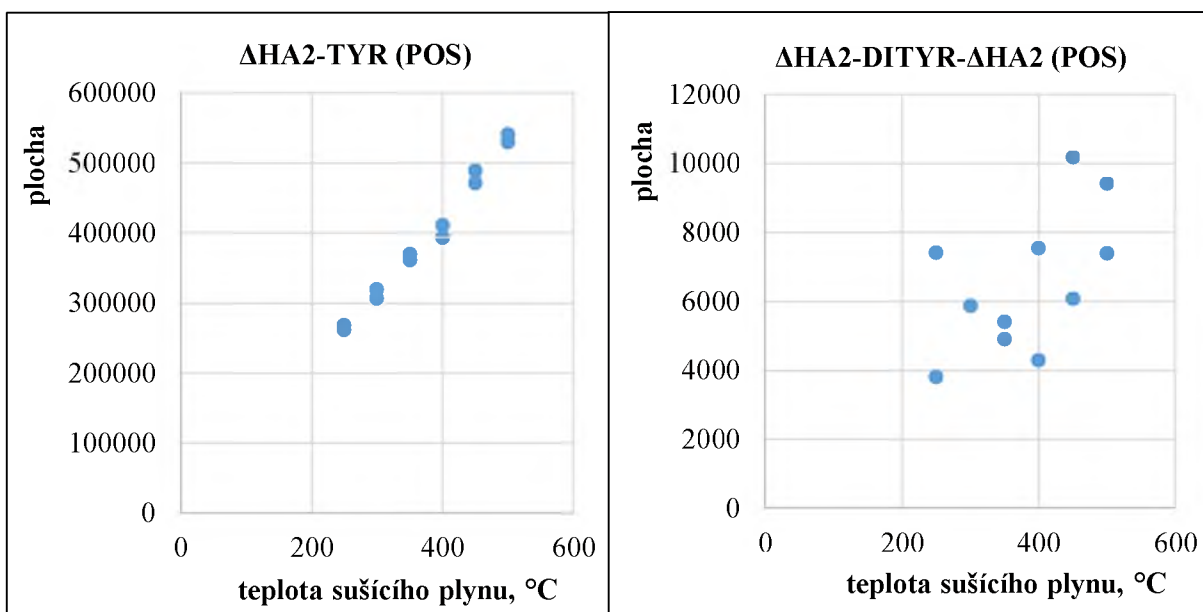
**Graf 9, 10.** Optimalizace CV pro stanovení  $\Delta$ HA2-TYR a  $\Delta$ HA2-DITYR- $\Delta$ HA2 v ESI<sup>+</sup> režimu



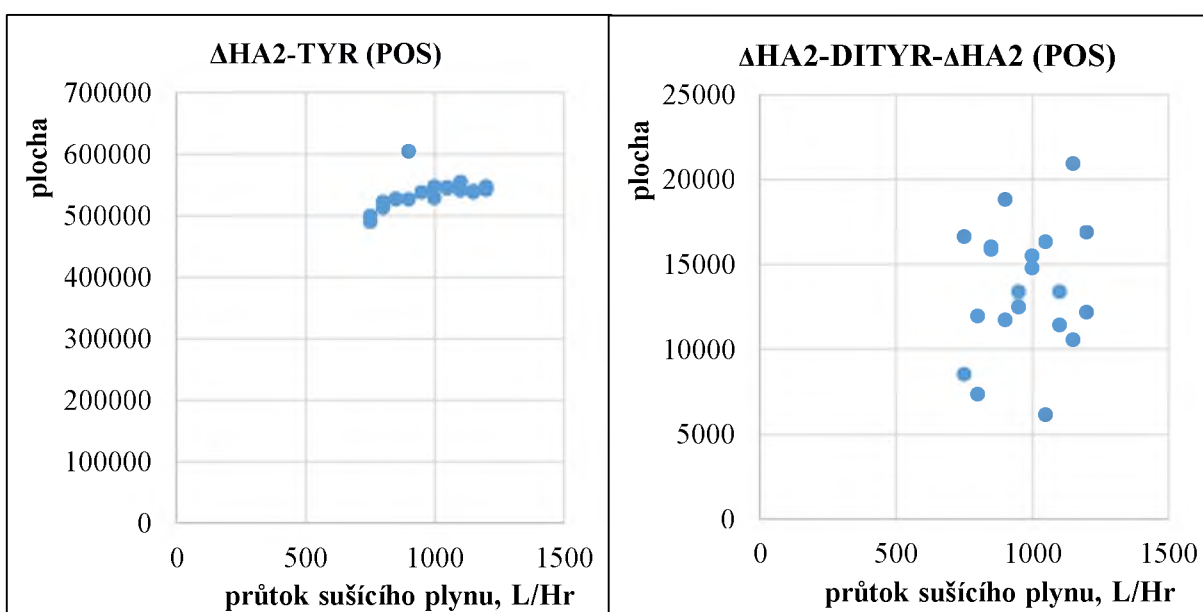
**Graf 11, 12.** Optimalizace napětí na kapiláře pro stanovení  $\Delta$ HA2-TYR a  $\Delta$ HA2-DITYR- $\Delta$ HA2 v ESI<sup>+</sup> režimu



**Graf 13, 14.** Optimalizace teploty sušícího plynu pro stanovení  $\Delta$ HA2-TYR a  $\Delta$ HA2-DITYR- $\Delta$ HA2 v ESI<sup>+</sup> režimu



**Graf 15, 16.** Optimalizace průtoku sušícího plynu pro stanovení  $\Delta$ HA2-TYR a  $\Delta$ HA2-DITYR- $\Delta$ HA2 v ESI<sup>+</sup> režimu



V ESI<sup>+</sup> režimu byly optimalizovány podmínky pro stanovení  $\Delta$ HA2-TYR a  $\Delta$ HA2-DITYR- $\Delta$ HA2. Pro finální optimalizovanou metodu byly na základě získaných výsledků s ohledem na maximální citlivost (Graf 9 až 16) nastaveny následující podmínky: sample cone 20 V, napětí na kapiláře 1,5 kV a 2 kV, teplota sušícího plynu 500 °C s průtokem 1100 L/Hr.

Pro každý analyt byla nejprve optimalizována kolizní energie v rozsahu 5 až 60 eV, a to vždy po přídatku 5 eV. Optimální hodnoty kolizních energií jsou uvedeny u jednotlivých MRM přechodů.

Pro stanovení tyraminu ve formě  $\Delta$ HA2-TYR a dityraminu ve formě  $\Delta$ HA2-DITYR- $\Delta$ HA2 byly nastaveny následující MRM přechody v režimu pro snímání kladně nabitých iontů: prekurzorový iont o hodnotě  $m/z$  612,37 odpovídající protonované molekule derivátu ( $\Delta$ HA2-TYR), produktový iont o hodnotě  $m/z$  234,19 při kolizní energii 40 eV a napětí 20 V,  $m/z$  263,22 při kolizní energii 30 eV a napětí 20 V a  $m/z$  400,29 při kolizní energii 30 eV a napětí 20 V. MRM snímání probíhalo v čase 0,8 – 1,6 min. V případě vnitřního standardu derivátu ( $\Delta$ HA2-TYR<sub>RED</sub>) odpovídal iont prekurzoru protonované molekule o hodnotě  $m/z$  615,37 a produktové ionty byly nastaveny na hodnotu  $m/z$  234,19 při kolizní energii 40 eV a napětí 20 V a produktový iont o hodnotě  $m/z$  421,3 při kolizní energii 25 eV a napětí 20 V. MRM snímání probíhalo v čase 0,8 – 1,6 min. Pro dityramin ( $\Delta$ HA2-DITYR- $\Delta$ HA2) byl nastaven iont prekurzoru dvojnásobně protonované molekuly na hodnotu  $m/z$  611,37 a produktové ionty byly nastaveny na hodnotu  $m/z$  330,74 při kolizní energii 25 eV a napětí 20 V,  $m/z$  399,27 při kolizní energii 25 eV a napětí 20 V a  $m/z$  514,32 při kolizní energii 20 eV a napětí 20 V. MRM snímání probíhalo v čase 1,25 – 3 min.

### 3.3 Robustnost metody

Robustnost analytické metody představuje míru kapacity analytické metody zůstat neovlivněná malými změnami experimentálních podmínek a zajistit tak spolehlivost během jejího používání. Jedná se o indikátor reprodukovatelnosti metody během rutinního používání. Uvádějí se zde poznatky z vývoje metody, upozornění na podmínky, které mohou ovlivnit výsledky. Cílem je prokázat spolehlivost analytické procedury při úmyslné variabilitě parametrů metody. K ověření robustnosti analytických metod na 3 koncentračních hladinách pro každý analyt byl použit tzv. Youdenův test.

Bylo připraveno 7 proměnných parametrů při 8 pokusech (*Tabulka 4*). Jednalo se o změny objemu extrakčního činidla, přídatku kyseliny, dále změna doby třepání a centrifugace, teploty kolony, průtoku mobilní fáze a CV (*Tabulka 5*). Následně bylo připraveno 8 vzorků o třech různých koncentracích (75, 15 a 1  $\mu\text{g/ml}$ ) s definovanými parametry, které byly poté měřeny.

**Tabulka 4.** Kombinace parametrů pro zhodnocení robustnosti

PARAMETRY	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Výsledek měření	r	z	u	v	w	x	y	z

**Tabulka 5.** Vybrané parametry pro robustnost metody. V závorce jsou uvedeny optimalizované parametry metody

VYBRANÉ PARAMETRY		PARAMETR A-G	PARAMETR a-g
A/a	extrakční činidlo (1000 µl)	1100 µl	900 µl
B/b	přídavek kyseliny (4 µl)	5 µl	3 µl
C/c	doba třepání (3 min)	3,5 min	2,5 min
D/d	teplota kolony (40 °C)	45 °C	35 °C
E/e	doba centrifugace (5 min)	6 min	4 min
F/f	průtok mobilní fáze (0,4 ml/min)	0,45 ml/min	0,35 ml/min
G/g	napětí na SC:		
	Derivát (20 V)	22 V	18 V
	Triclosan (20 V)	22 V	18 V

### 3.3.1 Výpočet robustnosti

Výpočet robustnosti byl proveden dle schématu výpočtu testu robustnosti (*Rovnice 1*) Test robustnosti spočíval v testování nulové hypotézy  $H_0$ ;  $V_i = 0$ , za předpokladu, že všechny kontrasty  $V_i$  jsou nulové.

**Rovnice 1.** Schéma výpočtu testu robustnosti

$$V_A = \frac{1}{4}(r + t + u + v) - \frac{1}{4}(w + x + y + z) = (A - a)$$

$$V_B = \frac{1}{4}(r + t + w + x) - \frac{1}{4}(v + u + y + z) = (B - b)$$

$$V_C = \frac{1}{4}(r + u + w + y) - \frac{1}{4}(t + v + x + z) = (C - c)$$



$$V_D = \frac{1}{4}(r + t + y + z) - \frac{1}{4}(w + x + u + v) = (D - d)$$

$$V_E = \frac{1}{4}(r + x + u + z) - \frac{1}{4}(w + t + y + v) = (E - e)$$

$$V_F = \frac{1}{4}(r + w + z + v) - \frac{1}{4}(t + x + y + u) = (F - f)$$

$$V_G = \frac{1}{4}(r + x + y + v) - \frac{1}{4}(w + t + u + z) = (G - g)$$

Dále byl vypočten interval spolehlivosti kontrastu dle vztahu (*Rovnice 2*). V případě, že vypočtený interval spolehlivosti obsahoval bod nula, znamenalo to, že kontrast je statisticky nevýznamný a danou metodu pro daný parametr bylo možné prohlásit za robustní.

**Rovnice 2.** Výpočet intervalu spolehlivosti kontrastu

$$L_{1,2} = V_i \pm t(1 - \alpha/2; 7) \cdot \frac{SD}{\sqrt{2}}$$

Hodnota odhadu směrodatné odchylky (SD) byla vypočítána obvyklým způsobem ze sedmi měření (*Rovnice 3*).

**Rovnice 3.** Výpočet odhadu hodnoty směrodatné odchylky

$$SD = \frac{1}{7} \sqrt{(r - \bar{x})^2 + \dots + (z - \bar{x})^2}, \text{ kde } \bar{x} = \frac{(r+t+u+v+w+x+y+z)}{8}$$

### 3.3.2 Výsledky testu robustnosti

Pro vyhodnocení robustnosti analytické metody stanovení TCS a HA-TYR jsou jako výsledky měření pro každý analyt a koncentrační hladinu uvedeny hodnoty koncentrací vyjádřené v  $\mu\text{g/ml}$ . Hodnocení bylo prováděno na hladině významnosti  $\alpha = 0,95$ . Aritmetický průměr, směrodatná odchylka, kontrasty  $V_A$ - $V_G$  a intervaly spolehlivosti kontrastů byly vypočteny dle *Rovnic 1 až 3*. Vzhledem k tomu, že relativní směrodatné odchylky (RSD) pro TCS i HA-TYR byly poměrně nízké (pohybovaly se v rozmezí od 3,03 do 12,77%), nebyly jednotlivé výsledky podrobeny testu odlehlosti. Po vyhodnocení výsledků měření byla potvrzena spolehlivost obou analytických metod, neboť hodnotu 0 obsahuje každý interval spolehlivosti kontrastu  $L_{1,2}$ . Žádná z testovaných podmínek nemá vliv na měření a metodu stanovení TCS i HA-TYR lze prohlásit za robustní.

**Tabulka 6.** Výsledky měření pro TYR derivát ( $c = 75 \mu\text{g/ml}$ ) s použitím VS

DERIVÁT/VS	75 $\mu\text{g/ml}$							
Výsledek měření ( $\mu\text{g/ml}$ )	r	t	u	v	w	x	y	z
	73,49	78,27	83,18	66,86	70,44	73,36	67,96	69,31

Hladina významnosti	$\alpha$	0,95	
Kvantil Studentova rozdělení	$t(1-\alpha/2)$	2,364624	
Aritmetický průměr	$\bar{x}$	72,86	
Směrodatná odchylka	$SD$	5,54	
Relativní směrodatná odchylka (%)	$RSD$	7,60	
Kontrast		Interval spolehlivosti kontrastu	
Označení	Hodnota	$L_1$	$L_2$
$V_A$	5,1868	-4,0788	14,4525
$V_B$	2,0597	-7,2059	11,3254
$V_C$	1,8166	-7,4491	11,0823
$V_D$	-1,2025	-10,4681	8,0632
$V_E$	3,9490	-5,3166	13,2147
$V_F$	-5,6691	-14,9348	3,5966
$V_G$	-4,8841	-14,1498	4,3815

**Tabulka 7.** Výsledky měření pro TYR derivát ( $c = 15 \mu\text{g/ml}$ ) s použitím VS

DERIVÁT/VS	15 $\mu\text{g/ml}$							
Výsledek měření ( $\mu\text{g/ml}$ )	r	t	u	v	w	x	y	z
	15,31	14,40	17,54	13,11	17,24	17,02	17,35	16,99

Hladina významnosti	$\alpha$	0,95	
Kvantil Studentova rozdělení	$t(1-\alpha/2)$	2,364624	
Aritmetický průměr	$\bar{x}$	16,12	
Směrodatná odchylka	$SD$	1,65	
Relativní směrodatná odchylka (%)	$RSD$	10,24	
Kontrast		Interval spolehlivosti kontrastu	
Označení	Hodnota	$L_1$	$L_2$
$V_A$	-2,0611	-4,8202	0,6980
$V_B$	-0,2576	-3,0168	2,5015
$V_C$	1,4834	-1,2757	4,2425
$V_D$	-0,2135	-2,9727	2,5456
$V_E$	1,1908	-1,5683	3,9500
$V_F$	-0,9137	-3,6729	1,8454
$V_G$	-0,8468	-3,6059	1,9124

**Tabulka 8.** Výsledky měření pro TYR derivát ( $c = 1 \mu\text{g/ml}$ ) s použitím VS

DERIVÁT/VS	1 $\mu\text{g/ml}$							
Výsledek měření	r	t	u	v	w	x	y	z
( $\mu\text{g/ml}$ )	0,97	0,98	0,96	0,99	0,99	1,04	0,95	1,03

Hladina významnosti	$\alpha$	0,95	
Kvantil Studentova rozdělení	$t(1-\alpha/2)$	2,364624	
Aritmetický průměr	$\bar{x}$	0,99	
Směrodatná odchylka	$SD$	0,03	
Relativní směrodatná odchylka (%)	$RSD$	3,03	
Kontrast		Interval spolehlivosti kontrastu	
Označení	Hodnota	$L_1$	$L_2$
$V_A$	-0,0278	-0,0823	0,0267
$V_B$	0,0141	-0,0404	0,0686
$V_C$	-0,0430	-0,0975	0,0115
$V_D$	-0,0143	-0,0688	0,0402
$V_E$	0,0245	-0,0300	0,0790
$V_F$	0,0093	-0,0452	0,0638
$V_G$	-0,0029	-0,0575	0,0516

**Tabulka 9.** Výsledky měření pro triclosan ( $c = 3,75 \mu\text{g/ml}$ ) s použitím VS

TRICLOSAN/VS	3,75 $\mu\text{g/ml}$							
Výsledek měření	r	t	u	v	w	x	y	z
( $\mu\text{g/ml}$ )	3,72	3,93	4,01	3,79	3,89	3,48	3,40	3,69

Hladina významnosti	$\alpha$	0,95	
Kvantil Studentova rozdělení	$t(1-\alpha/2)$	2,364624	
Aritmetický průměr	$\bar{x}$	3,74	
Směrodatná odchylka	$SD$	0,21	
Relativní směrodatná odchylka (%)	$RSD$	5,61	
Kontrast		Interval spolehlivosti kontrastu	
Označení	Hodnota	$L_1$	$L_2$
$V_A$	0,2450	-0,1122	0,6022
$V_B$	0,0306	-0,3266	0,3878
$V_C$	0,0344	-0,3228	0,3916
$V_D$	-0,1058	-0,4630	0,2514
$V_E$	-0,0316	-0,3888	0,3256
$V_F$	0,0668	-0,2904	0,4240
$V_G$	-0,2845	-0,6417	0,0727

**Tabulka 10.** Výsledky měření pro triclosan ( $c = 0,75 \mu\text{g/ml}$ ) s použitím VS

TRICLOSAN/VS	0,75 $\mu\text{g/ml}$							
Výsledek měření ( $\mu\text{g/ml}$ )	r	t	u	v	w	x	y	z
	0,69	0,75	0,70	0,69	0,72	0,69	0,68	0,76

Hladina významnosti	$\alpha$	0,95	
Kvantil Studentova rozdělení	$t(1-\alpha/2)$	2,364624	
Aritmetický průměr	$\bar{x}$	0,71	
Směrodatná odchylka	$SD$	0,03	
Relativní směrodatná odchylka (%)	$RSD$	4,23	
Kontrast		Interval spolehlivosti kontrastu	
Označení	Hodnota	$L_1$	$L_2$
$V_A$	-0,0076	-0,0588	0,0435
$V_B$	0,0076	-0,0436	0,0587
$V_C$	-0,0245	-0,0756	0,0267
$V_D$	0,0206	-0,0305	0,0718
$V_E$	-0,0016	-0,0528	0,0495
$V_F$	0,0095	-0,0417	0,0606
$V_G$	-0,0452	-0,0963	0,0060

**Tabulka 11.** Výsledky měření pro triclosan ( $c = 0,050 \mu\text{g/ml}$ ) s použitím VS

TRICLOSAN/VS	0,050 $\mu\text{g/ml}$							
Výsledek měření ( $\mu\text{g/ml}$ )	r	t	u	v	w	x	y	z
	0,056	0,040	0,043	0,051	0,046	0,041	0,046	0,056

Hladina významnosti	$\alpha$	0,95	
Kvantil Studentova rozdělení	$t(1-\alpha/2)$	2,364624	
Aritmetický průměr	$\bar{x}$	0,047	
Směrodatná odchylka	$SD$	0,006	
Relativní směrodatná odchylka (%)	$RSD$	12,77	
Kontrast		Interval spolehlivosti kontrastu	
Označení	Hodnota	$L_1$	$L_2$
$V_A$	0,0002	-0,0103	0,0106
$V_B$	-0,0030	-0,0134	0,0075
$V_C$	0,0006	-0,0099	0,0110
$V_D$	0,0044	-0,0060	0,0149
$V_E$	0,0034	-0,0071	0,0138
$V_F$	0,0096	-0,0008	0,0201
$V_G$	0,0019	-0,0085	0,0124

### 3.4 Validace metody

Při validaci posuzujeme, zda jsou parametry analytické metody takové, aby bylo možno touto metodou získat výsledky požadované jakosti.

V rámci validace analytické metody byla nejdříve ověřena její správnost, která je definována jako těsnost shody získané hodnoty s hodnotou skutečnou, či referenční hodnotou. Také byla sledována preciznost měření, tj. těsnost shody mezi naměřenými hodnotami získanými opakovanými měřeními na stejném přístroji za stejných pracovních podmínek v krátkém časovém úseku (opakovatelnost) i delším časovém úseku (mezilehlá preciznost).

Byla připravena kalibrační řada (viz kapitola 2.1.5) včetně 3 vzorků v různých koncentracích (75, 15 a 1  $\mu\text{g/ml}$  pro HA-TYR a 3,75, 0,75 a 0,05  $\mu\text{g/ml}$  pro TCS), které byly upravovány, extrahovány a v každé sérii proměřeny celkem 3x. Takto připravená série se stejným způsobem opakovala během následujících dnů (den 1, 5 a 12). Dále byla ověřována stabilita vzorků po dobu 14 dní při teplotě skladování  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Také byla sledována stabilita po 14 dnech při teplotě skladování  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  se třemi cykly rozmrazeno/zamrazeno. Vzorky byly následně upravovány, extrahovány a měřeny.

#### 3.4.1 Výsledky validace metody

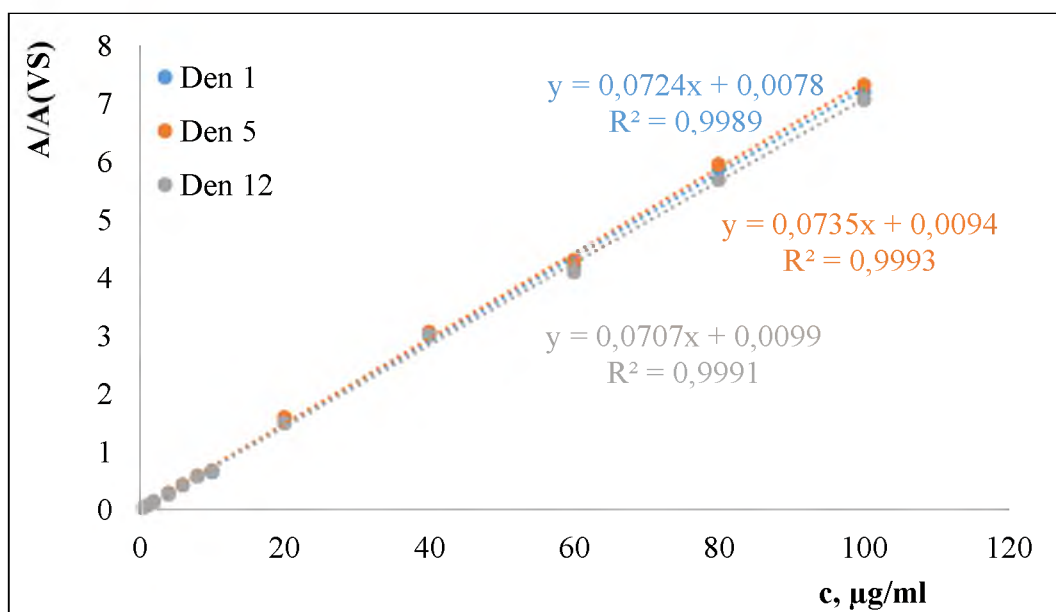
Správnost analytické metody byla ověřena vyjádřením její výtěžnosti. Ověření bylo provedeno na 3 koncentračních hladinách. Výtěžnost analytické metody pro stanovení HA-TYR se pohybovala v rozmezí od 87 do 125 % (Tabulka 12), přičemž nejvyšších odchylek bylo dosaženo na nejnižší koncentrační hladině, 1  $\mu\text{g/ml}$ . Vezmeme-li v úvahu, že byl analyzován derivát s DS 2,3 %, koncentrace  $\Delta\text{HA2-TYR}$  v analyzovaném roztoku ve skutečnosti není 1  $\mu\text{g/ml}$ , ale je zhruba 43x nižší (23  $\text{ng/ml}$ ), byla odchylka od správné hodnoty menší než 25 % považována za dostatečnou.

Opakovatelnost stanovení HA-TYR vyjádřená jako RSD ze tří opakování nabývala hodnot nižších než 9 % (Tabulka 12). Mezilehlá preciznost vyjádřená jako RSD z devíti opakování, které byly získány měřením ve třech dnech (nejedná se o dny za sebou jdoucí, nýbrž kalendářní den 1, 5 a 12), byla rovna 5,74 % (1  $\mu\text{g/ml}$ ), 7,48 % (15  $\mu\text{g/ml}$ ) a 6,68 % (75  $\mu\text{g/ml}$ ). Graf 17 znázorňuje kalibrační přímky z těchto měření. Relativní směrodatná odchylka mezi směnicemi kalibračních přímek byla rovna 1,95 %, co naznačuje stabilitu LC-MS systému během testování.

**Tabulka 12.** Experimentálně zjištěná koncentrace, přesnost a relativní směrodatná odchylka TYR derivátu pro tři různé koncentrace pro měření probíhající během 3 dní. RSD je vyjádřena ze 3 opakování pro každý den a koncentraci

DERI-VÁT/VS	Den 1			Den 5			Den 12		
	c μg/ml	Výtěžnost	RSD	c μg/ml	Výtěžnost	RSD	c μg/ml	Výtěžnost	RSD
1 μg/ml	1,23	123 %	3 %	1,14	114 %	4 %	1,05	105 %	9 %
	1,16	116 %		1,17	117 %		1,25	125 %	
	1,19	119 %		1,08	108 %		1,11	111 %	
15 μg/ml	15,25	102 %	4 %	13,05	87 %	8 %	14,04	94 %	7 %
	16,45	110 %		14,75	98 %		15,12	101 %	
	15,34	102 %		15,26	102 %		13,19	88 %	
75 μg/ml	71,15	95 %	5 %	74,75	100 %	7 %	85,30	114 %	5 %
	78,35	104 %		84,70	113 %		84,19	112 %	
	73,05	97 %		76,59	102 %		77,42	103 %	

**Graf 17.** Kalibrační přímky pro TYR derivát s použitím VS



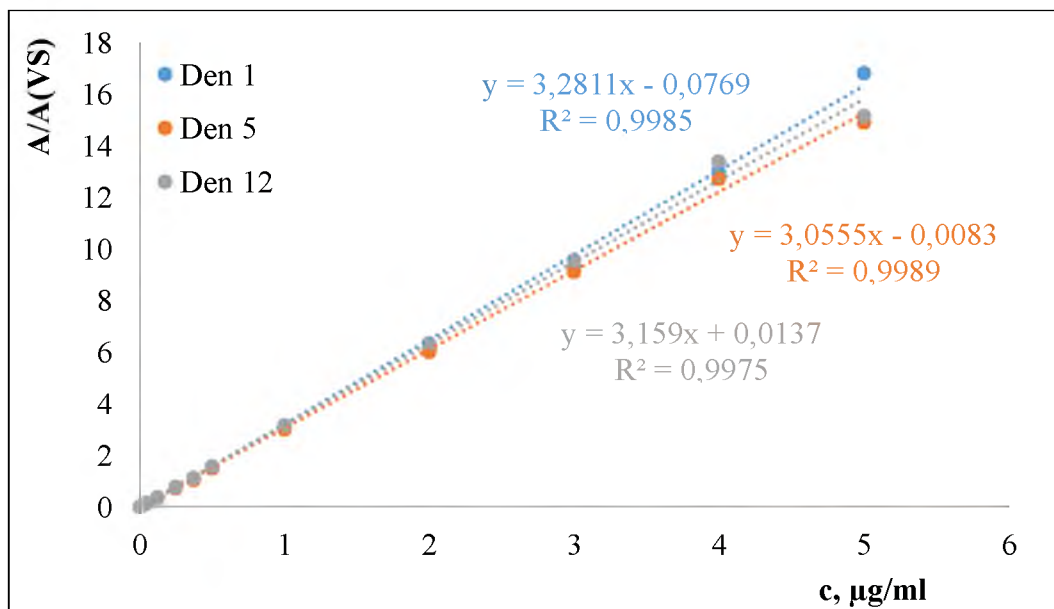
Výtěžnost analytické metody pro stanovení TCS se pohybovala v rozmezí od 86 do 138 % (*Tabulka 13*), přičemž nejvyšších odchylek bylo dosaženo na nejnižší koncentrační hladině, 0,05 μg/ml. Opakovatelnost stanovení TCS vyjádřená jako RSD ze tří opakování nabývala hodnot nižších než 23 % (*Tabulka 13*), přičemž nejhorší opakovatelnosti výsledků bylo dosaženo na nejnižší koncentrační hladině. Tato koncentrace je již na hraně meze kvantifikace TCS. Pro vyšší koncentrační hladiny RSD získané v rámci opakovatelnosti nepřekročilo 10 %. Mezilehlá preciznost vyjádřená jako RSD z devíti opakování, které byly

získány měření ve třech dnech (nejedná se o dny za sebou jdoucí, nýbrž kalendářní den 1, 5 a 12), byla rovna 20,8 % (0,05 µg/ml), 7,78 % (0,75 µg/ml) a 6,94 % (3,75 µg/ml). *Graf 18* znázorňuje kalibrační přímky z těchto měření. LC-MS systém používaný pro testování byl během celé doby poměrně stabilní. Relativní směrodatná odchylka mezi směnicemi kalibračních přímek byla rovna 3,57 %.

**Tabulka 13.** Experimentálně zjištěná koncentrace, přesnost a relativní směrodatná odchylka triclosanu pro tři různé koncentrace pro měření probíhající během 3 dní

TCS	Den 1			Den 5			Den 12		
	c µg/ml	Výtěžnost	RSD	c µg/ml	Výtěžnost	RSD	c µg/ml	Výtěžnost	RSD
0,05 µg/ml	0,07	138 %	14 %	0,06	126 %	23 %	0,07	130 %	8 %
	0,05	104 %		0,04	88 %		0,06	114 %	
	0,06	122 %		0,04	86 %		0,07	132 %	
0,75 µg/ml	0,83	111 %	6 %	0,76	101 %	10 %	0,83	111 %	4 %
	0,91	121 %		0,91	121 %		0,78	104 %	
	0,79	105 %		0,74	98 %		0,76	101 %	
3,75 µg/ml	3,50	93 %	2 %	4,08	109 %	1 %	3,58	95 %	1 %
	3,66	98 %		4,14	110 %		3,62	96 %	
	3,57	95 %		4,11	110 %		3,65	97 %	

**Graf 18.** Kalibrační přímky pro triclosan s použitím VS



Dále byla ověřována stabilita vzorků po dobu 14 dní při teplotě skladování -20 °C a tepelném namáhání vzorků, ze které vyplynulo, že vzorky mohou být při definovaných podmínkách skladovány nejméně během 14 dní.

**Tabulka 14.** Stabilita vzorků po dobu 14 dní při teplotě -20 °C. Vyjádřeno jako výtěžnost analytu po skladování (14 dní, -20 °C).

<b>Teoretická koncentrace TYR derivátu/TCS</b>	<b>TYR DERIVÁT/VS</b>	<b>TCS/VS</b>
1/0,05 µg/ml	118 ± 13 %	103 ± 5
15/0,75 µg/ml	110 ± 12 %	89 ± 6
75/3,75 µg/ml	98 ± 8 %	105 ± 2

**Tabulka 15.** Stabilita vzorků po dobu 14 dní při teplotě -20 °C; rozmrazeno/zamrazeno – 3 cykly. Vyjádřeno jako výtěžnost analytu po uvedeném zacházení se vzorky.

<b>Teoretická koncentrace TYR derivátu/TCS</b>	<b>TYR DERIVÁT/VS</b>	<b>TCS/VS</b>
1/0,05 µg/ml	114 ± 7 %	118 ± 9
15/0,75 µg/ml	107 ± 8 %	106 ± 4
75/3,75 µg/ml	108 ± 5 %	95 ± 1

### 3.5 Výsledky *in vivo* studie myších vzorků

#### 3.5.1 Distribuce v myších orgánech a krvi – TCS a jeho metabolity

V následujících grafech (*Graf 19 až 30*) je zobrazena farmakokinetika TCS, TCS sulfátu (TCS-S), TCS glukuronidu (TCS-GL) ve studovaných biologických vzorcích. Grafy vyjadřují jednak závislost koncentrace studované látky na čase, ale také závislost vyjádřenou v procentech aplikované dávky na čase.

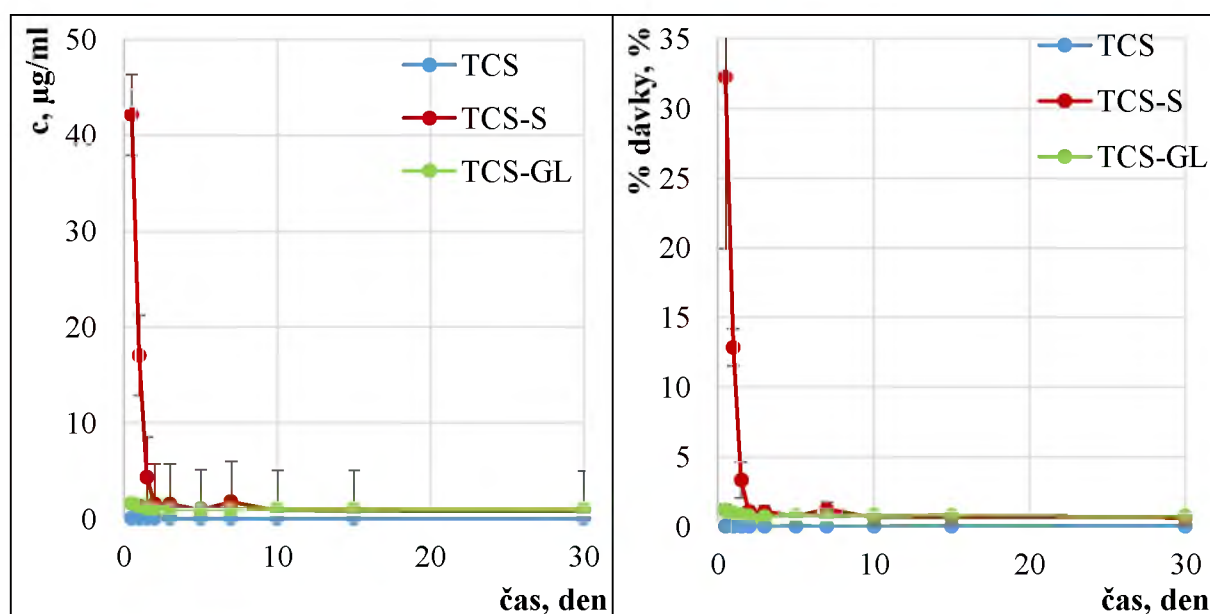
Z výsledků vyplývá, že hlavním metabolitem TCS je TCS-sulfát, na rozdíl od doposud publikované vědecké literatury, kde je jako hlavní metabolit popsán TCS-glukuronid.<sup>27</sup> Z peritonea je TCS velmi rychle absorbován do krevního řečiště ( $T_{max}$  0,5 dne, za tuto dobu je ve zbytku aplikovaného hydrogelu přítomno pouze 8 % aplikované dávky – *Graf 29 a 30*) a dále distribuován do jater, ledvin a sleziny (*Graf 23-28*). Hodnota  $T_{max}$  = 0,5 dne není velmi přesná, protože v kratších časových intervalech nebyla studie provedena. Je pravděpodobné, že tato hodnota by mohla být nižší, podobně jako u intra vaginální aplikace TCS, kde  $T_{max}$  = 2-4 hod.<sup>32</sup> Značná část TCS a jeho metabolitů byla také detekována v přítomnosti krevních buněk



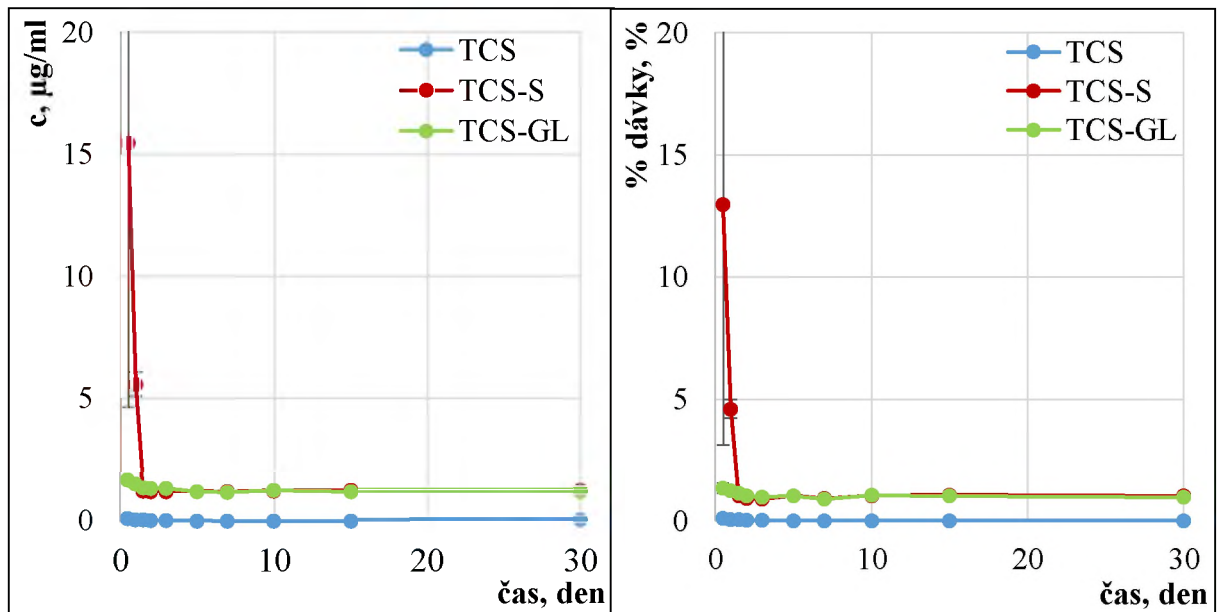
(Graf 21 a 22). Z provedených testů ale nevyplývá, zda se tyto látky na krevní buňky vážou, protože analyzované buňky nebyly před analýzou nijak promývány. Stanovené množství tedy může odpovídat TCS a jeho metabolitům nacházejících se v krevní plazmě. Poločas eliminace ( $T_{1/2}$ ) TCS-S, TCS-GL a TCS v krevní plazmě je 7, 58 a 33 hod. Tyto hodnoty jsou ale taktéž závislé na čase vzorkování. Podobné hodnoty (18 a 13 hod.) byly publikovány již dříve pro intraperitoneálně aplikovaný TCS potkanům a morčatům.<sup>33</sup>  $T_{1/2}$  TCS v krvi rovný 8,8 hod. byl také stanoven pro intravenózně aplikovaný TCS (dávka 5 mg/kg váhy zvířete) potkanům rodu Wistar.<sup>32</sup>

Pro myši byl také stanoven poločas eliminace TCS játry (8 hod.) po orální aplikaci myším.<sup>34</sup> Z naměřených dat v rámci diplomové práce byl jaterní  $T_{1/2}$  rovný 11 hod. pro TCS i TCS-S.  $T_{1/2}$  u jater pro TCS-GL byla rovna 90 hodin. Tato hodnota ale nedává smysl a je nadhodnocená zejména tím, že obsah TCS-GL v játrech je ve všech časových intervalech velmi nízký. Na rozdíl od TCS a TCS-S, byl TCS-GL distribuován více do ledvin než do jater. Eliminace TCS a jeho metabolitů je téměř ukončena v čase do 2 dnů od intraperitoneálního podání hydrogelu s obsahem TCS. V delších časových intervalech bylo ve všech analyzovaných orgánech, tkáních a tělních tekutinách detekováno velmi malé množství TCS a jeho metabolitů. Zbytkový obsah TCS v aplikovaném hydrogelu byl méně než 2 % z aplikované dávky.

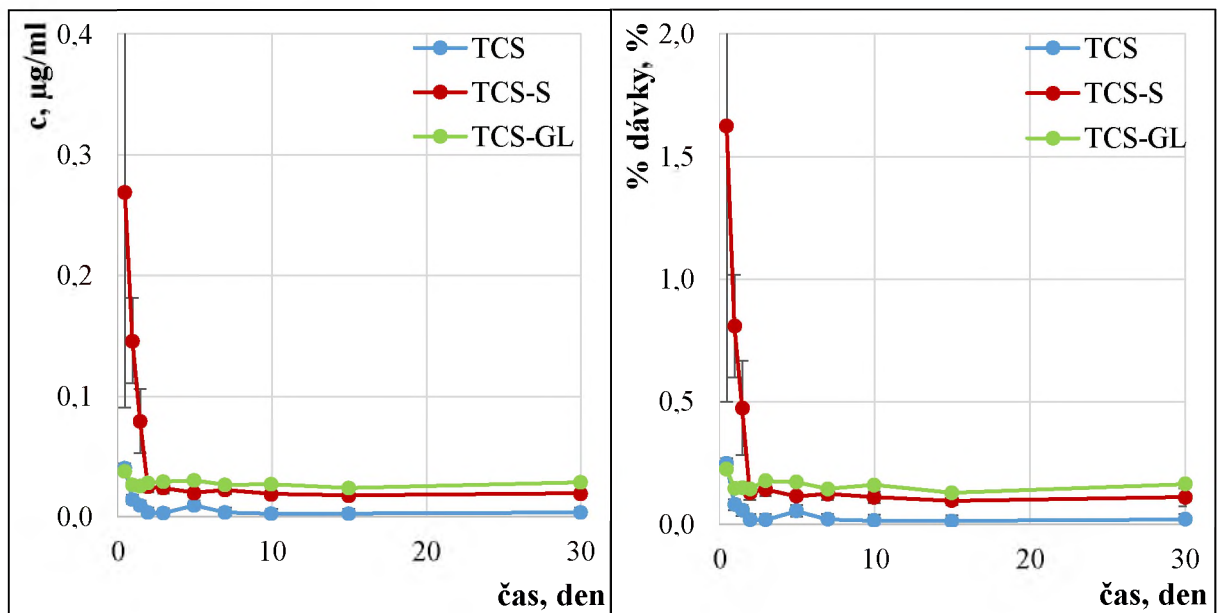
**Graf 19, 20.** Koncentrace TCS, TCS-S a TCS-GL v krevní plazmě v závislosti na čase



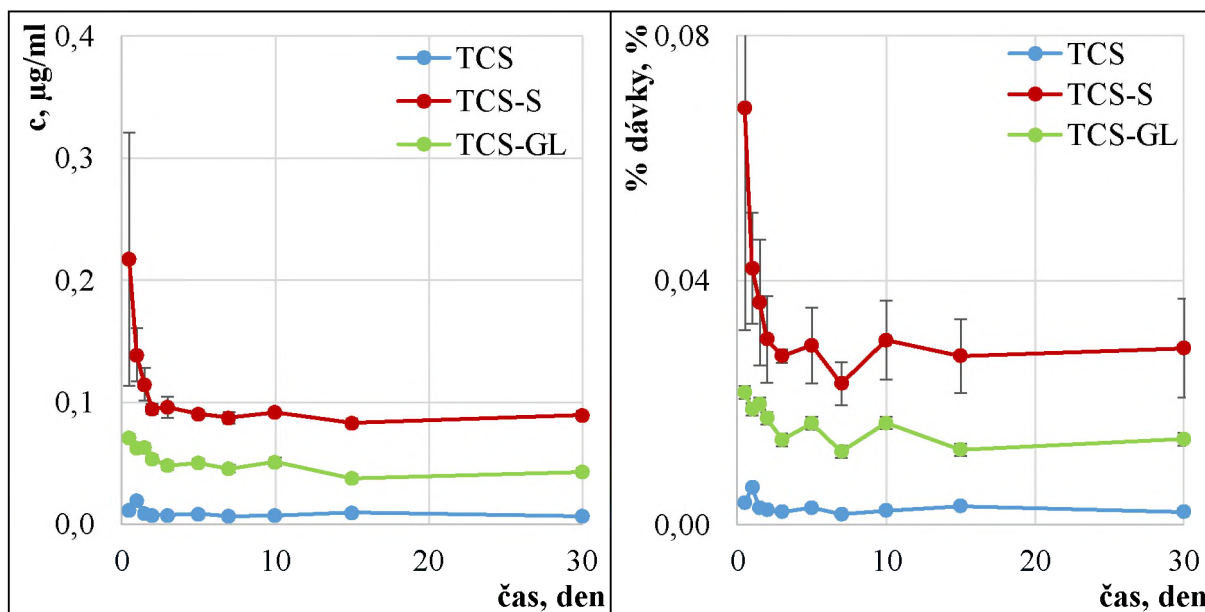
**Graf 21, 22.** Koncentrace TCS, TCS-S a TCS-GL v krevních buňkách v závislosti na čase



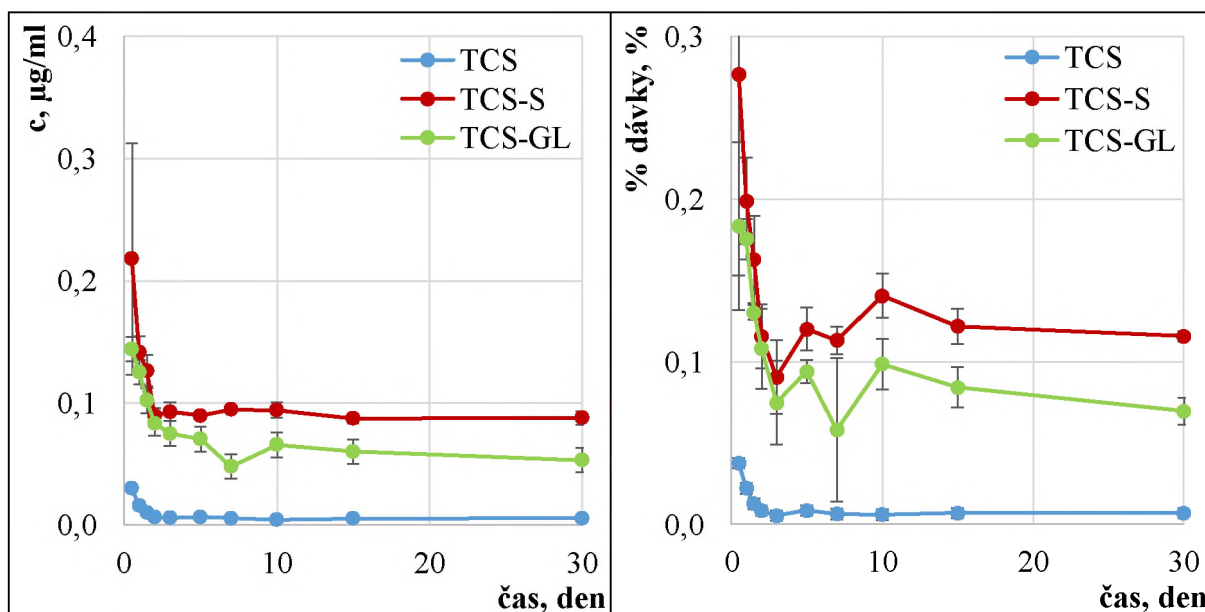
**Graf 23, 24.** Koncentrace TCS, TCS-S a TCS-GL v játrech v závislosti na čase



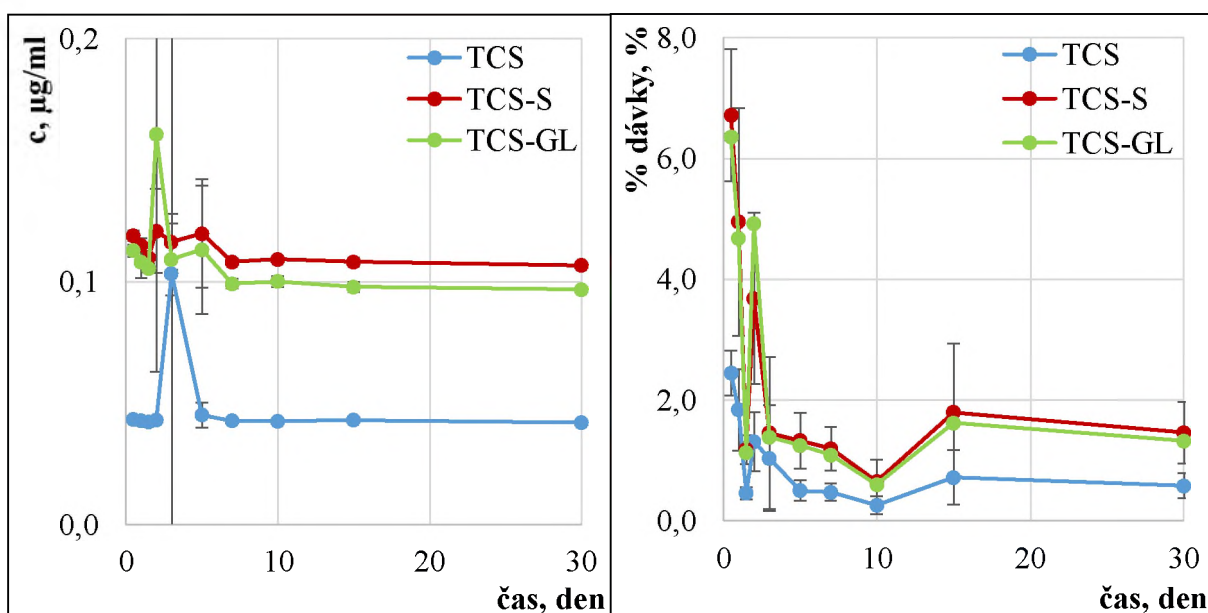
Graf 25, 26. Koncentrace TCS, TCS-S a TCS-GL ve slezině v závislosti na čase



Graf 27, 28. Koncentrace TCS, TCS-S a TCS-GL v ledvinách v závislosti na čase



**Graf 29, 30.** Koncentrace TCS, TCS-S a TCS-GL ve zbytku materiálu v závislosti na čase

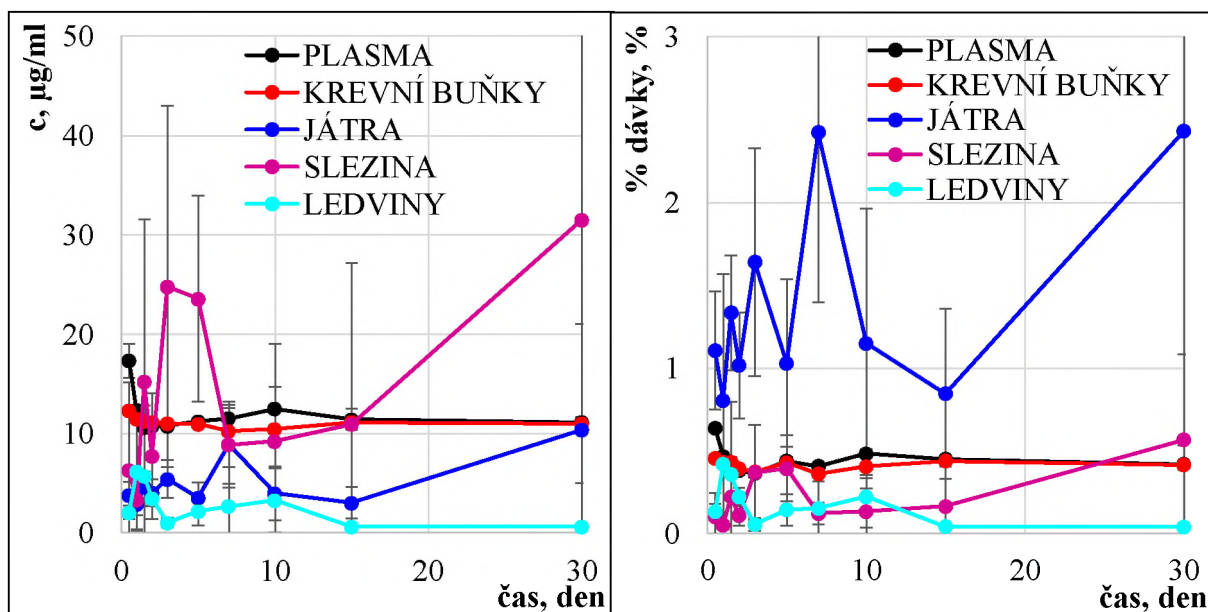


### 3.5.2 Distribuce v myších orgánech a krvi – tyraminový derivát

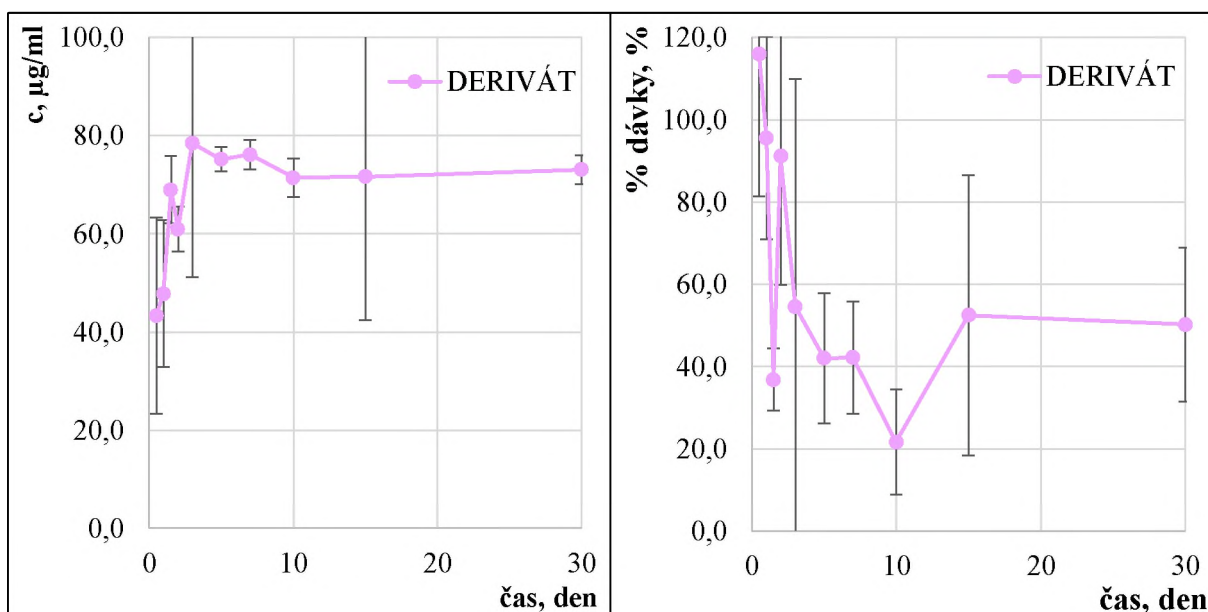
V následujících grafech (*Graf 31 až 34*) je zobrazena distribuce tyraminového derivátu ve studovaných biologických vzorcích. Grafy vyjadřují jednak závislost koncentrace studované látky na čase, ale také závislost vyjádřenou v procentech aplikované dávky na čase.

Na rozdíl od TCS, je tyraminový derivát/hydrogel absorbován z peritonea myši velmi pomalu. I 30 dnů od aplikace bylo v peritoneu analyzováno zhruba 50 % podaného materiálu (*Graf 34*), co značí velmi omezenou absorpci. Obsah tyraminového derivátu při aplikaci je 2 % a tomu při použitém způsobu zpracování vzorků odpovídá koncentrace při analýze zhruba 40 µg/ml. Téměř 98 % hydrogelu je voda. Z výsledků je zřejmé (*Graf 33*), že obsah HA-TYR v materiálu, který se nachází v peritoneu myši, se zvyšuje na zhruba dvojnásobek. Je to zřejmě způsobeno tím, že obsah vody v aplikovaném hydrogelu je příliš vysoký a po dostatečně dlouhé době se tento obsah sníží na přirozenou hodnotu (zřejmě kolem 96 %). Tento údaj je možné podpořit dalšími daty Contipro, které byly získány v *in vivo* studiích při intraperitoneální aplikaci suchých filmů na bázi hyaluronanu (*osobní sdělení M. Hermannová*). V tomto případě je obsah derivátu a vody ve filmu při aplikaci rovný 90, resp. 10 %. V průběhu času obsah derivátu poklesne na hodnotu zhruba 4 % a zbytek je tvořen absorbovanými proteiny (asi 2 %) a vodou.

**Graf 31, 32.** Koncentrace TYR derivátu ve vybraných tělních tekutinách a orgánech v závislosti na čase



**Graf 33, 34.** Koncentrace TYR derivátu ve zbytku materiálu v závislosti na čase

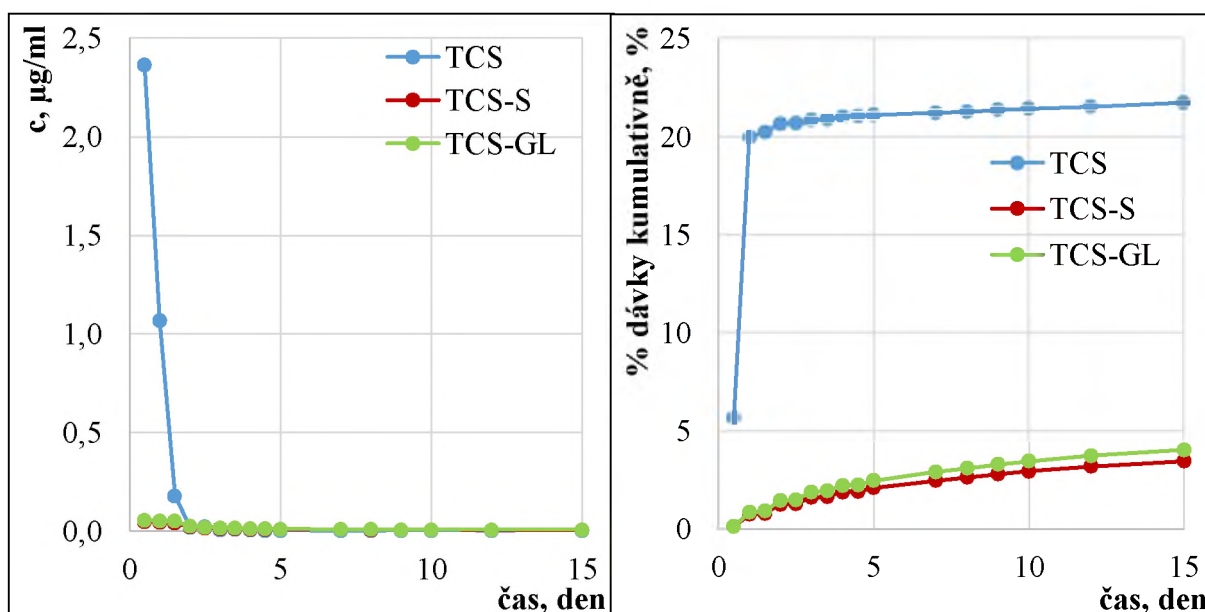


### 3.5.3 Vylučování TCS a jeho metabolitů a tyraminového derivátu

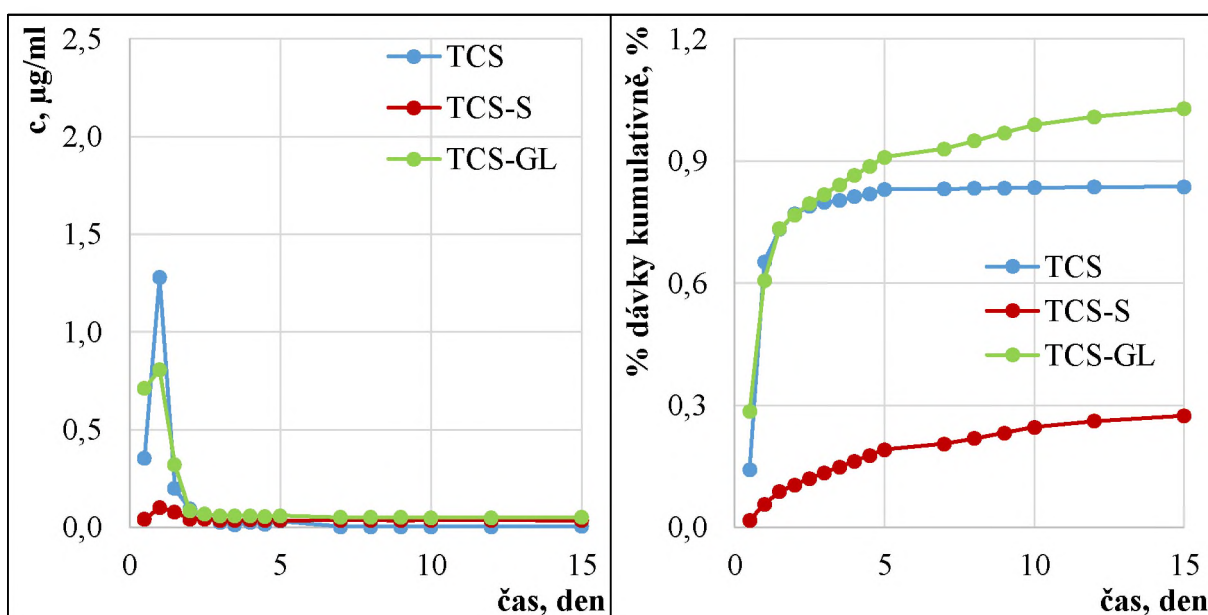
Následující grafy sumarizují vylučování TCS a jeho metabolitů stolicí a močí (*Graf 35 až 38*). Vylučování tyraminového derivátu je vyobrazeno v *Grafech 39 a 40*. Grafy vyjadřují jednak závislost koncentrace studované látky na čase, ale také závislost vyjádřenou v procentech aplikované dávky na čase.

Vylučování TCS a jeho metabolitů se liší v závislosti od jedince. U myši a potkanů převažuje vylučování játry přes žluč, u morčat převládá distribuce do ledvin doprovázená vylučováním TCS a jeho metabolitů močí.<sup>27</sup> U člověka jsou TCS a jeho metabolity primárně vylučovány močí a exkrece stolicí je popsána jako sekundární.<sup>35</sup> Vylučování TCS a jeho metabolitů je v souladu s literaturou, protože stolicí bylo vyloučeno zhruba 30 % a močí pouze 2,5 % aplikované dávky TCS (*Graf 36* vs. *Graf 38*). Celkově bylo ve formě TCS, TCS-S a TCS-GL vyloučeno zhruba 35 % aplikovaného TCS. V rámci diplomové práce však nebyly analyzovány všechny jeho metabolity. Tulp a kol.<sup>36</sup> popsali 5 hydroxylovaných metabolitů TCS, které byly vyloučeny močí. 3 z nich byly také nalezeny ve stolicí. Dalšími popsány metabolity TCS jsou produkty štěpení etherové vazby, a to 2,4-dichlorofenol a 4-chlorokatechol. Z hlediska látkové bilance TCS je nutné v odebraných vzorcích stanovit i tyto další látky.

**Graf 35, 36.** Koncentrace TCS, TCS-S a TCS-GL ve stolicí v závislosti na čase

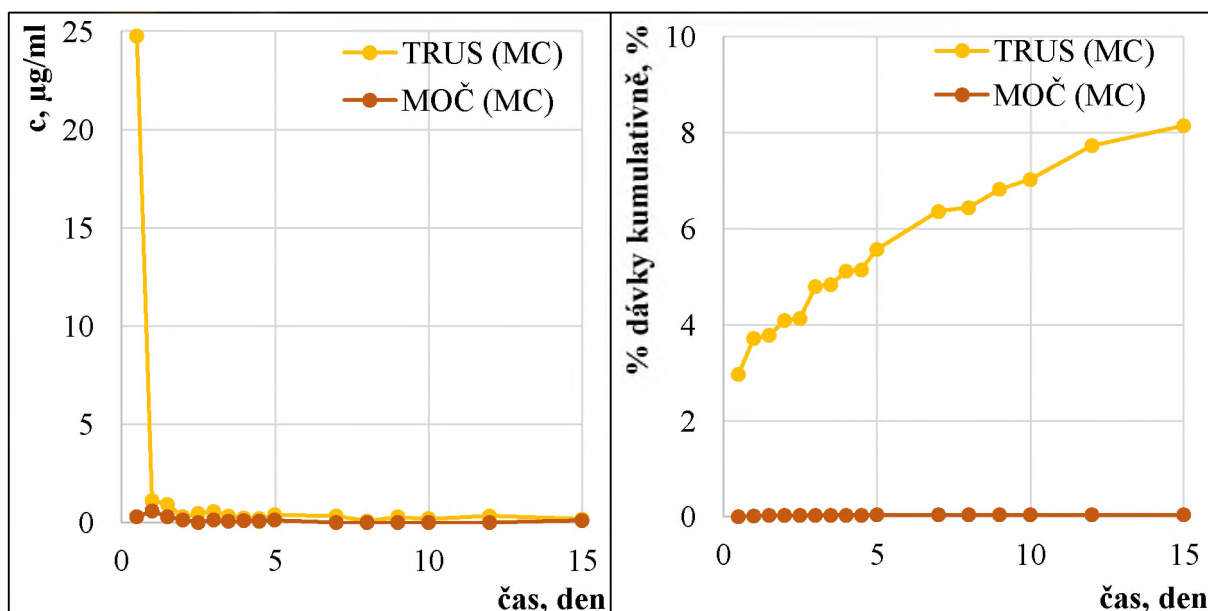


**Graf 37, 38.** Koncentrace TCS, TCS-S a TCS-GL v moči v závislosti na čase



Tyraminový derivát/hydrogel je také převážně vylučován stolicí (*Graf 40*). Ve sledovaných časech však bylo ještě téměř 50 % materiálu přítomno v peritoneu myši. Farmakokinetika derivátů na bázi hyaluronanu není prozatím popsána. Nadále zůstává otázkou, zda je derivát vylučován v nezměněné formě nebo jestli může být metabolizován.

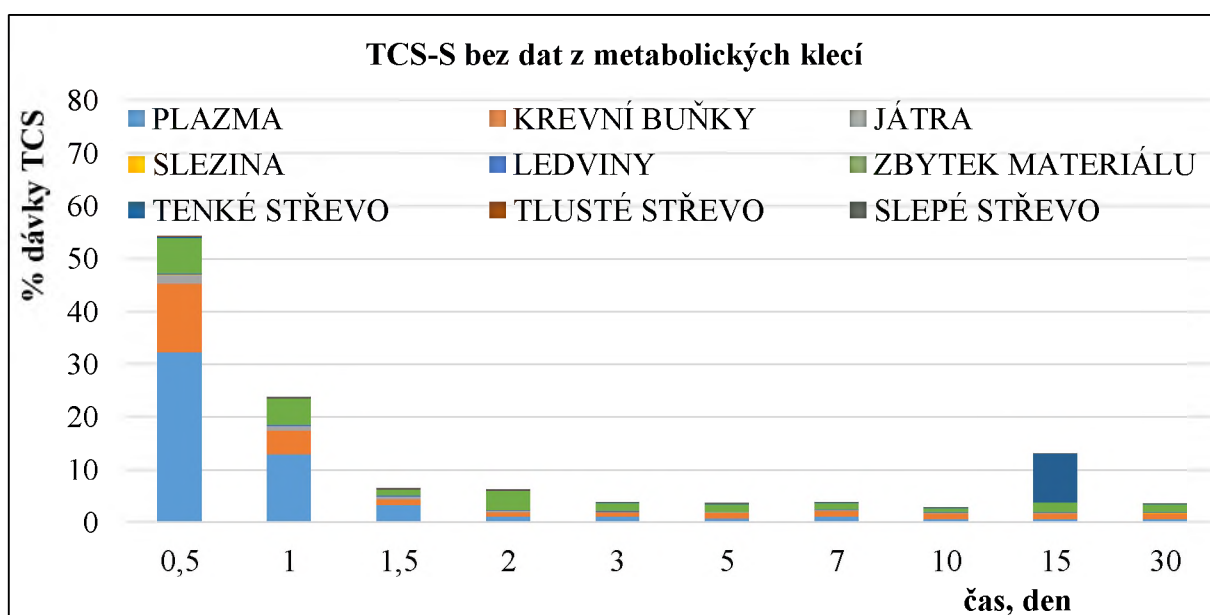
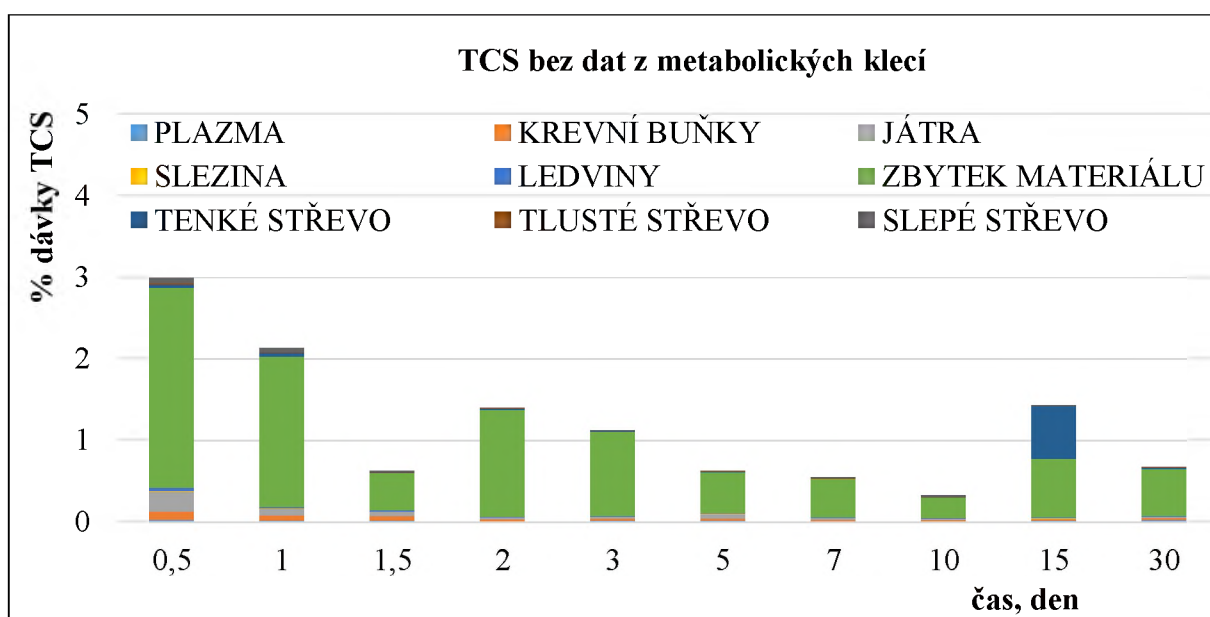
**Graf 39, 40.** Koncentrace TYR derivátu ve stolici a moči v závislosti na čase



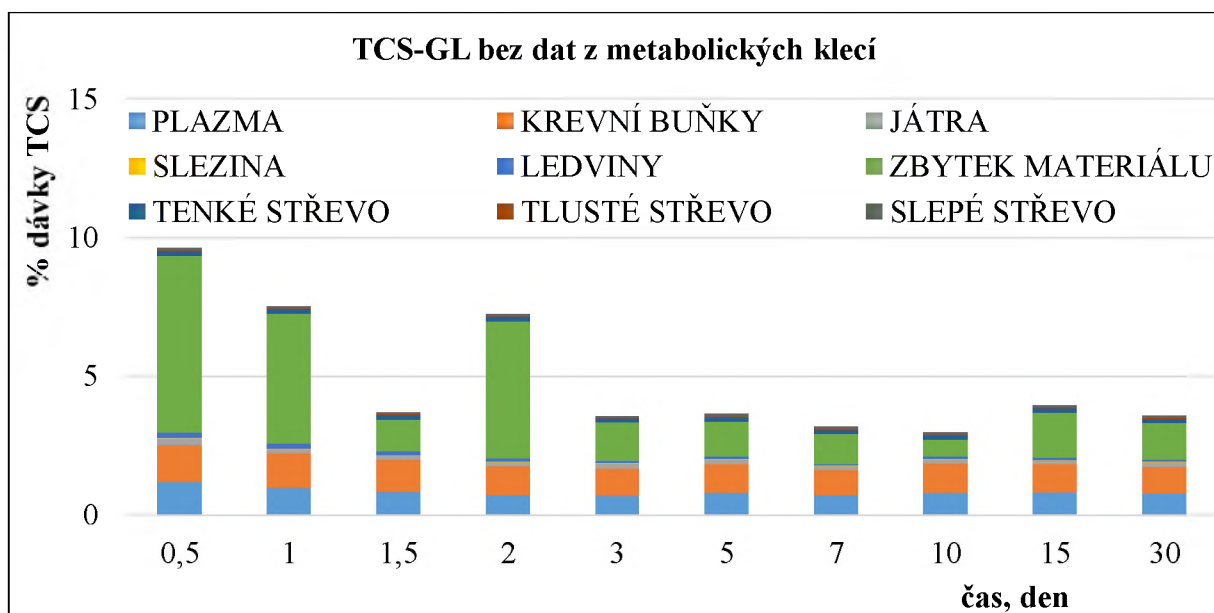
### 3.5.4 Distribuce v myších orgánech a krvi – souhrn

Souhrnná orgánová distribuce triclosanu a jeho metabolitů je vyobrazena v *Grafech 41 až 43*. Podobně jsou data shrnuta i pro tyraminový derivát (*Graf 44*). Grafy názorně shrnují výsledky popsané v předchozích částech. Je znázorněn kumulativní obsah analytu v jednotlivých orgánech/tělních tekutinách/materiálu vyjádřený v procentech aplikované dávky v závislosti na čase. Grafy sumarizují i výsledky z ostatních sledovaných tkání, orgánů či tělních tekutin. Z naměřených dat vyplývá, že dříve nepopsané orgány a tělní tekutiny nejsou z hlediska distribuce, metabolismu a vylučování TCS a HA-TYR klíčové.

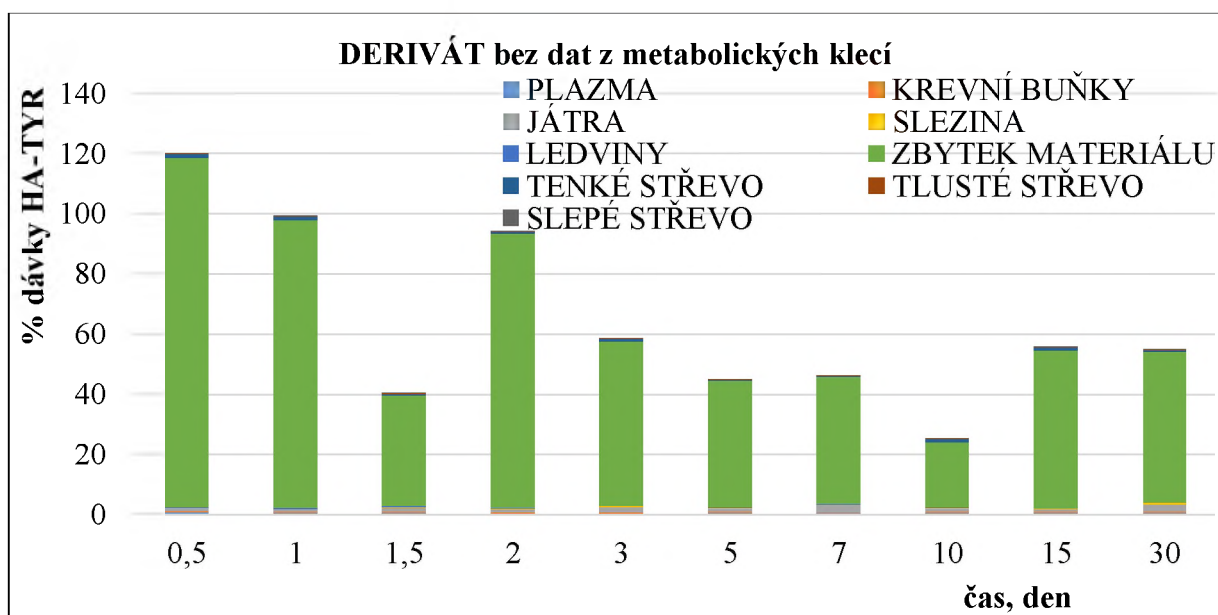
*Graf 41, 42, 43.* Souhrnná distribuce TCS, TCS-S a TCS-GL







**Graf 44.** Souhrnná distribuce tyraminového derivátu



## 4 Závěr

V diplomové práci byly zavedeny metody stanovení TCS a jeho metabolitů a tyraminového derivátu. Tyraminový derivát hyaluronanu je možné kvantifikovat po enzymatické degradaci hyaluronan lyázou. Typickými fragmenty hydrogelu na bázi tyraminového derivátu hyaluronanu jsou nenasycené nemodifikované disacharidy ( $\Delta$ HA2, v rámci diplomové práce nebyly studovány) a nenasycené modifikované disacharidy (modifikace pomocí tyraminu s linkerem  $\Delta$ HA2-TYR a spojení dvou modifikovaných disacharidů přes dityramin  $\Delta$ HA2-DITYR- $\Delta$ HA2).

Pro všechny studované látky byly optimalizovány parametry důležité z hlediska stanovení pomocí hmotnostní spektrometrie, zejména polarita, napětí na „sample cone“, napětí na kapiláře a teplota a průtok sušícího plynu. Pro každý analyt byla následně optimalizována kolizní energie s cílem dosáhnout co nejnižšího limitu detekce daného analytu.

Pro všechny studované látky byly metody ověřeny z hlediska přesnosti a robustnosti. Kromě toho byla ověřena linearita v rozsahu koncentrací 0,1-100  $\mu$ g/ml (tyraminový derivát/hydrogel), resp. 5-5000 ng/ml (TCS a jeho metabolity). Vyvinuté metody jsou aplikovatelné pro farmakokinetickou studii intraperitoneálně aplikovaného hydrogelu na bázi tyraminového derivátu hyaluronanu s obsahem TCS.

Hlavním metabolitem TCS je TCS-sulfát. Z peritonea je TCS velmi rychle absorbován do krevního řečiště a dále játry, ledvinami a slezinou. Značná část TCS a jeho metabolitů byla také detekována v přítomnosti krevních buněk. Z výsledků ale nevyplývá, zda se tyto látky na krevní buňky vážou, protože analyzované buňky nebyly před analýzou nijak promývány. Eliminace TCS a jeho metabolitů je ukončena v čase do 2 dnů od intraperitoneálního podání hydrogelu s obsahem TCS. V delších časových intervalech je detekováno pouze zbytkové množství TCS, které odpovídá zhruba 2 % z aplikované dávky. TCS je převážně vylučován stolicí.

Na rozdíl od TCS, je tyraminový derivát/hydrogel absorbován z peritonea myši velmi pomalu. I 30 dnů od aplikace bylo v peritoneu analyzováno zhruba 50 % podaného materiálu, co značí velmi omezenou absorpci. V průběhu studie byl tyraminový derivát detekován také v játrech a slezině. Jeho absorpce ledvinami je z důvodu vysoké molekulové hmotnosti velmi nízká, derivát byl vylučován stolicí.

Výsledky z provedené studie naznačily chování hydrogelu se zabudovanou nízkomolekulární látkou v peritoneu myši. Prozatím nebylo zjišťováno, zda je tyraminový derivát metabolizován *in vivo*. Také nebyl testován vliv stupně zesílení tyraminového derivátu

na rychlost absorpce z peritonea. Tato data by byla potřebná pro další směřování výzkumu v této oblasti aplikace.

## 5 Seznam použitých zdrojů

1. GUPTA, V., JAIN, A. D. K., GILL, N. S. & GUPTA, K. Development and validation of HPLC method - a review. *Int. Res. J. Pharm. Appl. Sci.* **2**, 17–25 (2012).
2. JANDERA, P. Pokroky v současné vysokoúčinné kapalinové chromatografii. *Chemagazín* **2**, 8–10 (2016).
3. FISCHER, J. ČESLA, P. *Kapalinová chromatografie*. Pardubice: Univerzita Pardubice, FCHT, Ústav analytické chemie, 23. 4. 2019. <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/pokrocila-instrum-analyza/kapalinova-chromatografie.pdf>.
4. High Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principle, Types, Instrumentation and Applications. *LaboratoryInfo.com* [online]. Copyright © 2020 [cit. 21.04.2020]. Dostupné z: <https://laboratoryinfo.com/hplc/>. <https://laboratoryinfo.com/hplc/>.
5. HOLČAPEK, M. Výuka - Hmotnostní spektrometrie v organické analýze. *Mass Spectrometry Group at University of Pardubice* [online]. Copyright © 2006 [cit. 21.04.2020]. Dostupné z: <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>. <http://holcapek.upce.cz/vyuka-ms-org-anal.php>.
6. PITT, J. J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin. Biochem. Rev.* **30**, 19–34 (2009).
7. NECAS, J., BARTOSIKOVA, L., BRAUNER, P. & KOLAR, J. Hyaluronic acid (hyaluronan): A review. *Vet. Med. (Praha)*. **53**, 397–411 (2008).
8. HERMANNOVÁ, M. *Studium degradačních produktů derivátů hyaluronanu na bázi tyraminu*. Dolní Dobrouč, 2014. Zpráva k ukončení dlouhodobého cíle. Contipro a.s.
9. Contipro Biotech s.r.o., D. D. Deriváty na bázi kyseliny hyaluronové schopné tvořit hydrogely na bázi těchto derivátů, způsob jejich přípravy a použití. Inventors: WOLFOVA, L., PRAVDA, M., FOGLEAROVA, M., NEMCOVA, M., NIEDOBA, K., VELEBNY, V. CZ 302503 B6. 25. 4. 2013.
10. Hyaluronic acid. *The Merck Index\* online* [online]. Whitehouse Station (New Jersey): Royal Society of Chemistry, ©2020. Last Revised 2013. [cit.18.3.2020]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m6066/hyaluronic%20acid?q=authorize>.
11. BLUNDELL, C. D. & ALMOND, A. Enzymatic and chemical methods for the generation of pure hyaluronan oligosaccharides with both odd and even numbers of monosaccharide units. *Anal. Biochem.* **353**, 236–247 (2006).
12. DARR, A. & CALABRO, A. Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **20**, 33–44 (2009).

13. SCHANTÉ, C. E., ZUBER, G., HERLIN, C. & VANDAMME, T. F. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* **85**, 469–489 (2011).
14. Van VLIERBERGHE, S., DUBRUEL, P. & SCHACHT, E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: A review. *Biomacromolecules* **12**, 1387–1408 (2011).
15. BARBUCCI, R. E. *Structure-Property Relationships in Hydrogels*. Hydrogels: Biological Properties and Applications. Milan: Springer, 2009. ISBN 978-88-470-1103-8.
16. SLAUGHTER, B. V., KHURSHID, S. S., FISHER, O. Z., KHADEMHOSEINI, A. & PEPPAS, N. A. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv. Mater.* **21**, 3307–3329 (2009).
17. *Formy a speciality hyaluronanu*. *Contipro.cz* [online]. Contipro a.s., © 2017 [cit. 21.04.2020]. Dostupné z: <https://www.contipro.cz/portfolio/formy-a-speciality-hyaluronanu>.
18. LEE, F., CHUNG, J. E. & KURISAWA, M. An injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogel system for protein delivery. *J. Control. Release* **134**, 186–193 (2009).
19. Tyramine. *The Merck Index\* online* [online]. Whitehouse Station (New Jersey): Royal Society of Chemistry, ©2020. Last Revised 2013. [cit.18.3.2020]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m11286/tyramine?q=authorize>.
20. YOSHIDA, H. *et al.* A simple liquid chromatographic method based on intramolecular excimer-forming derivatization and fluorescence detection for the determination of tyrosine and tyramine in urine. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **821**, 88–93 (2005).
21. GOSETTI, F., MAZZUCCO, E., GENNARO, M. C. & MARENCO, E. Simultaneous determination of sixteen underivatized biogenic amines in human urine by HPLC-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 907–916 (2013).
22. LOEBEL, C., D'ESTE, M., ALINI, M., ZENOBI-WONG, M. & EGLIN, D. Precise tailoring of tyramine-based hyaluronan hydrogel properties using DMTMM conjugation. *Carbohydr. Polym.* **115**, 325–333 (2015).
23. Triclosan. *The Merck Index\* online* [online]. Whitehouse Station (New Jersey): Royal Society of Chemistry, ©2020. Last Revised 2013. [cit.18.3.2020]. Dostupné z: <https://www.rsc.org/Merck-Index/monograph/m11092/triclosan?q=authorize>.
24. WU, J. L., LIU, J. & CAI, Z. Determination of triclosan metabolites by using in-source fragmentation from high-performance liquid chromatography/negative atmospheric

- pressure chemical ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **24**, 1828–1834 (2010).
25. BHARGAVA, H. N. & LEONARD, P. A. Triclosan: Applications and safety. *Am. J. Infect. Control* **24**, 209–218 (1996).
  26. FANG, J. L., VALANDINGHAM, M., GAMBOA da COSTA, G., BELAND, A. F. Absorption and Metabolism of Triclosan After Application to the Skin of B6C3F1 Mice. *Environ. Toxicol.* **26**, 146–152 (2014).
  27. FANG, J. L. *et al.* Occurrence, efficacy, metabolism, and toxicity of triclosan. *J. Environ. Sci. Heal. - Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* **28**, 147–171 (2010).
  28. WU, J., YUE, H., CAI, Z. Investigation on metabolism and pharmacokinetics of triclosan in rat plasma by using UPLC-triple quadrupole MS. *Chinese J. Chromatogr.* **27**, 724–730 (2009).
  29. YE, X., KUKLENYIK, Z., NEEDHAM, L. L. & CALAFAT, A. M. Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for the determination of nine environmental phenols in urine. *Anal. Chem.* **77**, 5407–5413 (2005).
  30. PROVENCHER, G. *et al.* Determination of bisphenol A, triclosan and their metabolites in human urine using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1348**, 97–104 (2014).
  31. ŠIMEK, M. *et al.* LC–MS/MS study of in vivo fate of hyaluronan polymeric micelles carrying doxorubicin. *Carbohydr. Polym.* **209**, 181–189 (2019).
  32. SIDDIQUI, W. H. & BUTTAR, H. S. Pharmacokinetics of triclosan in rat after intravenous and intravaginal administration. *J. Environ. Pathol. Toxicol* **2**, 861–871 (1979).
  33. BLACK, J. G. & HOWES, D. Percutaneous absorption of Triclosan from toilet preparations. *J. Soc. Cosmet. Chem. Japan* **26**, 205–215 (1975).
  34. KANETOSHI, A., OGAWA, H., KATSURA, E., OKUI, T. & KANESHIMA, H. Disposition and excretion of Irgasan® DP300 and its chlorinated derivatives in mice. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **17**, 637–644 (1988).
  35. SANDBORGH, G., ADOLFSSON, M., ODHAM, G. & EKSTRAND, J. Pharmacokinetics of triclosan following oral ingestion in humans. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* **69**, 1861–1873 (2006).
  36. TULP, M. T. M., SUNDSTRÖM, G., MARTRON, L. B. J. M. & HUTZINGER, O. Metabolism of chlorodiphenyl ethers and irgasan® DP 300. *Xenobiotica* **9**, 65–77 (1979).