

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra analytické chemie



**ANALÝZA GLYKOSAMINOGLYKANŮ HMOTNOSTNÍ
SPEKTROMETRIÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:

Bc. Kateřina Janíková

Studijní program:

Chemie

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Petr Bednář, Ph.D.

Olomouc 2015

Souhrn

Předložená diplomová práce se zabývá testováním možností analýzy glykosaminoglykanů (dermatan a heparan sulfátu) v preparátu Sulodexid v biologických tekutinách metodou tandemové hmotnostní spektrometrie ve spojení s výsokoúčinnou kapalinovou chromatografií (LC-MS/MS).

Práce je rozdělena do několika kapitol. V teoretické části jsou popsány biologické vlastnosti, struktura a možnosti analýzy nejvýznamnějších glykosaminoglykanů. Dále jsou v této kapitole popsány principy technik, které byly pro analýzu dermatan a heparan sulfátu použity.

Experimentální část práce je věnována vývoji metody umožňující monitorování hladiny Sulodexidu v krevní plazmě a v moči. Byly testovány dva přístupy. První přístup byl založen na převedení dermatan a heparan sulfátu methanolýzou bezvodým roztokem kyseliny chlorovodíkové v methanolu na methylované disacharidy. Byl prostudován proces fragmentace těchto derivátů v kolizní cele hmotnostního spektrometru. Charakteristické fragmenty byly využity pro analýzu těchto látek tandemovou MS. Produkty methanolýzy měly využitelnou retenci na reverzní fázi a byly dobře ionizovány v elektrospreji.

Druhý postup vycházel z LC-MS/MS analýzy nederivatizovaného dermatan a heparan sulfátu. Pro analýzu složek Sulodexidu bez předchozí derivatizace byly testovány možnosti jejich separace zejména v HILIC módu a na reverzní fázi. Optimalizovaná metoda umožňuje citlivou analýzu glykosaminoglykanů v moči (LOQ = 3 mg/l).

Klíčová slova: glykosaminoglykany, dermatan sulfát, heparan sulfát, hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie

Summary

This diploma thesis is focused on possibilities of analysis of glycosaminoglycans (dermatan and heparan sulfate) in preparation Sulodexide in biological fluids by high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

The thesis is divided into several chapters. The theoretical part describes structures, biological properties of the most important glycosaminoglycans and possible approaches for their analysis. Principles of particular analytical techniques are discussed as well.

The experimental part of work is focused on development of method for monitoring the levels of Sulodexide in blood plasma and urine. Two approaches were tested. First approach is based on the conversion of dermatan and heparan sulfate by methanolysis with anhydrous solution of hydrochloric acid in methanol to appropriate methylated disaccharides. Processes occurring during fragmentation of those derivatives in collision cell of mass spectrometer were studied. Characteristic fragments can be used for analysis of those compounds by tandem MS. Products of methanolysis exhibit a good retention on reverse phase and they were well ionised in electrospray.

The second approach was based on measurement of underivatized dermatan and heparan sulfate. Possibilities of their separation especially in HILIC and reverse phase were tested. Optimized method allows sensitive analysis of glykosaminoglycanes in urine (LOQ = 3 mg/l).

Keywords: glycosaminoglycans, dermatan sulfate, heparan sulfate, mass spectrometry, liquid chromatography

Já, Kateřina Janíková, prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem doc. RNDr. Petra Bednáře, Ph.D. Veškerá použitá literaturu a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 24. 4. 2015

.....

Kateřina Janíková

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé diplomové práce panu doc. RNDr. Petru Bednářovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a připomínky, které mi poskytl při vykonávání zadané práce, rodině a přátelům za podporu a také všem zaměstnancům Katedry analytické chemie za ochotu a vstřícnost.

Obsah

1 Úvod	8
2 Teoretická část	9
2.1 Glykosaminoglykany	9
2.1.1 <i>Přehled nejvýznamnějších GAGs</i>	9
2.1.1.1 Kyselina hyaluronová	9
2.1.1.2 Chondroitin-4-sulfát a chondroitin-6-sulfát	10
2.1.1.3 Dermatan sulfát	11
2.1.1.4 Keratan sulfát	12
2.1.1.5 Heparan sulfát a heparin	13
2.1.2 <i>Sulodexid</i>	14
2.1.3 <i>Mukopolysacharidóza</i>	14
2.2 Instrumentální metody použité pro analýzu GAGs	15
2.2.1 <i>Kapalinová chromatografie</i>	15
2.2.1.1 Kapalinová chromatografie na reverzních fázích	16
2.2.1.2 HILIC a ZIC-HILIC	17
2.2.1.2.1 Zwitteriontové stacionární fáze	19
2.2.2 <i>Hmotnostní spektrometrie (MS)</i>	20
2.2.2.1 Iontové zdroje	20
2.2.2.1.1 Ionizace elektrosprejem (ESI)	21
2.2.2.2 Hmotnostní analyzátory	22
2.2.2.2.1 Kvadrupólový analyzátor (Q)	23
2.2.2.2.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie	24
2.2.2.2.3 Trojitý kvadrupól (QqQ)	24
2.3 Metody stanovení glykosaminoglykanů	25
2.3.1 <i>Stanovení GAGs technikou MS</i>	27
2.3.1.1 Analýza GAGs technikou ESI-MS	28
2.3.2 <i>Stanovení GAGs technikou LC/MS</i>	29
2.3.3 <i>Stanovení GAGs technikou CE</i>	32
3 Cíl práce	34
4 Experimentální část	35
4.1 Chemikálie a analyzované materiály	35
4.2 Instrumentace	35
4.2.1 <i>Přístroje</i>	35
4.2.1.1 Nastavení přístrojů	36
4.2.1.1.1 Acquity UPLC/Q-TOF Premier	36
4.2.1.1.2 Acquity UPLC/Xevo TQD	37
4.2.1.1.3 Synapt G2-S	38

4.3 Příprava vzorků	39
4.3.1 Příprava roztoků standardů	39
4.3.2 Příprava modelových roztoků a vzorků plazmy s využitím methanolýzy	39
4.3.3 Příprava vzorků plazmy bez derivatizace	40
4.3.4 Příprava vzorků moči bez derivatizace	41
5 Diskuze a výsledky	42
5.1 Analýza DS a HS v preparátu Sulodexid po methanolýze	42
5.2 Analýza DS a HS v preparátu Sulodexid bez derivatizace	46
5.2.1 Analýza modelových roztoků Sulodexidu	48
5.2.1.1 Analýza modelových roztoků nástřikem metodou FIA	48
5.2.1.2 Analýza modelových roztoků s využitím HILIC kolony	50
5.2.1.3 Analýza modelových roztoků s využitím reverzní fáze	51
5.2.2 Analýza vzorků plazmy s využitím reverzní fáze	55
5.2.3 Testování dalších chromatografických kolon	57
5.2.3.1 YMC Triart C18 kolona	57
5.2.3.2 Testování kolony Ascentis Express HILIC	58
5.2.3.2.1 Analýza modelových roztoků Sulodexidu s využitím HILIC kolony	58
5.2.3.2.2 Analýza Sulodexidu v krevní plazmě s využitím kolony Ascentis Express HILIC	60
5.2.3.2.3 Analýza Sulodexidu na koloně HILIC v plazmě bez deproteinace	63
5.2.3.3 Testování kolony ZIC-cHILIC	64
5.2.3.3.1 Analýza modelových roztoků Sulodexidu na koloně ZIC-cHILIC	64
5.2.3.3.2 Analýza Sulodexidu v moči na koloně ZIC-cHILIC	70
6 Závěr	72
7 Seznam použité literatury	74
8 Použité zkratky	77

1 Úvod

Glykosaminoglykany (GAGs) patří do skupiny přírodních heteropolysacharidů, které se nacházejí ve všech tkáních savců. Jsou to dlouhé nevětvené heteropolysacharidy tvořené opakujícími se disacharidovými jednotkami, v nichž je vždy jedním členem uronová kyselina (D-glukuronová, L-iduronová) a druhým glykosamin (glukosamin, galaktosamin), většinou částečně esterifikované kyselinou sírovou. Tyto látky hrají důležitou roli ve fyziologických a patologických procesech. V posledních letech různé biologické studie prokázaly, že GAGs jsou klíčovými makromolekulami ovlivňujícími buněčné vlastnosti a funkce, které působí na buněčné receptory přímo nebo prostřednictvím růstových faktorů. Právě díky těmto vlastnostem jsou GAGs předmětem zájmu medicíny a farmaceutického průmyslu.¹

Preparát Sulodexid, jemuž byla věnována pozornost v této práci, je sulfatovaný glykosaminoglykan s antitrombotickým účinkem. Skládá se ze středněmolekulárního heparan a dermatan sulfátu. Podobně jako heparin a jeho deriváty ovlivňuje zejména srážlivost krve.² Podle posledních studií také významně působí na celou řadu tkání a jeho vlastnosti a možnosti využití je třeba dále detailně zkoumat. Nezbytnou podmínkou jeho sledování na nízkých koncentračních hladinách v biologických souvislostech je dostupnost dostatečně citlivých a rychlých analytických technik.

Cílem práce bylo nejdříve testování možností analýzy složek Sulodexidu v tělních tekutinách metodou LC/MS bez derivatizace a rovněž po chemické úpravě analytů methanolýzou.

2 Teoretická část

2.1 Glykosaminoglykany

Glykosaminoglykany neboli mukopolysacharidy, jsou přírodní, negativně nabitě, lineární polysacharidy, které se skládají z opakujících se disacharidových jednotek.³ Každý disacharid obsahuje jeden *hexosamin* (D-galaktosamin nebo D-glukosamin) a jednu *uronovou kyselinu* (D-glukuronová kyselina, *GlcA* nebo L-iduronová kyselina, *IdoA*) nebo *neutrální hexosu* (D-galaktosa, *Gal*).⁴ GAGs jsou na základě jejich struktury klasifikovány do několika skupin. Těmito skupinami jsou hyaluronan (HA), chondroitin sulfát (CS)/dermatan sulfát (DS), keratan sulfát (KS) a heparin/heparan sulfát (HP/HS).³

CS a DS obsahují galaktosamin (GalN) a jsou známy jako *galaktosaminoglykany* (GalAGs). Všechny další GAGs obsahují glukosamin (GlcN) a nazývají se *glukosaminoglykany* (GlcAGs).⁴ Tyto GAGs (kromě HA) jsou sulfatované polysacharidy, které se nacházejí v žírných buňkách a tvoří tzv. základní hmotu.⁵ Jde o gelovitou hmotu spojující extracelulární části, a to zejména chrupavky, šlachy, pokožku a cévní stěny.⁶

GAGs jsou biosyntetizovány v Golgiho aparátu pomocí vysoce specifických glykosid transferáz a jejich degradace probíhá v lysozomech štěpením specifickými lysozomálními enzymy.^{5,7} GAGs mají důležitou roli ve vývoji, patogenezi, antikoagulaci, metastázách, homeostázi a angiogenezi.⁸ GAGs jsou kovalentně vázané přes spojovací oblasti k proteinovému jádru a tvoří tzv. *proteoglykany* (PGs), které mají různé biologické funkce.^{4,9} Kromě toho GAGs nacházející se na povrchu buněk interagují s řadou rodin růstových faktorů, receptorů růstových faktorů, cytokinů a chemokinů.⁵

Pokud organismus není schopen GAGs metabolicky štěpit, vzniká onemocnění zvané *mukopolysacharidóza* (MPS). Toto onemocnění je blíže popsáno v kapitole 2.1.3.

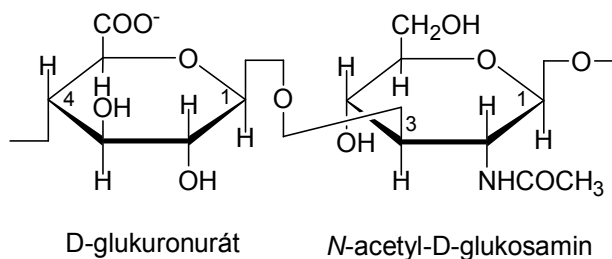
2.1.1 Přehled nejvýznamnějších GAGs

2.1.1.1 Kyselina hyaluronová

Z chemického pohledu je nejjednodušším GAG *kyselina hyaluronová* (HA).⁶ Tento GAG je syntetizován hyaluronan syntázou v plazmatické membráně. K prodlužování řetězce

dochází adicí na jeho redukující konec. HA je všudypřítomný extracelulární GAG s několika biologickými funkcemi. Ovlivňuje migraci, proliferaci a diferenciaci buněk, interaguje s agregujícími proteiny a hyaladheriny (tyto interakce jsou důležité v tkáňové morfogenezi a angiogenezi), urychluje hojení ran, aj. HA není kovalentně vázaná k jádru proteinu, tedy netvoří proteoglykany.⁴

Molekula kyseliny hyaluronové (Obr. 1) je složena z 250 až 25 000 $\beta(1\rightarrow4)$ vázaných disacharidových jednotek. Tyto disacharidy jsou tvořeny kyselinou D-glukuronovou a *N*-acetyl-D-glukosaminem, které jsou navzájem vázány $\beta(1\rightarrow3)$ vazbami. HA může vázat sodné, draselné nebo vápenaté kationty (vyskytuje se tedy ve formě odpovídajících solí), a proto se používá spíše označení hyaluronan či hyaluronát.⁶



Obr. 1 Chemická struktura hyaluronátu

Oligosacharidy hyaluronanu mají důležitou biologickou aktivitu, a proto je velmi důležitá analýza molekulové hmotnosti HA. Nejčastěji používané metody pro stanovení molekulové hmotnosti HA je molekulová vylučovací chromatografie (SEC) a gelová elektroforéza.

Pro určení velikosti oligosacharidů odvozených od hyaluronanu je rovněž vhodné použití techniky MALDI-MS nebo ESI-MS.⁵

2.1.1.2 Chondroitin-4-sulfát a chondroitin-6-sulfát

Chondroitin sulfát (CS) se skládá z pravidelně opakujících se monomerů D-glukuronátu a *N*-acetylgalaktosaminu. CS může být sulfatován na hydroxylové skupině v poloze 4 (chondroitin-4-sulfát) nebo v poloze 6 (chondroitin-6-sulfát).⁵

CS je hlavní složkou chrupavek a dalších pojivových tkání. Chondroitin-4-sulfát (Obr. 2) a chondroitin-6-sulfát (Obr. 3) se mohou vyskytovat samostatně nebo společně, v závislosti na typu tkáně.⁶

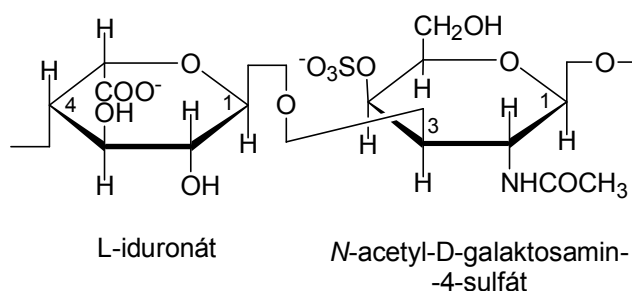


2.1.1.3 Dermatan sulfát

DS je složen z lineárních polysacharidů sestavených z disacharidových jednotek, obsahujících hexosamin, *N*-acetyl-D-galaktosamin (GalNAc) nebo glukuronovou kyselinu (GlcA), spojených $\beta(1\rightarrow4)$ nebo $\beta(1\rightarrow3)$ vazbami (Obr. 4).¹¹

DS se nachází v mnoha tkáních savců a je převládajícím glykanem přítomným v pokožce. Dále se také vyskytuje v srdečních chlopních a cévních stěnách. Změny v jeho

koncentracích mohou být spojeny s patologickými stavy, jako jsou kardiovaskulární onemocnění, infekce, vznik nádorů a fibrózy. Ovlivňuje také hojení ran.¹²

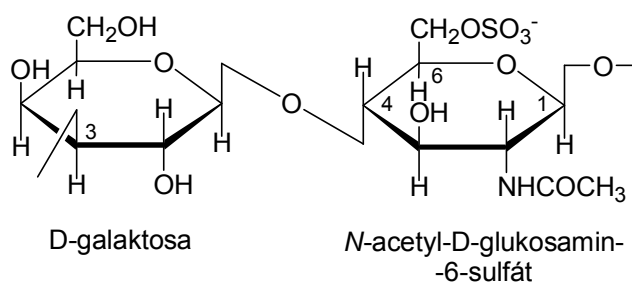


Obr. 4 Chemická struktura dermatan sulfátu

2.1.1.4 Keratan sulfát

Keratansulfát (KS), představuje jedinečnou třídu GAG, a to proto, že místo uronové kyseliny obsahuje galaktosu. Biosyntéza KS řetězců nastává simultánní polymerizací a sulfatací za vzniku nesulfatovaných, mono- a disulfatovaných disacharidových jednotek. KS je tedy lineární sulfatovaný polymer galaktosaminu, který se nachází především v rohovce, chrupavkách a kostech.¹³ Základní opakující se disacharidovou jednotkou je $\beta(1 \rightarrow 4)$ vázaná D-galaktosa a N-acetyl-D-glukosamin-6-sulfát (Obr. 5).⁶

KS se skládá přibližně z 50 disacharidových jednotek. Jsou známy dvě třídy KS, keratan sulfát I (KS I) a keratan sulfát II (KS II). KSI, který byl izolován z rohovky, je přes aminoskupinu specificky vázaný k aminokyselině asparaginu přes N-acetyl-glukosamin. KS II se izoluje z kostní tkáně a je vázaný přes serin a threonin.⁵



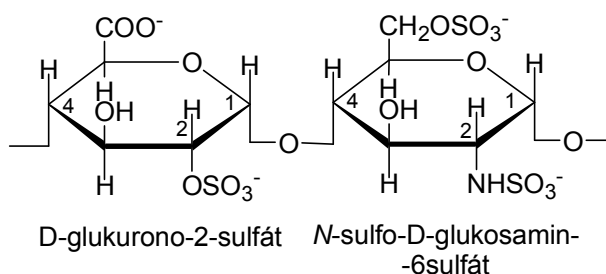
Obr. 5 Chemická struktura keratan sulfátu

2.1.1.5 Heparan sulfát a heparin

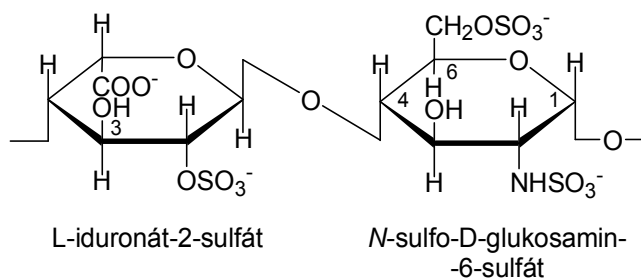
Heparan sulfát (HS) a heparin (HP) jsou kyselé lineární polysacharidy, které mají velmi podobnou strukturu. Jsou složeny z variabilně sulfatovaných opakujících se disacharidových jednotek. Hlavní disacharidová jednotka vyskytující se v HP se skládá z 2-*O*-sulfo-L-iduronové kyseliny $\alpha(1\rightarrow4)$ vázané k 6-*O*-sulfo-, *N*-sulfo-D-glukosaminu, -IdoA2S(1 $\rightarrow$ 4)GlcNS6S- (Obr. 7).¹⁴

HS má podobnou strukturu, ale má daleko proměnlivější složení, s více *N*- a *O*-sulfátovými skupinami a méně *N*-acetylovými skupinami. Nejběžnější disacharidovou jednotkou HS je D-glukuronová kyselina (GlcA) a *N*-acetyl-D-glukosamin (GlcNAc), -GlcA(1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc- (Obr. 6).¹⁵

HP má nejvyšší hustotu náboje ze všech známých biologických makromolekul. Řetězce HS jsou zpravidla delší než heparinové, jsou méně sulfatované a mají menší obsah IdoA.⁴



Obr. 6 Chemická struktura heparan sulfátu



Obr. 7 Chemická struktura heparinu

HS/HP se účastní v mnoha důležitých biologických procesech, např. krevní antikoagulaci, virových a bakteriálních infekcích, zánětech, rakovině, atd. Své biologické funkce vykonávají především přes interakce s proteiny (elektrostatické interakce sulfo skupin a vodíkové vazby s aminokyselinami vázanými v proteinu). HP má zásadní

antikoagulační/antitrombotický efekt, a to díky jeho schopnosti zvyšovat aktivitu přírodně se vyskytujících inhibitorů serinových proteáz a antitrombinu.¹²

HS se nachází v mnoha typech savčích buněk a je tedy syntetizován různými způsoby (vznikají různé primární struktury). HP je produkován jen žírnými buňkami vyskytujícími se především v játrech, plicích a střevech.^{6,16} Oba jsou izolovány extrakcí z živočišné tkáně. HS a HP z rozdílných tkání a různých živočichů se mohou podstatně lišit v disacharidovém složení, a proto často také vykazují velmi odlišné biologické aktivity.¹⁷

2.1.2 Sulodexid

Sulodexid patří chemicky do skupiny sulfátovaných GAGs. Jedná se o velmi čistou přírodní látku, která se získává ze střevní mukózy vepřů. Sulodexid je směsí 80% heparan sulfátu (nízkomolekulárního – cca 7 000 Da), který má afinitu k antithrombinu III a 20% dermatan sulfátu (vysokomolekulárního – 25 000 Da) s afinitou k heparinovému kofaktoru II. Toto složení přispívá k jeho antitrombotickému a antitrombinovému účinku.¹⁸

Sulodexid patří podobně jako heparin a od něj odvozené látky mezi léčiva, která se užívají k ovlivnění srážlivosti krve (antitrombotika). Dále také Sulodexid komplexně působí na metabolismus lipidů, ovlivňuje endotelie a také bazální glomerulární membrány v ledvinách. Léčba Sulodexidem se používá zejména u těch pacientů, u kterých není požadována plná antikoagulační léčba nebo u kterých není takováto léčba dostatečně bezpečná. Výhodou Sulodexidu je možnost jeho aplikace nejen intravenózně (injekčně), ale také perorálně ve formě tablet.

Do skupiny antitrombotik patří také dobře známý Heparin (nefrakcionovaný), jeho nízkomolekulární deriváty a Warfarin (kumarinový derivát). Díky příznivému bezpečnostnímu profilu se Sulodexid hodí jako náhrada kumarinových derivátů u pacientů, pro které je léčba těmito látkami příliš nebezpečná.

Ve srovnání s Warfarinem jsou náklady na léčbu Sulodexidem asi dvojnásobné. I navzdory tomu, že je léčba Sulodexidem z hlediska nákladů na preparát samotný dražší, tak celkově vyjde léčba levněji, a to především díky eliminaci nákladných pravidelných kontrol.²

2.1.3 Mukopolysacharidóza

Mukopolysacharidóza (MPS) je dědičně podmíněné metabolické onemocnění patřící do skupiny lysozomálních stádavých onemocnění, které jsou vyvolané nedostatkem

specifických lysozomálních enzymů (hydroláz). Nedostatek těchto štěpících enzymů způsobuje ukládání GAGs v moči, krvi, plazmě a také v různých tkáních. Podle typu enzymatického defektu a klinického postižení se mukopolysacharidóza dělí na několik typů. Jedná se o mukopolysacharidózu typu I (MPS I), II (MPS II), III(MPS III), IV (MPS IV), VI (MPS VI) a VII(MPS VII). Mezi základní projevy MPS patří poruchy růstu s deformací kostí, organomegalie a pro některé typy MPS je charakteristická i mentální retardace.¹⁹

MPS I je způsobena nedostatkem α -L-iduronidázy, která má za následek ukládání dvou specifických GAGs – dermatan sulfátu a heparan sulfátu.²⁰ MPS II je vyvolána deficitem iduronát-2-sulfatázy, která štěpí konečné 2-O-sulfátové zbytky z DS a HS.²¹ MPS typu VI je zapříčiněná nedostatkem N-acetylgalaktosamin-4-sulfatázy (arylsulfatázy B) potřebné k degradaci DS.

Mezi primární možnosti léčby MPS patří transplantace hematopoetických kmenových buněk z kostní dřeně (HSCT) a enzymová substituční terapie (ERT). ERT slouží ke snížení akumulace GAGs a je použitelná pro MPS I, MPS II a MPS VI.²²

2.2 Instrumentální metody použité pro analýzu GAGs

V této kapitole jsou popsány principy kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, které byly použity v experimentální části práce.

2.2.1 Kapalinová chromatografie

Ze všech analytických separačních technik používaných pro analýzu netěkavých látek je nejpoužívanější právě kapalinová chromatografie (LC). V moderním uspořádání jde o citlivou, velmi selektivní a do značné míry automatizovanou analytickou platformu. LC je tedy metoda použitelná pro analýzu celého spektra látek v širokém rozmezí polarit a molekulových hmotností (aminokyselin, proteinů, nukleových kyselin, sacharidů, léčiv, pesticidů, organokovových sloučenin, aj).²³

Princip LC spočívá v rozdílné distribuci složek vzorku (analytů) mezi nepohyblivou *stacionární fází* (SF) a pohyblivou *mobilní fází* (MF), kterou je kapalina. Průtokem mobilní fáze přes fázi stacionární jsou analyty tímto systémem unášeny různou rychlostí k detektoru a jsou tedy vzájemně separovány (elují v různých retenčních časech).

O separaci složek analytu rozhoduje nejen jejich interakce se SF, ale velmi výrazně i použitá MF (na rozdíl od plynové chromatografie). Při separaci jsou využívány zejména tyto mechanismy: *adsorpce, rozdělování, iontová výměna, molekulově síťový efekt nebo specifické interakce v afinitní chromatografii*.²⁴

V LC rozlišujeme kolonovou chromatografii a plošné techniky, kde patří papírová chromatografie (PC) a tenkovrstvá chromatografie (TLC). Nejčastějším uspořádáním LC je v dnešní době tzv. *vysokoučinná kapalinová chromatografie* (HPLC- High Performance Liquid Chromatography). Základní rozdíl oproti klasické LC je, že v technice HPLC je mobilní fáze přiváděna pomocí vysokotlakých čerpadel, čímž je tato technika rychlejší a účinnější než klasická LC.^{24,25}

Pro analytické účely jsou dnes nejčastěji používány kolony s vnitřním průměrem 2,1 až 5 mm a délkou 10 až 30 cm. Velikost částic, kterými je kolona naplněna, se pohybuje v rozmezí 1 až 10 μm . V případě HPLC jsou používány částice s průměrem 3-5 μm , u UHPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography) pak částice $< 2 \mu\text{m}$. Částice s průměrem okolo 10 μm se dnes používají spíše pro semipreparativní účely.

K detekci se v LC používají zejména spektrofotometrické, fluorescenční, elektrochemické, vodivostní, refraktometrické detektory, aj. Pro svůj identifikační potenciál jsou v současnosti jako detektory často využívány také hmotnostní spektrometry.²⁵ Tento typ detektoru byl použit také v experimentální části této práce, a proto je mu věnována samostatná kapitola.

Na základě kombinací zvolených SF a MF existuje několik různých systémů v LC. Podrobněji jsou dále popisovány systémy reverzních a HILIC fází.

2.2.1.1 Kapalinová chromatografie na reverzních fázích

V současné době se v HPLC využívá nejvíce *chromatografie na reverzních fázích* (RP-LC).²⁵ Ta je populární zejména s ohledem na svoji univerzálnost (uvádí se, že umožňuje řešit přibližně 80-90% separačních úloh).

V technice RP-LC je mobilní fáze polární směs jednoho nebo více organických rozpouštědel a vody, příp. pufru, zatímco stacionární fáze je nepolární. Obvykle se jedná o silikagel s navázanými dlouhými alkylovými řetězci, přičemž nejpoužívanějšími fázemi jsou

C18 (oktadecylové kolony) a dále pak také C8 (oktylové kolony). Rozpouštědla používaná pro přípravu MF v RP-LC jsou zejména acetonitril, methanol, tetrahydrofuran a dioxan.²⁵

Při separaci v módu reverzních fází retence látek vzrůstá s rostoucí hydrofobicitou analytů a s klesající koncentrací organického rozpouštědla v mobilní fázi.²⁶ Retenci ionizovatelných látek je možné zvýšit potlačením jejich disociace (úpravou pH) nebo tím, že se zvýší iontová síla MF. Je možno také využít tvorby iontových párů a asociátů analytu s vhodným aditivem (objemné ionty, tenzidy), které mají větší retenci než látka samotná (iontově párová chromatografie, RPIP-LC).²⁵

2.2.1.2 HILIC a ZIC-HILIC

Alternativní řešení pro separaci polárních a hydrofilních látek je využití *hydrofilní interakční chromatografie* (HILIC).²⁷

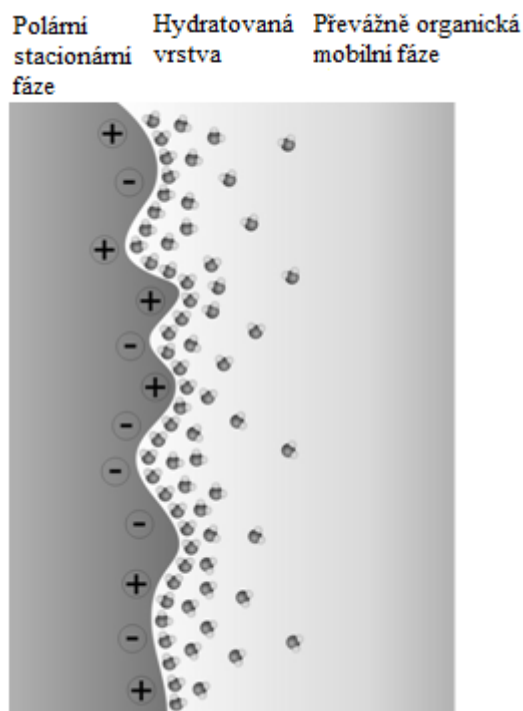
Pojem HILIC uvedl poprvé v roce 1990 Alpert jako modifikaci chromatografie na normálních fázích (NP), kde se do mobilní fáze přidává definované množství vody (samotná technika normálních fází pracovala obvykle s fázemi bezvodými).²⁸ HILIC tedy může být charakterizována jako separační mód využívající polární stacionární fáze v kombinaci s mobilními fázemi běžně používanými v RP-LC, které obsahují vysoký podíl (obvykle více než 50%) organického rozpouštědla ve vodě nebo pufru.²¹ Podmínkou separace v HILIC módu je, že mobilní fáze musí být méně polární než fáze stacionární. Polárnější látky mají potom delší retenci než látky méně polární.²⁹

Původně byla chromatografie v módu HILIC využívána především pro stanovení sacharidů, aminokyselin a peptidů. Zájem o tuto techniku vzrostl v posledních letech, a to zejména díky svému potenciálu pro analýzu polárních léčiv a jejich metabolitů.

Další výhodou HILIC chromatografie je výborná kompatibilita s ionizací elektrosrejem při spojení s hmotnostní spektrometrií. Vysoký obsah organických složek v mobilní fázi (nejčastěji acetonitrilu nebo methanolu) usnadňuje proces elektrospreje (malé povrchové napětí a snadné odpařování rozpouštědel z nabitých kapiček) a zvyšuje výtěžek vznikajících iontů.^{25,27,30}

Separace v módu HILIC se řídí primárně hydrofilními interakcemi mezi analytem a polární stacionární fází (primární interakce). Mohou se ovšem uplatňovat i jiné např. elektrostatické interakce (sekundární interakce), které je možné omezit přidavkem těkavých

amonných solí organických kyselin (např. mravenčan nebo octan amonný). Toto platí především při použití negativně nabitě SF na bázi silikagelu, kdy amonné kationty jsou schopny kompenzovat tento negativní náboj SF. Přítomnost vody v mobilní fázi vede k vytvoření jejího tenkého filmu na povrchu stacionární fáze.²⁹ Při separaci tedy dochází k rozdělování mezi relativně hydrofobní mobilní fází a silně hydrofilní vrstvou vody imobilizovanou na povrchu polární stacionární fáze (Obr. 8).²⁵



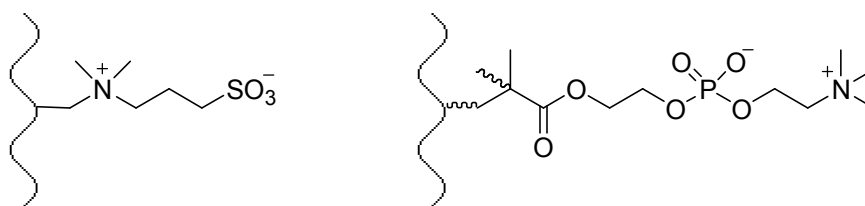
Obr. 8 Adsorbovaná difúzní vrstva vody na povrchu polární stacionární fáze²⁶

Ovlivňování retence v systému HILIC je obdobné jako u chromatografie na normálních fázích. Retence klesá se zvýšením polaritý mobilní fáze (klesá s rostoucím podílem vody nebo pufru) a vzrůstá s rostoucí polaritou analytu, tedy s větším počtem polárních funkčních skupin v analytu (např. –OH skupiny v malých molekulách, monomerní jednotky cukrů v oligosacharidech nebo polární aminokyselinové jednotky v peptidech).^{25,26}

Mezi běžné typy *HILIC kolon* patří klasické silikagelové fáze nebo stacionární fáze obsahující diolové, nitrilové, aminové či amidové funkční skupiny, které jsou navázané na silikagelový, polymerní nebo hybridní nosič. Novějším typem stacionární fáze pro techniku HILIC jsou tzv. *zwitteriontové stacionární fáze* (ZIC[®]-HILIC).²⁹

2.2.1.2.1 Zwitteriontové stacionární fáze

Zwitteriontové stacionární fáze jsou široce využívány pro separaci malých polárních sloučenin,³¹ aminoglykosidů,³² peptidů,³³ glykopeptidů,³⁴ aniotových a kationtových sloučenin, aj. Zwitteriontové kolony jsou komerčně dostupné například pod obchodním názvem ZIC-HILIC (pokud je chemická modifikace vázána na silikagelovém nosiči) a ZIC-*p*HILIC (pokud je zwitterionní uskupení vázáno na polymerní nosič). Hlavními zástupci této skupiny stacionárních fází jsou fosforylcholinové kolony (obchodní název ZIC-cHILIC) a sulfo alkyl betainové kolony (Obr. 9).²⁶



Sulfoalkylbetainová stacionární fáze

Fosforylcholinová stacionární fáze

Obr. 9 Struktury zwitteriontových HILIC stacionárních fází²⁶

V případě sulfoalkylbetainové fáze je na aktivní vrstvu velkoporézního silikagelu nebo polymerního nosiče vázána jak silně kyselá sulfonová skupina, tak silně bazická kvartérní amoniová skupina (ve stechiometrickém poměru 1:1), přičemž tyto dvě skupiny jsou od sebe odděleny krátkým alkylovým řetězcem. Sulfoalkylbetainové fáze na svém povrchu silně adsorbují vodu. Převažujícími interakcemi ve stacionární fázi jsou primárně polární interakce, ačkoliv slabé elektrostatické interakce mohou ovlivňovat separaci analytů nesoucích pozitivní nebo negativní náboj.²⁶

Mezi různými typy stacionárních fází používaných v HILIC chromatografii mají zwitteriontové SF unikátní postavení.³⁵ Tento typ analytických kolon je ideální volbou pro HPLC a LC-MS separace polárních a hydrofilních látek, které vykazují slabou retenci na reverzních fázích a běžných HILIC fázích. Při práci na těchto fázích byla pozorována velmi dobrá reprodukovatelnost retence řady sloučenin, které se obtížně separují na RP fázích.³⁶

2.2.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je nepostradatelnou analytickou technikou v oblasti chemie, biochemie, farmacie, medicíny a mnoha dalších příbuzných vědních oborů. MS umožňuje separaci a identifikaci sloučenin ve vzorku podle jejich atomové nebo molekulové hmotnosti. Měřením hmotnostních spekter získáváme informace o molekulové hmotnosti, izotopickém profilu a štěpení (fragmentaci) analytů.

Základním principem této techniky je generování iontů z anorganických nebo organických sloučenin vhodnou ionizační metodou, separace těchto iontů podle jejich hodnoty m/z (poměr hmotnost/náboj), detekce iontů po jejich rozdělení a určení relativní intenzity (četnosti) jednotlivých iontů.

Přístroj, který se používá k měření hodnot m/z a zaznamenává jejich intenzity, se nazývá *hmotnostní spektrometr*. Ten se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Výsledkem každé analýzy je *hmotnostní spektrum*, které představuje graf závislosti intenzity iontů na hodnotě m/z .³⁷

2.2.2.1 Iontové zdroje

Aby mohl být vzorek analyzován pomocí hmotnostní spektrometrie, tak musí být nejdříve neutrální molekuly analytu převedeny na ionty (nabitě částice). Tento proces se nazývá *ionizace*. Ionizace může probíhat buď za sníženého tlaku, nebo za atmosférického tlaku, a to v tzv. iontovém zdroji.

Existuje celá řada ionizačních technik. Vhodná ionizační technika se zvolí především na základě fyzikálně chemických vlastností analytu, který má být ionizován a také podle množství vnitřní energie, která se během ionizace analytu dodá.

Některé ionizační techniky jsou velmi energetické a jsou příčinou rozsáhlé fragmentace rodičovského iontu. Tyto techniky se nazývají „tvrdé“ a patří zde zejména *elektronová ionizace* (EI - Electron Ionization). Jiné techniky produkují ionty s malým přebytkem energie, díky kterému nedochází k tak bohaté fragmentaci jako v předchozím případě. Těmto ionizačním technikám se říká „měkké“. Do této skupiny patří *chemická ionizace* (CI - Chemical Ionization), *ionizace polem* (FI - Field Ionization), *desorpce polem* (FD - Field Desorption), *matricí asistovaná desorpce/ionizace laserem* (MALDI -

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization), aj. Doposud jmenované techniky pracují za sníženého tlaku.

Řada ionizačních technik může pracovat i za atmosférického tlaku, potom mluvíme o tzv. API technikách (*Atmospheric Pressure Ionization*). Patří zde *ionizace elektrosprejem* (ESI – Electrospray Ionization), *chemická ionizace za atmosférického tlaku* (APCI – Atmospheric Pressure Chemical Ionization) a *fotoionizace za atmosférického tlaku* (APPI – Atmospheric Pressure Photoionization). Hlavní výhodou API technik je možnost jejich on-line spojení se separačními technikami v kapalně fázi (HPLC, CE, aj.).³⁸

V experimentální části této práce byl jako iontový zdroj používán elektrosprej, který je podrobněji popsán v následující kapitole.

2.2.2.1.1 Ionizace elektrosprejem (ESI)

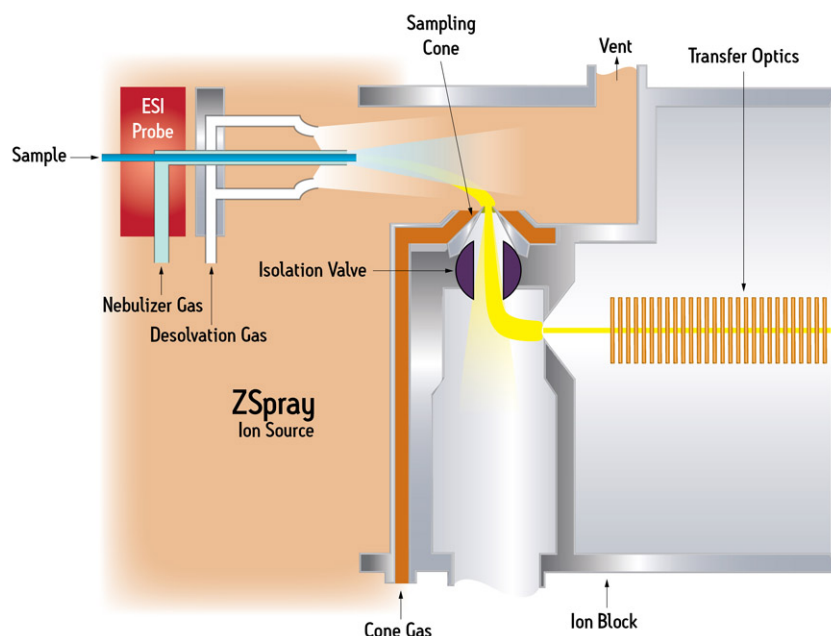
Ve skupině API metod má nejvýznamnější postavení ionizace elektrosprejem (ESI).^{37,39}

Pro techniku ESI je charakteristická tvorba vícenásobně nabitých iontů, což umožňuje analyzovat i velmi velké molekuly. Protože se jedná o velmi šetrnou ionizační techniku, tak v ESI spektrech většinou nejsou pozorovány fragmentové ionty anebo jsou přítomny jen ve velmi nízké intenzitě.³⁷ Pomocí ESI techniky může být ionizováno velké množství chemických látek.³⁹ Používá se především pro analýzu velkých a netěkavých molekul, jako jsou například proteiny, sacharidy, nukleové kyseliny, aj. Stejně tak je ESI vhodná i pro analýzu malých polárních molekul, iontových komplexů s kovy a dalších rozpustných anorganických analytů.³⁷

Princip ESI je následující. Roztok analytu prochází sprejovací kapilárou, na kterou je vložen vysoký elektrický potenciál (obvykle 3-4 kV).^{37,40} Díky jeho působení je roztok analytů převáděn na jemný aerosol obsahující vícenásobně nabitě kapky. Proces zmlžování je obvykle podporován proudem zmlžujícího plynu. Nabité kapičky přecházejí do vyhřívaného prostoru (v některých uspořádáních s protiproudem sušícího plynu), kde dochází k odpařování rozpouštědel. Odpařováním rozpouštědel se zmenšuje velikost nabitých kapiček a tím roste hustota náboje na jejich povrchu. Pokud jsou repulzní síly mezi náboji stejné jako je povrchové napětí kapky, pak se jedná o tzv. *Rayleighův limit*. V okamžiku, kdy jsou repulzní síly větší, než je povrchové napětí kapky, dojde k překročení Rayleighova limitu a tím k tzv. *Coulombické explozi*, kdy se větší kapičky rozpadají na menší. K tomuto procesu dochází

opakovaně a jsou tedy generovány stále menší a menší kapičky, až vzniknou samotné ionty.³⁷ Existují dva modely popisující vznik iontů z nabitých kapek a to CRM (z angl. charged residue model) a IEM (z angl. ion evaporation model). CRM předpokládá, že elektrosprej generuje na konci procesu kapky obsahující pouze jeden ion, který se získá odpařením rozpouštědla.³⁹ Při IEM se zmenšuje poloměr kapky a po překročení kritické hodnoty pak dojde k přímému vytržení plynných iontů analytu z kapky.⁴¹ Takto vzniklé ionty jsou poté fokusovány do hmotnostního analyzátoru.³⁷

Velmi důležitá je u ESI geometrie sprejování, tedy úhel sprejování vzhledem ke vstupu do hmotnostního analyzátoru. Může jít o uspořádání lineární v ose vstupu do analyzátoru nebo mimo osu, ortogonální uspořádání nebo uspořádání elektrospreje ve tvaru písmen Z (*Z-Spray* geometrie) (Obr.10).⁴³



Obr. 10 Schéma elektrospreje se Z-geometrií (*Z-Spray*)

2.2.2.2 Hmotnostní analyzátoři

Ionty v plynné fázi, které jsou získány po ionizaci analytu v iontovém zdroji, je potřeba rozdělit na základě jejich hodnoty m/z . K separaci těchto iontů slouží hmotnostní analyzátor pracující za vysokého vakua, který je umístěn za iontovým zdrojem a před detektorem.³⁷

Je známo několik typů hmotnostních analyzátorů, u nichž dochází k separaci iontů podle jejich hodnot m/z na základě různých principů. Všechny hmotnostní analyzátory využívají statické nebo dynamické elektrické pole, magnetické pole nebo jejich kombinaci. Hlavní rozdíl mezi běžnými typy hmotnostních analyzátorů je v tom, jaké pole je pro separaci iontů použito.³⁸

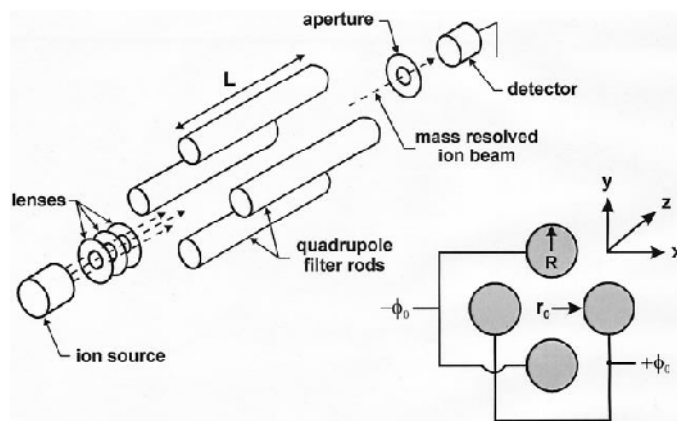
V hmotnostní spektrometrii se používají zejména tyto typy hmotnostních analyzátorů: *elektrický sektor* (E - Electric sector), *magnetický sektor* (B - Magnetic sector), *kvadrupólový analyzátor* (Q - Quadrupole), *iontová past* (IT - Ion trap), *analyzátor doby letu* (TOF - Time-of-flight), *iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací* (FT-ICR - Fourier transform ion cyclotron resonance), *orbitální past* (OT-orbitrap) a *analyzátor iontové mobility* (IMS - Ion mobility spectrometry).³⁸

Detailněji je dále popsán kvadrupólový analyzátor a analyzátor tvořený kombinací třech kvadrupólů (trojitý kvadrupól).

2.2.2.2.1 Kvadrupólový analyzátor (Q)

Kvadrupólový hmotnostní analyzátor je dnes široce využíván v mnoha oblastech chemické analýzy. Hlavní výhodou tohoto analyzátoru je jeho jednoduchost a relativně nízká cena.⁴⁰

Kvadrupól se skládá ze čtyř stejných hyperbolických nebo cylindrických kovových tyčí – elektrod (Obr. 11). Na dvě protilehlé elektrody ve směru osy x je vloženo kladné stejnosměrné napětí, na zbylé dvě elektrody ve směru osy y záporné stejnosměrné napětí, přičemž na všechny tyče zároveň působí vysokofrekvenční střídavé napětí. Ionty vstupují do kvadrupólu ve směru osy z a začnou mezi elektrodami oscilovat. Při určitém nastavení poměru U/V (kde, U je hodnota stejnosměrného napětí a V je amplituda střídavého napětí) budou mít stabilní trajektorii jen ionty o určité hodnotě m/z . Tyto ionty projdou kvadrupólem a poté dopadají na detektor. Postupnou změnou velikosti U a V , přičemž jejich poměr zůstává konstantní, postupně projdou kvadrupólem všechny ionty. Kvadrupólový analyzátor tedy pracuje jako hmotnostní filtr.^{37,43,44}



Obr. 11 Kvadrupólový hmotnostní analyzátor⁴³

2.2.2.2 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Tandemová hmotnostní spektrometrie, zkráceně MS/MS, je metoda zahrnující minimálně dva stupně hmotnostní analýzy ve spojení s procesem disociace.⁴⁵

Nejběžnější tandemové hmotnostní spektrometry využívají první hmotnostní analyzátor k izolaci *iontu prekursoru*, který je následně v kolizní cele aktivován a fragmentován za vzniku *produktových iontů* a neutrálních fragmentů. Druhý analyzátor pak vybírá podle m/z hodnoty vzniklé produktové ionty. Je možné také zvyšovat počet stupňů analýzy a to tak, že jsou vybrány ionty o určité hodnotě m/z a ty jsou fragmentovány. Některý ze vzniklých fragmentů je dále izolován a znovu fragmentován. Tím jsou získány spektra vyšších řádů (MS^3 apod.). Takto pracují zařízení na principu iontové pasti.³⁸ Pro kvantitativní analýzu je v současné době nejčastěji jako analyzátor používán trojitý kvadrupól (QqQ), který je dále popsán podrobněji.

2.2.2.3 Trojitý kvadrupól (QqQ)

Široce využívaným tandemovým hmotnostním spektrometrem je trojitý kvadrupól,⁴⁶ a to především díky cenové dostupnosti, vysoké citlivosti, specifitě a robustnosti při analýze složitějších biologických vzorků.⁴⁷

Jedná se o tři kvadrupóly, které jsou spojeny za sebou, přičemž $Q1$ a $Q3$, slouží jako hmotnostní filtry a prostřední $q2$ jako kolizní cela, ve které dochází k fragmentaci iontu prekursoru. Do analyzátoru $q2$ je přiváděn kolizní plyn (inertní plyn), se kterým se ionty analytu vybraného kvadrupólem $Q1$ sráží a dochází k jejich fragmentaci na specifické

fragmenty. Jedná se o tzv. kolizně indukovanou disociaci (CID).⁴⁷ Vzniklé fragmentové ionty vystupující z $q2$ jsou následně analyzovány kvadrupólem $Q3$.³⁷

Trojité kvadrupól může operovat ve čtyřech základních skenovacích módech.^{38,47}

1. Sken produktových iontů

$Q1$ propouští iont prekursoru o určité hodnotě m/z , který je následně v kolizní cele $q2$ fragmentován. $Q3$ pracuje v určitém rozsahu m/z , všechny vzniklé fragmenty (produktové ionty) jsou zaznamenávány detektorem a je tedy možno získat kompletní informaci o fragmentaci vybraného iontu.

2. Sken iontů prekursoru

V tomto případě se jedná o opačnou situaci než v předchozím případě. $Q1$ skenuje v definovaném rozsahu m/z , tedy postupně propouští do $q2$ ionty s rostoucí hodnotou m/z a následně dochází k jejich fragmentaci. $Q3$ propouští pouze jeden vybraný fragment, který je následně detekován.

3. Sken neutrální ztráty

V tomto módu $Q1$ a $Q3$ skenují najednou ionty s konstantní diferencí m/z , která odpovídá neutrálnímu fragmentu vznikajícímu v kolizní cele $q2$.

4. Sledování rozpadu iontu („Selected reaction monitoring“ – SRM)

SRM je velmi selektivní a citlivý mód umožňující monitorování jednoho hmotnostního přechodu. V případě MRM („Multiple reaction monitoring“) je možno rychle monitorovat několik vybraných fragmentací naprogramováním odpovídajícího počtu MRM přechodů. V tomto módu $Q1$ vybírá iont prekursoru, který je následně fragmentován v kolizní cele $q2$. Kolizní energie je optimalizována pro vznik fragmentu, který je následně vybrán pomocí $Q3$ a detekován.

2.3 Metody stanovení glykosaminoglykanů

GAGs představují biologicky významnou třídu látek, které je věnována čím dál větší pozornost. Pro analytické chemiky je analýza GAGs stále určitou výzvou, a to především díky velké strukturní rozmanitosti těchto látek.^{14,30} Tradiční metody analýzy GAG řetězců zahrnují štěpení (depolymerizaci), následnou separaci a izolaci produktů a nakonec analýzu disacharidů v jednotlivých frakcích.³⁸

Depolymerizační krok spočívá v enzymatickém nebo chemickém štěpení GAG polymerních řetězců na menší komponenty (disacharidy příp. oligosacharidy), které lze jednodušeji separovat a následně určit jejich strukturu.⁴⁸ Při enzymatické depolymerizaci se používá třída enzymů zvaná lyázy, které působí tak, že štěpí hexosaminové vazby a nově uvolněné neredukující konce obsahují 4,5-nenasycené (Δ -nenasycené) uronosylové zbytky. Chondroitin lyázy a heparin lyázy jsou specifické, komerčně dostupné a často používané pro depolymerizaci GAGs. Depolymerizace chemickým štěpením GAGs se provádí například použitím kyseliny dusité. Tento způsob štěpení se používá pro analýzu HP, ale může být použit také pro analýzu CS/DS po deacetylaci GalNAc zbytků.⁵

V systematických studiích je stanovení disacharidového složení depolymerizovaných GAGs prvním a klíčovým krokem při charakterizaci a hodnocení změn ve složení GAGs během biologických procesů.³⁰

Pro separaci di- a oligosacharidů po (po jejich depolymerizaci) byla použita celá řada chromatografických a elektroforetických technik. Z elektroforetických technik to byla například papírová elektroforéza, elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE) a kapilární elektroforéza ve spojení s MS (CE/MS).⁴⁹ Z chromatografických technik byly použity afinitní chromatografie, vylučovací chromatografie (SEC), aniontově výměnná chromatografie (SAX), iontově párová chromatografie (RPIP-LC), chromatografie na reverzních fázích (RP-LC) a HILIC chromatografie. Pro detekci byly použity UV, fluorescenční nebo MS detektory.^{10,30,49}

CE a především vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC/MS) se v posledních letech staly předními metodami pro analýzu disacharidových jednotek GAGs. Tyto metody jsou obecně citlivější a účinnější než např. NMR spektroskopie, kterou lze použít pro stanovení HP a HS. Technika NMR je velmi významnou metodou pro objasnění struktury těchto GAGs. Ačkoli některé potřebné informace je možno získat z ^1H chemických posunů, pro kompletní objasnění struktury jsou zpravidla požadovány 2D-NMR experimenty. Hlavní výhodou NMR v porovnání s jinými technikami, jako je například MS, je její unikátní schopnost jednoznačného určení polohy sulfatace. I přes to má tato technika značná omezení, kterými jsou především složitá interpretace spekter (překryv signálů v ^1H -NMR spektrech a absence měřitelných interakčních konstant, J) a nižší citlivost.^{10,48,50}

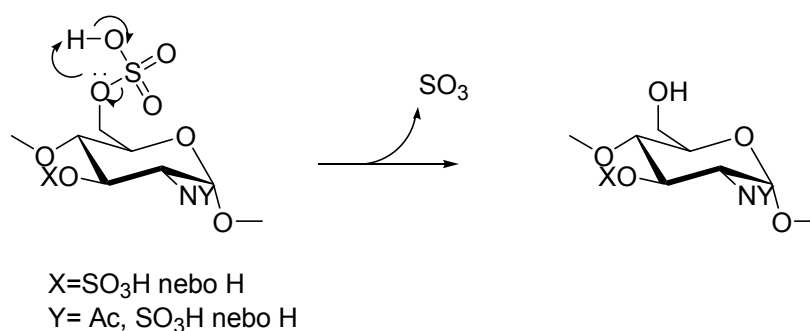
2.3.1 Stanovení GAGs technikou MS

Hmotnostní spektrometrie je velmi významnou technikou pro strukturní analýzu sacharidů. MS představuje univerzální metodu poskytující přesné výsledky, velmi vysokou citlivost⁵¹ a také produkuje větší množství informací o struktuře analytu v porovnání s konvenčními UV nebo fluorescenčními detektory⁵² – použití fluorescenční detekce je uvedeno v kapitole 2.3.2.

Pomocí MS můžeme zjistit molekulovou hmotnost studovaných sacharidů, zastoupení monosacharidů v jejich řetězcích, typ a stupeň modifikace (u GAGs např. sulfatace) a v některých případech také sekvenci sacharidových jednotek. Rychlý vývoj v MS instrumentaci vede k čím dál častějšímu použití této metody pro strukturní studie GAGs.⁴⁸

GAGs jsou kyselé molekuly, které produkují záporné ionty a mohou tedy být analyzovány přímo v negativním módu. Také je možné provést analýzu GAGs v pozitivním módu, jak bude uvedeno níže.^{5,13}

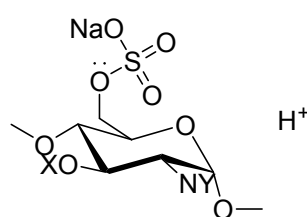
Ionizace urychlenými atomy (FAB- Fast Atom Bombardment) byla jednou z prvních technik, která poskytovala dobrou citlivost pro oligosacharidy odvozené od GAGs.⁵³ Od této techniky se ovšem postupně upustilo a to především proto, že při ionizaci analytu je dodáváno příliš mnoho vnitřní energie a tím dochází k velmi rozsáhlé fragmentaci (ztráta sulfátové skupiny (Obr. 12) a štěpení glykosidických vazeb). Další nevýhodou této techniky je větší množství vzorku potřebného pro analýzu v porovnání s MALDI nebo ESI technikou, jejichž využití je popsáno dále.⁴⁸



Obr. 12 Schéma popisující ztrátu sulfátové skupiny během procesu ionizace¹³

Technika *MALDI* patří mezi měkké ionizační techniky, které umožňují MS analýzu velmi malých množství vzorků. Přesto při použití této techniky také dochází k rozsáhlé

fragmentaci. U vysoce sulfatovaných oligosacharidů může tedy dojít ke ztrátě sulfo skupin, čímž dochází ke snížení intenzity molekulárního iontu a následně zhoršení limitu detekce.³² Řešením tohoto problému může být spárování negativně nabitých sulfatovaných oligosacharidů s bazickými proteiny nebo peptidy (pozitivně nabitá rezidua argininu a lysinu), čímž dochází k vytvoření komplexu těchto látek, který může být pozorován v pozitivní módu MALDI.⁵⁴ Tento přístup byl použit v sérii biochemických studií HS a doporučuje se jej využívat při analýze GAGs metodou MALDI. Dále je také možné provést analýzu GAG v pozitivním módu MALDI-TOF MS pokud dojde ke spárování sodných nebo jiných kationtů alkalických kovů se sulfo skupinou GAG (Obr. 13).^{5,13}



X=SO₃H nebo H
Y= Ac, SO₃H nebo H

Obr. 13 Spárování sulfo skupiny GAGs s kationtem sodíku pro analýzu v pozitivním módu MALDI-MS¹³

Technika MALDI-MS může být použita pro analýzu chromatografických frakcí obsahujících GAG oligosacharidy v off-line módu. Pro on-line separace GAGs je primárně používanou ionizační technikou *ESI*.⁵

2.3.1.1 Analýza GAGs technikou ESI-MS

Pro kvantitativní analýzu CS/DS, KS a HS v biologických vzorcích se ukázala být nejvhodnější kombinace ionizace elektrosprejem s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem (ESI-QqQ).⁹

ESI patří do skupiny měkkých ionizačních technik, jejíž výhodou při analýze GAGs je minimální ztráta sulfátových skupin a vysoký výtěžek rodičovských iontů.⁴⁸ Vzhledem k velmi kyselému charakteru GAGs oligosacharidů je vhodnou volbou ionizace negativními potenciály. ESI spektra sulfatovaných GAGs jsou velmi komplexní díky několika faktorům: a) v ESI-MS vznikají vícenásobně nabitě ionty molekul; b) sulfátové skupiny tvoří adukty

s různými kationty v různých stupních; c) i přes to, že je ESI velmi šetrnou technikou, tak při ionizaci GAGs vzniká určité malé množství fragmentů, jejichž přítomnost komplikuje interpretaci získaných spekter.

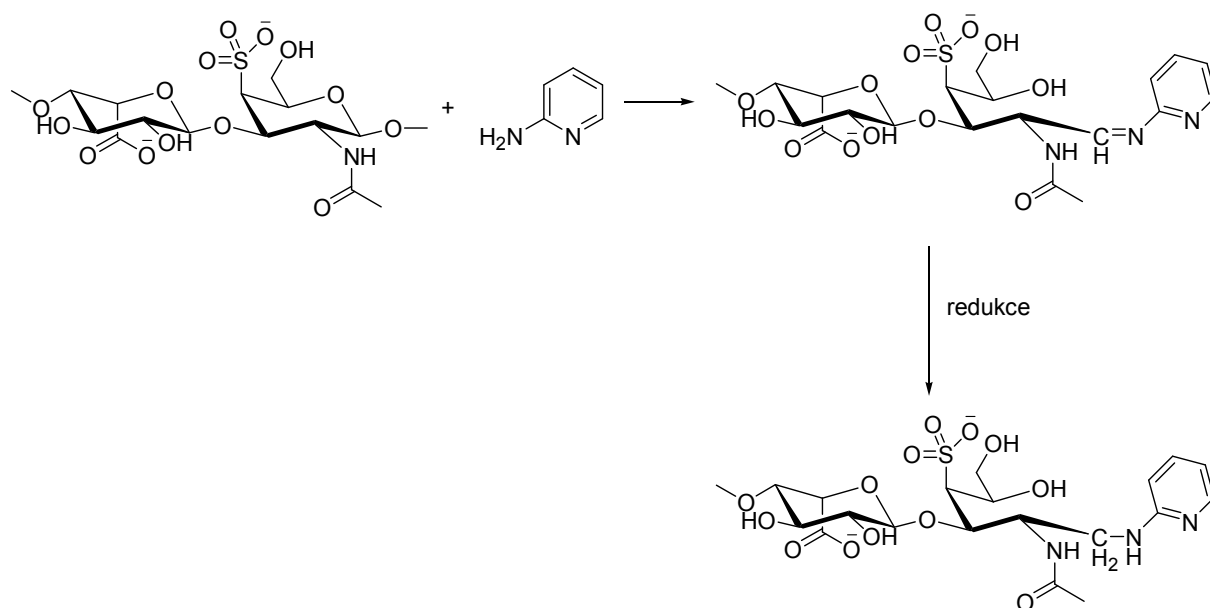
Technika ESI umožňuje přímou detekci chromatografického eluentu. Chromatografické mobilní fáze ovšem musí obsahovat pouze těkavé složky kompatibilní s ESI-MS. Z jiných separačních metod je možno použít například kapilární elektroforézu s on-line MS detekcí.⁵

2.3.2 Stanovení GAGs technikou LC/MS

Vylučovací chromatografie (SEC) je dlouho používanou metodou pro separaci oligosacharidových produktů po depolymerizační reakci GAGs.⁵ Výhodou této metody je zejména její robustnost. Mobilní fáze neobsahuje ion-párovací činidla nebo jiná aditiva a množství vzorku GAGs potřebné pro úspěšnou analýzu touto technikou je jen několik mikrogramů.¹⁰

SEC-LC využívá pro rozlišení sulfatovaných polohových izomerů tandemovou MS.¹⁰ Touto technikou bylo možno provést stanovení stupně sulfatace a epimerizace pro CS/DS extrahovaných z pojivové tkáně za použití kolony Superdex Peptide 3,2/30, která byla ekvilibrována 10% ACN, 50 mM roztokem mravenčanu amonného s průtokem 40 μ l/min.⁵⁵ Dále byla pomocí SEC-LC provedena analýza disacharidů odvozených od HS (*kolona*: SuperdexTM peptide PC 3,2/30; *mobilní fáze*: 12,5 mM kyselina mravenčí, pH upraveno na 4,4 amoniakem v 10% ACN; *doba analýzy*: 110 min)⁵⁶ a také k charakterizaci nízkomolekulárních heparinových vzorků (*kolona*: dvě SEC kolony Waters Ultrahydrogel 250 (7,8mm x 30 cm) v sérii; *mobilní fáze*: MeOH:voda (4:6; v/v) s 30 mM hydrogenuhličitanem amonným; *průtok MF*: 0,5 ml/min).⁵⁷

Nativní sacharidy nejsou na *reverzních stacionárních fázích* zadržovány, avšak po derivatizaci vhodnou hydrofobní skupinou je možné zlepšit jejich chromatografické vlastnosti. Touto derivatizací může být například reduktivní aminace (Obr. 14). Jde o robustní metodu, která zvyšuje hydrofobicitu a tím i retenci oligosacharidů na reverzních fázích a také zlepšuje odezvu hmotnostního spektrometru.⁵⁸ Pro tento způsob derivatizace může být využit například 2-pyridylamin (PA) nebo kyselina 2-aminobenzoová.⁵



Obr. 14 Schéma reaktivní aminace dermatan sulfátu s 2-pyridylaminem

Pro LC/MS analýzu GAG metabolitů z biologických tekutin byla použita derivatizace s 1-fenyl-3-methyl pyrazolonem (PMP). Derivatizace s PMP vede k adici dvou PMP skupin na redukující konec monosacharidu s následnou eliminací vody. Po této chemické modifikaci byly vzorky extrahovány chloroformem a analyzovány použitím off-line nebo on-line ESI-MS.⁵⁹ Použití PMP je efektivní způsob pro derivatizaci HS a DS oligosacharidů ze vzorků moči pacientů onemocněných mukopolysacharidózou a následnou analýzu hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem.⁶⁰

RPIP-LC (*Iontově párová chromatografie*) je technika založená na tvorbě iontových párů. Při spojení této techniky s MS detekcí lze očekávat snížení výtěžku ionizace, což zhoršuje citlivost. Dále také ion-párovací činidlo často může kontaminovat iontový zdroj. I přes tyto problémy je na RPIP-LC založena celá řada metod pracujících s dobrými výsledky. Tato metoda využívá pro separaci GAGs oligosacharidů standardní C18 kolony (RP kolony).⁶¹ Pro MS analýzu je zapotřebí používat těkavá ion-párovací činidla. Koncentrace ion-párovacích činidel musí být dostatečně velká, aby došlo k zadržení analytu na stacionární fázi a přesto dostatečně nízká, aby zabránila významné iontové supresi v iontovém zdroji, která snižuje citlivost MS.⁴⁸

Pro RPIP-LC byl využit přídavek aminů a kvartérních amoniových solí do mobilních fází, který způsobil párování alkyl amoniových kationtů s negativně nabitými GAG oligosacharidy. Tím je usnadněna jejich interakce se stacionární reverzní fází. Aminová

činnidla musí být dostatečně těkavá, aby byla kompatibilní s ESI-MS a zároveň musí poskytovat dostatečnou hydrofobicitu pro interakci se SF. V systematických studiích vlastností di-, tri- a tetraalkyl amoniových iontů se jako slibné ion-párovací činidlo ukázal být 5 mM dibutylamin.⁵⁵

Nederivatizované disacharidy CS/DS a heparin/HS byly separovány použitím iontově-párové RP chromatografie (kapilární nebo microflow) s ESI-MS detekcí. Metoda však neumožňovala dostatečné chromatografické rozlišení izomerů mono- a disulfatovaných CS/DS. Pro jednoznačnou identifikaci byla použita tandemová MS (MS/MS).³

HILIC chromatografie je široce využívanou metodou pro analýzu sacharidů včetně GAGs. Umožňuje separaci nabitých i nenabitých sacharidů. Pro LC/MS analýzu GAGs jsou nejvíce využívány pro HILIC separace aminové a amidové SF, nověji pak zwitteriontové SF.⁵

První kolony použité pro HILIC separaci sacharidů byly naplněny *aminopropyl silikagelovými SF*. Určitým nebezpečím při použití těchto kolon je zde tvorba Schiffovy báze mezi primární amino skupinou a aldehydickou skupinou redukujícího konce glykanu. Tím může docházet k nevratnému navázání cukrů nesoucích v molekule aldehydickou skupinu. Proto jsou aminové HILIC kolony využívány především pro separaci redukováných nebo reduktivně aminovaných sacharidů.⁵ Pro separaci sulfatovaných GAGs je možno použít aminové HILIC kolony v kombinaci s hmotnostním spektrometrem vybaveným iontovým zdrojem turbo ionspray. Hmotnostní spektrometr pracoval v módu MRM, který umožnil kvantifikaci specifických produktů štěpení mezi různými vzorky tkání.⁹ Stejný chromatografický systém byl použit pro LC/MRM MS analýzu Δ -nenasycených disacharidů HS produkovaných štěpením pomocí lyáz, které byly extrahovány z mozku a jater myši a ze vzorků nádorových tkání myši.⁶²

Amidová skupina je méně bazická a reaktivní než primární aminová skupina. Z tohoto důvodu je výhodné pro separaci všech tříd kyselých glykanů používat právě tyto *amidové SF*. Retence na amidové HILIC koloně je méně citlivá na změny pH eluentu, nedochází ke tvorbě Schiffových bází s nativními sacharidy a neobjevují se problémy s recovery vysoce sulfatovaných GAGs.⁵ Amidové kolony jsou velmi robustní a použitelné pro všechny třídy glykanů. Při použití amidických-HILIC kolon s velikostí částic 3-5 μm nebylo dosaženo dostatečného rozlišení pro separaci disacharidů. Kromě toho nesulfatované disacharidy koeluují s artefakty, které jsou u tohoto typu kolon vždy přítomny a mohou interferovat s MS detekcí. Z těchto důvodů 3-5 μm amidické-HILIC kolony nejsou vhodné pro analýzu

disacharidů. Při použití 1,9 μm amidických-HILIC stacionárních fází dochází ke zlepšení účinnosti a následně i rozlišení pro stanovení GAG disacharidů. Nezanedbatelnou výhodou je i kratší čas analýzy poskytovaný chromatografií na těchto sub-2 μm fázích.¹⁰

Částečné lyázové štěpení CS/DS GAGs produkuje série Δ -nenasycených oligosacharidových produktů lišících se počtem disacharidových jednotek. Takovéto produkty mohou být velmi efektivně separovány využitím amidových-HILIC kolon s gradientem klesajícího obsahu organické fáze. Použitá mobilní fáze měla toto složení: MF A – 3% kyselina octová upravená na pH 7,3 s triethylaminem a ACN (20:80; v/v) a MF B obsahující stejné látky ovšem v poměru triethylamin:ACN (50:50; v/v).⁶³ V této práci byly GAG oligosacharidy podrobeny reduktivní aminaci použitím fluorogenního činidla (2-aminopyridinu) a následně detekovány fluorescenční detekcí (excitační vlnová délka - 320 nm; emisní vlnová délka - 400 nm).^{5,63}

Již dříve se některé techniky ukázaly být použitelné jak pro analýzu HS tak CS/DS, avšak v mnoha případech byly tyto metody vyvíjeny a optimalizovány pouze pro analýzu jedné třídy GAG. Do té doby tedy nebyla známá technika, která by byla schopná simultánní analýzy více tříd GAGs. V roce 2011 Takegawa a kolektiv publikoval práci,³⁰ v níž popsal analytickou techniku, která byla jako první použitelná pro analýzu všech hlavních tříd GAG najednou (v tomto případě HS, CS/DS a HA). Příprava biologických vzorků spočívala v purifikaci disacharidů GAGs pomocí BlotGlyco (z angl. Glycoblotting) s následným značením disacharidových jednotek fluoroforem (2-aminobenzamidem - 2AB). Separace 2AB-značených GAG disacharidů byla provedena pomocí ZIC-HILIC chromatografie (sulfoalkylbetainová SF) s fluorescenční detekcí (excitační vlnová délka – 330 nm; emisní vlnová délka - 420 nm). Pro stanovení byla použita gradientová eluce, přičemž MF obsahovala vodu, acetonitril a octan amonný. Tato metoda byla následně použita i pro analýzu dalších tříd GAGs (např. KS).³⁰

2.3.3 Stanovení GAGs technikou CE

Kapilární elektroforéza má velký význam pro separaci a analýzu biomolekul zahrnující proteiny, glykany a malé molekuly metabolitů. CE se ukázala být také velmi slibnou technikou pro analýzu di- a oligosacharidů odvozených od GAGs, a to především díky silně aniontovému charakteru těchto látek.^{4,5,48} Nejběžnějším a nejjednodušším módem CE, který lze pro analýzu disacharidů GAGs využít je *kapilární zónová elektroforéza* (CZE).

Disacharidy vzniklé depolymerizací GAGs mohou být analyzovány ve dvou módech CZE: v *módu normální polarity* při vysokém pH (použitím borátového pufru při pH 8-9) a v *módu reverzní polarity* při nízkém pH (pH 3-4).^{4,5}

V normálním polárním módu jsou složky analytu unášeny elektroosmotickým tokem v povrchově neupravené křemenné kapiláře směrem ke katodě. Jednotlivé složky analytu jsou separovány na základě různých elektroforetických mobilit. Při použití tohoto módu eluují jako první nejméně kyselé sloučeniny s nejmenším počtem záporných nábojů.

V módu reverzní polarity je elektroosmotický tok minimalizován použitím kyselých pufrů a pouze analyty, které mají charakter aniontů (disacharidy GAGs) jsou schopny migrovat směrem od katody k anodě.⁵

Například Karamanos a kolektiv analyzovali oligosacharidy HP a HS v módu reverzní polarity CE a to použitím 15 mM fosfátového pufru o pH 3,5 a s využitím UV detekce při 232 nm. Při tomto stanovení bylo zapotřebí pouze několik femtogramů HP a HS a doba analýzy byla pouhých 15 min.⁶⁴

MS a NMR jsou velmi účinné techniky pro získání strukturních informací o dané molekule. Avšak existuje pouze několik publikací zabývajících se strukturní analýzou GAGs pomocí CE ve spojení s MS nebo NMR.^{48,50} Zajímavé je spojení kapilární izotachofórey (cITP) s NMR. Ačkoli je publikovaná metoda cITP-NMR stále ve stádiu vývoje, představuje slibnou techniku pro analýzu kyselých oligosacharidů HP a HS. Hlavní výhodou cITP je její schopnost koncentrovat analyt o 2 až 3 řády.⁴⁸

Pro detekci separovaných disacharidů HP může být použita také technika ESI-MS a to jak v negativním tak i v pozitivním módu. Pozitivní mód ESI vyžaduje kyselé prostředí (pufr obsahující kyselinu mravenčí) a negativní mód ESI bazické prostředí (triethylamin). Metoda využívající triethylamin (negativní mód ESI) může být použita také pro separaci oligosacharidů hyaluronanu.⁵

Výhodou techniky CZE je především rychlost separace disacharidů GAGs (poskytuje dobré rozlišení pro všechny disacharidy v jedné analýze za krátkou dobu), malé množství vzorku potřebného pro analýzu (10-20 pg) a vysoká citlivost.⁴

3 Cíl práce

Cíle předložené diplomové práce lze shrnout do následujících bodů:

1. Testování možností derivatizace GAGs a vývoj metody tandemové hmotnostní spektrometrie ve spojení s kapalinovou chromatografií pro jejich stanovení v biologických materiálech.
2. Analýza GAGs v tělních tekutinách metodou LC-MS/MS bez derivatizace.
3. Testování možností separace složek Sulodexidu na reverzní fázi.
4. Testování možností separace složek Sulodexidu s využitím HILIC chromatografie.

4 Experimentální část

4.1 Chemikálie a analyzované materiály

Pro přípravu roztoků standardů, reálných vzorků a mobilní fáze byla použita deionizovaná voda z dvoustupňové deionizační stanice Merck-Millipore Direct (Merck-Millipore S.A.S, Molsheim, Francie), kyselina trifluoroctová (Reagent Plus, 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), acetylchlorid (p.a., 99%, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), methanol (gradient grade, pro HPLC, CHROMANORM, Francie), octan amonný (p.a., Lachema, Brno, ČR), acetonitril (gradient grade, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), kyselina mravenčí (p.a., 99,7%, Lachema, Brno, ČR). Preparát Sulodexid (směs středně molekulárního heparan a dermatan sulfátu) a vzorky lidské a potkaní plazmy byly k analýze dodány společností Noventis s.r.o., Zlín). Do doby analýzy byly vzorky plazmy uchovávány v mrazáku.

4.2 Instrumentace

4.2.1 Přístroje

Experimentální část diplomové práce byla provedena na těchto přístrojích:

I. Ultra účinný kapalinový chromatograf Acquity UPLC (Waters, Milford, USA), který je vybaven diode array detektorem (Acquity PDA Detector), termostatovaným kolonovým manažerem (Acquity Column Manager), modulem pro automatické dávkování vzorků (Acquity Sample Manager) a binárním gradientovým čerpadlem (Acquity Binary Solvent Manager). Tento chromatograf byl spojen s hmotnostním spektrometrem Q-TOF Premier (Waters, USA) s hybridním analyzátozem typu QqTOF a elektrosprejem se Z-spray geometrií.

II. Ultra účinný kapalinový chromatograf Acquity UPLC (Waters, Milford, USA), který je vybaven termostatovaným kolonovým manažerem (Acquity Column Manager), modulem pro automatické dávkování vzorků (Acquity Sample Manager) a binárním gradientovým čerpadlem (Acquity Binary Solvent Manager). Tento UPLC byl spojen s hmotnostním spektrometrem Xevo TQD (Waters, USA). Tento hmotnostní spektrometr byl vybaven elektrosprejem (Z-spray) a analyzátozem sestávajícím z prvního kvadrupólu, T-Wave kolizní cely a druhého kvadrupólu. Tento typ analyzátoru pracuje na stejném principu jako trojitě kvadrupóly.

III. Synapt G2-S HDMS (Waters, USA) je hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením (40 000 FWHM). Je vybavený iontovým zdrojem ESI a MALDI a iontovou opikou T-Wave. Hmotnostní analyzátor Q-TOF se skládá z kvadrupólového analyzátoru (Q) a analyzátoru doby letu (TOF) s ortogonálním uspořádáním. V prostoru analyzátoru je integrovaná mobilitní cela (T-Wave IMS) umožňující separaci iontů podle jejich kolizních průřezů (iontově mobilitní separace).

4.2.1.1 Nastavení přístrojů

4.2.1.1.1 Acquity UPLC/Q-TOF Premier

Kapalinová chromatografie:

Metoda I.

Kolona Acquity BEH C18 (100 x 2,1mm, dp = 1,7um); Mobilní fáze A - 10 mM octan amonný ve vodě + 4% methanolu, mobilní fáze B - 10 mM octan amonný v methanolu. Gradient: 0 - 2,4 min 95 % A; 2,4 - 6,4 min 95-10% A; 6,4 - 8,0 min 10% A; 8,0 - 9,0 min 10 - 95% A; 9,0 - 12,0 min 95% A. Průtok mobilní fáze: 250 µl/min. Úprava mobilní fáze za kolonou (post-column make-up liquid, 5% kyselina mravenčí (mícháno s využitím T-spojky za kolonou, průtok 150 µl/min)).

Hmotnostní spektrometrie

Iontový zdroj - elektrosprej (Z-spray); napětí na sprejovací kapiláře +2,8 kV; napětí na Sampling Cone 30 V; teplota zdroje 120°C; desolvační teplota 380°C; průtok zmlžovacího plynu (N₂) - 25 l/hod; průtok desolvačního plynu 400 l/hod; kolizní energie: sken 1 pro

kvantifikaci CE = 5 eV; sken 2 pro identifikaci na základě fragmentů CE1 = 15 eV, CE2 = 30 eV, CE3 50 eV. Doba skenu 0,2 s; inter scan delay 0,02 s.

Nastavení iontového zdroje a iontové optiky bylo optimalizováno kontinuálním zaváděním roztoku vzorku do iontového zdroje. Optimální parametry byly uloženy jako pracovní „tune method“ a tato metoda byla použita při LC/MS měřeních.

4.2.1.1.2 Acquity UPLC/Xevo TQD

Kapalinová chromatografie

Metoda II.

Kolona Acquity BEH C18 (100 x 2,1 mm, dp = 1,7 μm). Mobilní fáze A -10 mM octan amonný ve vodě + 4% methanolu, mobilní fáze B - 10 mM octan amonný v methanolu. Gradient: 0 - 1,5 min 98 % A; 1,5 - 1,6 min 98-85% A; 1,6 - 5,0 min 85-10% A; 5,0 - 6,0 min 10-98% A; 6,0 - 8,0 min 98% A. Průtok mobilní fáze: 350 μl/min. Post-column make-up liquid - 5% kyselina mravenčí (mícháno s využitím T-spojky za kolonou, průtok 350 μl/min).

Metoda III.

Průtoková injekční analýza (měření bez chromatografické kolony). Mobilní fáze - ACN:voda (90:10, v/v). Průtok mobilní fáze: 200 μl/min.

Metoda IV.

Kolona YMC Europe Triart HILIC–diol, 100 x 2,0 mm, dp = 5 μm, 120 Å (YMC, USA). Mobilní fáze - ACN:voda (95:5, v/v). Průtok mobilní fáze: 200 μl/min.

Metoda V.

Kolona Acquity C18, TSS 3, 100 x 2,1 mm, dp = 1,8 μm, Waters. Mobilní fáze - deionizovaná voda. Průtok mobilní fáze: 200 μl/min. Post-column make-up liquid - MeOH (mícháno s využitím T-spojky za kolonou, průtok 400 μl/min).

Metoda VI.

Kolona YMC Triart C18 100 x 2,0 mm I. D.; dp = 1,9 μm (YMC). Mobilní fáze - deionizovaná voda. Průtok mobilní fáze: 200 μl/min. Post-column make-up liquid – MeOH (mícháno s využitím T-spojky za kolonou, průtok 400 μl/min).

Metoda VII.

Kolona Ascentis Express HILIC 100 x 2,1 mm, 2,7 μm . Mobilní fáze - deionizovaná voda (experimenty pro kontrolu sorpce analytu na stacionární fázi a kontrolu citlivosti detekce). Průtok mobilní fáze: 200 $\mu\text{l/min}$. Post-column make-up liquid - MeOH (mícháno s využitím T-spojky za kolonou, průtok 400 $\mu\text{l/min}$).

Metoda VIII.

Kolona ZIC[®]-cHILIC (3 μm , 120 Å) 150 x 2,1 mm, PEEK (Merck-Millipore, KGaA, Německo). Mobilní fáze A - ACN:voda (90:10, v/v) + 25 mM octan amonný, mobilní fáze B - deionizovaná voda + 25 mM octan amonný. Gradient: 0-4 min 35% MF A; 4-4,5 min 35%-100% MF A; 4,5-9 min 100% MF A. Průtok mobilní fáze: 200 $\mu\text{l/min}$.

Metoda IX.

Kolona ZIC[®]-cHILIC (3 μm , 120 Å) 150 x 2,1 mm PEEK (Merck-Millipore, KGaA, Německo). Mobilní fáze A - ACN:voda (90:10, v/v) + 1,25 mM octan amonný, mobilní fáze B - deionizovaná voda + 1,25 mM octan amonný. Gradient: 0-4 min 39% MF A; 4-4,5 min 39%-100% MF A; 4,5-9 min 100% MF A. Průtok mobilní fáze: 200 $\mu\text{l/min}$.

Hmotnostní spektrometrie

Iontový zdroj - elektrosprej (Z-spray); napětí na sprejovací kapiláře +3,1 kV; napětí na Sampling cone 105 V; teplota zdroje 150°C; desolvační teplota 500°C; průtok desolvačního plynu 1000 l/hod, kolizní energie 20 V.

Nastavení iontového zdroje a iontové optiky bylo optimalizováno kontinuálním zaváděním roztoku vzorku do iontového zdroje. Optimální parametry byly uloženy jako pracovní „tune method“ a tato metoda byla použita při LC/MS měřeních.

MRM přechody: 457,922 $\rightarrow$ 377,99; 457,922 $\rightarrow$ 281,92.

4.2.1.1.3 Synapt G2-S

Iontový zdroj - elektrosprej (negativní mód), napětí na sprejovací kapiláře +2,2 kV; napětí na Sampling cone 80V; teplota zdroje 100°C; desolvační teplota 250°C; Cone Gas Flow 30 l/h; průtok desolvačního plynu 300 l/hod; LM Resolution 10; HM Resolution 15; kolizní energie: Ramp 20-40 eV.

4.3 Příprava vzorků

4.3.1 Příprava roztoků standardů

Základní roztok standardu o koncentraci 1 mg/ml byl připraven rozpuštěním 1 mg sulodexidu v 1 ml deionizované vody. Následně byla připravena kalibrační řada o koncentracích 0,8; 1; 2; 5; 10, 50 a 100 mg/l a to postupným ředěním základního roztoku mobilní fází ve složení, které bylo použito na začátku gradientu každé testované chromatografické metody.

4.3.2 Příprava modelových roztoků a vzorků plazmy s využitím methanolýzy

Byly připraveny modelové roztoky Sulodexidu o koncentracích 0; 0,1; 0,2; 1, 5 a 20 mg/l ve třech opakování na každé koncentrační úrovni. Dále byly připraveny vzorky potkaní plazmy - plazma blank a vzorky plazem s přidavky Sulodexidu na koncentračních úrovních 0,1; 0,2; 1; 5 a 20 mg/l. Vzorky plazmy byly následně deproteinovány následujícím způsobem.

5 ml plazmy bylo odpipetováno do plastové zkumavky vhodné pro centrifugaci, bylo přidáno odpovídající množství standardního roztoku Sulodexidu a 0,5 ml koncentrované kyseliny trifluoroctové, čímž došlo k vysrážení proteinů. Provedla se centrifugace (10 min/4x1000 rpm) a byl oddělen supernatant (kapalná část zbavená proteinů - 1. podíl) do lahvičky pro head space analýzu (10 ml). K vysráženým proteinům bylo přidáno 5 ml deionizované vody, dobře promícháno a byla provedena centrifugace (10 min/4x1000 rpm). Opět byl oddělen supernatant, čímž byl získán 2. podíl. Tato frakce byla připravena pro kontrolu, zda dochází k sorpci Sulodexidu na vysrážené proteiny. Oba vodné podíly byly vysušeny přes noc v lyofilizátoru a vysušené vzorky (odparky) byly následně podrobeny methanolýze.

Pro methanolýzu bylo potřeba nejdříve připravit bezvodý roztok chlorovodíku v methanolu ($c = 3 \text{ mol.l}^{-1}$). Tento roztok byl připraven opatrným přikapáváním vypočteného množství acetylchloridu do methanolu chlazeného ledovou drtí za stálého míchání. Acetylchlorid bylo potřeba přidávat velmi pomalu, aby nedošlo k explozi reakční směsi (při

této práci bylo nutno dodržovat všechna bezpečnostní pravidla: bezpečnostní štít, rukavice, digestoř).

5 ml připraveného HCl v MeOH o $c = 3 \text{ mol.l}^{-1}$ bylo poté přidáno k jednotlivým odparkům. Vzniklá suspenze byla 5 min sonifikována v ultrazvukové lázni a následně byla vložena do sušárny na 75 min při 65°C. Při manipulaci se vzorky během methanolýzy bylo potřeba pracovat velmi opatrně a za použití výše uvedených bezpečnostních pomůcek. Methanolyzované vzorky byly následně odpařeny proudem dusíku za laboratorní teploty do sucha a odparek byl do doby analýzy skladován v mrazáku. Nakonec byly odparky rozpuštěny v 500 μl MF A a 500 μl vody.

4.3.3 Příprava vzorků plazmy bez derivatizace

Pro analýzu Sulodexidu v krevní plazmě bez derivatizace s využitím reverzní fáze byly připraveny tyto vzorky: plazma blank a plazma s přídavkem Sulodexidu o koncentraci 0,2 mg/l. Sulodexid byl přidán v jednom případě před deproteinací a v druhém případě po deproteinaci. Tyto vzorky byly připraveny podle následujících postupů:

I. Vzorek *plazma blank* byl připraven odpipetováním 0,5 ml plazmy do plastové zkumavky vhodné pro centrifugaci. Aby došlo k vysrážení proteinů, bylo k plazmě přidáno 0,5 ml ACN. Po deproteinaci byla provedena centrifugace a následně byl oddělen supernatant, který byl odfoukán proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 250 μl vody a vzorek byl přefiltrován přes membránový mikrofiltr (PTFE, velikost pórů 0,22 μm).

II. Vzorek *plazma s přídavkem Sulodexidu 0,2 mg/l před deproteinací* byl připraven odpipetováním 0,5 ml plazmy do plastové zkumavky vhodné pro centrifugaci. K plazmě bylo přidáno 100 μl roztoku Sulodexidu ($c = 1 \text{ mg/l}$) a vzniklá směs byla promíchána. Dále bylo přidáno 0,5 ml ACN a po deproteinaci byla provedena centrifugace. Poté byl oddělen supernatant, který byl odfoukán proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 250 μl deionizované vody a vzorek byl přefiltrován přes membránový mikrofiltr (PTFE, velikost pórů 0,22 μm).

III. Vzorek *plazma s přídavkem Sulodexidu 0,2 mg/l po deproteinaci* byl připraven odpipetováním 0,5 ml plazmy do plastové zkumavky vhodné pro centrifugaci. K plazmě bylo

přidáno 0,5 ml ACN a po deproteinaci byla provedena centrifugace. Po oddělení supernatantu bylo k plazmě přidáno 100 µl roztoku Sulodexidu ($c = 1 \text{ mg/l}$). Supernatant byl odfován proudem dusíku, odparek byl rozpuštěn v 250 µl deionizované vody a nakonec byl vzorek přefiltrován přes membránový mikrofiltr (PTFE, velikost pórů 0,22 µm).

Při použití HILIC kolony byly vzorky plazmy připraveny stejným způsobem. Navíc byly analogicky připraveny i vzorky plazmy s přídavkem 1 mg/l Sulodexidu.

4.3.4 Příprava vzorků moči bez derivatizace

Nejdříve byly připraveny standardní roztoky Sulodexidu o koncentracích 1 mg/ml (*Roztok I.*) a 100 mg/l (*Roztok II.*).

Pro analýzu Sulodexidu v moči bez derivatizace byly připraveny vzorky moči s přídavky Sulodexidu na koncentračních úrovních 0; 3; 3,75; 4,5; 30; 37,5 a 45 mg/l podle níže uvedené tabulky (Tab. I).

Tab. I Tabulka popisující přípravu vzorků moči

Vzorek	Moč [µl]	Roztok I. [µl]	Roztok II. [µl]
1	1000	-	-
2	910	90	-
3	925	75	-
4	940	60	-
5	910	-	90
6	925	-	75
7	940	-	60

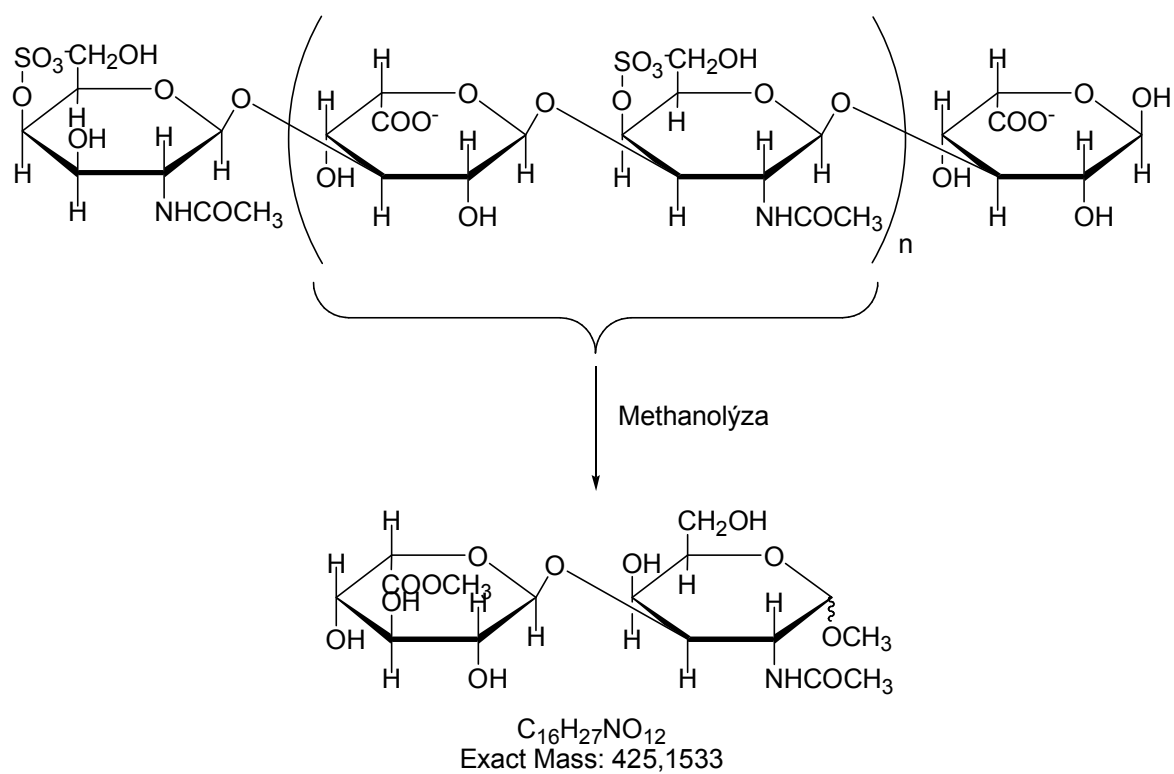
Ze vzorků 1-7 bylo odpipetováno 0,5 ml (ne)spikované moči do skleněných vialek a zředěno 0,5 ml mobilní fáze (195 µl MF A a 305 µl MF B). Vzorky byly následně zfiltrány přes membránový mikrofiltr (PP, velikost pórů 0,22 µm).

5 Diskuze a výsledky

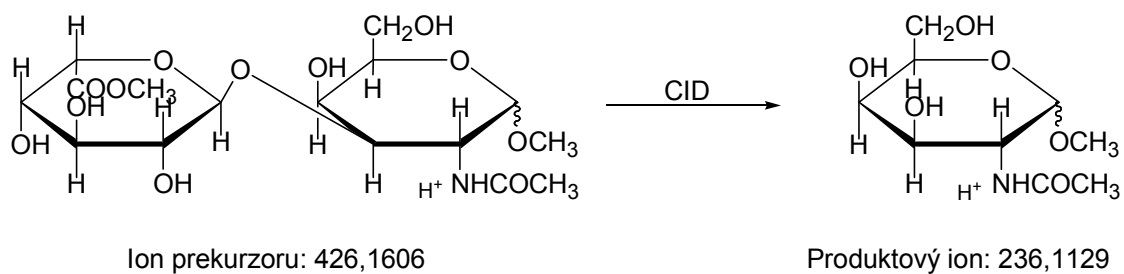
Pro analýzu dermatan a heparan sulfátu v preparátu Sulodexid v biologických tekutinách byly testovány dva přístupy. První část této kapitoly je věnována analýze Sulodexidu v krevní plazmě po methanolýze a druhá část je zaměřena na analýzu Sulodexidu v plazmě a moči bez derivatizace.

5.1 Analýza DS a HS v preparátu Sulodexid po methanolýze

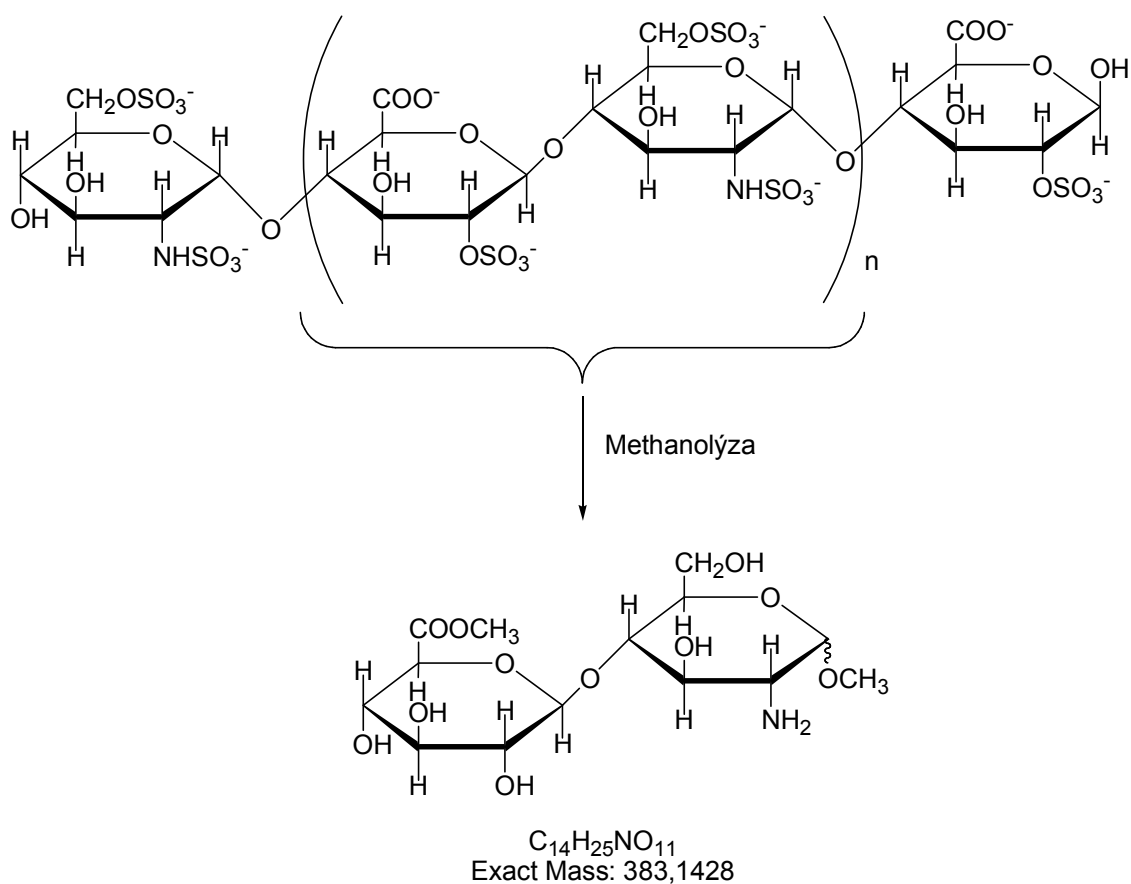
První experimenty vycházely z již dříve publikované práce,¹⁹ která se zabývala analýzou vybraných GAGs (DS a HS) v moči metodou LC-MS/MS. V této publikaci bylo dosaženo hodnot LOD 2 mg/l a LOQ 6 mg/l. Jak je obecně známo, moč představuje oproti plazmě výrazně jednodušší matici. Pokud se tedy má analýza DS a HS provádět v plazmě, je zapotřebí provést úpravu vzorku deproteinací. Úkolem bylo optimalizovat metodu umožňující analýzu na koncentrační úrovni 0,2 mg/l. Proto bylo třeba uvažovat i o prekoncentraci. Autoři zmíněné publikace použili pro úpravu vzorku methanolýzu, čímž získali z řetězců DS (Obr. 15) a HS (Obr. 17) methylované disacharidy se strukturami uvedenými na Obr. 16 a Obr. 18.



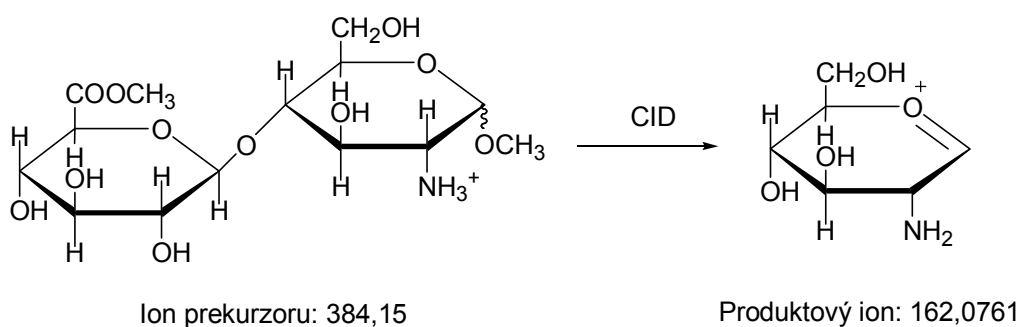
Obr. 15 Degradace polysacharidu dermatan sulfátu methanolýzou



Obr. 16 Struktura iontu prekurzoru a předpokládaného produktového iontu vznikajícího v kolizní cele hmotnostního spektrometru

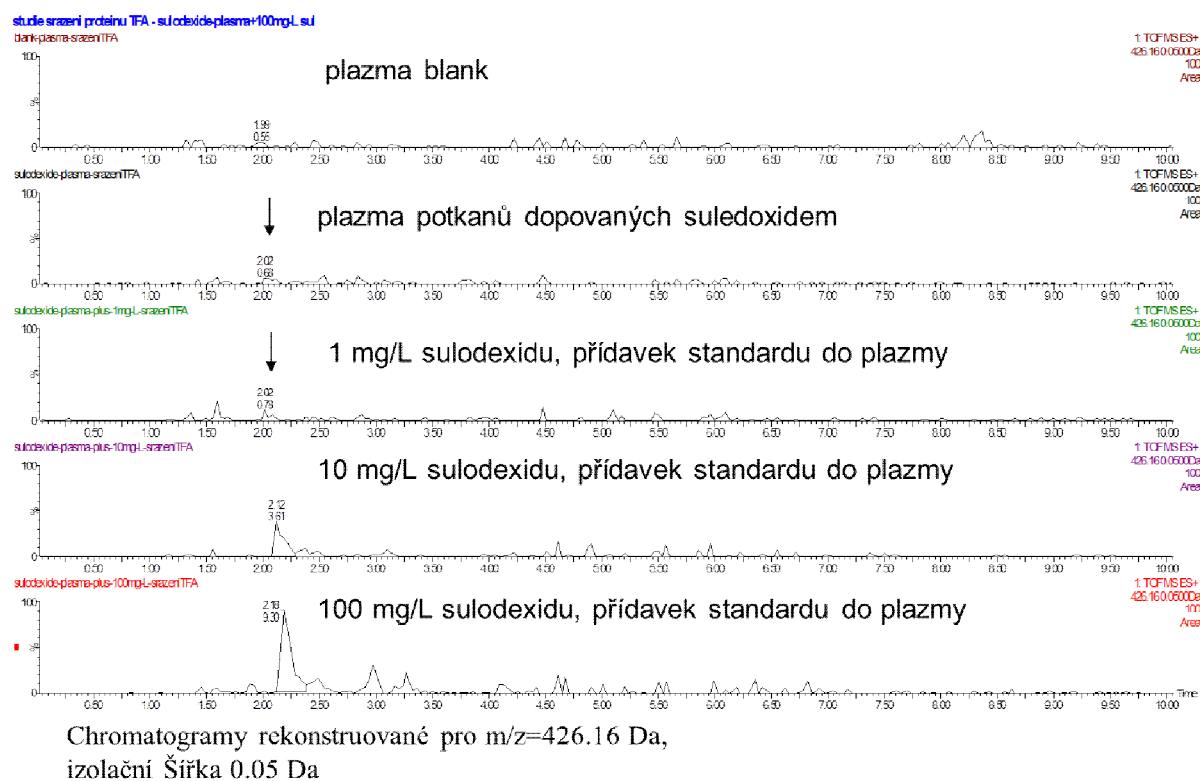


Obr. 17 Degradace polysacharidu heparan sulfátu methanolýzou



Obr. 18 Struktura iontu prekursoru vznikajícího z heparan sulfátu a předpokládaného produktového iontu vznikajícího v kolizní cele hmotnostního spektrometru¹⁹

Prvotní analýza DS a HS po methanolýze byla provedena na LC/MS sestavě Acquity UPLC/Q-TOF Premier. Pro měření byly použity podmínky popsané v kapitole 4.2.1.1.1. Obr. 19 ukazuje chromatogramy rekonstruované pro m/z hodnotu methanolyzovaného DS.



Obr. 19 Stanovení Sulodexidu v krevní plazmě na různých koncentračních úrovních

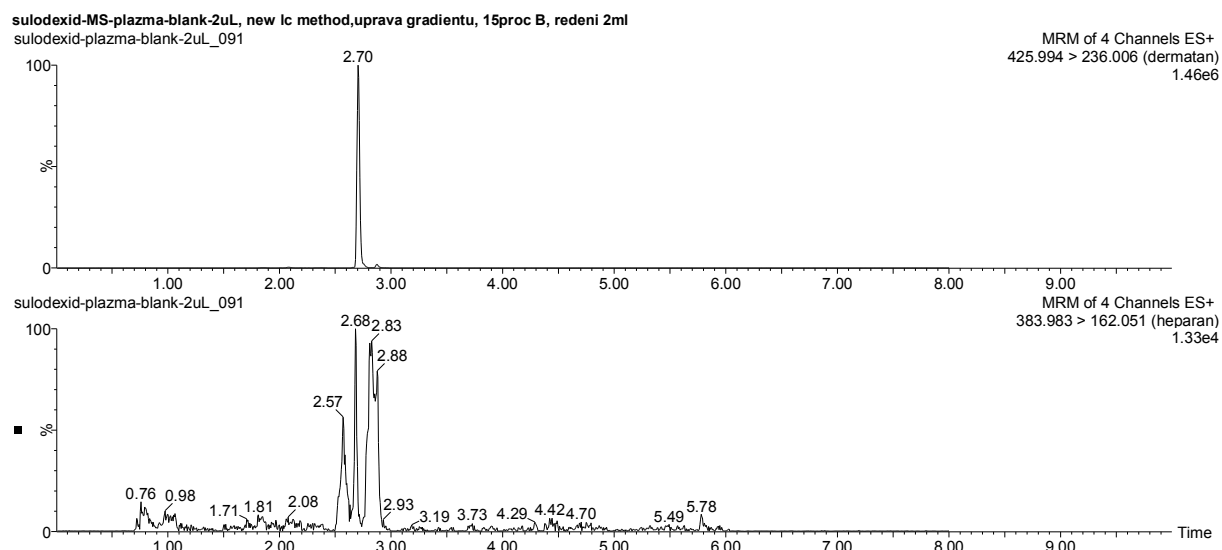
Z chromatogramů rekonstruovaných pro methanolizovaný dermatan sulfát je patrné, že spolehlivě lze za těchto podmínek pracovat na koncentrační úrovni 10 mg/l. Pro další experimenty bylo tedy potřeba vzorek prekoncentrovat a využít vyšší citlivosti druhé LC/MS sestavy (Acquity UPLC/Xevo TQD).

Vedle vysokého limitu kvantifikace byl problémem i výskyt iontů odpovídajících methanolizovanému dermatan sulfátu v plazmě blanku. I přes pečlivé promývání všech částí autosampleru se tyto ionty v plazmě-blanku vyskytovaly. Je tedy možné, že v plazmě jsou přítomny složky, které methanolýzou poskytují produkt analogický k dermatan sulfátu.

Při použití sestavy Acquity UPLC/Xevo TQD byly použity podmínky viz kapitola 4.2.1.1.2, *metoda II*. Za těchto podmínek byla provedena jednotlivá měření modelových roztoků Sulodexidu, plazmy blanku a plazmy s přídavky Sulodexidu. Každý vzorek byl proměřen ve třech opakováních.

Při měření na tomto přístroji byly pozorovány stejné problémy jako v případě sestavy Acquity UPLC/Q-TOF Premier, tedy vysoký limit kvantifikace nedovolující stanovit koncentrace na úrovni 0,2 mg/l a přítomnost signálů analytů v plazmě bez přídavku

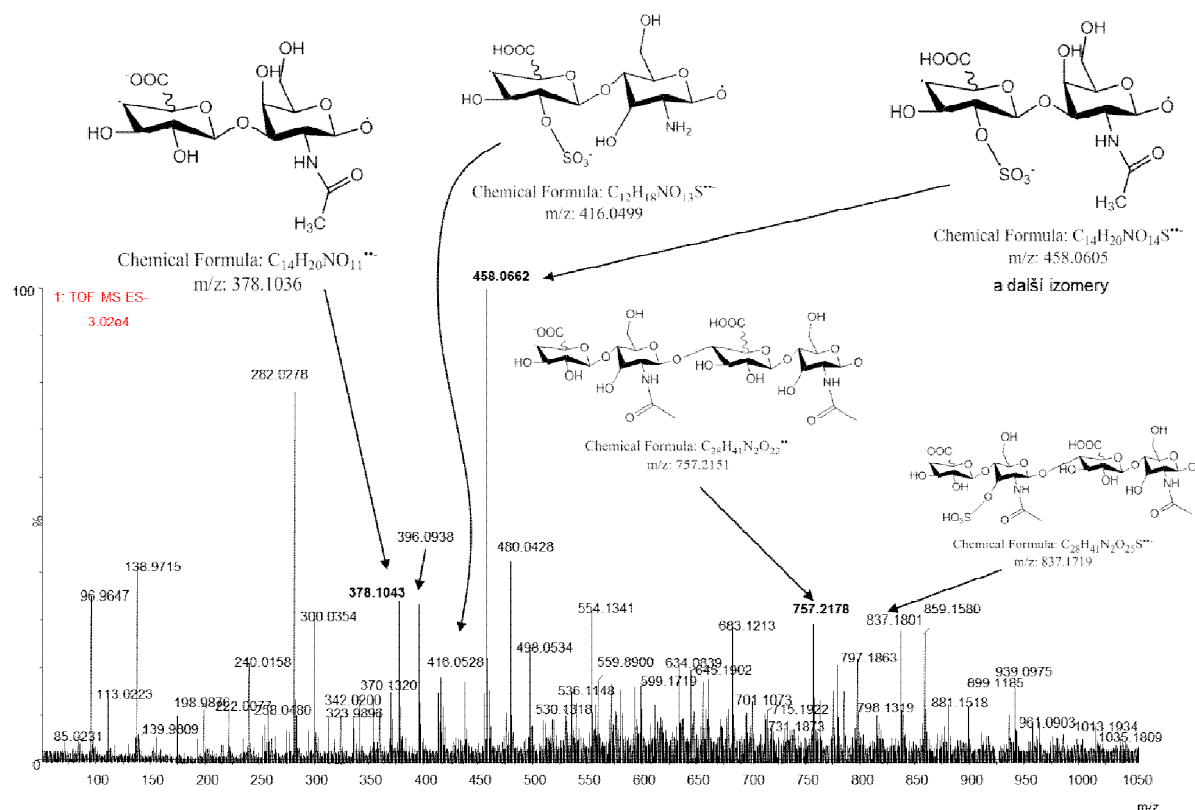
Sulodexidu (Obr. 20) Uvedené problémy vedly k hledání jiné metody úpravy vzorku a koncové techniky.



Obr. 20 Chromatogram vzorku plazmy blanku získaný měřením obou MRM přechodů (Acquity UPLC/Xevo TQD)

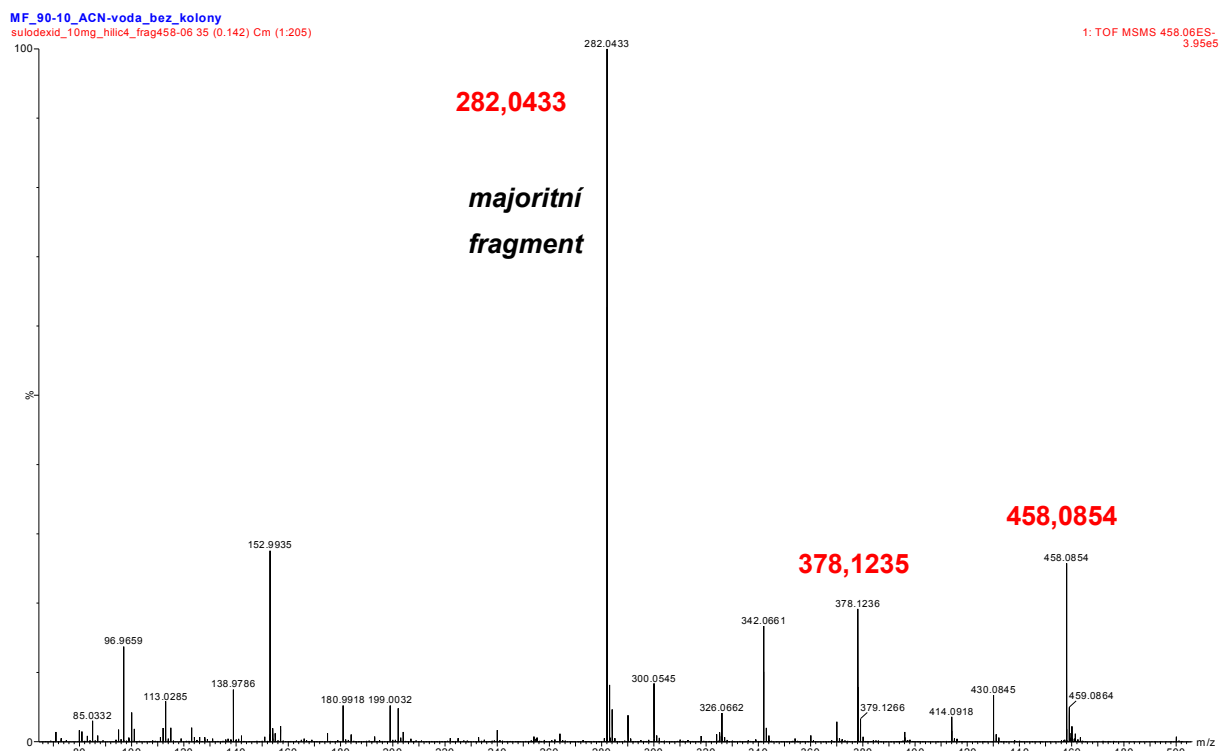
5.2 Analýza DS a HS v preparátu Sulodexid bez derivatizace

Pro zjištění možností analýzy složek Sulodexidu bez solvolýzy (methanolýzy) nebo derivatizace byla nejdříve provedena analýza nederivatizovaného Sulodexidu na tandemovém hmotnostním spektrometru s vysokým rozlišením a integrovanou iontově mobilní celou (Synapt G2-S, Waters). Obr. 21 ukazuje analýzu provedenou přímou infuzí roztoku Sulodexidu do iontového zdroje.



Obr. 21 Analýza roztoku Sulodexidu na hmotnostním spektrometru Synapt G2-S

Ve spektru je dominantní signál s hodnotou m/z 458,0662 odpovídající s odchylkou 5,7 mDa disacharidové jednotce z řetězce DS. Ve spektru je patrný i signál s hodnotou m/z 378,1043, který přísluší s odchylkou 0,7 mDa disacharidu z řetězce HS. Signál odpovídající majoritnímu iontu DS je možné dobře použít pro kontrolu obsahu Sulodexidu ve vzorku a byl pro tento účel detailněji zkoumán tandemovým hmotnostním spektrometrem (po kolizi indukované disociaci (CID) v kolizní cele (Trap cell)) byla prozkoumána fragmentace iontu s m/z 458,0662. Fragmentací tohoto iontu vznikly ionty o m/z 282,0433 a 378,1236. Obr. 22 ukazuje získané kolizní spektrum.



Obr. 22 Kolizní spektrum disacharidu DS

Modelový roztok Sulodexidu (bez derivatizace) o $c = 10 \text{ mg/l}$ (přímá infuze do iontového zdroje); měření v negativním ionizačním módu.

Ionty s m/z 282,0433 a 378,1236 získané fragmentací je možno použít jako dva hlavní MRM přechody při analýze Sulodexidu s využitím LC/MS přístroje Acquity UPLC/Xevo TQD (trojitý kvadrupól).

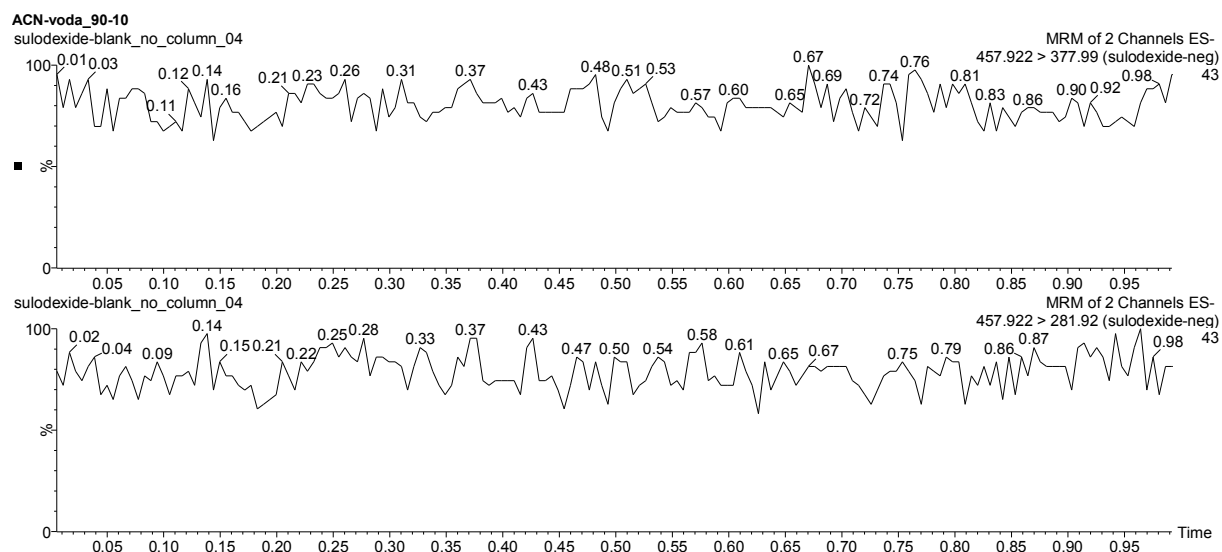
5.2.1 Analýza modelových roztoků Sulodexidu

Před samotnou LC/MS analýzou byla provedena analýza nástřikem pulzu analytu do proudu mobilní fáze (FIA – *flow injection analysis*).

5.2.1.1 Analýza modelových roztoků nástřikem metodou FIA

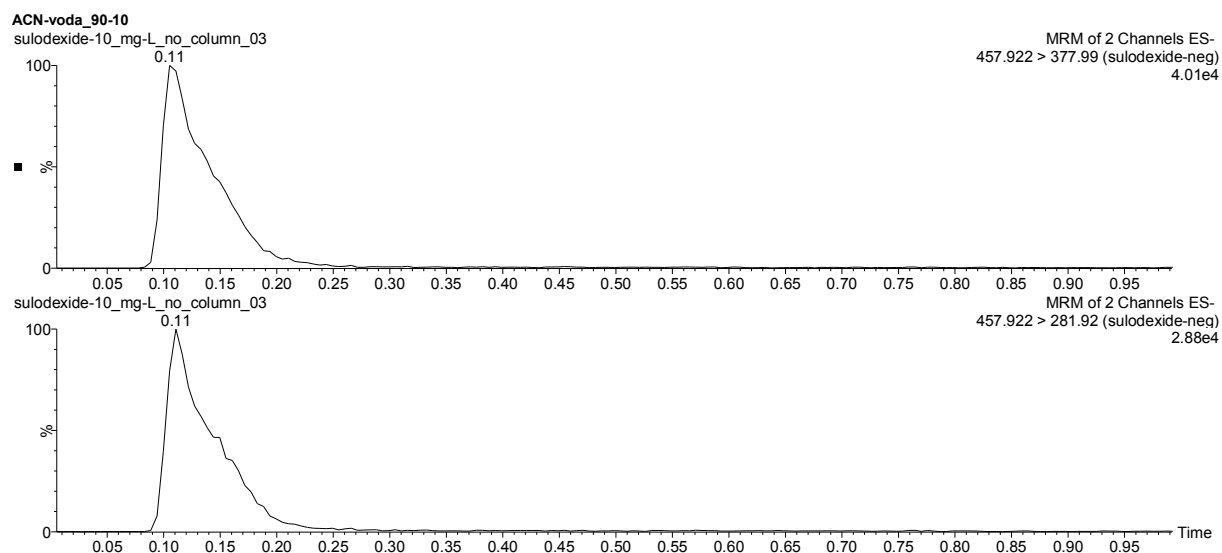
Pro tuto analýzu byla použita mobilní fáze ve složení ACN:voda (90:10, v/v – *metoda III.*), která byla uvažována jako počáteční pro optimalizaci retence v systému HILIC chromatografie. Podle Obr. 23, který ukazuje analýzu blanku (mobilní fáze), je patrné, že

v chromatogramu nejsou přítomny ionty o m/z 282,0433 a 378,1236 odpovídající iontům DS nebo HS.



Obr. 23 Nástrih modelového blanku metodou FIA

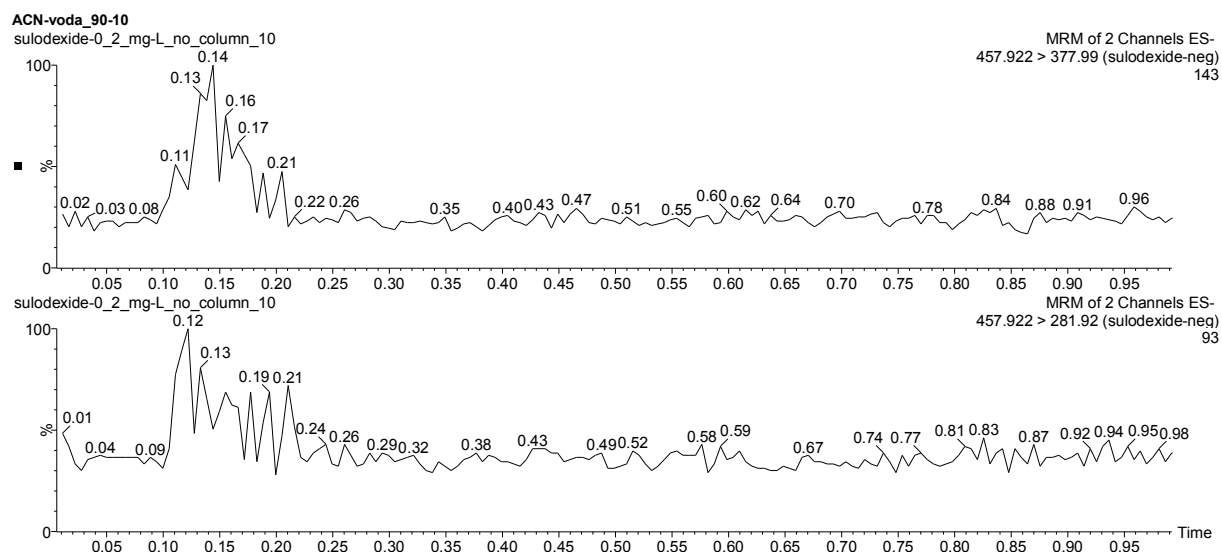
Následně byla provedena analýza Sulodexidu o koncentraci 10 mg/l, kterou znázorňuje Obr. 24.



Obr. 24 Nástrih modelového roztoku Sulodexidu o $c = 10$ mg/l metodou FIA

V chromatogramu rekonstruovaném pro oba MRM přechody je patrný výrazný pík disacharidu odpovídající majoritnímu signálu v DS. Díky příznivé odezvě při analýze Sulodexidu o koncentraci 10 mg/l byly dále testovány i nižší koncentrace. Obr. 25 ukazuje, že

na koncentrační úrovni 0,2 mg/l je zejména na MRM přechodu 458 → 378 využitelný signál analytu.



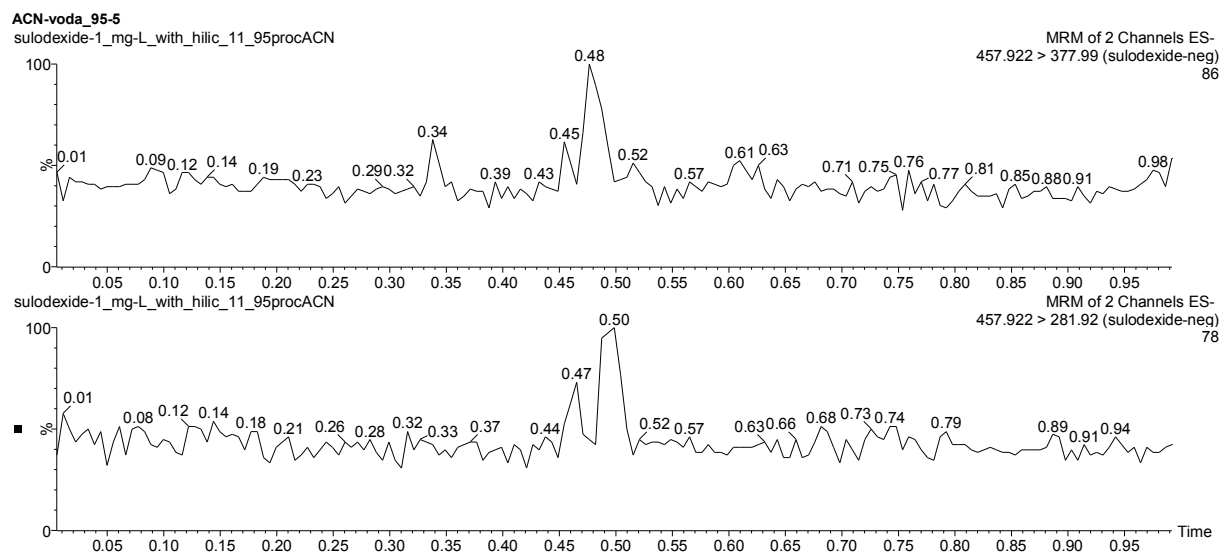
Obr. 25 Nástržek modelového roztoku Sulodexidu o $c = 0,2$ mg/l metodou FIA

Na základě toho, že bylo metodou FIA dosaženo takto pozitivního výsledku, byly provedeny vstupní experimenty pro výběr vhodné kolony a optimalizace LC/MS techniky.

Pro analýzu plazmy bylo nutno nalézt chromatografický systém, který by zajistil retenci DS a jeho oddělení od složek matrice z plazmy. V dalších kapitolách jsou uváděny experimenty na různých chromatografických kolonách. Nejdříve jsou studovány vlastnosti HILIC kolony YMC Triart, dále pro porovnání vlastnosti kolony s reverzní fází Acquity C18. Protože se vlastnosti obou chromatografických módů mohou výrazně lišit podle materiálu použitého dalšími výrobci, jsou v kapitolách následujících shrnuty informace o dalších kolonách. Jsou řazeny v pořadí, jak bylo testování v průběhu řešení diplomové práce prováděno.

5.2.1.2 Analýza modelových roztoků s využitím HILIC kolony

Při výběru vhodné kolony, která by umožnila stanovení Sulodexidu v krevní plazmě na požadované úrovni, byla nejdříve testována HILIC kolona YMC Europe Triart HILIC-diol 100 x 2,0 mm s částicemi o velikosti 5 μ m. Jako mobilní fáze byla použita směs ACN:voda (95:5, v/v – metoda IV.). Obr. 26 ukazuje chromatogram rekonstruovaný pro oba MRM přechody při analýze modelového roztoku Sulodexidu o koncentraci 1 mg/l.

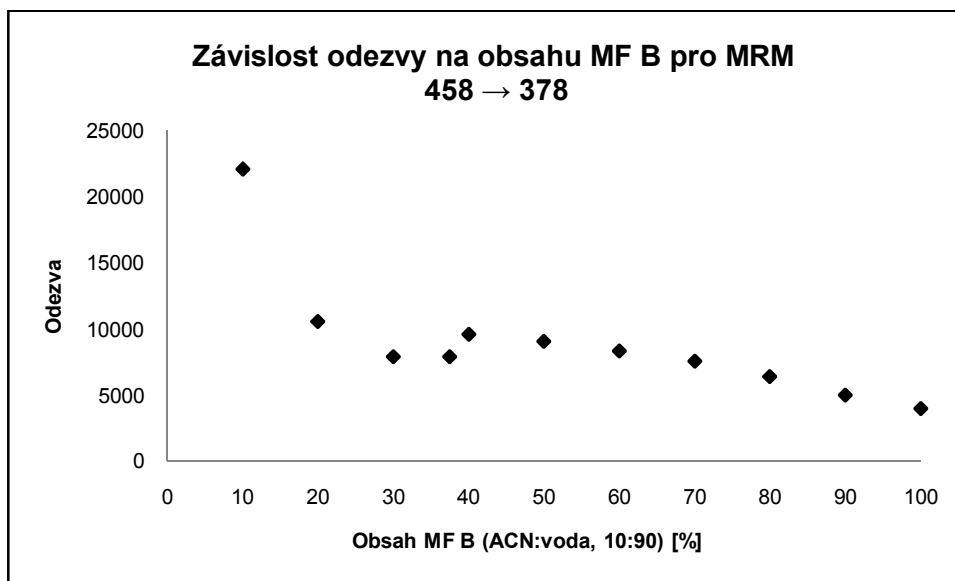


Obr. 26 Modelový roztok Sulodexidu o koncentraci 1 mg/l na koloně HILIC

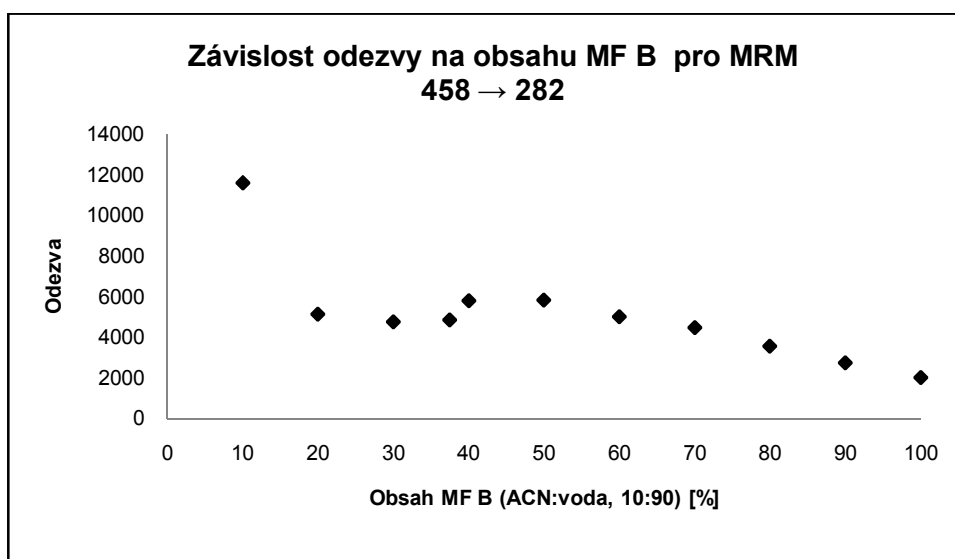
I přes to, že byla provedena optimalizace mobilní fáze, nebylo na této koloně dosaženo požadované retence DS, a proto se od použití této kolony upustilo.

5.2.1.3 Analýza modelových roztoků s využitím reverzní fáze

Pro získání představy o polaritě nederivatizovaného DS byla testována retence i na RP koloně Acquity C18 100 x 2,1 mm s částicemi o velikosti 1,8 μm . Při použití generických mobilních fází (voda, ACN, MeOH) bylo na RP koloně dosaženo slabé retence složek Sulodexidu. Mobilní fáze měla toto složení: *MF A*- ACN:voda (90:10, v/v) a *MF B*- ACN:voda (10:90, v/v). Během optimalizace složení mobilní fáze byly vyzkoušeny různé poměry MF A a MF B. Jak ukazují Obr. 27 a Obr. 28, přidavek ACN jakožto složky mobilní fáze výrazně zlepšil odezvu pro oba MRM přechody DS.

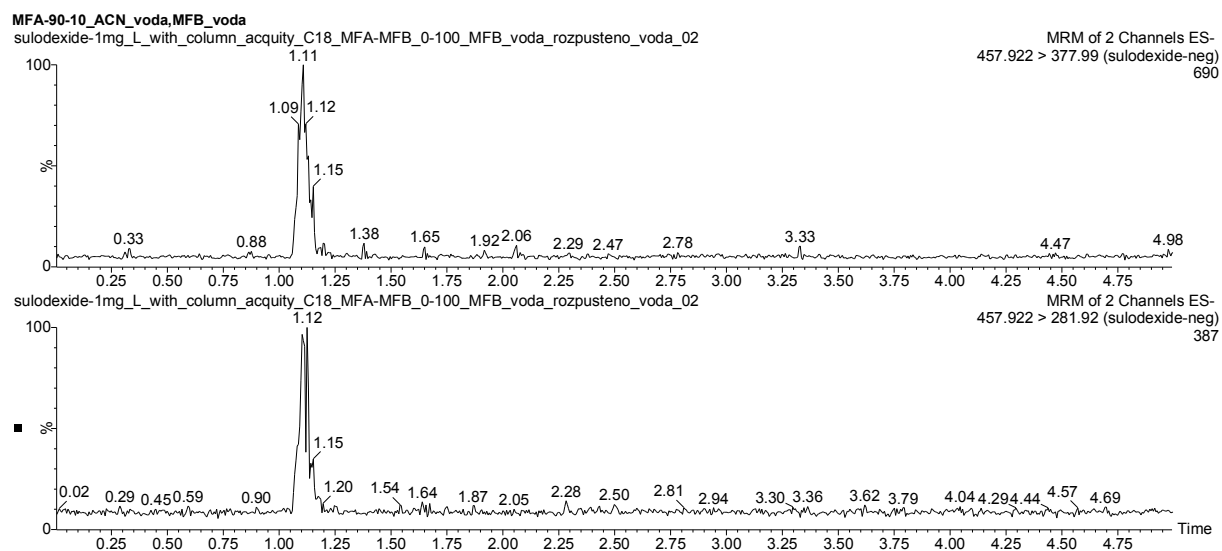


Obr. 27 Závislost odezvy MRM přechodu 458 → 378 na rostoucím obsahu vody (MF B) – modelový roztok Sulodexidu o $c = 10 \text{ mg/l}$



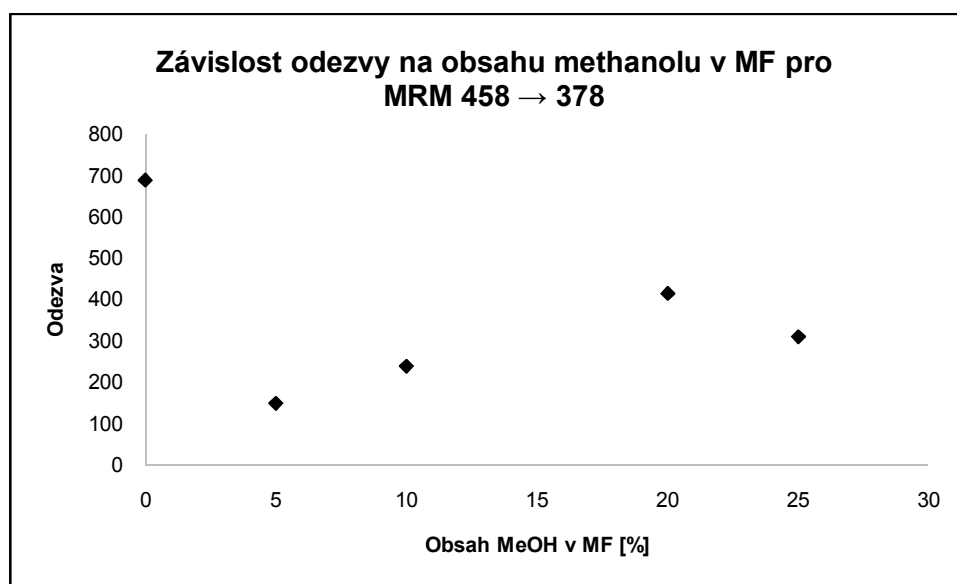
Obr. 28 Závislost odezvy MRM přechodu 458 → 282 na rostoucím obsahu vody (MF B) – modelový roztok Sulodexidu o $c = 10 \text{ mg/l}$

Při použití binárního systému ACN-voda nebylo dosaženo retence. Bez ohledu na obsah ACN byl retenční čas 0,50 min. V případě, že byla jako mobilní fáze použita deionizovaná voda bez přídavku organického rozpouštědla, bylo dosaženo slabé retence a to 1,11 min. Tuto skutečnost ukazuje Obr. 29.

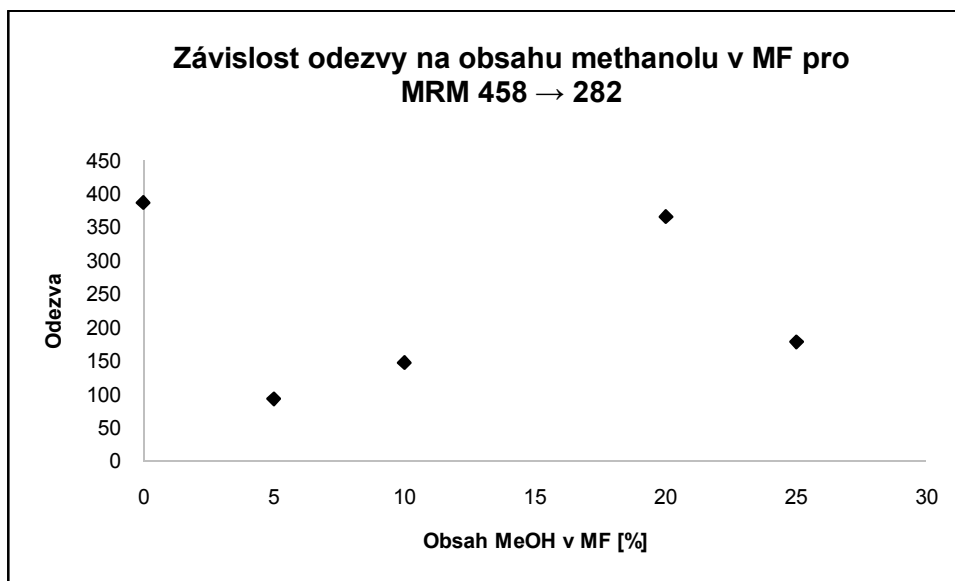


Obr. 29 Analýza modelového roztoku Sulodexidu o $c = 1 \text{ mg/l}$ na RP koloně

Při optimalizaci mobilní fáze byl dále vyzkoušen vliv přidavku MeOH, a to jak na změnu retence, tak i odezvy. Složení mobilní fáze bylo následující: *MF A* - deionizovaná voda a *MF B* - MeOH. Grafy popisující závislost odezvy na rostoucím obsahu MeOH (*MF B*) v mobilní fázi jsou uvedeny na Obr. 30 a Obr. 31. Porovnávány byly modelové roztoky Sulodexidu o koncentraci 1 mg/l .



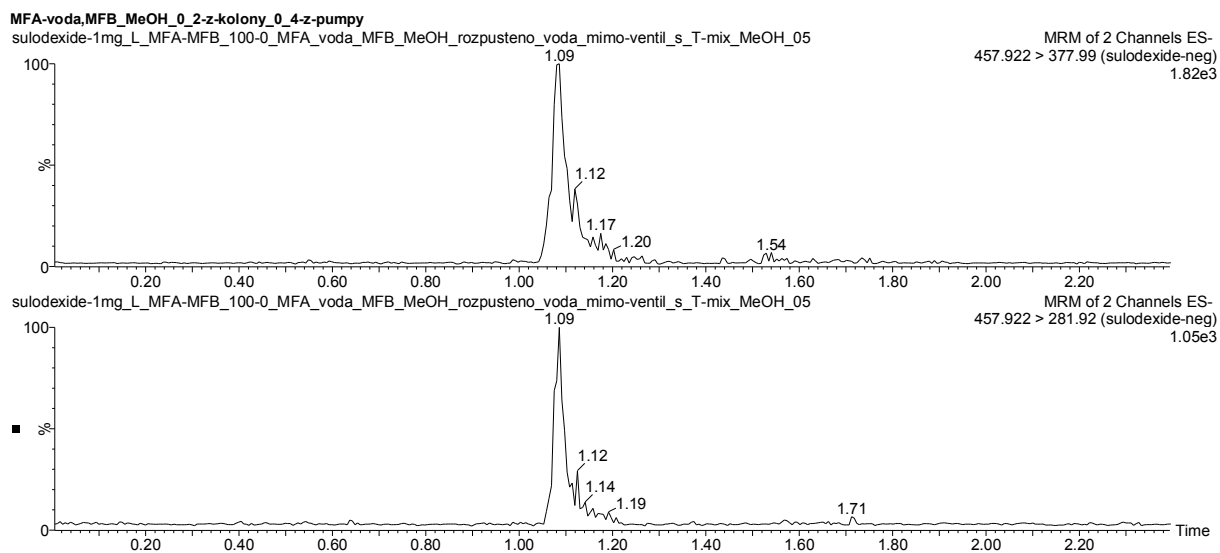
Obr. 30 Vliv obsahu methanolu v MF na odezvu DS (pro MRM 458 → 378)



Obr. 31 Vliv obsahu methanolu v MF na odezvu DS (pro MRM 458 → 282)

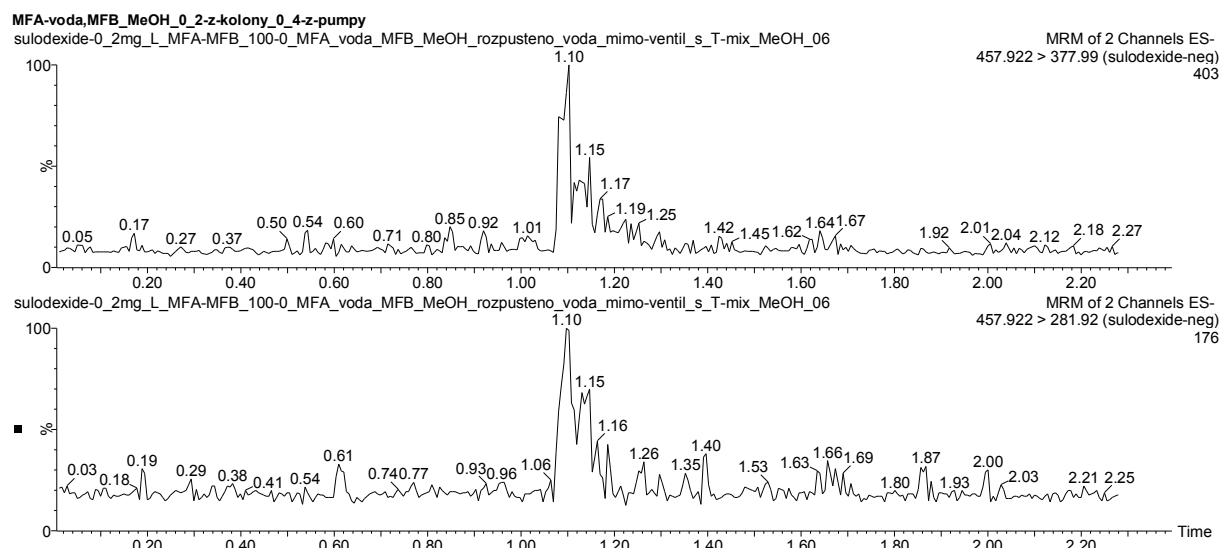
Při zvyšování obsahu MeOH v MF nebylo dosaženo vyšší odezvy, než když byla jako mobilní fáze použita pouze deionizovaná voda.

Dále se vyzkoušelo přimíchávat MeOH za kolonou (post-column T-mixing). Za těchto podmínek (*metoda V.*) bylo dosaženo výrazného zlepšení odezvy, což demonstruje Obr. 32.



Obr. 32 Analýza modelového roztoku Sulodexidu o $c = 1$ mg/l s přimícháváním MeOH na T-prvku za kolonou (post-column T-mixing)

Za těchto podmínek bylo možno zachytit také signál DS v požadované koncentraci 0,2 mg/l, což lze vidět na Obr. 33.



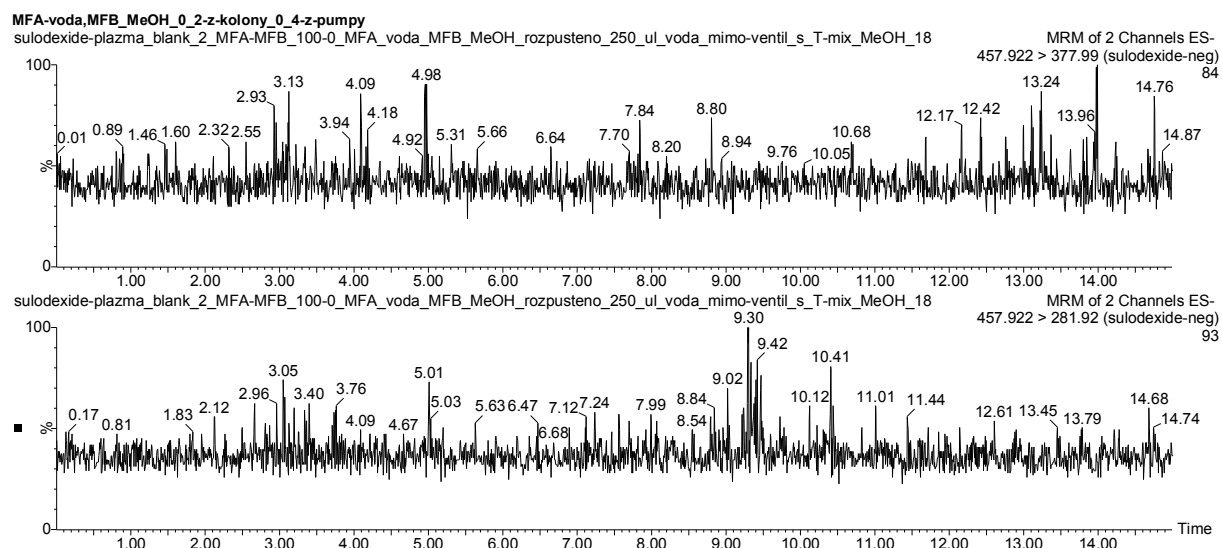
Obr. 33 Analýza modelového roztoku Sulodexidu o $c = 0,2$ mg/l s přimícháváním MeOH na T-prvku za kolonou (post-column T-mixing)

Na základě toho, že bylo možno v tomto systému pozorovat signál DS na požadované úrovni $0,2$ mg/l, byly následně provedeny i analýzy Sulodexidu přidaného do lidské krevní plazmy.

5.2.2 Analýza vzorků plazmy s využitím reverzní fáze

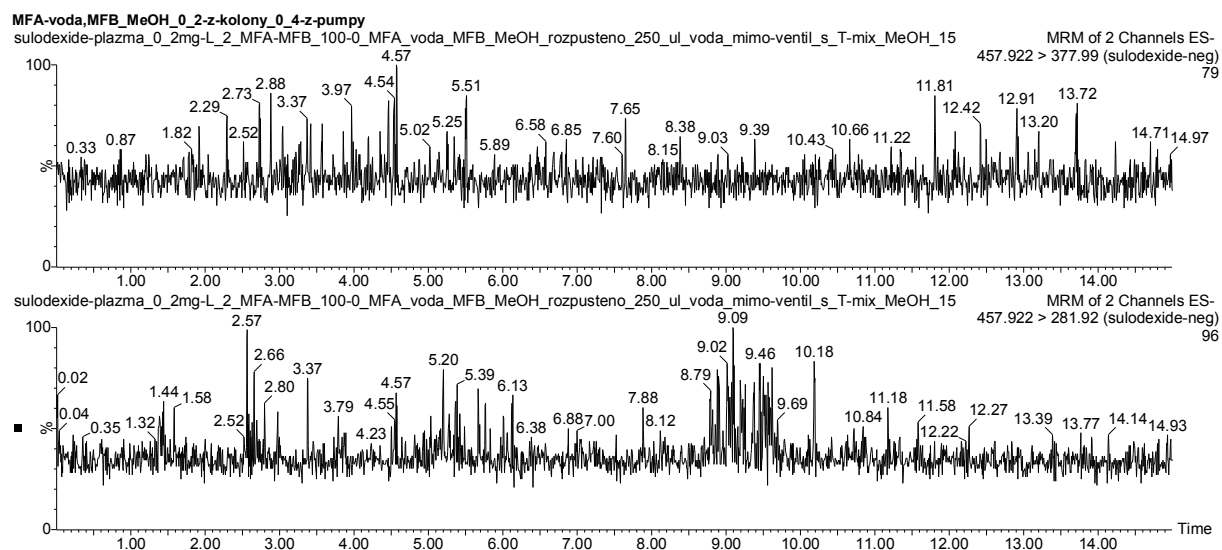
Pro pilotní analýzy vzorků plazmy bez derivatizace byly připraveny tyto vzorky: plazma blank, plazma s přidavkem Sulodexidu o koncentraci $0,2$ mg/l před deproteinací a plazma s přidavkem Sulodexidu o $c = 0,2$ mg/l po deproteinaci. Takto volené vzorky měly za úkol posoudit, v které fázi zpracování vzorku může případně docházet ke ztrátě analytů. Detailní protokol přípravy je uveden v kapitole 4.3.3. Podmínky, za kterých bylo měření prováděno, byly převzaty z předchozího postupu optimalizace (*metoda V.*)

Získané výsledky jsou shrnuty v následujícím textu. Na Obr. 34 je možno vidět, že ve vzorku plazma blank není přítomen signál, který by odpovídal DS.

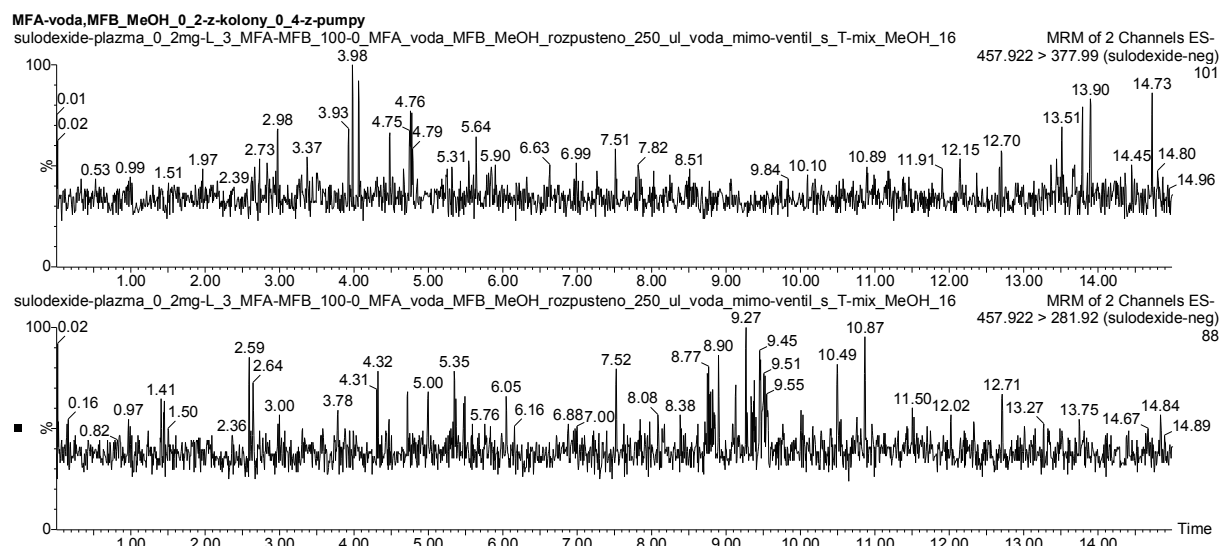


Obr. 34 Analýzy vzorku plazma blank s využitím RP kolony

Avšak stejně tak v chromatogramech plazmy s přidavkem Sulodexidu o koncentraci 0,2 mg/l před ani po deproteinaci nebyl signál analytu na odpovídajících MRM přechodech pozorován, což je ukázáno na Obr. 35 a Obr. 36.



Obr. 35 Plazma s přidavkem Sulodexidu o c = 0,2 mg/l před deproteinací s využitím RP kolony



Obr. 36 Plazma s přidavkem Sulodexidu o $c = 0,2$ mg/l po deproteinaci s využitím RP kolony

Závěrem k této části lze říct, že i když uvedený systém je dostatečně citlivý pro analýzu modelových roztoků Sulodexidu, tak neumožňuje po úpravě deproteinací analýzu Sulodexidu v plazmě na požadované koncentrační hladině 0,2 mg/l. Hlavním problémem, jak naznačuje analýza s přidavkem Sulodexidu po deproteinaci, je nejspíše potlačení ionizace Sulodexidu složkami matrice. Toto ovšem nebyl jediný problém, s kterým jsme se potýkali. Další potíží byla také špatná reprodukovatelnost při opakovaných měřeních.

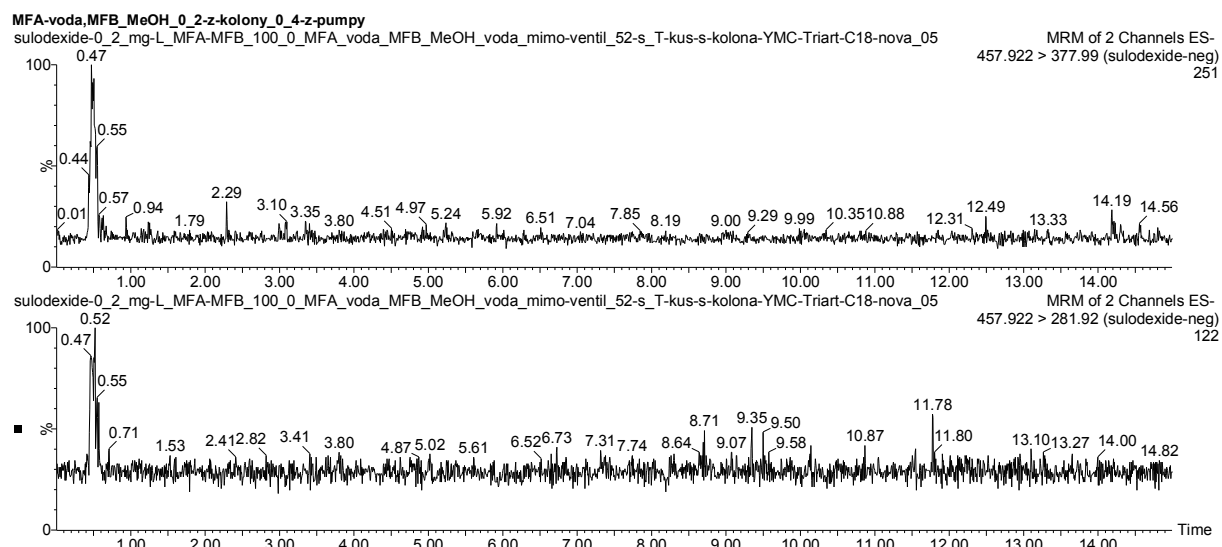
Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto otestovat další chromatografické kolony, u kterých bylo možno předpokládat rozdílnou selektivitu oproti předešlým výše popisovaným kolonám, a tím případně dosáhnout i lepší separace DS a HS od nativních složek plazmy. Postupně byly testovány tyto kolony: a) YMC Triart C18 (100 x 2,0 mm I. D.; dp 1,9 μ m), jako analogie k fázi Acquity C18, b) Ascentis Express HILIC (10 cm x 2,1 mm, 2,7 μ m) a c) ZIC[®]-cHILIC (150 x 2,1 mm, 3 μ m, 120 Å PEEK) jako analogie k YMC Triart HILIC koloně s předpokládanou jinou selektivitou stacionární fáze.

5.2.3 Testování dalších chromatografických kolon

5.2.3.1 YMC Triart C18 kolona

Při těchto experimentech byla mobilní fáze deionizovaná voda s průtokem 0,2 ml/min a stejně tak, jako v optimalizovaných experimentech s fází Acquity C18 bylo pro zlepšení

odezvy použito přimíchávání MeOH (0,4 ml/min) za kolonou (post column T-mixing) – metoda VI. Na Obr. 37 je možno vidět, že modelový roztok Sulodexidu na požadované koncentrační úrovni 0,2 mg/l poskytuje patrný signál, avšak retentivita této kolony je ještě nižší než retentivita kolony Acquity C18.



Obr. 37 Modelový roztok Sulodexidu o koncentraci 0,2 mg/l analyzovaný na koloně YMC Triart C18

Na této koloně nebylo dosaženo selektivity, která by umožnila separaci komponent Sulodexidu od polárních složek plazmy. Rovněž se opět vyskytly problémy s reprodukovatelností analýzy, která nebyla dostatečná. Z těchto důvodů se dále v testování této kolony nepokračovalo. Testování separace v modu reverzních fází tedy nevedlo k požadovaným cílům. Další experimenty byly zaměřeny opět na možnosti HILIC modu a byla vyzkoušena kolona Ascentis Express HILIC.

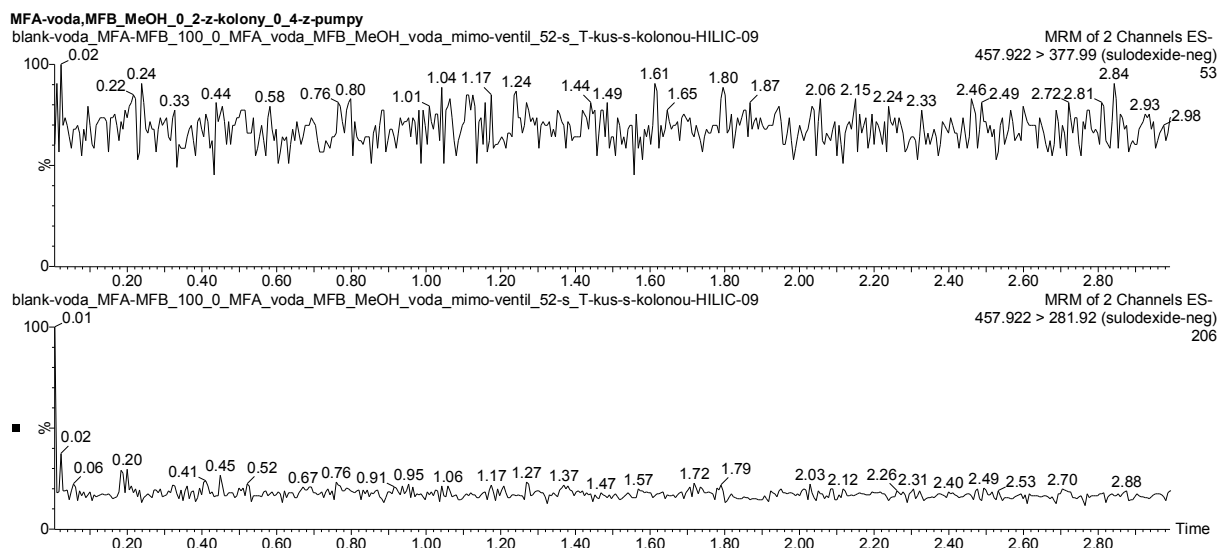
5.2.3.2 Testování kolony Ascentis Express HILIC

5.2.3.2.1 Analýza modelových roztoků Sulodexidu s využitím HILIC kolony

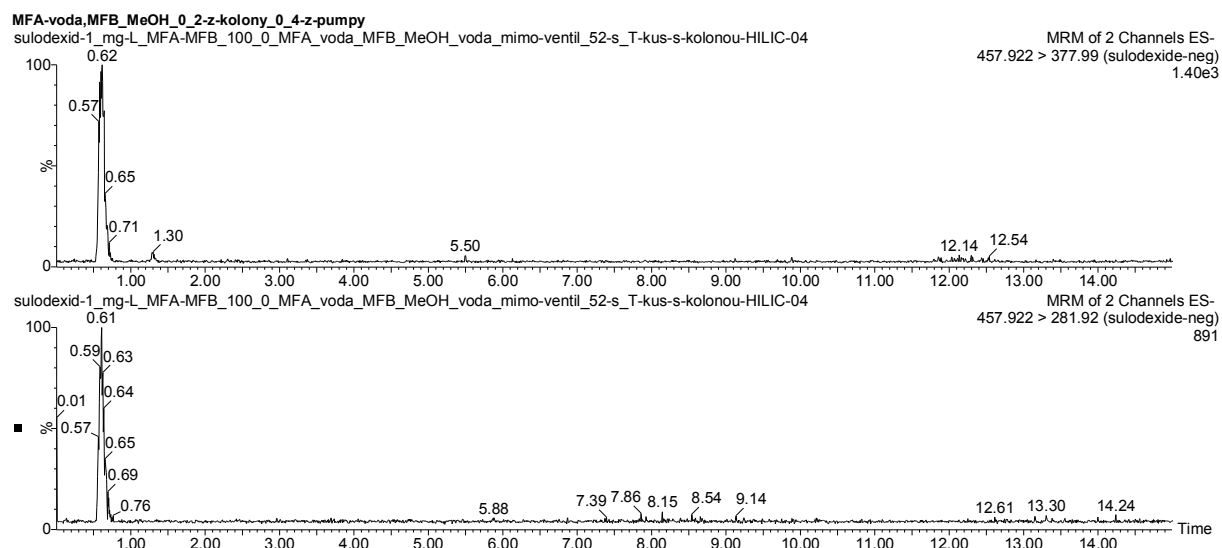
Kolona Ascentis Express HILIC je založena na core-shell technologii. Částice mají tedy neporézní jádro a porézní povrchovou vrstvu. Toto uspořádání částic umožňuje zvýšení účinnosti separace. Stacionární fáze je tvořena nemodifikovaným silikagelem. Podle údajů

výrobce je určena pro separace neutrálních polárních látek, polárních kyselin a bází a nepolárních bazických aminů.

Použití Ascentis Express HILIC kolony rovněž umožňovalo analyzovat nízké koncentrace Sulodexidu. Oproti předchozí testované koloně bylo při použití této kolony dosaženo mírně lepší retence. Problémem ovšem bylo, že při zvyšování podílu organické složky v MF docházelo na této koloně k velmi výraznému zhoršení tvaru píku. Proto bylo v této fázi testováno použití deionizované vody jako MF s přimícháváním MeOH za kolonou (*metoda VII.*). Pokud by systém umožňoval analýzu ve vzorku plazmy na požadované koncentrační úrovni, byla plánována rozsáhlejší optimalizace složení MF. Obr. 38 ukazuje analýzu blanku (deionizovaná voda) a Obr. 39 pak analýzu modelového roztoku Sulodexidu o koncentraci 1 mg/l.



Obr. 38 Analýza blanku s využitím kolony Ascentis Express HILIC



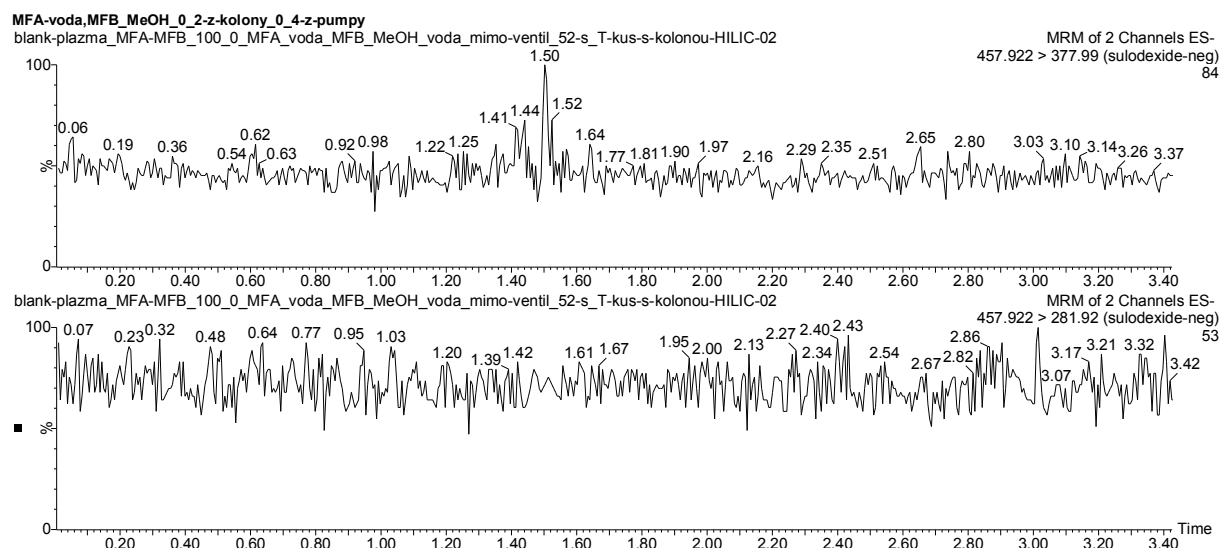
Obr. 39 Analýza modelového roztoku Sulodexidu ($c = 1 \text{ mg/l}$) s využitím kolony Ascentis Express HILIC

Na základě toho, že při analýze modelového roztoku Sulodexidu o koncentraci 1 mg/l byl patrný pík analytu, bylo rozhodnuto testovat tuto kolonu pro analýzu krevní plazmy.

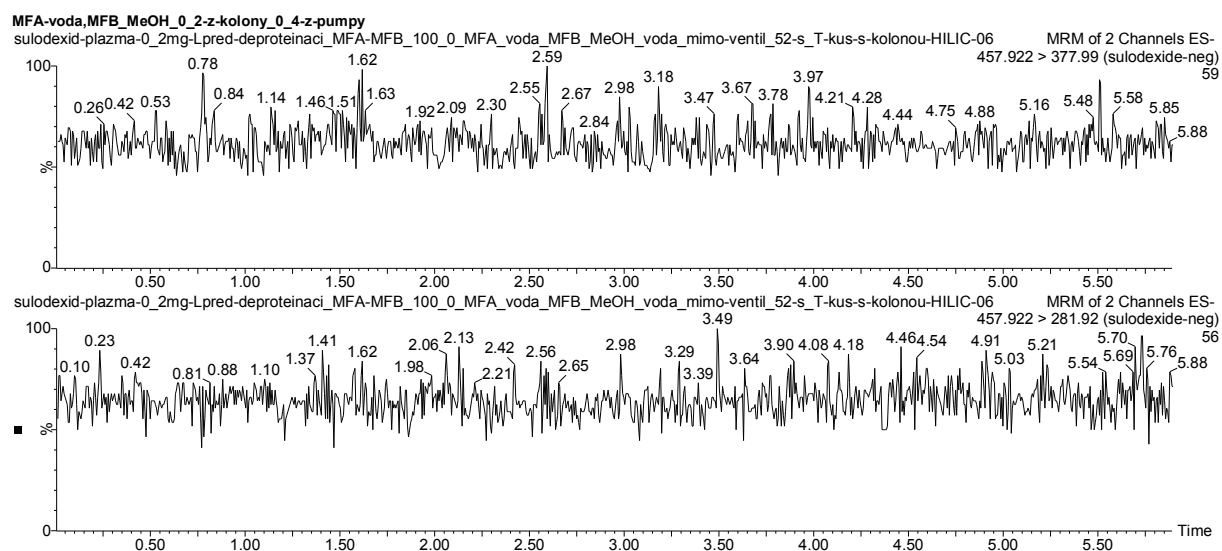
5.2.3.2.2 Analýza Sulodexidu v krevní plazmě s využitím kolony Ascentis Express HILIC

Pro analýzu Sulodexidu v krevní plazmě s HILIC kolonou byly připraveny stejné vzorky jako v předchozím případě, a to plazma blank, plazma s přídatkem Sulodexidu o koncentraci $0,2 \text{ mg/l}$ před a po deproteinaci (viz kapitola 4.3.3). Pro deproteinaci byl použit stejně jako u předešlé přípravy vzorků plazmy ACN. Byl zkoušen také MeOH, ale lepší vysrážení proteinů proběhlo při použití ACN, a proto byl také použit i v dalších experimentech.

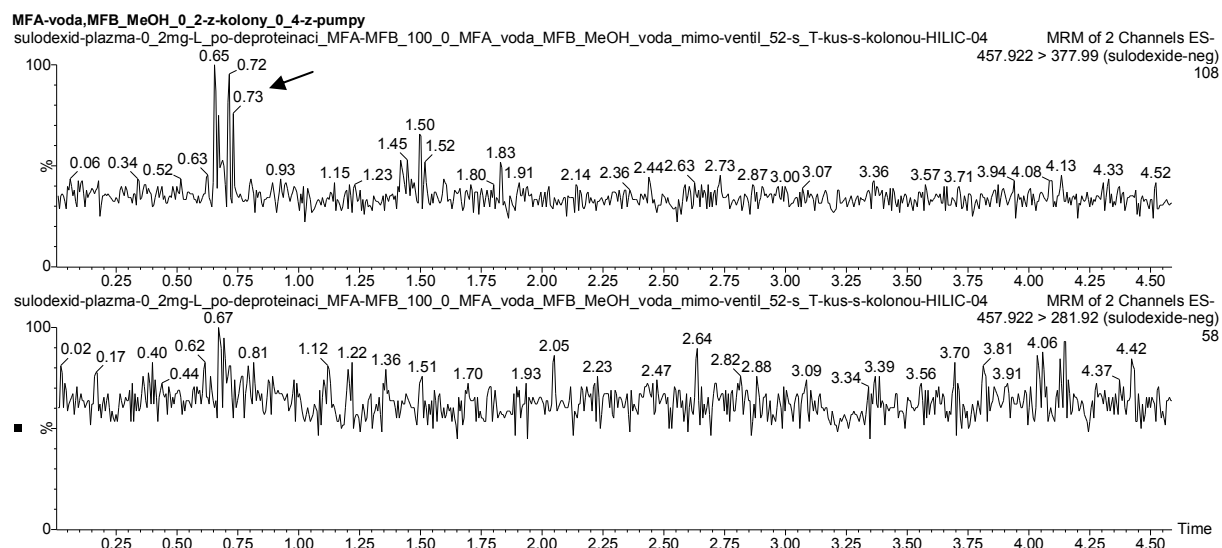
Pro měření byly převzaty podmínky z předchozího postupu (*metoda VII*). Na Obr. 40, Obr. 41 a Obr. 42 jsou výsledné chromatogramy získané při opakovaných analýzách s využitím obou MRM přechodů pro DS.



Obr. 40 Analýza plazmy blanku s využitím kolony Ascentis Express HILIC

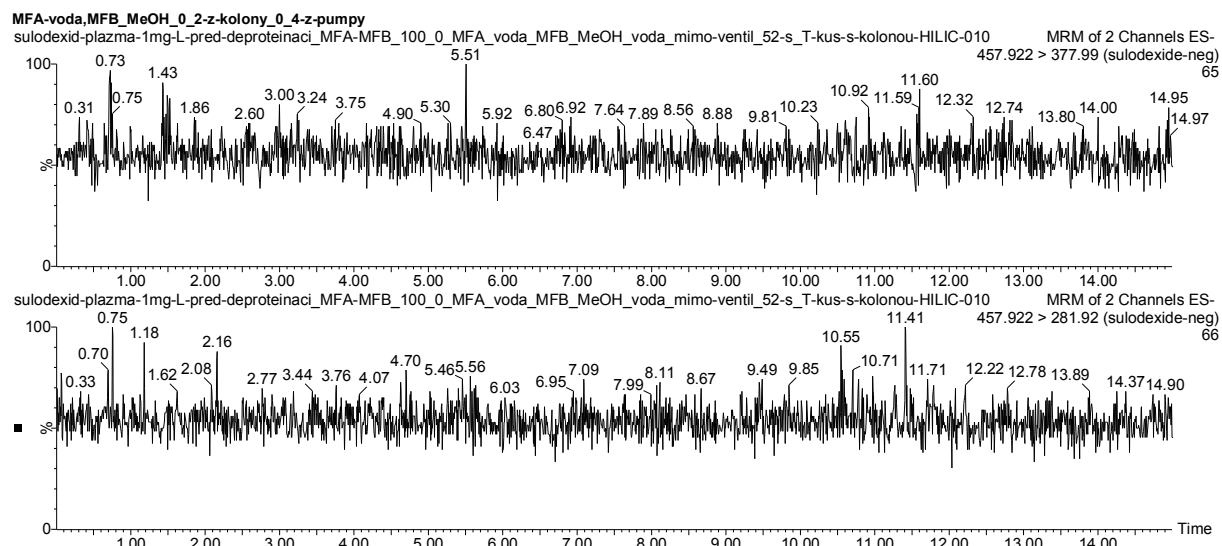


Obr. 41 Analýza plazmy s přidavkem 0,2 mg/l Sulodexidu před deproteinací s využitím kolony Ascentis Express HILIC

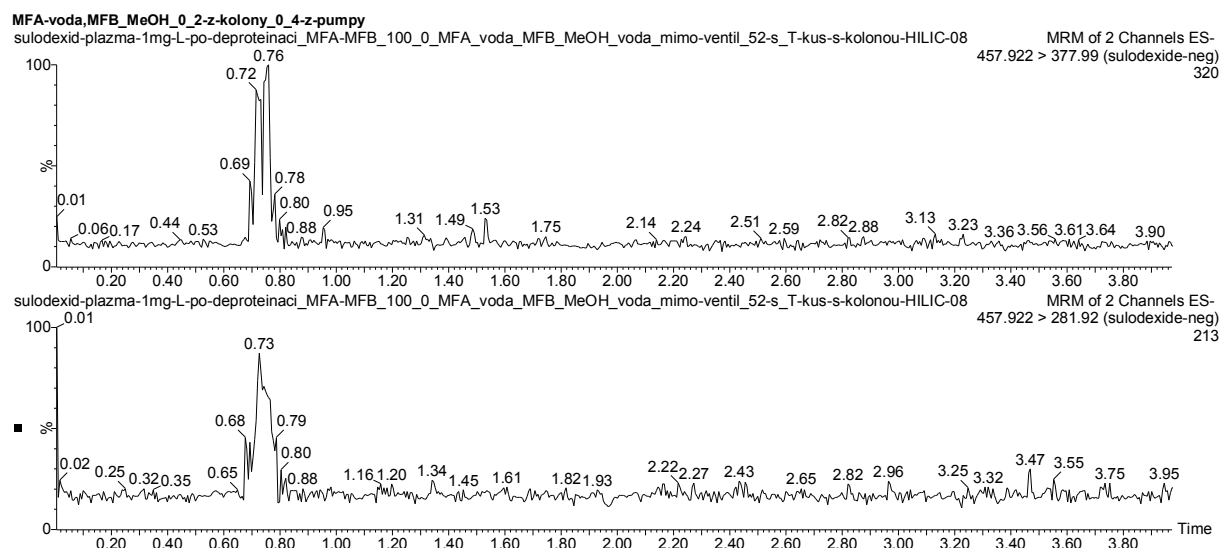


Obr. 42 Analýza plazmy s přidavkem 0,2 mg/l Sulodexidu po deproteinaci s využitím kolony Ascentis Express HILIC

Ve vzorku plazmy, do kterého byl Sulodexid přidán po deproteinaci byl pozorován slabý signál DS na MRM přechodu $458 \rightarrow 378$. Pro ověření jeho identity byly proměřeny vzorky plazmy obsahující vyšší koncentraci Sulodexidu ($c = 1 \text{ mg/l}$), čímž došlo ke zvýšení signálu analytu (Obr. 43 a Obr. 44).



Obr. 43 Analýza plazmy s přidavkem 1 mg/l Sulodexidu před deproteinací s využitím HILIC kolony

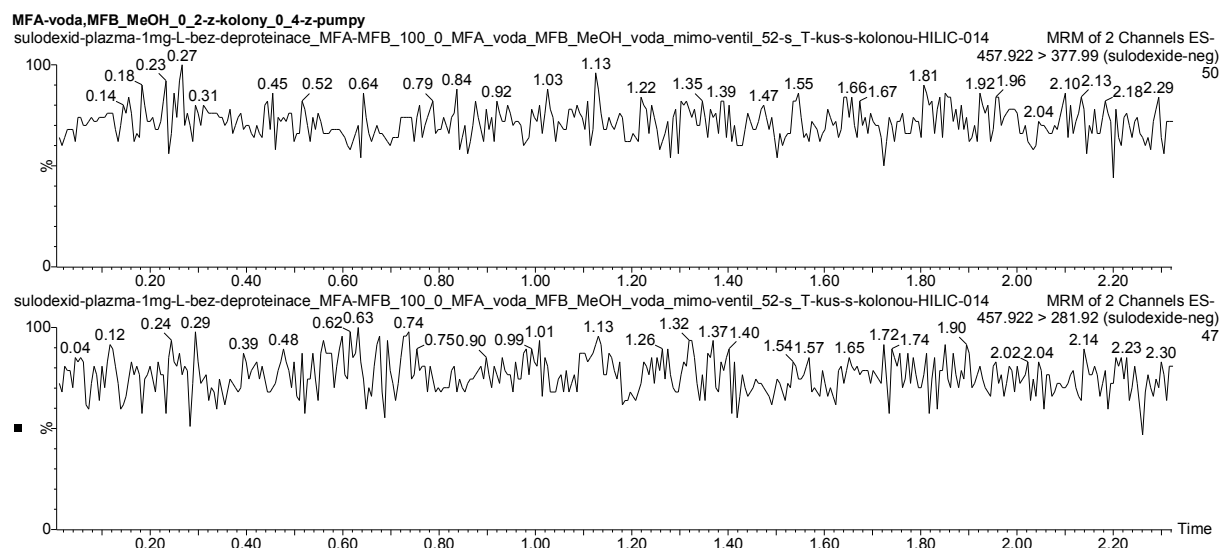


Obr. 44 Analýza plazmy s přidavkem 1 mg/l Sulodexidu po deproteinaci s využitím HILIC kolony

Je zřejmé, že v případě, kdy je do vzorku plazmy přidán Sulodexid po deproteinaci, dostáváme signál analytu, a to při koncentraci 0,2 mg/l přibližně na úrovni limitu detekce a při koncentraci 1 mg/l zhruba na úrovni limitu kvantifikace. Tyto výsledky ukazují, že i přes slabou retenci nabízí systém s kolonou Ascentis Express HILIC selektivitu pro analýzu DS, pokud je provedena deproteinace. Na druhou stranu, pokud je analyzován vzorek plazmy s přidavkem Sulodexidu před deproteinací, který simuluje reálnou situaci při analýze Sulodexidu v plazmě pacientů léčených Sulodexidem, není pík Sulodexidu v chromatogramu patrný (signál DS nebyl pozorován). Logickým vysvětlením je výrazná sorpce Sulodexidu na složky matrice, které jsou oddělené deproteinací. Z tohoto důvodu bylo rozhodnuto vyzkoušet možnost přímé analýzy Sulodexidu v plazmě bez předchozí deproteinace.

5.2.3.2.3 Analýza Sulodexidu na koloně HILIC v plazmě bez deproteinace

Pro měření Sulodexidu v plazmě bez provedení deproteinace byly připraveny tyto vzorky: plazma blank, plazma s přidavkem 0,2 mg/l a 1 mg/l Sulodexidu. Podle Obr. 45 je zřejmé, že v chromatogramu nebyly pozorovány žádné využitelné signály složek Sulodexidu.



Obr. 45 Analýza vzorku plazmy s přidavkem Sulodexidu o koncentraci 1 mg/l v plazmě bez deproteinace na koloně Ascentis Express HILIC

Za těchto podmínek došlo k výraznému potlačení signálu v důsledku přítomnosti komplexní matrice včetně proteinů. Dalším vysvětlením může být skutečnost, že výrazný podíl složek Sulodexidu je silně vázán na přítomné složky matrice, které buď neprocházejí chromatografickou kolonou a/nebo kolonou procházejí, ale jsou v iontovém zdroji přítomny ve formě komplexů (aduktů) s proteiny. Také v tomto systému bylo vyzkoušeno zvýšit obsah ACN v mobilní fázi, avšak rovněž nebylo dosaženo toho, že by byl v chromatogramu pozorován využitelný signál.

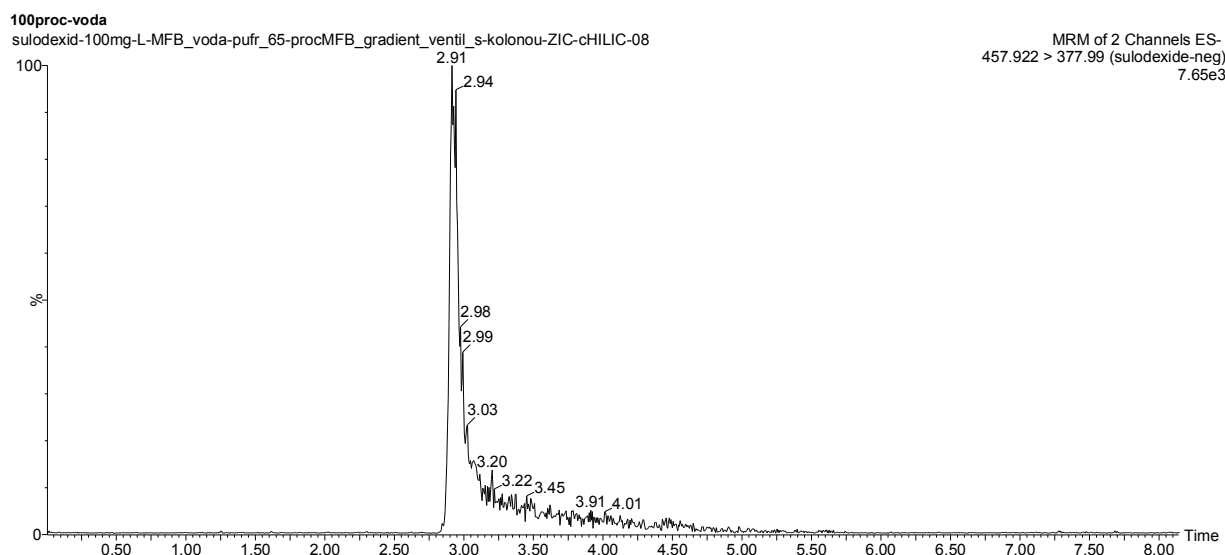
5.2.3.3 Testování kolony ZIC-cHILIC

5.2.3.3.1 Analýza modelových roztoků Sulodexidu na koloně ZIC-cHILIC

Velmi zajímavou možností jak zvýšit retenci nativních forem DS a HS pro jejich analýzu v krevní plazmě je použití nové fáze dodávané komerčně firmou Merck-Millipore. Jedná se o kolonu s obchodním názvem ZIC-cHILIC, která je popsána v kapitole 2.2.1.2.1. Tuto SF je dle výrobce vhodné použít v situacích, kdy je dosahováno slabé retence na RP i u běžných HILIC fází.

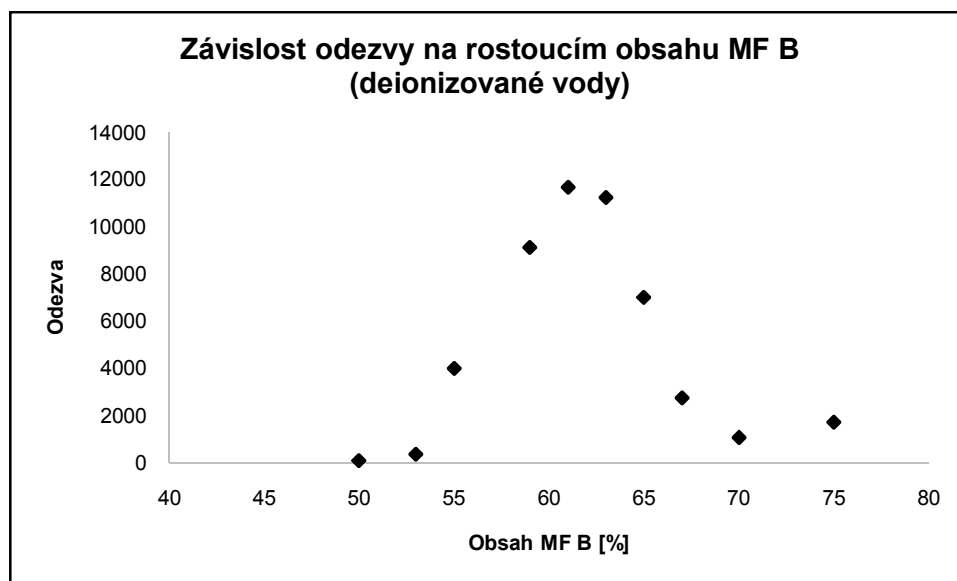
Pro první experimenty byla dle doporučení výrobce použita mobilní fáze o složení: *MF A* ACN:voda (90:10, v/v) + 25 mM octan amonný a *MF B* deionizovaná voda + 25 mM octan amonný. Na Obr. 46 lze vidět analýzu modelového roztoku Sulodexidu o koncentraci

100 mg/l. Z chromatogramu je zřejmé, že v tomto systému bylo dosaženo nejlepší retence ze všech doposud studovaných chromatografických systémů.



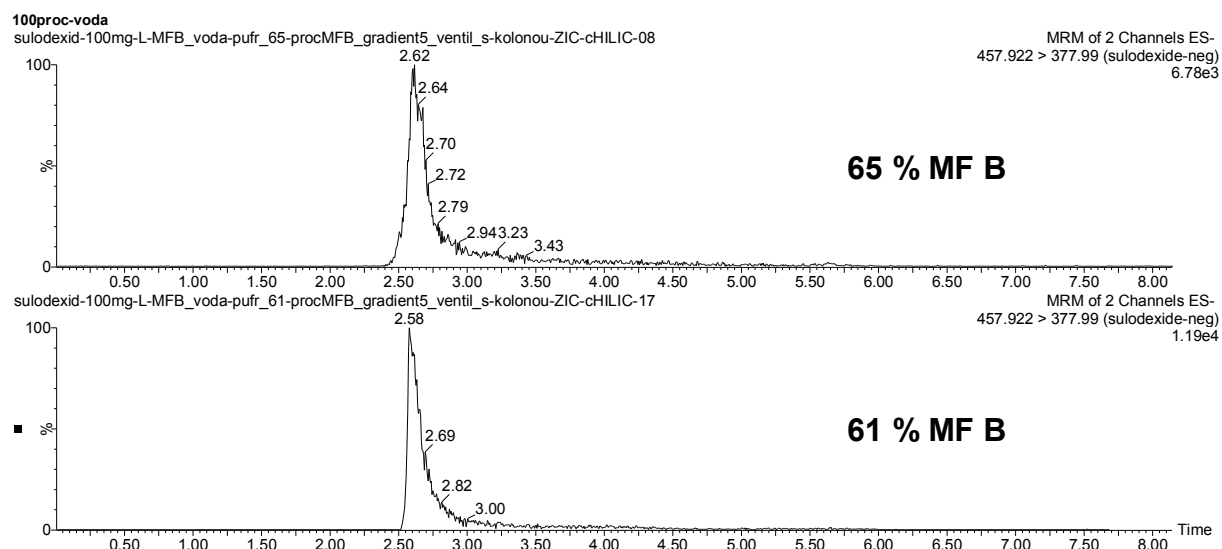
Obr. 46 Analýza modelového roztoku Sulodexidu o $c=100$ mg/l na koloně ZIC-chILIC

Pro první měření byla použita *metoda VIII.*, která vycházela z následujícího poměru složek mobilní fáze: 35% MF A a 65% MF B. Při optimalizaci složení mobilní fáze byly testovány různé poměry MF A a MF B. Obr. 47 ukazuje vliv složení mobilní fáze na odezvu při použití kolony ZIC-chILIC.



Obr. 47 Graf popisující závislost odezvy na rostoucím obsahu MF B na koloně ZIC-chILIC pro modelový roztok Sulodexidu o koncentraci 100 mg/l

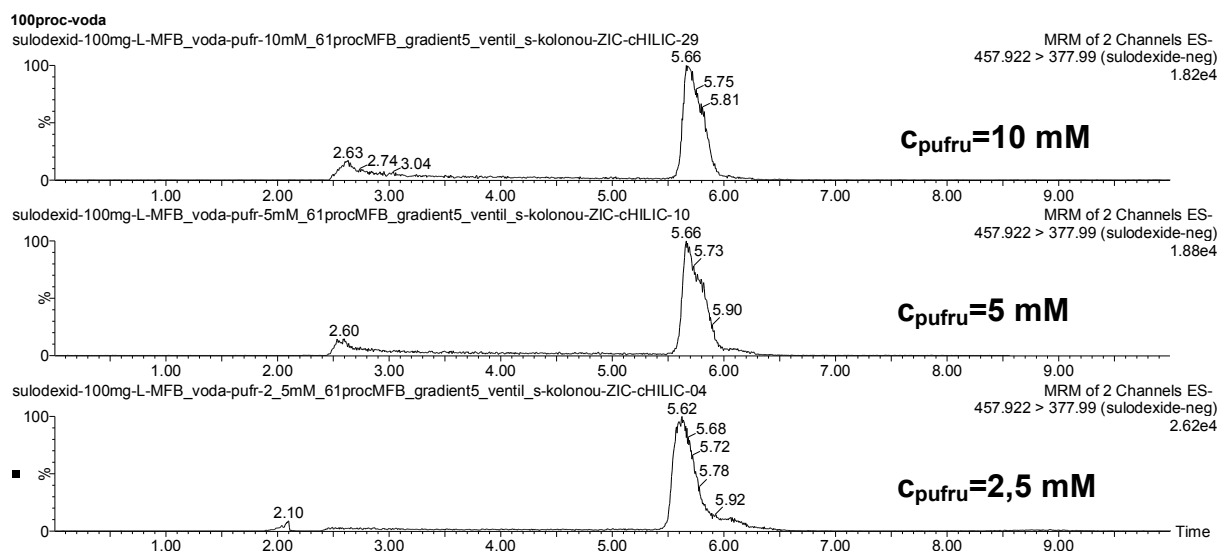
Z výše uvedeného grafu je zřejmé, že tato závislost prochází maximem a nejvyšší odezvy je dosaženo v případě, kdy je obsah MF B 61%. Na Obr. 48 jsou pro srovnání ukázány analýzy modelových roztoků Sulodexidu o koncentraci 100 mg/l a to v případě, kdy byl v mobilní fázi obsah MF B 61% a původních 65%.

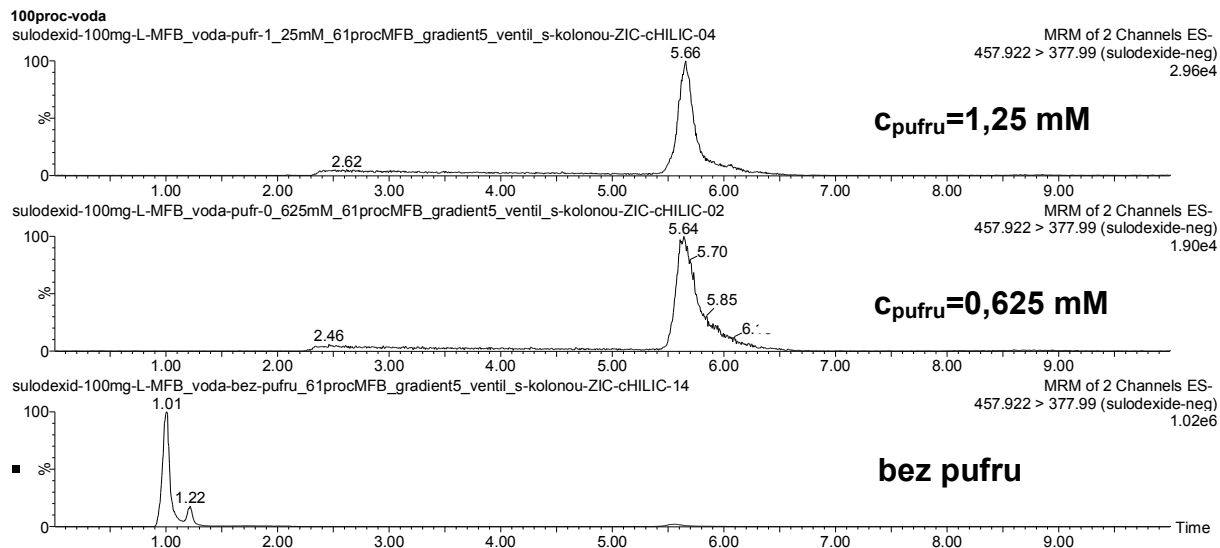


Obr. 48 Modelový vzorek Sulodexidu o $c = 100 \text{ mg/l}$ při obsahu MF B 61 % a 65 % (pro MRM 458 $\rightarrow$ 378)

Optimální odezvy tedy bylo dosaženo v případě, kdy mobilní fáze obsahovala 61% MF B, a proto bylo toto složení MF použito i v dalších experimentech.

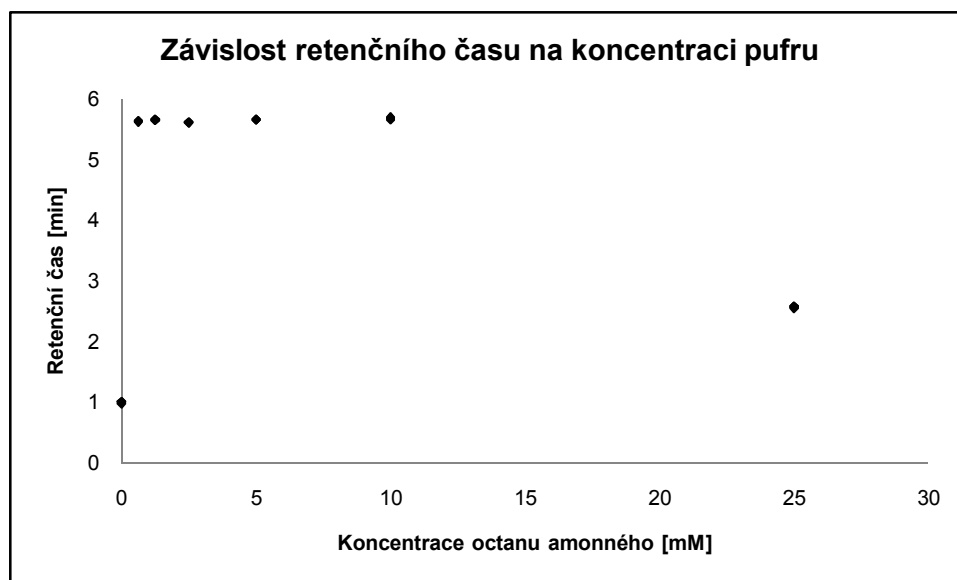
Dále byla optimalizována také koncentrace octanu amonného přidávaného do MF v rozsahu 0-25 mM (7 koncentračních úrovní). Vliv koncentrace pufru na odezvu i retenci DS popisuje Obr. 49.



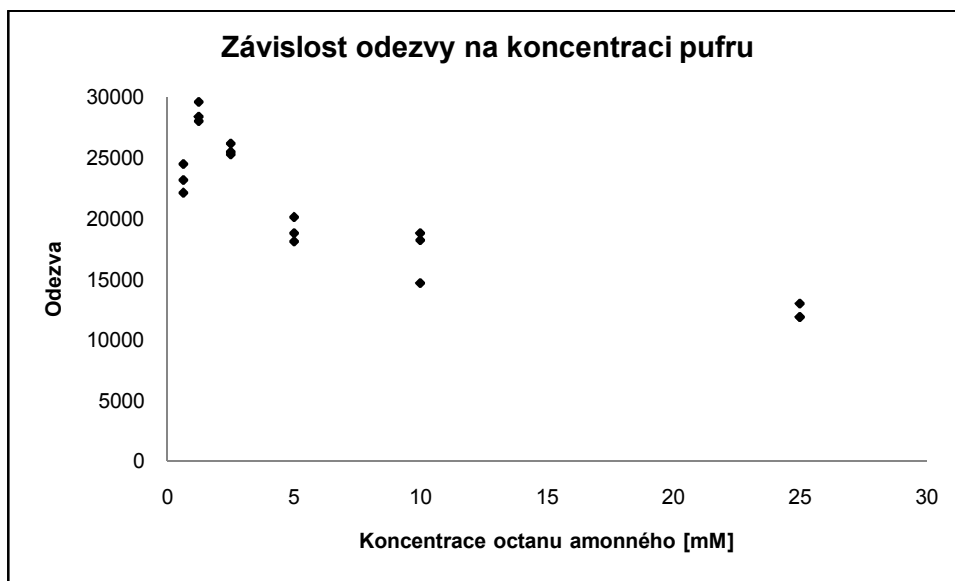


Obr. 49 Vliv koncentrace octanu amonného na retenci a odezvu pro modelový roztok Sulodexidu o koncentraci 100 mg/l

Z výše uvedených chromatogramů je možno pozorovat výrazný nárůst retence (2.58 min $\rightarrow$ 5.66 min) i citlivosti ($1,19 \cdot 10^4 \rightarrow 2,96 \cdot 10^4$) při koncentraci octanu amonného 1,25 mM. Na Obr. 50 a Obr. 51 jsou detailněji ukázány parametry metody.

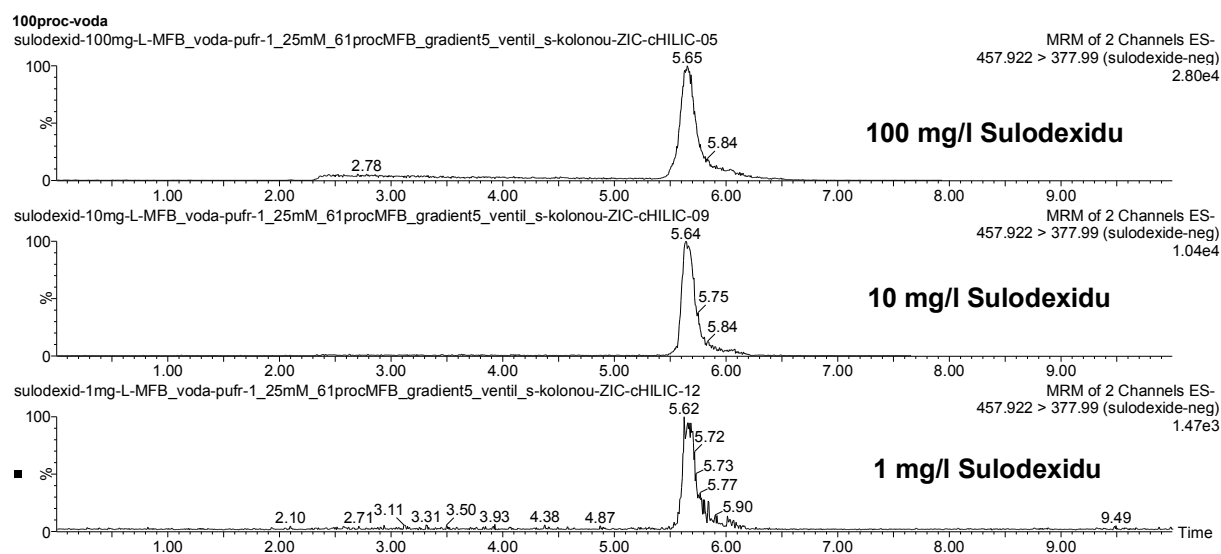


Obr. 50 Závislost retenčního času na koncentraci octanu amonného



Obr. 51 Závislost odezvy na koncentraci octanu amonného

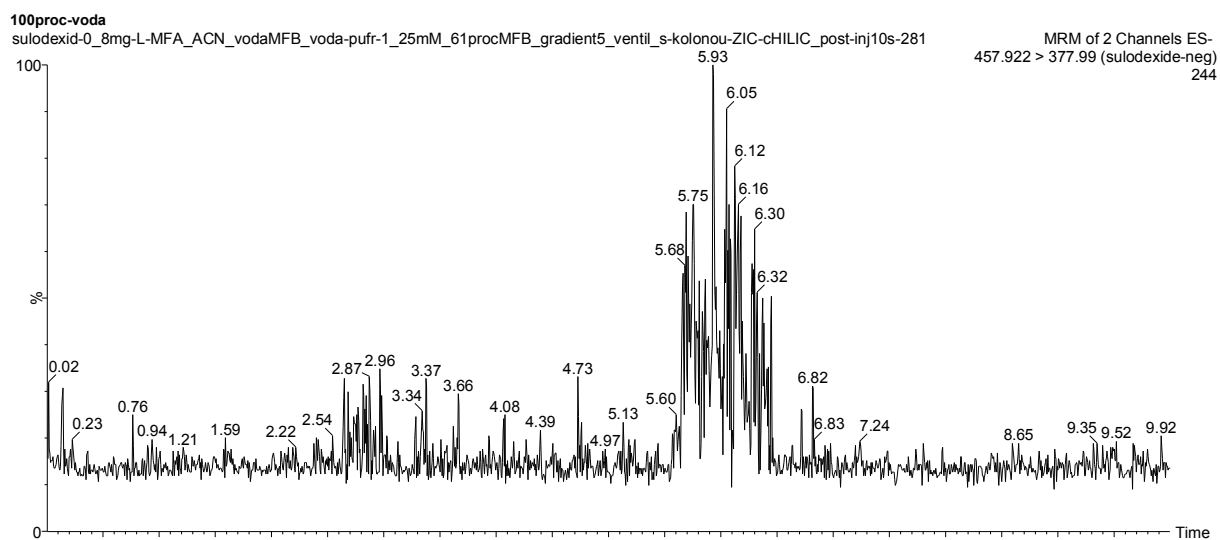
Z uvedených grafů lze vyčíst, že nejvyšší odezvy a velmi dobré retence bylo dosaženo při použití mobilní fáze obsahující pufr o koncentraci 1,25 mM. V této oblasti koncentrací bylo dosaženo také relativně vysoké retence a dobré symetrie píku, jak lze vidět na Obr. 52.



Obr. 52 Analýza modelových roztoků Sulodexidu pro $c = 100$; 10 a 1 mg/l

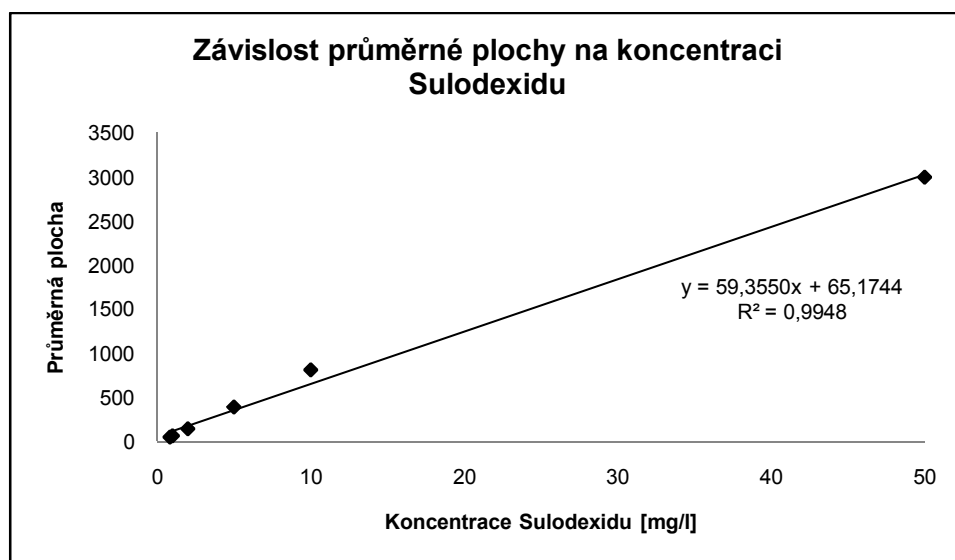
Při optimalizované koncentraci pufru (1,25 mM) tedy bylo možno spolehlivě detekovat koncentraci 1 mg/l Sulodexidu. Pozorovaným problémem při použití tohoto typu kolony ovšem bylo zachycování analytu v chromatografickém systému, které zkreslovalo výsledné analýzy. Aby došlo k úplnému vymytí analytu ze systému, musely být mezi jednotlivými analýzami vloženy relativně dlouhé promývací postupy a promývání před

nástřikem kontrolovat opakovanými analýzami blanků. Pro vyvinutou metodu (*metoda IX.*) byla testována odezva detektoru. Ta je lineární v rozmezí koncentrací 0,8-50 mg/l Sulodexidu. Obr. 53 ukazuje analýzu modelového roztoku Sulodexidu o koncentraci 0,8 mg/l, kterou lze považovat za limit kvantifikace.



Obr. 53 Analýza modelového vzorku Sulodexidu o $c = 0,8$ mg/l (MRM 458 $\rightarrow$ 378)

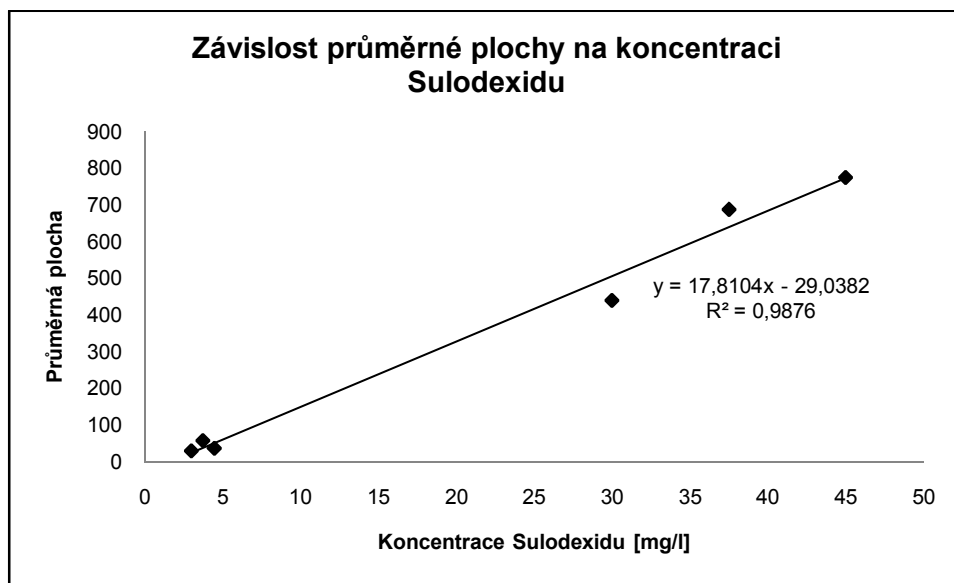
Jak je možno vidět na Obr. 54, bylo v tomto koncentračním rozmezí (0,8-50 mg/l) dosaženo poměrně dobré linearit y s koeficientem determinace $R^2 = 0,9948$. Následně tedy byla vyvinutá metoda s promývacími cykly použita pro analýzu Sulodexidu v moči.



Obr. 54 Graf popisující závislost plochy píku na koncentraci Sulodexidu (každý bod je průměrem ze tří měření)

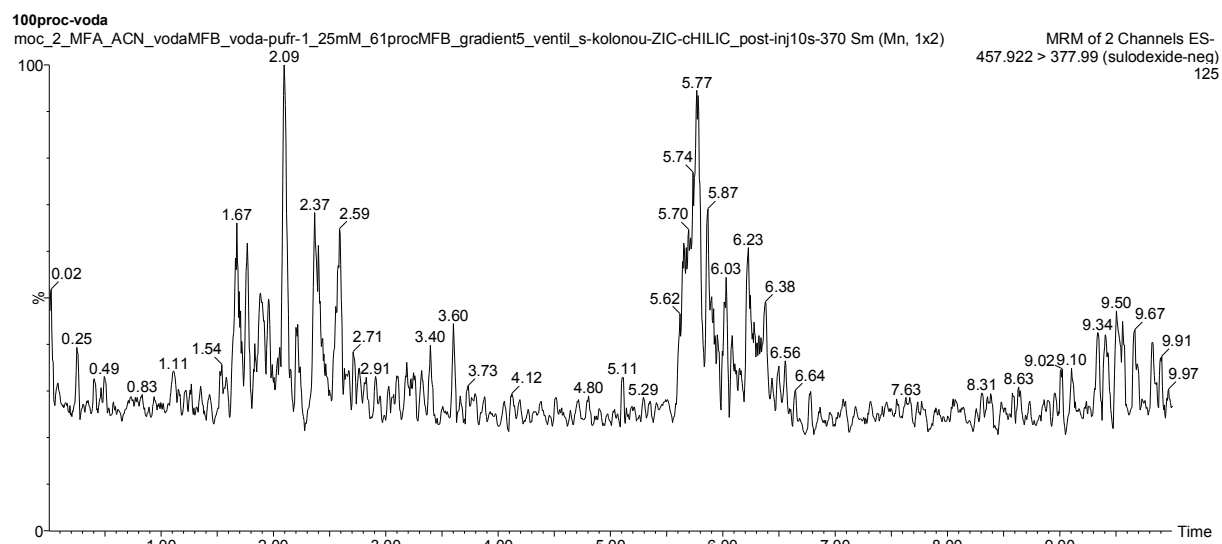
5.2.3.3.2 Analýza Sulodexidu v moči na koloně ZIC-cHILIC

Pro měření Sulodexidu v moči byly připraveny vzorky moči s přídavkem Sulodexidu na koncentračních úrovních 3; 3,75; 4,5; 30; 37,5 a 45 mg/l. Pro měření byly použity optimalizované podmínky analýzy modelových roztoků Sulodexidu (*metoda IX.*). Obr. 55 ukazuje závislost plochy píku na koncentraci Sulodexidu přidávaného do vzorku moči.



Obr. 55 Graf popisující závislost plochy píku na koncentraci Sulodexidu v moči (každý bod je průměrem ze tří měření)

Z výše uvedeného grafu lze vidět, že optimalizovanou metodou bylo i ve vzorcích moči s přídavkem Sulodexidu dosaženo únosné linearitě s koeficientem determinace $R^2 = 0,9876$ a návratností 87,7% vypočítané pro koncentrační úroveň 30 mg/l. Z grafů lze také vidět, že při analýze Sulodexidu v moči došlo vlivem složek matrice k výraznému poklesu odezvy. Na Obr. 56 je ukázaná analýza vzorku moči s přídavkem Sulodexidu o koncentraci 3 mg/l.



Obr. 56 Analýza vzorku moči s přidavkem Sulodexidu o koncentraci 3 mg/l

6 Závěr

Předložená diplomová práce se zabývala analýzou dermatan a heparan sulfátu v preparátu Sulodexid v biologických tekutinách metodou LC-MS/MS. Testovaly se dva různé přístupy, přičemž první přístup byl založen na analýze DS a HS s použitím derivatizace/methanolýzy. Tento postup úpravy vzorku v kombinaci se separací na reverzní fázi a detekcí hmotnostní spektrometrií umožňoval analýzu modelových roztoků Sulodexidu, avšak při analýze krevní plazmy se vyskytla řada problémů. Hlavním problémem byla přítomnost signálu analytu v blanku plazmy. Jedním z možných vysvětlení, je přítomnost nativních složek plazmy, které byly methanolyzovány na disacharidy analogické k produktům složek Sulodexidu. Ačkoli byla tato metoda vhodná pro analýzu Sulodexidu v modelových roztocích a v moči, pro stanovení Sulodexidu v krevní plazmě, vzhledem k její složitosti, vhodná nebyla. Dalším pozorovaným problémem byla také špatná reprodukovatelnost analýz, a to jak z hlediska odezvy tak i retence.

Vzhledem k těmto problémům byl testován druhý přístup, který spočíval v analýze nativních forem složek Sulodexidu. Využitím vysokorozlišujícího tandemového hmotnostního spektrometru byla ověřena možnost použití tohoto postupu. Bylo zjištěno, že majoritním iontem ve spektru je signál odvozený od disacharidu DS. Signál této složky mohl být využit pro kontrolu Sulodexidu v biologickém materiálu. Studium fragmentačního spektra byly nalezeny nejvhodnější MRM přechody ($458 \rightarrow 378$ a $458 \rightarrow 282$) pro detekci analytů hmotnostním spektrometrem s analyzátozem typu trojitého kvadrupólu.

Prvotní testování možností hmotnostního spektrometru bylo provedeno s využitím metody FIA analýzy, při které bylo dosaženo dostatečné citlivosti modelových roztoků Sulodexidu. Z důvodů potlačení signálu iontu matrice, malé selektivity a kontaminace iontového zdroje však přímá FIA analýza pro analýzu krevní plazmy nemohla být použita. Dále byly tedy testovány možnosti analýzy metodou LC/MS.

Pro chromatografickou separaci složek Sulodexidu od složek plazmy byly testovány různé typy kolon. Zajímavou se ukázala být kolona Acquity C18 (RP), u které se po optimalizaci složení MF dosáhlo toho, že bylo možno pozorovat signál analytu i při požadované koncentraci 0,2 mg/l. Tento systém byl následně použit pro prvotní analýzy vzorků plazmy, avšak tyto první experimenty nepřinesly pozitivní výsledky. Z hlediska citlivosti při analýze modelových roztoků Sulodexidu tedy kolona Acquity C18 vyhovovala, ale neumožňovala stanovit Sulodexid v plazmě na koncentrační úrovni 0,2 mg/l. Hlavními

problémy byla nedostatečná selektivita separace složek Sulodexidu od složek plazmy (potlačení signálu analytu), interakce analytu s proteiny zejména při procesu deproteinace a také špatná reprodukovatelnost při opakovaných měřeních.

V další fázi byly testovány kolony s odlišnou selektivitou, u nichž se předpokládalo lepší oddělení matrice od analytu. Testovanými kolonami byly YMC Triart C18 jako varianta reverzní fáze, Ascentis Express HILIC a ZIC[®]-cHILIC kolona. V případě YMC Triart C18 kolony nastaly stejné problémy jako u kolony Acquity C18.

Nejlepší retence disacharidické složky DS ($RT_{opt} = 5,6$ min) bylo dosaženo na koloně ZIC-cHILIC. Při analýze modelových vzorků bylo dosaženo dostatečné odezvy pro koncentraci 1 mg/l a na úrovni přibližně limitu detekce i koncentrace nižší. Jednoduchou prekoncentrací by tedy bylo možno s rezervou kvantifikovat i koncentrace na požadované úrovni 0,2 mg/l. U všech použitých chromatografických postupů byl pozorován stejný problém, a to znečišťování chromatografického systému (autosampleru i kolony) částí analytu. Pro úplné vymytí analytu bylo potřeba relativně dlouhých promývacích postupů nebo lépe opakovaných nástřiků blanku (typicky pět nástřiků), které byly současně kontrolou dokonalého vymytí analytu před následující analýzou vzorků.

Závěrem lze tedy říct, že vypracovaná LC/MS metoda založená na separaci s využitím kolony ZIC-cHILIC a trojitým kvadrupólovým analyzátozem s vloženými promývacími cykly mezi jednotlivými analýzami je tedy doposud nejlepší vstupní variantou pro analýzu Sulodexidu v biologických tekutinách. Metodu lze dobře použít pro analýzu dermatan a heparan sulfátů v moči s parametry lepšími, než které poskytuje publikovaná metoda využívající methanolýzy¹⁹ (*publikovaná hodnota LOQ: 6 mg/l; LOQ hodnota nově navržené metody: 3 mg/l*). Kritickým a nedořešeným momentem úpravy vzorku krevní plazmy však zůstává interakce složek Sulodexidu s endogenními složkami plazmy, která vyžaduje další optimalizaci.

7 Seznam použité literatury

1. Afratis, N.; Gialeli, Ch.; Nikitovic, D.; Tsegenidis, T.; Karousou, E.; Theocharis, A. D.; Pavão, M. S.; Tzanakakis, G. N.; Karamanos, N. K. *FEBS Journal* **2012**, 279, 1177-1197.
2. Strojil, J. *Remedia* **2006**, 16, 376-381.
3. Volpi, N. *Anal. Biochem.* **2010**, 397, 12-23.
4. Lamari, F. N.; Militopoulou, M.; Mitropoulou, T. N.; Hjerpe, A.; Karamanos, N. K. *Biomed. Chromatogr.* **2002**, 16, 95-102.
5. Zaia, J. *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, 28, 254-272.
6. Voet, D., Voet, J. G. *Biochemie*; Victoria publishing: Praha, 1995.
7. Zhang, F.; Zhang, Z.; Thistle, R.; McKeen, L.; Hosoyama, S.; Toida, T.; Linhardt, R. J.; Page-McCaw, P. *Glycoconjugate J.* **2009**, 26, 211-218.
8. Staples, G. O.; Zaia, J. *Curr. Proteomics* **2011**, 8, 325-336.
9. Oguma, T.; Tomatsu, S.; Montano, A. M.; Okazaki, O. *Anal. Biochem.* **2007**, 368, 79-86.
10. Gill, V. L.; Aich, U.; Rao, S.; Pohl, Ch.; Zaia, J. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 1138-1145.
11. Trowbridge, J. M.; Gallo, R. L. *Glycobiology* **2002**, 12, 117R-125R.
12. Cocheri, S.; Mannello, F. *Drug Des. Dev. Ther.* **2014**, 8, 49-65.
13. Zaia, J. *J. Biomacromol. Mass Spectrom.* **2005**, 1, 3-36.
14. Zhang, Z.; Xie, J.; Liu, H.; Linhardt, R. J. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 4349-4355.
15. Linhardt, R. J. *Med. Chem.* **2003**, 46, 2551-2564.
16. Horner, A. A. *Biochem. J.* **1990**, 266, 553-559.
17. Loganathan, D.; Wang, H. M.; Mallis, L. M.; Linhardt, R. J. *Biochemistry* **1990**, 29, 4362-4368.
18. Cirujeda, J. L.; Coronel, P.; Aza, M. J.; Gimeno, M. J. *Blood Med.* **2010**, 1, 105-115.
19. Auray-Blais, Ch.; Bhérer, P.; Gagnon, R.; Young, S. P.; Zhang, H. H.; An, Y.; Clarke, J. T. R.; Millington, D. S. *Mol. Genet. Metab.* **2011**, 102, 49-56.
20. Vazna, A.; Beesley, C.; Berna, I.; Stolnaja, I.; Myskova, H.; Bouckova, M.; Vlaskova, H.; Poupetova, J.; Zeman, J.; Magner, M.; Hlavata, A.; Winchester, B.; Hrebicek, M.; Dvorakova, I. *Am. J. Med. Genet. A.* **2009**, 149 A, 965-974.
21. Cudry, S.; Tigaud, I.; Froissart, R.; Bonnet, V.; Maire, I.; Bozon, D. *J. Med. Genet.* **2000**, 37, E29.
22. Muenzer, J. *J. Pediatr.* **2004**, 144, S27-S34.

23. Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition*; David Harris: USA, 2007.
24. Klouda, P. *Moderní analytické metody*; Pavel Klouda: Ostrava, 2003.
25. Nováková, L., Douša, M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*; Praha, 2013.
26. Jandera, P. *Anal. Chim. Acta* **2011**, 692, 1-25.
27. Gong, L.; McCullagh, J. S. O. *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 5480-5486.
28. Kovaříková, P.; Stariat, J.; Klimeš, J.; Hrušková, K.; Vávrová, K. *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 416-426.
29. Vacek, J.; Onofreiová, L.; Klejdus, B.; Kubáň, V. *Chem. Listy* **2009**, 103, 381-385.
30. Takagewa, Y.; Araki, K.; Fujitani, N.; Furukawa, J.; Sugiyama, H.; Sakai, H.; Shinohara, Y. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 9443-9449.
31. Appelblad, P.; Abrahamsson, P. *LCGC N. Am. Suppl. S.* **2005**, 24.
32. Oertel, R.; Renner, U.; Kirch, W. *J. Chromatogr. A.* **2004**, 1058, 197.
33. Boersma, P. J.; Divecha, N.; Heck, A. J. R.; Mohammed, S. *J. Proteome Res.* **2007**, 6, 937.
34. Takegawa, Y.; Deguchi, K.; Keira, T.; Ito, H.; Nakagawa, H.; Nishimura, S. *J. Chromatogr. A.* **2006**, 1113, 177.
35. Qiu, H.; Wanigasekara, E.; Zhang, Y.; Tran, T.; Armstrong, D. W. *J. Chromatogr. A.* **2011**, 1218, 8075-8082.
36. http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/products/analytics-sample-prep/chromatography-for-analysis/analytical-hplc/sequant-zic-hilic-hplc-columns/sequant-zic-hilic/KFeb.qB..CsAAAE__RJ3.Lxj,nav,
staženo 20. dubna 2015
37. Gross, J. H. *Mass Spectrometry A Textbook 2nd Edition*; Springer: Heidelberg, 2011.
38. de Hoffmann, E., Stroobant, V. *Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3rd Edition*; John Wiley & Sons Ltd.: England, 2007.
39. Wilm, M. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, 1-8.
40. Miller, P. E.; Denton, M. B. *J. Chem. Educ.* **1986**, 63, 617-623.
41. Cole, R. B.: *Electrospray ionization mass spectrometry: fundamentals, instrumentation and applications*; John Wiley & Sons Inc.: New York, 1997.
42. http://www.waters.com/waters/en_US/SQ-Detector-2---Single-Quadrupole-Detection/nav.htm?cid=134631584, staženo 25. února 2015
43. Blaum, K.; Geppert, Ch.; Müller, P.; Nörtershäuser, W.; Otten, E. W.; Schmitt, A.; Trautmann, N.; Wendt, K.; Bushaw, B. A. *Int. J. Mass Spectrom.* **1998**, 181, 67-87.

44. Swinger D. L. *Vacuum* **1968**, *18*, 669.
45. McLafferty, F. W. (ed.) *Tandem Mass Spectrometry*; John Wiley & Sons Inc.: New York, 1983.
46. de Hoffmann, E. *J. Mass Spectrom.* **1996**, *31*, 129-137.
47. Friedecký, D.; Lemr, K. *Klin. Biochem. Metab.* **2012**, *20 (41)*, 152-157.
48. Korir, A. K.; Larive, C. K. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 155,169.
49. Thanawiroon, Ch.; Linhardt, R. J. *J. Chromatogr. A.* **2003**, *1014*, 215-223.
50. Guerinni, M.; Raman, R.; Venkataraman, G.; Torri, G.; Sasisekharan, R.; Casu, B. *Glycobiology* **2002**, *12*, 713-719.
51. Zaia, J. *Mass Spectrom. Rev.* **2004**, *23*, 161-227.
52. Zaia, J.; Costello, C. E. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 233-239.
53. Mallis, L. M.; Wang, H. M. Loganathan, D.; Linhardt. R. J. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 4987-4993.
54. Juhasz, P.; Biemann K. *Carbohydr. Res.* **1995**, *270*, 131-147.
55. Hitchcock, A. M.; Costello, C. E.; Zaia, J. *Biochemistry* **2006**, *45*, 2350-2361.
56. Shi. X.; Zaia, J. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 11806-11814.
57. Henriksen, J.; Ringborg, L. H.; Roepstorff, P. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1305-1312.
58. Harvey, D, J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2000**, *11*, 900-915.
59. Mason, K. E.; Meikle, P. J.; Hopwood, J. J.; Fuller, M. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 4534-4542.
60. Nielsen, T. C.; Rozek, T.; Hopwood, J. J.; Fuller, M. *Anal. Biochem.* **2010**, *402*, 113-120.
61. Thanawiroon, C.; Rice, K. G.; Toida, T.; Lingardt, R. J. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 2608-2615.
62. Oguma, T.; Toyoda, H.; Toida, H. Imanarik T. *J. Chromatogr. B* **2001**, *754*, 153-159.
63. Saitoh, H.; Takagaki, K.; Majima, M.; Nakamura, T., Matsuki, A.; Kasai, M. Narita, H., Endo, M. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 3741-3747.
64. Karamanos, N. K.; Vanky, P.; Tzanakakis, G. N.; Hjerpe, A. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 1104-1109.

8 Použité zkratky

2AB	2-aminobenzamid
ACN	acetonitril
APCI	atmospheric pressure chemical ionisation (chemická ionizace za atmosférického tlaku)
API	atmospheric pressure ionisation (ionizace za atmosférického tlaku)
APPI	atmospheric pressure photoionisation (fotoionizace za atmosférického tlaku)
B	magnetic sector (magnetický sektor)
CE	capillary electrophoresis (kapilární elektroforéza)
CI	chemical ionisation (chemická ionizace)
cITP	capillary isotachopheresis (kapilární izotachoforéza)
CID	collision-induced dissociation (kolizí indukovaná disociace)
CRM	charged-residue model (model zbytkového náboje)
CS	chondroitin sulfát
CZE	capillary zone electrophoresis (kapilární zónová elektroforéza)
Da	Dalton (jednotka molekulové hmotnosti)
DS	dermatan sulfát
E	electric sector (elektrický sektor)
EI	electron ionisation (ionizace elektronem)
ERT	enzyme replacement therapy (enzymová substituční terapie)
ESI	electrospray ionisation (ionizace elektrosprejem)
FAB	fast atom bombardment (ionizace urychlenými atomy)
FD	field desorption (desorpce polem)
FI	field ionization (ionizace polem)
FIA	flow injection analysis
FT-ICR	Fourier transform ion cyclotron resonance (iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací)
GAG	glykosaminoglykany
HA	kyselina hyaluronová
HILIC	hydrophilic interaction liquid chromatography (hydrofilní interakční chromatografie)
HP	heparin

HPLC	high performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
HS	heparan sulfát
HSCT	hematopoietic stem cell transplantation (transplantace hematopoetických kmenových buněk)
IEM	ion evaporation model (model vypařování iontů)
IMS	ion mobility spectrometry
IP-LC	ion pair chromatography (iontově párová chromatografie)
IT	ion trap (iontová past)
KS	keratan sulfát
LC	liquid chromatography (kapalinová chromatografie)
LOD	limit of detection (limit detekce)
LOQ	limit of quantification (limit kvantifikace)
MALDI	matrix assisted laser desorption ionisation (laserová desorpční ionizace za účasti matrice)
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MPS	mukopolysacharidóza
MRM	multiple reaction monitoring
MS	mass spectrometry (hmotnostní spektrometrie)
NMR	nukleární magnetická rezonance
NP	normal phase (normální fáze)
OT	orbitrap (orbitální past)
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu)
PC	paper chromatography (papírová chromatografie)
PG	proteoglykany
PP	polypropylen
PTFE	polytetrafluorethylen
Q	quadrupole (kvadrupól)
RP	reverse phase (obrácené fáze)
RT	retention time (retenční čas)
SAX	strong anion exchange (aniontově výměnná chromatografie)
SEC	size exclusion chromatography (vylučovací chromatografie)

SF	stacionární fáze
TLC	thin layer chromatogramy (tenkovrstvá chromatografie)
TOF	time of flight (detektor doby letu)
UHPLC	ultra-high performance liquid chromatography (ultraúčinná kapalinová chromatografie)
UV	ultra violet (ultra fialové záření)
ZIC-HILIC	zwitteriontová hydrofilní interakční chromatografie