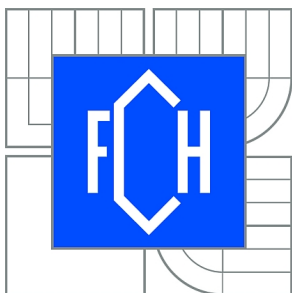




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
CENTRUM MATERIÁLOVÉHO VÝZKUMU
FACULTY OF CHEMISTRY
MATERIALS RESEARCH CENTRE

METODY STANOVENÍ HYALURONANU

ANALYTICAL METHODS FOR HYALURONAN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

LUCIE ČERNÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

prof. Ing. MILOSLAV PEKAŘ, CSc.

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0786/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Centrum materiálového výzkumu	
Student(ka):	Lucie Černá	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808R031)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Metody stanovení hyaluronanu

Zadání bakalářské práce:

1. Provést rešerši na téma jednoduché metody stanovení hyaluronanu.
2. Navrhnout experimenty testující nalezené metody a možnost jejich realizace na školicím pracovišti.
3. Realizovat experimenty, ověřit nalezené metodiky,
4. Zhodnotit jednotlivé metody a jejich možnosti.

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Lucie Černá
Student(ka)

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá souhrnem jednoduchých metod pro stanovení koncentrace hyaluronanu ve vodných roztocích a porovnává funkčnost jednotlivých vybraných metod, jako jsou UV-VIS spektroskopie, IČ spektroskopie a metoda stanovení pomocí alciánové modře. Tyto metody byly vybrány pro jejich jednoduchost a nízkou cenu. Jako nejspolehlivější z těchto tří, se jeví metoda IČ spektroskopie. Stanovení koncentrace HA touto metodou je v deionizované vodě u koncentrací nad 0,4 % poměrně přesné. U metody pomocí UV-VIS spektroskopie vychází kalibrační závislosti stanovení lineárně, ale stanovení nám neposkytuje charakteristickou informaci ve formě píku, to znamená, že by toto stanovení mohlo být lehce ovlivněno dalšími složkami vodného roztoku. Slabá iontová síla a molekulová hmotnost HA ale nemají na stanovení vliv. U metody pomocí alciánové modře byly výsledky značně nevyhovující a nekorespondující s literaturou. Proto tato metoda není v této podobě použitelná pro stanovení koncentrace HA. Další možnou variantou pro stanovení koncentrace HA je metoda ELISA. Jedná se o komerčně vyráběné kity, vhodné pro stanovování nízkých koncentrací v nízkých objemech. Jejich cena je ovšem vyšší než u výše zmíněných metod.

SUMMARY

This thesis deals with of simple methods for determining the concentration of hyaluronan in aqueous solution and compares the performance of each selected methods such as UV -VIS spectroscopy, IR spectroscopy and the method of determination by alcian blue. These methods were chosen for their simplicity and low cost of the assay. As the most reliable of these three methods, seems to be the method of IR spectroscopy. Determination of the concentration of HA by this method is relatively accurate at concentrations above 0.4 % in deionized water. The method of UV-VIS spectroscopy is based on a linear calibration curve determination, but no characteristic peak was detected, which means that this determination could be influenced by other components of the aqueous solution. Weak ionic strength and molecular weight of HA does not affect the determination. In the method with alcian blue, the results were quite unsatisfactory and does not correspond with the literature. Therefore, this method is not applicable in this form for determining the concentration of HA. Another option for determining the concentration of the HA is ELISA method. These are commercially produced kits suitable for determining low concentrations in low volumes. Its price is higher than the above- mentioned methods.

KLÍČOVÁ SLOVA

hyaluronan, alciánová modř, infračervená spektroskopie, ultrafialová spektroskopie

KEY WORDS

hyaluronan, alcian blue, infrared spectroscopy, ultraviolet spectroscopy

ČERNÁ, L. *Metody stanovení hyaluronanu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 36 s. Vedoucí bakalářské práce prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc..

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

*Na tomto místě chci poděkovat
panu prof. Ing. Miloslavu
Pekařovi, CSc. za vstřícnost, cenné
rady a připomínky. Dále chci
poděkovat panu Ing. Vojtěchu
Enevovi za pomoc při měření a
vyhodnocování dat.*

OBSAH

1	ÚVOD	6
2	TEORETICKÁ ČÁST	7
2.1	Hyaluronan	7
2.1.1	Historie.....	7
2.1.2	Struktura a vlastnosti.....	7
2.2	Infračervená spektroskopie	7
2.2.1	Stanovení koncentrace HA pomocí FTIR	8
2.2.2	FTIR spektrometr s ATR technikou - (ATR,attenuated total reflectance)	8
2.3	UV-VIS spektroskopie.....	9
2.3.1	Metoda stanovení koncentrace HA	10
2.4	Alciánová modř.....	11
2.4.1	Metoda stanovení koncentrace HA	12
2.4.2	Další metody	13
2.5	Fluorescenční rozbor	13
2.5.1	Princip fluorescence	13
2.5.2	Metoda stanovení koncentrace HA	14
2.6	Využití Rayleighova rozptylu	15
2.6.1	Princip Rayleighova rozptylu.....	15
2.6.2	Metoda stanovení koncentrace HA	15
2.7	Thiobarbiturátová metoda.....	15
2.8	Metoda ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)	16
2.8.1	Výrobci ELISA kitů	16
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	19
3.1	UV-VIS spektroskopie.....	19
3.1.1	Použité chemikálie	19
3.1.2	Postup stanovení	19
3.2	Alciánová modř.....	20
3.2.1	Použité chemikálie	20
3.2.2	Postup stanovení	20
3.3	Infračervená spektroskopie	21
3.3.1	Postup a stanovení.....	21
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	21
4.1	UV/VIS	21
4.1.1	Zhodnocení	23
4.2	Alciánová modř.....	23
4.2.1	Zhodnocení	28
4.3	Infračervená spektroskopie	28
4.3.1	Zhodnocení	30
5	ZÁVĚR.....	31
6	POUŽITÉ INFORMAČNÍ ZDROJE.....	32
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	34
8	PŘÍLOHY	35

1 ÚVOD

Kyselina hyaluronová (hyaluronan) byla objevena v třicátých letech minulého století. Nejčastěji je využívána v medicínském odvětví a v kosmetickém průmyslu. Jednou z nejdůležitějších biologických funkcí HA je retence vody. Ta hraje důležitou roli u tkáňové hydratace, mazivové funkce v kloubech a buněčné funkce. Má důležitou úlohu při růstu, vývoji a výživě tkání. Dále plní velkou roli při poskytování živin a odstraňování odpadních látek z buněk, které nemají přímé krevní zásobení, jako jsou například chondrocyty. Pokud tyto buňky obsahují nižší množství HA než je standard, jedná se o patologický stav, kdy nedochází u buněk k výměně důležitých látek. Jelikož HA stimuluje buněčné pochody, tak se s ním můžeme setkat i u různých typů rakovinného bujení. Po vzniku nádoru se HA akumuluje v jeho okolí, podporuje jeho růst a zvyšuje jeho rezistenci vůči chemoterapeutické léčbě. V rané fázi morfogeneze začne hladina HA charakteristicky stoupat. Jeho včasné vyšetření a eliminování jeho tvorby by se mohlo stát částečnou zbraní proti rakovině. Právě zvýšená afinita rakovinných buněk k HA může být využita při vývoji takzvaných cílených nosičových systémů. Proto je velmi důležité studovat způsoby a možnosti stanovení kvantity a kvality HA.

Tato práce je zaměřená na jednoduché metody stanovení koncentrace HA především ve vodných roztocích. Navržené metody mohou být použity na školním pracovišti k různým účelům. Jedním z nich je například kvantitativní analýza postupu přípravy nosičů léčiv pomocí interakcí mezi hyaluronanem a tenzidy.

V mé práci jsou popsány vybrané metody, které se pro toto stanovení dají použít. Pro výběr tématu mé práce a další inspiraci bylo čerpáno především z knihy [2].

Experimentální část je zaměřena na zkoumání jednotlivých vybraných metod na školním pracovišti a na vyhodnocení jejich citlivosti a funkčnosti.

2 TEORETICKÁ ČÁST

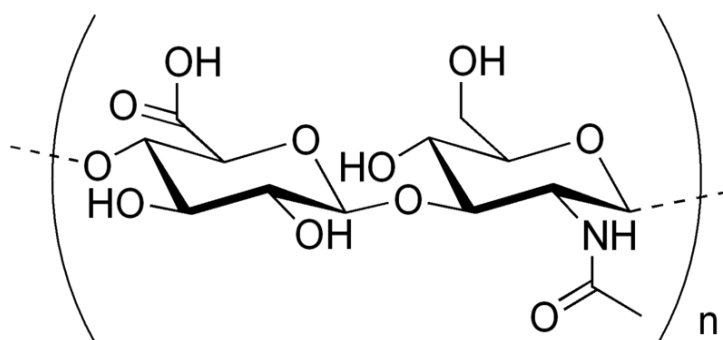
2.1 Hyaluronan

2.1.1 Historie

V roce 1934 Karl Meyer a jeho asistent John Palmer popsali postup izolace glykosaminoglykanu z očního sklivce skotu [19]. Ukázalo se, že tento glykosaminoglykan je složený z kyseliny uronové a aminoglykanu. Pro tento glykosaminoglykan zavedli název kyselina hyaluronová (hyaloid (sklivce) + kyselina uronová.). Dnes je tato makromolekula označována spíše jako hyaluronan a to proto, že in-vivo existuje pouze ve formě polyaniontu a nikoli ve formě kyseliny [18].

2.1.2 Struktura a vlastnosti

Hyaluronan (HA) je přirozeně se vyskytující polydisperzní lineární polysacharid, spadající do skupiny glykosaminoglykanů. Je tvořen z opakujících se disacharidických jednotek, a to D-N-acetylglukosaminu a D-glukuronové kyseliny, které jsou spojeny glykosidickými vazbami β 1-3 a β 1-4 [1,18].



Obr. 1. Chemická struktura základní jednotky hyaluronanu

Z objemné konformace HA lze vyvodit, že kyselina hyaluronová je schopna vázat velké množství vody, a to především díky hydroxylovým skupinám, které jsou ve struktuře velmi početné. Je tedy schopna udržet více vody než jakékoli jiné přírodní látky [1,18].

Vodný roztok této kyseliny je bezbarvý a bez zápachu. Jedná se o viskoelastickou látku, což znamená, že má velmi vysokou viskozitu a elasticitu, jež jsou závislé na její koncentraci a molekulové hmotnosti. U vysokých koncentrací a molekulových hmotností se tento roztok chová jako gel [16,14].

2.2 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie je analytická metoda určená především pro identifikaci a strukturní charakterizaci organických sloučenin a také pro stanovení anorganických látek. Tato analytická metoda je nedestruktivní, tudíž nedochází k poškození vzorku, ale přesto poskytuje informaci o složení daného vzorku. Tato technika měří pohlcení infračerveného záření o různé vlnové délce analyzovaným materiálem. Infračerveným zářením je elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 0.78 - 1000 nm, což odpovídá rozsahu vlnových délek 12800 - 10 cm^{-1} . Celá oblast bývá rozdělena na blízkou (13000 - 4000 cm^{-1}), střední

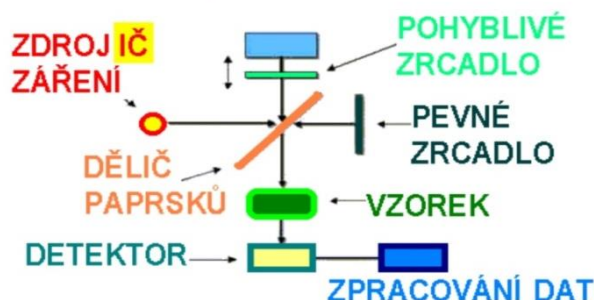
(4000 - 200 cm^{-1}) a vzdálenou infračervenou oblast (200 - 10 cm^{-1}), nejpoužívanější je střední oblast [8,17].

Princip metody je založen na absorpci infračerveného záření při průchodu vzorkem, kde dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Výsledné hodnoty vibračních energií nám vypovídají o pevnosti chemických vazeb, molekulové geometrii a hmotnosti jader, tedy o celé molekulové struktuře [8,17].

Výstupem z této metody je infračervené spektrum, které je grafickým zobrazením funkční závislosti energie, většinou vyjádřené v procentech transmitance (T) nebo jednotkách absorbance (A) na vlnové délce dopadajícího záření. Závislost energie na vlnové délce je logaritmická, proto se používá vlnočet, který je definován jako převrácená hodnota vlnové délky, a tedy závislost energie na vlnočtu bude funkce lineární [8].

2.2.1 Stanovení koncentrace HA pomocí FTIR

V roce 1976 Cael [4] popsal spektrum HA pomocí FTIR. Mimo jiné, bylo možno zjistit orientaci molekul ve vláknech polymeru. Následně Gilli [5] použil FTIR zařízení s technikou ATR „útlum totálního odrazu“ (attenuated total reflectance) pro analýzu vzorků HA ve vodném roztoku a zajistil detailnější rozdělení. Výhodou spektra vodného roztoku je potlačení zbytkového efektu krystalizace [2].



Obr. 2. Schéma FTIR spektrometru

Jako příklad této metody je uveden experiment z roku 2006, kdy byl roztok HA s ultra-čistou vodou skenován pomocí FTIR spektroskopie s ATR technikou. Byly provedeny 3 skeny o teplotě 20°C a vlnové délce 180 nm a 250nm. Pro určení pozadí bylo provedeno 64 skenů při vlnočtu mezi 4000 a 400 cm^{-1} a rozlišení 4 cm^{-1} . Zdrojem byl He-Ne laser o vlnové délce 632.8 nm a výkonu 3mW [9].

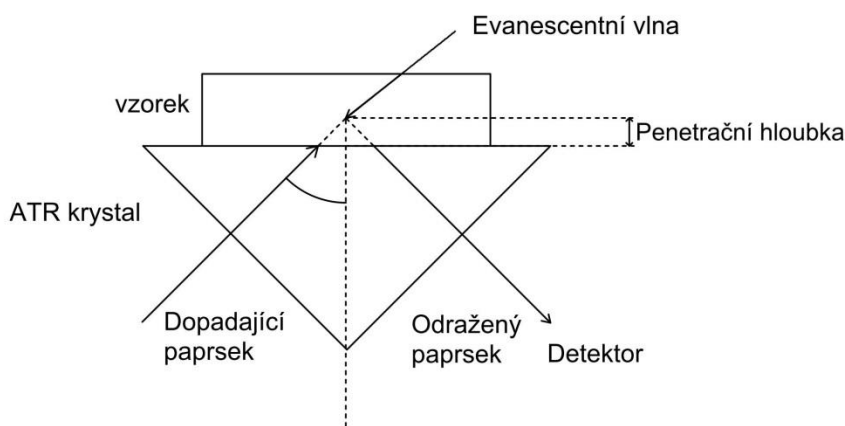
FTIR spektrometry pracují na principu interference spektra, měří interferogram modulovaného svazku záření po průchodu vzorkem.

2.2.2 FTIR spektrometr s ATR technikou - (ATR, attenuated total reflectance)

Česky je tato metoda nazývána metodou zeslabeného vnitřního odrazu. Tato metoda je založena na principu odrazu optického svazku záření na fázovém rozhraní krystalu a vzorku,

který je s krystalem v těsné blízkosti. Zvolený materiál krystalu musí být transparentní v oblasti naší zvolené vlnové délky a musí mít vysoký index lomu, jako například technický diamant. Svazek paprsků je přiveden do krystalu soustavou zrcadel tak, aby úhel dopadu na fázové rozhraní byl totálně odražen. Pokud měřený vzorek absorbuje záření o určité frekvenci, pak bude tato složka v totálně odraženém světle zeslabena. Penetrace do vzorku je ovlivněna vlnovou délkou dopadajícího záření, tzn., že s vlnovou délkou se zvyšuje penetrace do vzorku, a také indexy lomů vzorku a krystalu. Proto je důležité před vyhodnocováním spektra změřit index lomu měřeného vzorku. Tento jev, kdy máme se zvyšujícím se vlnočtem nižší penetraci do vzorku, je vyrovnáván matematicky, kde toto matematické vyhodnocení je součástí softwarového vybavení FTIR spektrofotometrů a nazývá se ATR korekce.

Tato metoda je výhodná tím, že nevyžaduje přílišnou přípravu vzorku. Dají se s ní stanovit vysoce absorbující látky, pevné látky a také plyny. V některých zařízeních může být krystal také ponořen do analyzované látky [8].



Obr. 3. Schéma FTIR spektrofotometru s ATR technikou

2.3 UV-VIS spektroskopie

Spektroskopie v ultrafialové a viditelné oblasti patří mezi analytické metody, které řadíme mezi elektromagnetické spektroskopické metody. Jejím základním principem je absorpce elektromagnetického záření molekulami vzorku v intervalu 200–800 nm. To znamená, že využívá světlo ve viditelné a jí přilehlé oblasti (přilehlé UV a infračervená oblast). V této oblasti elektromagnetického spektra dochází při absorpci k excitaci valenčních elektronů, které jsou součástí molekulových orbitalů. Tato technika je komplementární s fluorescenční spektroskopií v tom, že fluorescence se zabývá přechody z excitovaného stavu do základního stavu, kdežto absorpce měří přechody ze základního stavu do excitovaného [10,20].

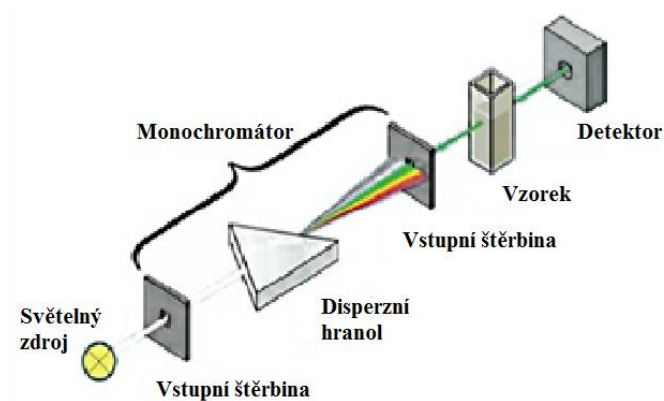
Obecně poskytuje málo informací o struktuře vzorku, ale je velmi užitečná pro kvantitativní měření. Koncentrace analytu v roztoku může být stanovena měřením absorpce při určité vlnové délce za použití Lambert - Beerova zákona. Absorpci nebo odraz ve viditelné části spektra přímo ovlivňuje barva zkoumaného vzorku. Tato metoda je tedy považována za kolorimetrickou. Kolorimetrie se vztahuje nejen na sloučeniny, které mají absorpční spektrum

v této spektrální oblasti, ale také na všechny sloučeniny, které po přidání určitých činidel, vedou k derivátům, které toto měření umožní [8].

Tato metoda je přesná, rychlá, citlivá a experimentálně nenáročná. Díky těmto vlastnostem má velmi široké uplatnění. Pomocí UV-Vis spektroskopie lze v kombinaci s dalšími spektroskopickými metodami identifikovat neznámé látky. Proto se s detektorem UV-Vis spektroskopie můžeme setkat i u různých separačních aparatur, například u HPLC.

Měření se provádí buď při dané vlnové délce, nebo se snímá celé spektrum v krátkých časových intervalech.

Velikou výhodou UV-Vis spektroskopie je, že nezáleží na skupenství vzorku, ale nejčastěji se ovšem používá pro stanovení kapalné fáze [10,20].

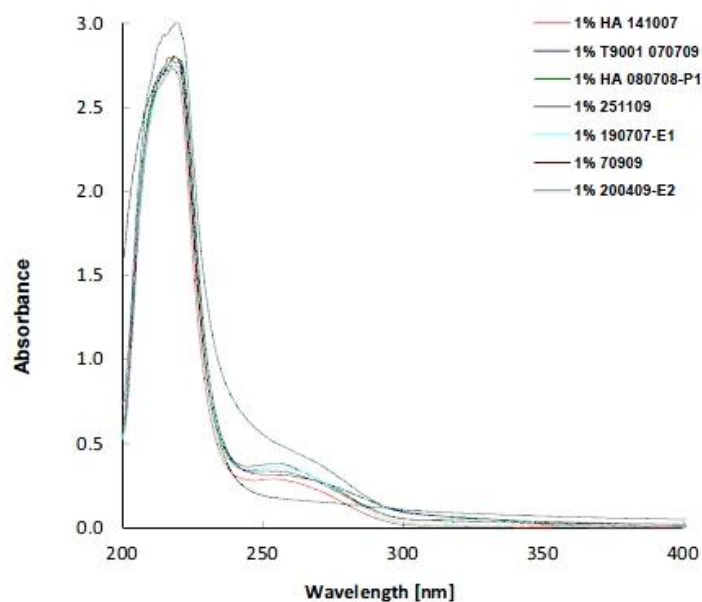


Obr. 4. Schéma UV-VIS spektrofotometru

2.3.1 Metoda stanovení koncentrace HA

Čistá kyselina hyaluronová je bezbarvá. Údaje získané z viditelné absorpční spektroskopie ale mohou nést určitou informaci o koncentraci vzorku, HA má poměrně silnou UV absorpci v okolí 220 nm, a proto může být použita pro kvantitativní rozbor čistého HA při UV spektroskopii [2].

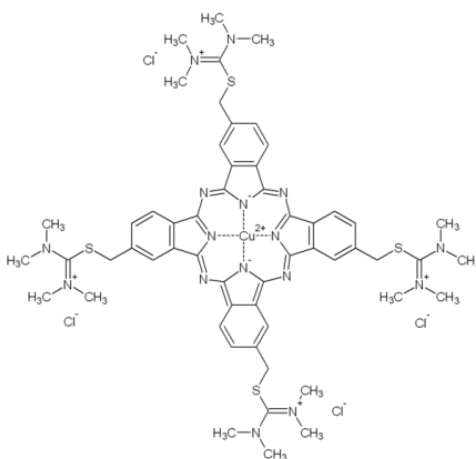
Na **obrázku 5** vidíme výstup z UV-Vis spektrofotometru, kde píky při 220 nm korespondují s čistým hyaluronanem, lokální píky při 260 nm poukazují na výskyt nečistot. Čím vyšší je výskyt nečistot, tím je pík absorbance při 220 nm nižší. Měření probíhalo pravděpodobně u předem zfiltrovaného roztoku HA na mikrometrovém filtru o velikosti pórů 0,22, při pH 7,0 [11].



Obr. 5. Graf závislosti absorbance na vlnové u různých roztoků, především 1% roztok HA.

2.4 Alciánová modř

Je kationtové barvivo s chemickým vzorcem $C_{56}H_{68}N_{16}S_4Cl_4Cu$, tvořící tmavě zelené krystalky s kovovým leskem. Roztok alciánové modře (AB „alcian blue“) 8GX je vhodný pro identifikaci (rozlišení) kyselých polysacharidů, například glykosaminoglykanů v různých tělních strukturách, například v chrupavkách, a také některých typů mukopolysacharidů v tkáňových řezech. Použití alciánové modře je známo především z histologie, zejména u barvení pro mikroskopii. Alciánová modř je tedy jedním z nejvíce používaných kationtových barviv pro světelnou a elektronovou mikroskopii. Tkáňové díly, které se specificky zabarvují po obarvení (od modré po modro-zelenou) se nazývají "Alcianophilic". Alciánové modření může být kombinováno i s řadou dalších barvení. Alciánová modř může být také použita ke kvantifikaci kyselých glykanů, jak mikrospektrofotometricky v roztoku, tak pro barvení glykoproteinů v polyakrylamidovém gelu [7].



Obr. 6. struktura alciánové modře

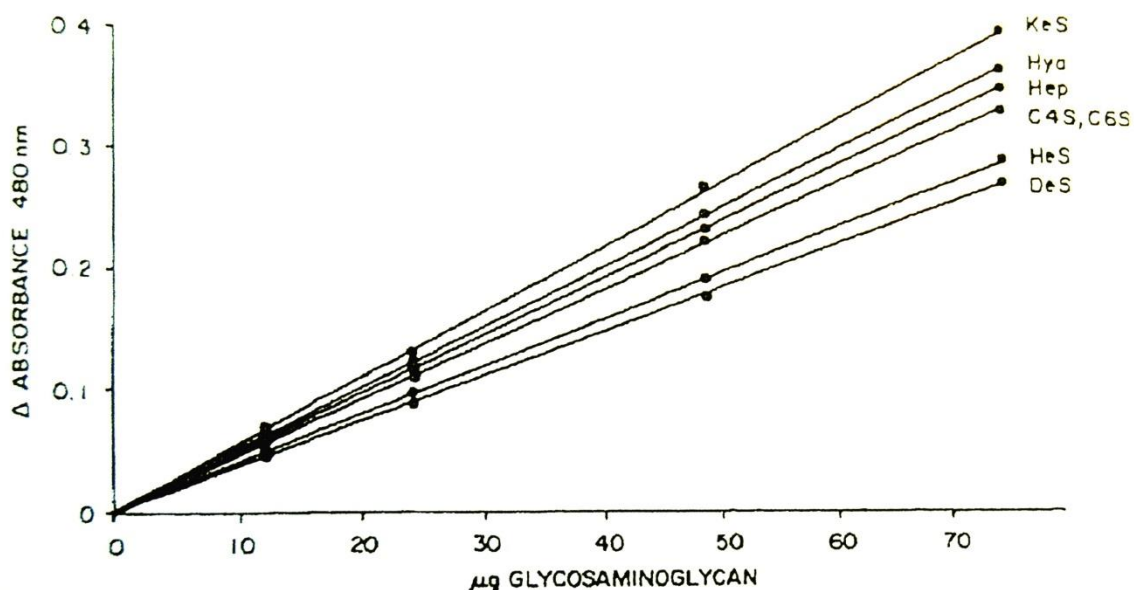
2.4.1 Metoda stanovení koncentrace HA

Edward W. Gold [6] vyvinul spektrometrickou metodu pomocí alciánové modře, která umožňuje jednoduchý, rychlý a spolehlivý odhad mikrogramů glykosaminoglykanů. Je vhodná například pro stanovení koncentrace HA v biologických tekutinách. Tato metoda je založena na rozdílu absorbancí při 480 nm mezi komplexem HA-barviva (vyšší absorbance) a řídícího barviva (nižší absorbance). Obě skupiny vykazovaly lineární nárůst v rozsahu 5–75 µg [2].

Jako rozpouštědlo pro alciánovou modř byl po testování různých rozpouštědel vybrán octan sodný, protože se v něm rozpustí jak barvivo, tak jeho komplex s HA. U rozpuštěné AB v octanu sodném ale dochází k postupné agregaci. Proto by se měl roztok barviva použít co nejdříve po přípravě. Absorbanční spektrum agregátu je vyšší při 480 nm než u nezagregovaného barviva. A proto čím vyšší stárí roztoku AB bude, tím větší bude měřitelná absorbance u slepého vzorku. S malými potížemi se setkáváme až po několika hodinách stárí roztoku. Agregované barvivo se vysráží z roztoku během 24 hodin. Po této době je roztok barviva nepoužitelný. Rychlost tvoření agregátu lze pozorovat při vlnové délce 480 nm, kde může být pozorovatelná lineárně se zvyšující absorbance v čase. Roztok barviva, ke kterému byl přidán HA, také vykazuje postupné zvýšení absorbance při 480 nm. Zvýšenou absorpenci, při 480 nm, v důsledku tvorby komplexů lze snadno stanovit měřením každého vzorku proti slepému vzorku [2].

Albumin, jednoduché cukry a chloridové ionty nízkých koncentrací neovlivňují rozbor. Příkladem je fyziologický roztok 0,9 %. Při vyšších koncentracích těchto iontů můžeme však očekávat ovlivnění výsledku [2].

Obrázek 7 ukazuje absorpenci měřenou při vlnové délce 480 nm, roztoku HA a dalších glykosaminoglykanů s roztokem alciánové modře v 0,5 M octanu sodném rozpuštěném v deionizované vodě. Z grafu je patrné, že se zvyšující koncentrací roztoku (větší množství glykosaminoglykanů) roste i rozdíl absorbance [2].



Obr. 7. Kalibrační křivka různých glykosaminoglykanů při 480 nm při užití roztoku alciánové modře v 0,5M octanu sodném.

2.4.2 Další metody

S barvením alciánovou modří se také setkáváme u kolorimetrické metody stanovení koncentrace individuálních glykosaminoglykanů pomocí elektroforézy, kdy se alciánovou nebo toluidinovou modří barví foretogram. Po odbarvení vzniknou komplexy GAG- barvivo a ty jsou dále izolovány, rozpouštěny a disociovány do roztoku. Množství barviva v roztoku je poté spektrofotometricky určeno a na základě intenzity zbarvení je stanovena koncentrace glykosaminoglykanů [21]. Tato metoda však není úplně jednoduchá pro běžné stanovení koncentrace glykosaminoglykanů.

Atomovou absorpční spektroskopií lze také stanovovat měď obsaženou v komplexech v komplexech GAG-barvivo. Tato metoda je poměrně citlivá, ale vyžaduje technicky náročnější vybavení laboratoře [6].

Další metoda popisuje izolování komplexů centrifugací po dvou hodinách reakce barviva s GAG. Sražené komplexy jsou promývány a znovu centrifugovány. Obsah glykosaminoglykanů je poté určen v roztoku alciánové modře uvolněné z rozpuštěných a oddělených sraženin spektroskopicky [6].

2.5 Fluorescenční rozbor

2.5.1 Princip fluorescence

Mnoho sloučenin při excitaci světelným zdrojem ve viditelné nebo ultrafialové oblasti absorbuje energii, která je téměř okamžitě znovu emitována. U vyzáření jde o přechod z prvního singletového stavu (S_1) do singletové hladiny (S_0), kdy se excitovaný elektron vrací do svého základního stavu, jedná se tedy o sekundární záření. Tento jev se nazývá

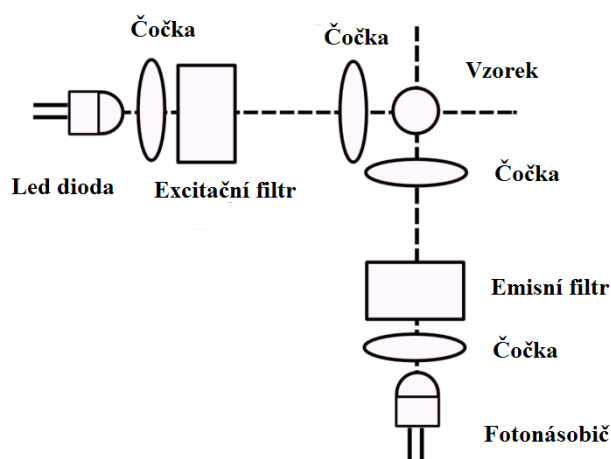
fluorescence, a to proto, že byl tento jev poprvé pozorován u minerálu fluoritu. Fluorescenční životnost je pouze několik nanosekund [8].

Ve fluorometru se emitované záření měří nejčastěji v kolmém směru k budícímu paprsku. Toto emitované záření nejprve prochází emisním monochromátorem a poté je detekováno pomocí fotonásobiče (viz. **obr. 8**).

Touto metodou se dá stanovit i koncentrace mnohých látek. Pro malé koncentrace je fluorescence na koncentraci lineární, a u vyšších koncentrací může docházet ke zhášení fluorescence, zde se jedná o jev nežádoucí.

2.5.2 Metoda stanovení koncentrace HA

Na sklíčko jsou nanášeny vazebné proteiny HA (HABP) získané z hovězí chrupavky a následně inkubovány společně se vzorky obsahujícími standardní roztoky HA, séra z normálních i cirhozních subjektů, biotinem konjugovanou HABP, nebo europiem značený streptavidin. Po uvolnění europa z roztoku streptavidinu a HA je finální fluorescence změřena fluorometrem. Metoda přináší výsledky i v případě přítomnosti značného množství ostatních glykosaminoglykanů (chondroitin, heparin) nebo proteinů. Je možné stanovit množství HA v rozmezí 0,2 - 500 $\mu\text{g/L}$. Analýza koncentrace HA u 545 normálních subjektů ukázala průměrné hodnoty 14,5 $\mu\text{g/L}$, zatímco u 40 cirhozních pacientů 542 $\mu\text{g/L}$. U starších subjektů (více než 51 let) byla dokázána vyšší koncentrace HA (průměrně 28 $\mu\text{g/L}$) než u mladších subjektů (průměrně 13 $\mu\text{g/L}$). Tato metoda umožňuje velmi precizní detekci HA. Je časově nenáročná a nevyužívá radioaktivní materiály [13].



Obr. 8. Schéma fluorometru

2.6 Využití Rayleighova rozptylu

2.6.1 Princip Rayleighova rozptylu

Rayleighův rozptyl je nazýván podle významného anglického fyzika lorda Johna Williama Strutta Rayleigha a je charakterizován rozptylem světla na částicích (molekulách) látky. Nejintenzivnější rozptyl na překážce nastává, pokud se rozměr částice přibližuje rozměru srovnatelnému s vlnovou délkou. Při rozptylu se frekvence záření nemění. Tento rozptyl je takzvaná re-emise, což znamená, že vyzáří malý podíl absorbovaného světla o stejné vlnové délce ve všech směrech. Intenzita Rayleighova rozptylu závisí na polarizovatelnosti molekul rozpouštědla [8].

Rayleighův rozptyl (Resonance Rayleigh scattering - RRS) se stal známým pro jeho citlivost a jednoduchost v rámci nové analytické techniky vyvinuté v posledních letech. Poskytuje informace týkající se molekulární struktury, velikosti, tvaru, rozložení náboje a další. Tato technologie byla úspěšně použita ke studiu agregace chromoforů u biologických makromolekul, pro stanovení stopového množství anorganických iontů a ke stanovení povrchově aktivních látek pomocí iontové asociačních reakcí s některými barvivy. Pomocí této metody se dá stanovit i koncentrace HAa to pomocí barviva ethyl-violet' (EV) a jeho detekcí pomocí RRS [14].

2.6.2 Metoda stanovení koncentrace HA

Experimentálně bylo zjištěno, že při pH 4,4 - 8,0 (Britton-Robinson pufr) má EV s HA velmi slabý RRS. Při stopovém množství HA, vzhledem k tvorbě komplexu HA s EV na základě elektrostatických a hydrofobních sil, se RRS intenzita v roztoku zvyšuje a objeví se nové spektrum. Na základě tohoto jevu byla vyvinuta jednoduchá a vysoce citlivá RRS metoda pro stanovení HA, kdy intenzita RRS je přímo úměrná koncentraci HA [14].

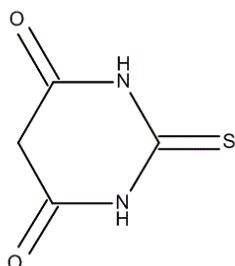
V experimentu byla kyselina hyaluronová (1 mg/ml) připravena rozpuštěním 0,1 g HA sodného ve 100 ml vody. Pracovní roztok se dále zředil vodou na 10 mg/ml. Roztok EV ($2,03 \times 10^{-4}$ mol/l) byl připraven rozpuštěním 0,1 g EV ve vodě a zředěn vodou na 1000 ml. Britton-Robinson pufr (tlumivý roztok) byl připraven s různými hodnotami pH (pH 09/02-02/11) , a to smícháním smíšené kyseliny (složené z 0,04 mol/l H_3PO_4 , HA a H_3BO_3) s 0,2 mol/l NaOH. Pufr se používá k řízení kyselosti interagujících systémů. V celém experimentu byla použita dvakrát destilovaná voda. Pro měření RRS spektra a intenzity při dané vlnové délce byl použit fluorescenční spektrofotometr Hitachi F-2500. Pro měření absorpčního spektra byl použit UV-Vis spektrofotometr [14].

2.7 Thiobarbiturátová metoda

G.W. Jourdian rozvinul metodu stanovení hyaluronanu pomocí thiobarbiturátu. Tento thiobarbiturátový test je enzymatický kolorimetrický test, vhodný pro měření obsahu HA ve směsi glykosaminoglykanů nebo surových biologických extraktů toho důvodu, že je účinný k HA. Thiobarbiturátový test zahrnuje následující kroky: použití čištěné formy HA lyázy, *Streptomyces hyalurolyticus*, u kterého je méně pravděpodobné, že bude potlačen dalšími

glykosaminy, a proto je účinnější při degradaci HA k jejím nenasyceným disacharidovým jednotkám; oxidaci disacharidů kyselinou jodistou na formyl pyruvát a jeho reakce s thiobarbiturátem na chromofor s maximální absorbancí při 549 nm.

Jourdianova metoda má lineární odezvu, tedy citlivost v rozmezí 5-100 µg HA. Tuto citlivost ještě snížil Adams, který automatizoval provedení thiobarbiturátového testu s kyselinou jodistano-thiobarbitovou [2].



Obr. 9 Vzorec kyseliny 2-thiobarbiturové

2.8 Metoda ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

ELISA představuje v praxi jednu z nejpoužívanějších bioanalytických metod, a to především díky její specifitě, jednoduchosti a snadné automatizovatelnosti. Tato metoda je založena na specifické interakci antigenu s příslušnou protilátkou.

Látky, které mají vysokou afinitu k HA, se dají použít ke stanovení koncentrace pomocí ELISA. Tuto vlastnost mají proteoglykany, které mohou být izolovány z kloubních nebo nosních chrupkek hovězího masa. Touto metodou je možné určit množství HA v nanogramech. Pomocí peroxidáz a alkalických fosfatáz lze měřit zbarvení komplexu HA-proteoglykan spektrofotometricky. V tomto případě patří ELISA také do kategorie kolorimetrických metod. Hodí se především ke stanovení velmi malých koncentrací HA [2].

2.8.1 Výrobci ELISA kitů

Zde je krátký přehled továrně vyráběných ELISA kitů. Každý kit obsahuje mikrotitrační destičku, většinou 96-jamkovou, s nanesenými protilátkami, dále činidla pro stanovení a návod k použití. Všechny kity fungují na stejném principu.

V kitech je využívána především sendvičová metoda mezi HA a HABP navázanou na plášťovém povrchu jamky a HABP konjugovanou s křenu peroxidázou. Pro rozvoj barevné reakce je přidán chromogenní substrát, TMB a peroxid vodíku. Optická hustota barvy je měřena spektrofotometrem při 450 nm. Tato ELISA metoda, díky níž můžeme stanovit koncentraci HA, byla vymyšlena především pro serologická vyšetření u

revmatoidních artritid, jaterních fibroz a cirhoz. Tyto kity jsou dostupné především v USA [2].

Z přehledu je vidět, že každý výrobce má uveden jiný rozsah detekce, jinou citlivost a délku stanovení, to se také odráží v ceně jednotlivých kitů. Proto je důležité vědět, na jakou koncentraci budeme kit potřebovat, a podle toho zvolit ten správný.

2.8.1.1 VÝROBCE : USCN LIFE SCIENCE INC.

ELISA Kit for Hyaluronic Acid (HA)

Citlivost: 2,5ng/ml

Rozsah detekce : 7,4 – 600ng/ml

Cena: 11 820 Kč

Délka stanovení: 2,5 hodiny

Formát: destička 96-jamková

Standardní křivka je pro koncentrace 600 ng / ml, 200 ng / ml, 66,67 ng / ml, 22,22 ng / ml, 7,41 ng / mL



Obr.1.1 ilustrační foto kitu (Uscn Life Science Inc.).

Tento test má vysokou citlivost a vynikající specifitu pro detekci (HA).
Žádná významná zkřížená reaktivita nebo rušení mezi (HA) a analogů nebyla zaznamenána.

Vlastní test

Zkouška uplatňuje princip sendvičové metody ELISA. Mikrotitrační destičky jsou v tomto kitu potaženy protilátkou specifickou pro kyselinu hyaluronovou (HA).

Standards a vzorky se přidají do příslušných jamek mikrotitrační destičky s biotin-konjugovanými protilátkami specifické pro kyselinu hyaluronovou (HA). Dále se do každé jamky mikrotitrační destičky přidá avidin konjugovaný s křenovou peroxidázou a nechají se inkubovat. Poté se do jamek, které obsahují kyselinu hyaluronovou (HA), přidá TMB substrát. Biotin-protilátka konjugovaná s enzymem a konjugovaný avidin vykazují změnu barvy. Reakce enzym-substrát se ukončí přidáním roztoku kyseliny sírové a změna barvy se měří spektrofotometricky při vlnové délce 450 nm ± 10 nm. Koncentrace kyseliny hyaluronové (HA) se ve vzorcích stanoví porovnáním se standardy dodávanými v kitech.

Postup testu

- Připravte všechny reagenty, vzorky a standardy;
- Napipetujte 100 µl standardu nebo vzorku do každé jamky. Inkubujte 2 hodiny při 37°C;
- Přidejte 100 µl připraveného detekčního reagentu A. inkubujte 1 hodinu při 37°C;
- Odsajte a promyjte 3 x;
- Přidejte 100 µl připravené detekčního činidla B. Inkubujte 30 minut při teplotě 37°C;
- Odsajte a promyjte 5x;
- Přidejte 90µL substrátu. Inkubujte 15-25 minut při 37°C;
- Přidejte 50 µl zastavovacího roztoku. Změřte ihned při 450 nm .

2.8.1.2 VÝROBCE: CUSABIO

Human Hyaluronic Acid (HA) ELISA Kit

Citlivost:	0,039 ng/ml
Rozsah detekce:	0,156 – 10 ng/ml
Cena:	výrobce neuvádí
Délka stanovení:	1 – 4,5 hodiny
Formát: destička	96-jamková



Obr.1.2 ilustrační foto kitu (Cusabio)

2.8.1.3 VÝROBCE: CORGENIX

Human Hyaluronic Acid (HA) ELISA Kit

Citlivost:	výrobce neuvádí ng/ml
Rozsah detekce:	výrobce neuvádí ng/ml
Délka stanovení:	2 hodiny
Formát:	destička 96-jamková



Obr.1.3 ilustrační foto kitu (Corgenix)

2.8.1.4 VÝROBCE: MYBIOSOURCE

Hyaluronic acid, HA, ELISA Kit

Citlivost:	1,02 ng/ml
Rozsah detekce:	2 – 600 ng/ml
Cena:	9 700 Kč
Délka stanovení:	2 – 3hodiny
Formát:	destička 96-jamková

2.8.1.5 VÝROBCE: ECHELON

Hyaluronic acid (HA) sandwich ELISA Kit

Citlivost:	25 ng/ml
Rozsah detekce:	12,5 – 3200 ng/ml
Cena:	14 350 Kč
Délka stanovení:	2 – 3hodiny
Formát:	destička 96-jamková

Stanovujeme jím HA o velikosti řetězce nižší než 130 kDa.

Hyaluronic acid (HA) competitive ELISA Kit

Citlivost:	25 ng/ml
Rozsah detekce:	0 – 1600ng/ml
Cena:	13 390 Kč
Délka stanovení:	2 – 3hodiny
Formát: destička	96-jamková

Dají se s ním stanovit všechny velikosti řetězce HA.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část je zaměřena na ověření vybraných nalezených metod. Všechna procenta jsou uvedena v hmotnosti HA na objem roztoku (w/v) .

3.1 UV-VIS spektroskopie

Tento experiment se opírá o fakta z kapitoly 2.3.

3.1.1 Použité chemikálie

Hyaluronan sodný od firmy Contipro

1 500 – 1 750 kDa (šarže 2013-4722 tedy přesná molekulová hmotnost: 1 669 kDa)

15 – 30 kDa (šarže 212-2069 tedy přesná molekulová hmotnost: 15 kDa)

3.1.2 Postup stanovení

V našem pokusu byla zvolena koncentrace pro proměření 0,025 – 0,4% roztoku hyaluronanu v deionizované vodě. Tato koncentrace byla zvolena proto, aby kalibrační křivka vycházela co nejvíce lineárně.

1.

Byl připraven 0,4% roztok HA (1500 – 1750kDa) v deionizované vodě. Po cca 24 hodinách stálého míchání na automatické míchačce při pokojové teplotě byl tento roztok rozředěn na koncentrační řadu v rozmezí 0,4 – 0,05 % s krokem 0,05 a dále byl připraven ještě nejvíce zředěný roztok 0,025%. Před samotným měřením se rozředěné roztoky nechaly míchat dalších cca 24 hodin na automatické míchačce.

Roztoky byly proměřeny na dvoupaprskovém UV-Vis spektrofotometru Hitachi U-3900H v rozmezí UV oblasti (200 – 400 nm) v křemenné kyvetě o tloušťce 1 cm. Jako slepý vzorek byla použita deionizovaná voda.

2.

Jelikož tato metoda nevycházela zcela podle očekávání, byla provedena další dvě stanovení. V jednom byl hyaluronan rozředěn v 0,15 M NaCl na koncentraci 0,4 % HA (1500 – 1750 kDa) v NaCl, aby se ověřil vliv iontové síly.

3.

V dalším byl hyaluronan opět ředěn deionizovanou vodou, ale byla zvolena nižší molekulová hmotnost HA (15 – 30 kDa). Postup ředění byl obdobný jako u prvního stanovení (u postupu s použitím NaCl bylo ředěno 0,15 M roztokem NaCl).

3.2 Alciánová modř

Postup naší metody byl zpracován dle literatury [6], kdy se alciánová modř naředí v roztoku octanu sodného. Tento roztok je považován za slepý vzorek a přikápnutím roztoku hyaluronanu 1:12 vytvoříme vzorek k proměření. Kalibrační křivku jsme zpracovali z nejnižší absorpance, která náleží blízkosti 480 nm. Tato metoda by měla být citlivá na koncentrační rozmezí 5 – 75 µg/ml.

3.2.1 Použité chemikálie

Hyaluronan sodný od firmy Contipro 1 500-1 750 kDa (šarže 2013 – 4722, tedy přesná molekulová hmotnost: 1 669 kDa)

Alciánová modř (Alcian blue 8 GX) od spol. Sigma-Aldrich spol. s.r.o. (šarže 75881-23-1)

Octan sodný

3.2.2 Postup stanovení

1.

Byly připraveny roztoky HA ve vodě v rozmezí koncentrací 0,005 – 0,08 %, což přibližně odpovídá hodnotám, při kterých je tato metoda citlivá.

Nejprve byl připraven roztok 0,08% HA (1500 – 1750 kDa) v deionizované vodě, kdy po cca 24 hodinách míchání na automatické míchačce při pokojové teplotě byl tento roztok rozředěn na koncentrační řadu v rozmezí 0,005 – 0,08 % s krokem 0,01. Před samotným měřením se rozředěné roztoky nechaly míchat dalších cca 24 hodin na automatické míchačce. Dále byl těsně před tímto měřením připraven roztok alciánové modře o koncentraci 1,4mg/ml v 0,5 M octanu sodném, takže na přípravu 25 ml roztoku octanu sodného bylo naváženo 1,701 g trihydrátu, a 0,035g alciánové modře bylo doplněno tímto roztokem, na 25 ml v odměrné baňce.

Vlastní měření bylo provedeno na dvoupaprskovém UV-Vis spektrofotometru Hitachi U-3900H v rozmezí (400 – 700 nm) v plastové jednorázové kyvetě o šířce 1 cm. Jako blank byl použit roztok, který byl přímo namíchán v kyvetě, a to 0,2 ml H₂O s 2,4 ml připraveného roztoku alciánové modře. Vzorek ke stanovení byl namíchán obdobně, takže k 0,2 ml vzorku (HA) byly přidány 2,4 ml roztoku alciánové modře. Kyveta s připraveným vzorkem se před měřením ponechala 10 minut inkubovat při pokojové teplotě.

2.

V důsledku toho, že výsledky z této metody neodpovídaly závěru podle Golda, byly proměřeny časové závislosti roztoků alciánové modře (v octanu sodném) o koncentraci 0,14mg/ml a 1,4mg/ml a to každých 5 minut po 1 hodinu proti 0,5 M octanu, těsně po namíchání roztoků.

3.

Roztoky byly pozorovány také po vizuální stránce, a to roztoky alciánové modře o koncentraci 1,4mg/ml v 0,5M octanu ve vodě a 0,1% roztoku kyseliny hyaluronové.

4.

Na základě těchto pozorování byla celá metoda dle Golda zopakována ještě jednou s nepatrnou změnou. Roztok alciánové modře o koncentraci 1,4mg/ml byl namíchán pouze v deionizované vodě. Jako slepý vzorek byl použit nejprve roztok barviva s 0,2 ml H₂O a poté samotná voda. Tato změna byla provedena na základě dobré rozpustnosti AB v H₂O.

3.3 Infračervená spektroskopie

3.3.1 Postup a stanovení

1.

Byly použity stejné roztoky HA, jako u prvního stanovení HA pomocí UV-VIS spektroskopie.

Postupně byly tyto roztoky měřeny na FTIR spektrometru s ATR technikou. Nejprve bylo změřeno spektrum pozadí, v našem případě deionizované vody, a to tak, že bylo kápnuto 100 µl deionizované vody na ATR krystal (technický diamant) do nástavce na vzorek, tak aby vzorek byl v dokonalém kontaktu s tímto krystalem kvůli dostatečnému průniku záření ve formě evanescentní vlny do vzorku. Krystal byl překryt nekorodujícím víčkem tak, aby se látka nemohla během měření odpařit. Následně bylo proměřeno spektrum v rozmezí vlnových délek 4000 – 0 cm⁻¹. Po změření pozadí bylo sejmuto nekorodující víčko a nástavec na vzorek. Voda byla setřena z krystalu buničitou vatou a dále byl krystal a ostatní komponenty důkladně očištěny ethanolem. Měření vzorků probíhalo obdobně. Kvůli tomu, že penetrační hloubka záření do povrchu vzorku je závislá na vlnové délce, byla proto u námi naměřených infračervených spekter udělána ATR korekce.

2.

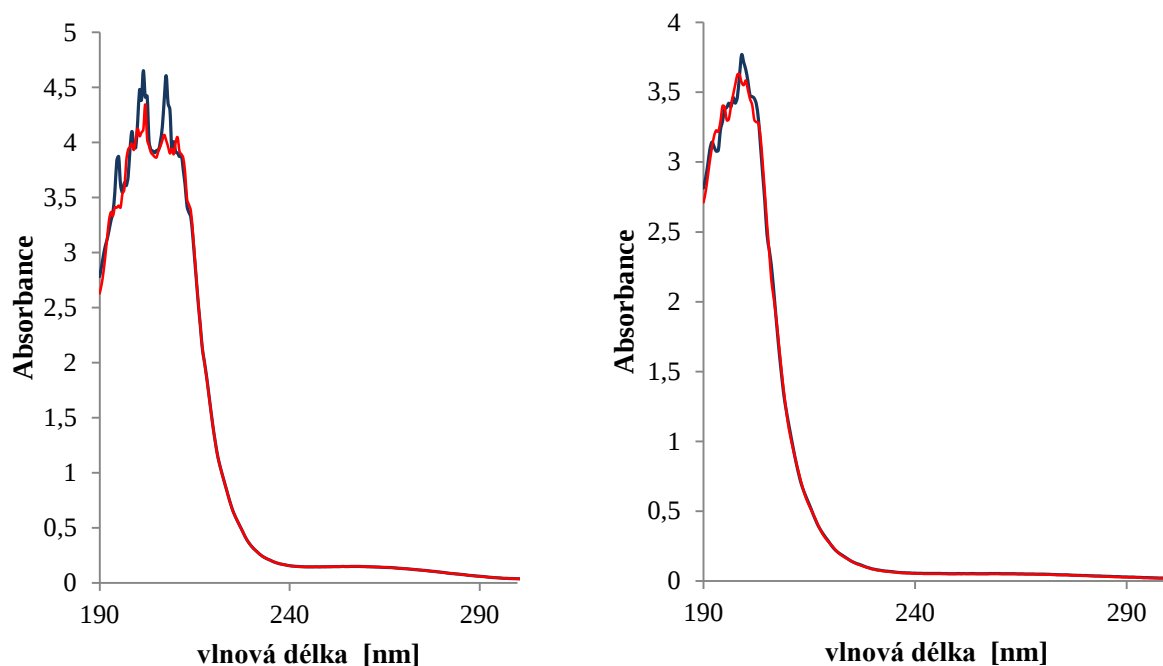
Jelikož tato spektra nevycházela podle očekávání, byla vytvořena nová koncentrační řada, a to 0,4% – 0,7 % s krokem 0,1%. Tyto roztoky byly před samotným měřením odstředěny po dobu 10 minut při 4 000 otáčkách/minutu. Další postup je obdobný jako u přechozího stanovení, včetně spektra pozadí, kde byla zvolena také deionizovaná voda.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

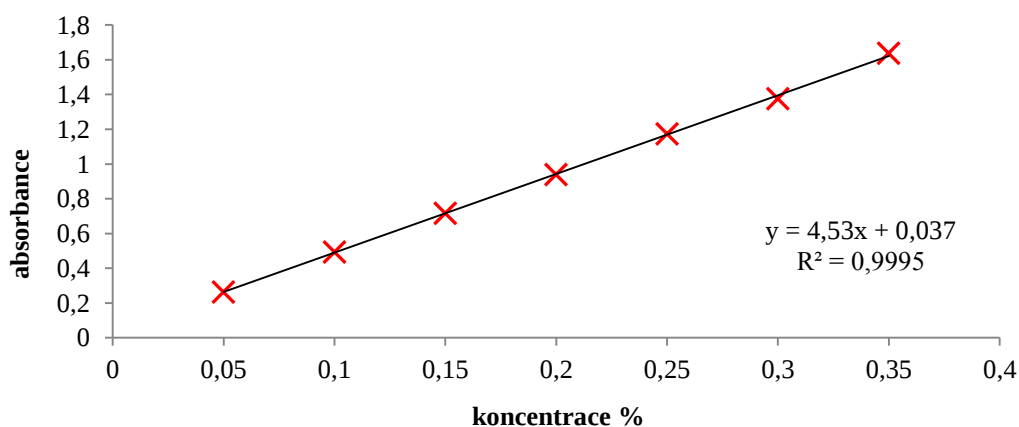
4.1 UV/VIS

V našem stanovení bohužel při 220 nm není znatelný žádný pík, pouze při 200 nm je znatelný pík s velkým šumem (viz **obr. 10**), což může být způsobeno vysokou koncentrací roztoku. Pouze nepatrný pík je při cca 260 nm, což zřejmě vypovídá o výskytu nečistot ve vzorku.

Ve výsledném grafu kalibrační křivky, který byl vytvořen z vlnové délky 220 nm (viz **kapitola 2.2**) byly vynechány krajní hodnoty koncentrace HA a to, 0,25 % a 0,4 % protože jejich hodnoty nespádaly do lineární přímky. Tato kalibrační křivka (viz **obr. 11**) je tedy v rozmezí 0,05 % – 0,35 %.

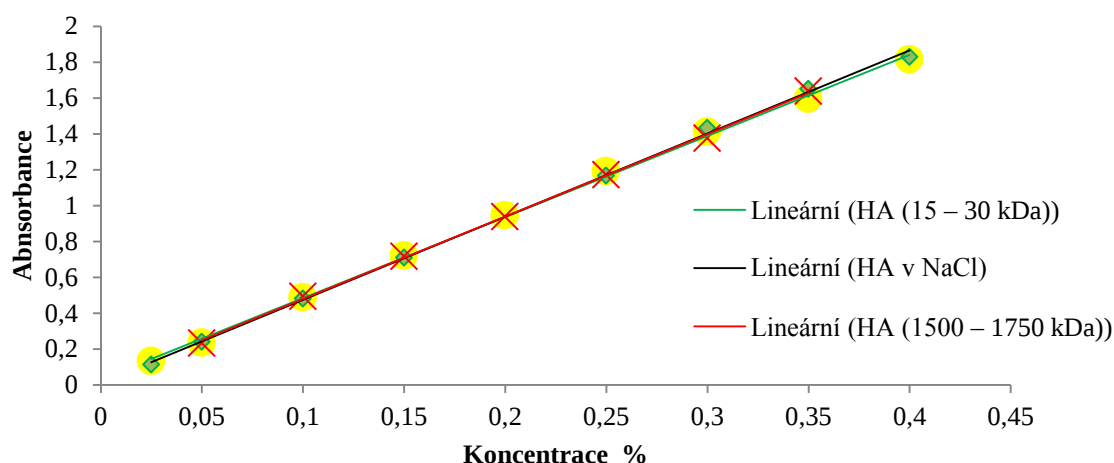


Obr. 10. Příklady grafů závislosti absorbance na vlnové délce u roztoků, vpravo 0,3% HA ve vodě a vlevo 0,05% HA ve vodě.



Obr. 11. Graf kalibrační křivky při 220 nm, roztoku hyaluronanu (1500 – 1750 kDa) ve vodě.

U ověření závislosti na iontové síle a molekulové váze nám vyšlo, že nemají vliv na samotné měření. Na **obrázku 12** jsou vyneseny křivky lineární regrese všech tří stanovení. Vzhledem k tomu, že se přímky navzájem překrývají lze usoudit, že iontová síla roztoku (0,5 M NaCl), ani molekulová hmotnost HA, nemají na toto stanovení vliv.



Obr. 12. Graf závislosti absorpance roztoků HA ve vodě při 220 nm na koncentraci, proložena lineární regresí.

4.1.1 Zhodnocení

Z této metody tedy vyplývá, že jí lze stanovit koncentrace HA, ale pouze za určitých podmínek, jelikož není nikterak specifická a při 220 nm nám nevychází žádný pík. To může být způsobeno velkým množstvím rozpuštěných plynů ve vzorku, které mohou ovlivňovat výsledné spektrum. Dále na stanovení může mít vliv i pH roztoku. Pro další stanovení by bylo vhodné roztoky před samotným měřením odstředit. Další možností by bylo roztoky před samotným měřením zfiltrovat na filtru s malou velikostí pórů, aby došlo k rozbití možných agregátů.

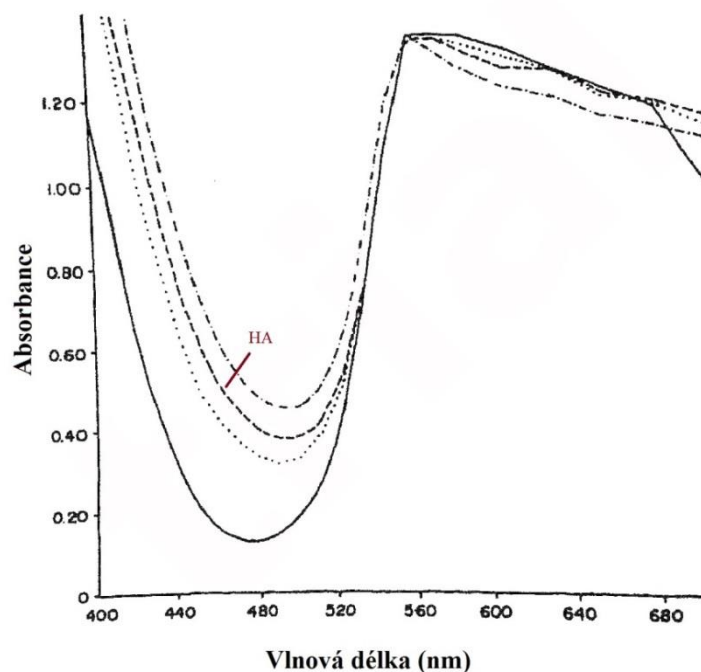
Lze tedy usuzovat, že touto metodou by se dala stanovovat koncentrace HA převážně v čistých vodných roztocích.

4.2 Alciánová modř

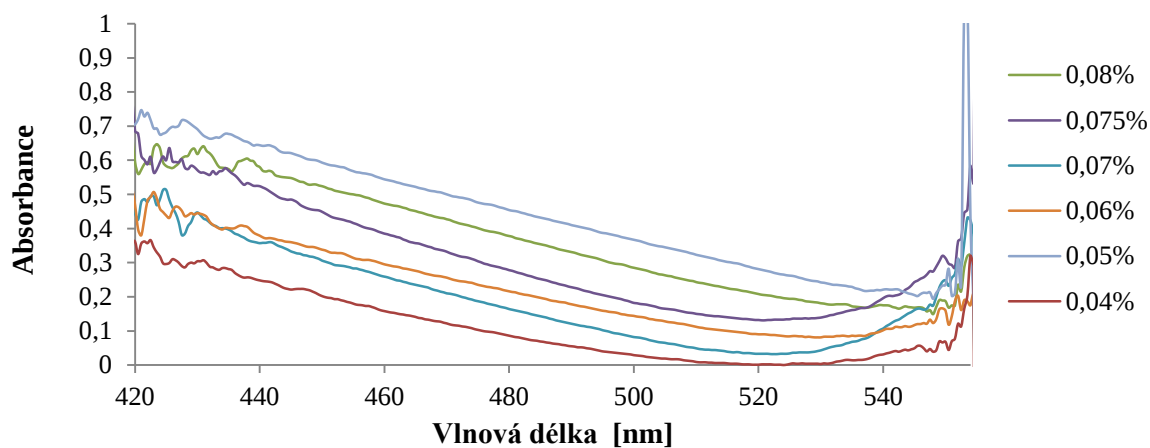
1.

V prvním experimentu bylo pracováno přesně podle Goldova postupu. Výsledky z této metody byly značně nevyhovující. V grafu tohoto experimentu jsou jisté podobnosti s výsledky Goldova experimentu (viz. **obr. 13**). Určité píky a minima v našem grafu jsou také (viz. **obr. 14**), nicméně z hodnot absorpance získaných při určitém minimu (př. 490 nm) nebylo možné vytvořit kalibrační křivku.

Z grafů je také patrné, že nejnižší možná koncentrace, která nám dává kladnou absorbanci v nejnižším bodě, je 0,04% roztok HA, což odpovídá 40 µg/ml. Tím se zdaleka neblížíme Goldově koncentračnímu rozmezí.



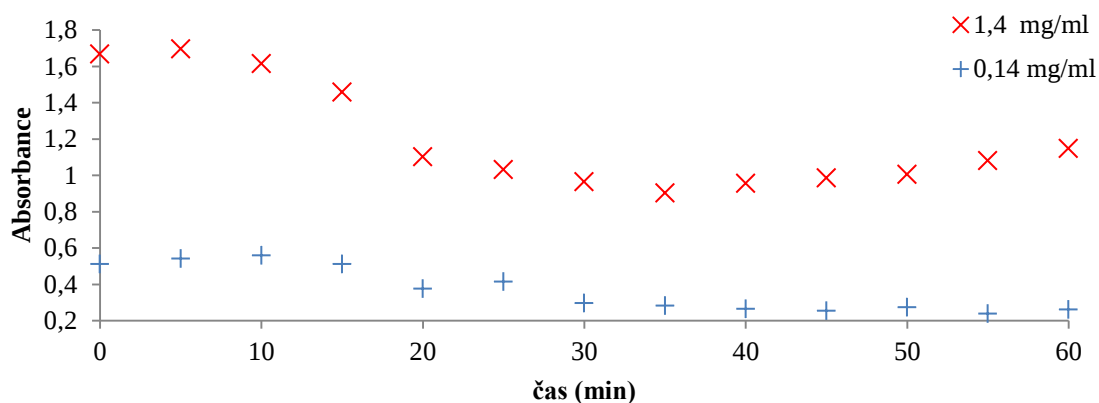
Obr. 13. Goldův graf závislosti absorpance na vlnové délce (několika glykosaminoglykanů) vyznačen pouze HA.



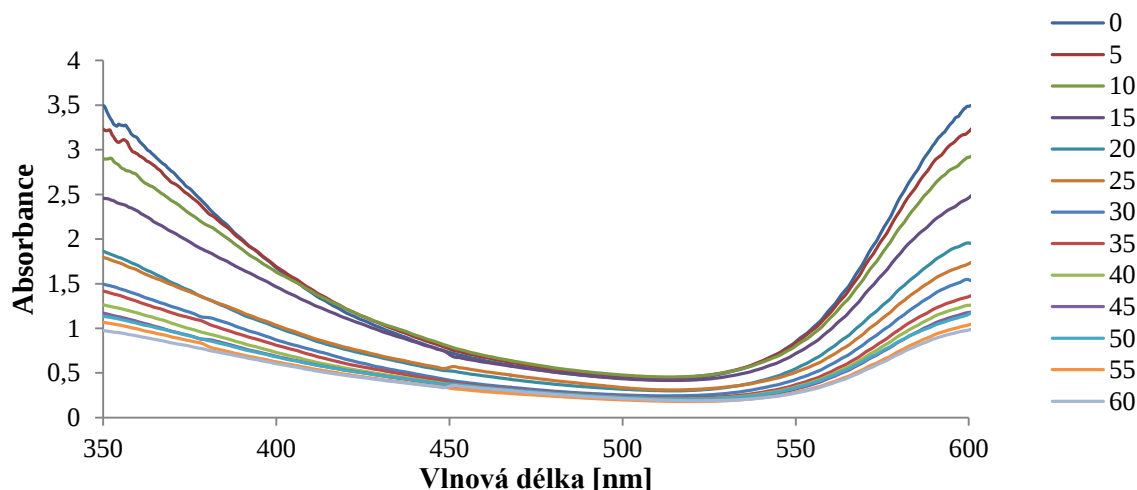
Obr. 14. Graf různých koncentrací HA v roztoku AB v 0,5M octanu sodném.

2.

U proměření roztoku alciánové modře v čase bylo zjištěno, že po patnácti minutách se její absorpance radikálně změní (viz. **obr. 15**). To je způsobeno reakcí octanu s barvivem, které vytváří určité agregáty. Vzhledem k tomu, že Gold popisuje ve své metodě barvivo jako stabilní po dobu jedné hodiny, graf na **obrázku 15** toto tvrzení nepotvrzuje. Tudíž nelze říct, že by AB v octanu byla stabilní.



Obr. 15. Graf závislosti absorbance roztoku alciánové modře v octanu sodném o různé koncentraci na čase, při vlnové délce 480 nm.

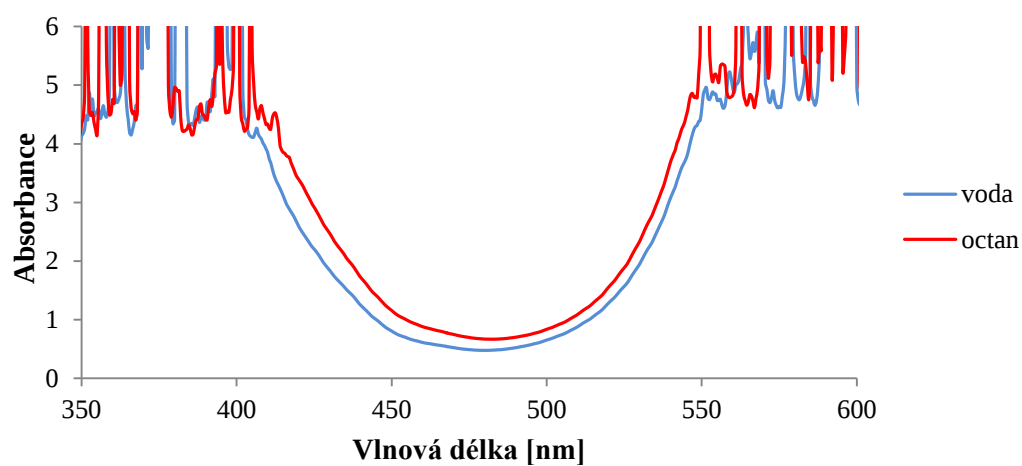


Obr. 16. Graf závislosti absorbance na vlnové délce u alciánové modře (0,14 mg/ml) v octanu sodném v různých časech (min).

3.

Při sledování rozpustnosti alciánové modři ve vodě a 0,5 M octanu, se alciánová modř dokonale rozpustila v obou. Roztoky byly modré a čiré, a proto mohla být proměřena závislost absorbance na vlnové délce v rozmezí 350 – 600 nm (viz. **obr. 17**). Z grafu vyplývá, že vyšší absorbanci má roztok s octanem sodným. Tyto roztoky byly dále vizuálně pozorovány i druhý den po rozředění (viz. **obr. 18**). Na obrázku je viditelné zakalení roztoku octanu sodného s AB, zatímco co vodný roztok je stále čirý. Třetí den byl vodný roztok AB stále čirý, kdežto roztok octanu sedimentoval (viz. **obr. 19**).

U roztoku AB s 0,1% HA ve vodě o celkové koncentraci barviva 1,4mg/ml se začala HA hned srážet s barvivem (viz. **obr. 20**), proto tento roztok nemohl být proměřen. Druhý den pozorování byla veškerá HA s AB vysrážena z roztoku ve formě malých modrých šupinek.



Obr. 17. Graf závislosti absorbance na vlnové délce rozpuštěné AB ve vodě a 0,5 M octanu sodném o celkové koncentraci 1,4mg/ml.



Obr. 18. Roztoky AB druhý den po rozpuštění, vlevo AB ve vodě, vpravo AB v roztoku octanu.



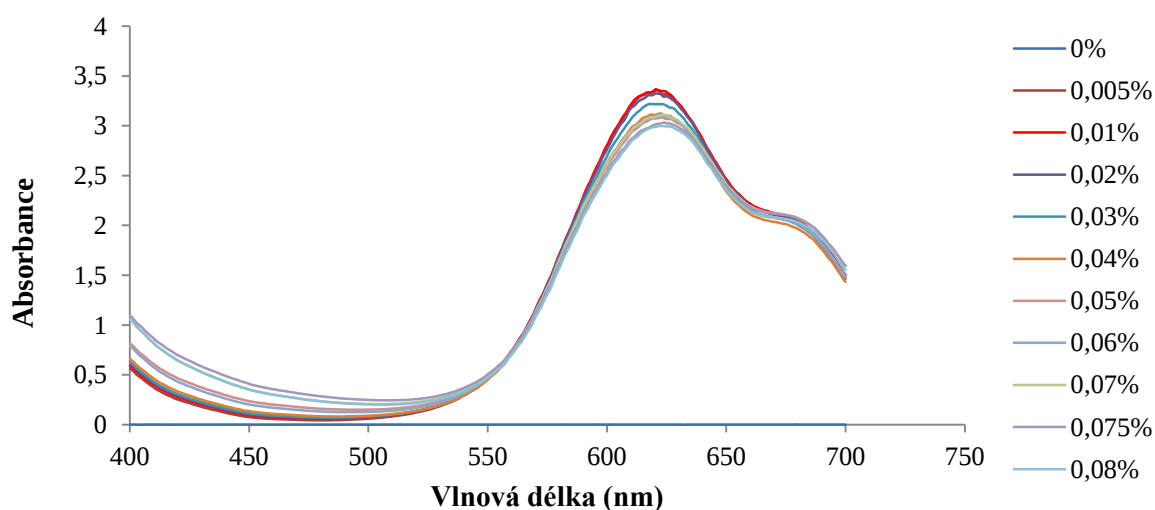
Obr. 19. Roztoky AB třetí den po rozpuštění, ve vodě je alci stále čirá (vlevo) kdežto AB v octanu sedimentovala (vlevo).



Obr. 20. AB rozmíchaná v 0,1% HA o celkové koncentraci AB 1,4mg/ml vlevo těsně po promíchání, vpravo po 24 hodinách.

4.

U proměřené koncentrační řady ve vodě, proti AB s 0,2 ml vody, vyšly všechny absorbance záporné. To byl důsledek toho, že se roztok se zvyšující koncentrací odbarvoval, a tedy byl světlejší než slepý vzorek. Proto byla celá koncentrační řada proměřena proti samotné vodě (viz. **obr. 21**). Tento graf je velmi odlišný od grafu na **obrázku 14**, kde byla AB rozpuštěna v octanu sodném. Vedle minima tu máme absorpční maximum při cca 625 nm. Z tohoto maxima však nelze sestavit kalibrační křivku. Hodnoty sice klesají s rostoucí koncentrací, ale nerovnoměrně.



Obr. 21 proměření koncentrační řady HA s AB 1,4mg/ml ve vodě proti vodě.

4.2.1 Zhodnocení

Tuto metodu, kterou popsal Gold, se nám bohužel nepodařilo zopakovat. Proto nebude prozatím na školním pracovišti používána ke stanovení koncentrace HA. Důvodů, proč tuto metodu nelze zopakovat, může být hned několik. Například ten, že tato metoda byla vymyšlena v roce 1979 a tehdy ještě nebyly tak citlivé přístroje. Je také možné, že byly použity trochu odlišné chemikálie. Dále mohlo dojít k určité chybě při stanovení, a to například nedokonalým promícháním roztoku před samotným měřením. To by znamenalo, že se nemusely vytvořit stabilní komplexy, a tím tedy došlo k ovlivnění výsledku.

Další možnou variantou tohoto stanovení by bylo centrifugování vzorku před samotným měřením.

4.3 Infračervená spektroskopie

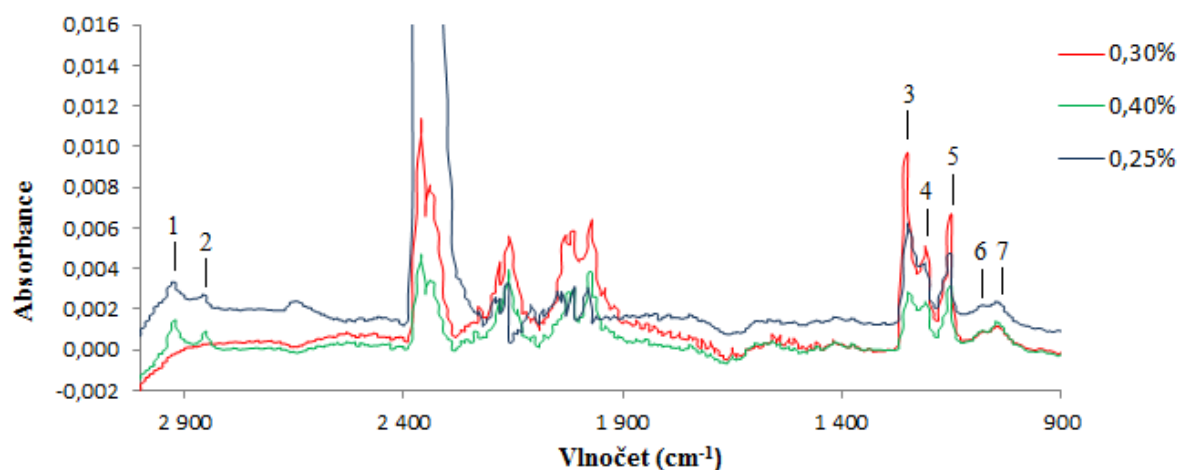
1.

Z **obrázku 22** je patrné, že se zvyšující koncentrací se nezvyšuje ani nesnižuje absorbance u jednotlivých vibrací, ale absorbance je náhodná. Proto z těchto dat nelze vytvořit kalibrační křivka.

Dále bylo zjištěno, že měřitelná koncentrace je od 0,25 % výš, jelikož píky u nižších koncentrací nebyly znatelné. Nejvyšší proměřená koncentrace byla 0,4 %, protože vzorky s vyšší koncentrací nebyly pro danou metodu připraveny. Předpoklad byl, že u roztoků s vyšší koncentrací by kalibrační křivka mohla vycházet více lineárně.

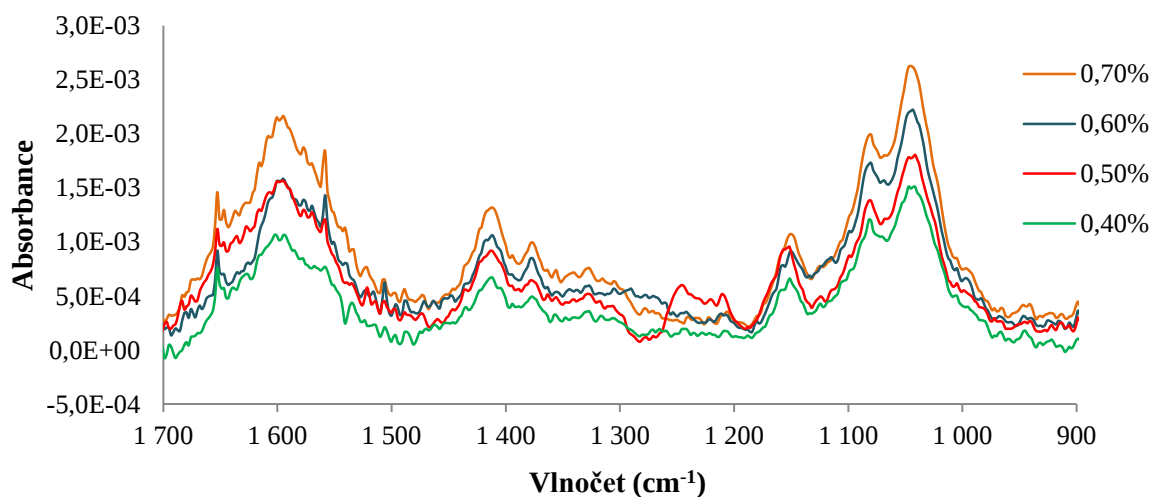
2.

U roztoků vyšších koncentrací (viz. **obr. 23**) je vidět, že píky absorbance rostou lineárně s koncentrací, tudíž se náš předpoklad u vyšších koncentrací potvrdil. Dále na **obrázku 24** můžeme vidět, jak výsledné spektrum ovlivňuje to, zda byl roztok odstředěn či nikoli. Změny u některých vibrací jsou dost znatelné, ale u námi vybraných píků, ze kterých byly vytvořeny kalibrační křivky, je změna pouze v jejich vyhlazení. Kalibrační křivka může být vytvořena jak z vibrací C-OH v sekundárních alkoholech s vibrací C-O-C v glykosidu při vlnočtu $1\,083,798\text{ cm}^{-1}$, tak z vibrací C-OH v sekundárních alkoholech při vlnočtu $1\,043,301\text{ cm}^{-1}$. Lineárnější kalibrace však byla získána pro pík odpovídající vlnočtu $1\,083,798\text{ cm}^{-1}$ (viz. **obr. 2.**).

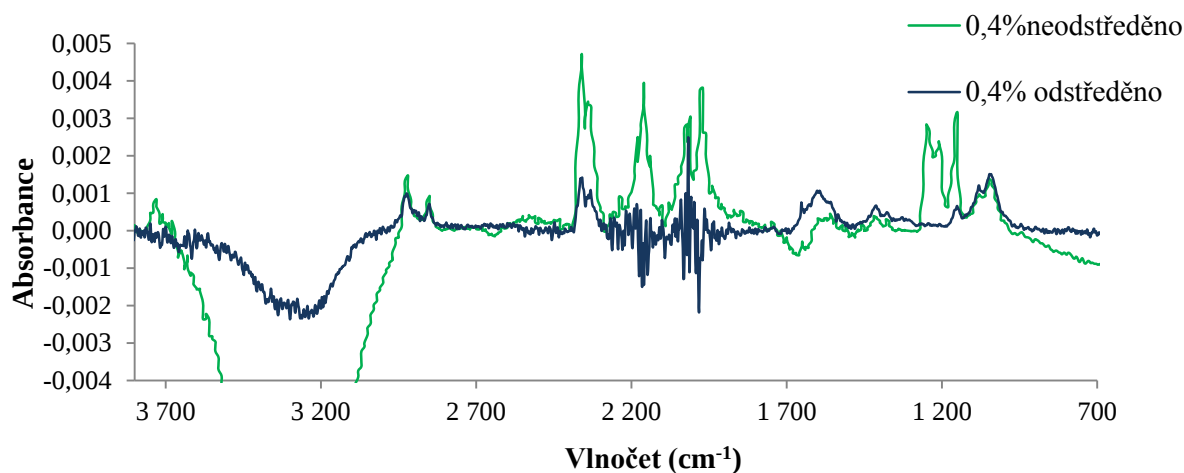


- 1 – asymetrická vibrace $-\text{CH}_2-$
- 2 – symetrická vibrace $-\text{CH}_2-$
- 3 – vibrace C-OH v primárních a sekundárních alkoholech
- 4 – vibrace COOH v karbonylech
- 5 – asymetrické vibrace C-O-C v glykosidu
- 6 – vibrace v sekundárních alkoholech + vibrace C-O-C v glykosidu
- 7 – vibrace C-OH v sekundárních alkoholech

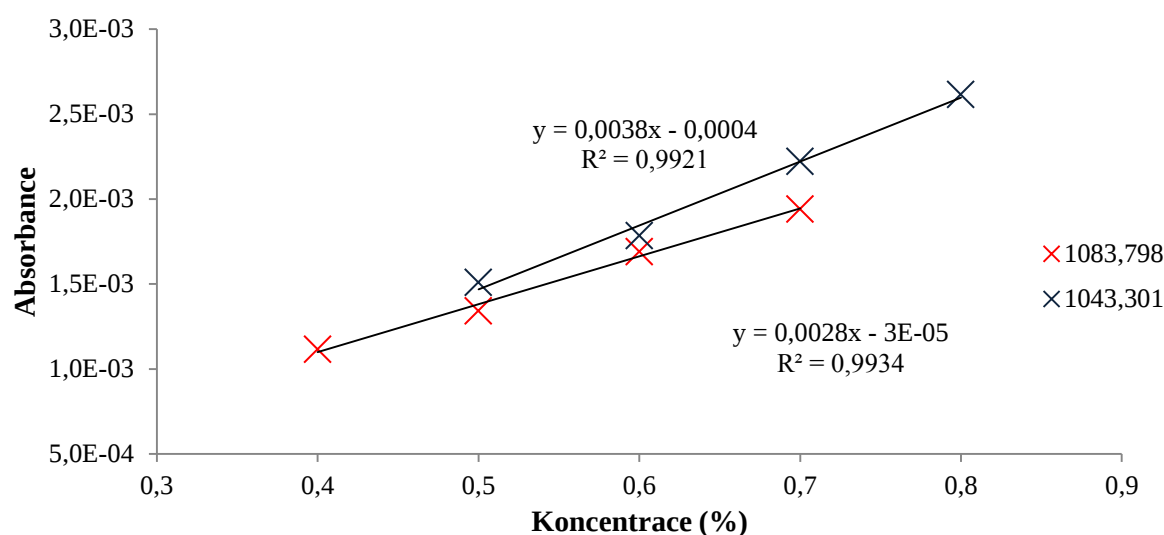
Obr. 22. Výšek z celkového spektra závislosti absorbance na vlnočtu, u nižších koncentrací vodných roztoků HA, z infračervené spektroskopie.



Obr. 23. Výšek z celkového spektra závislosti absorbance na vlnočtu, u vyšších koncentrací vodných roztoků HA, z infračervené spektroskopie.



Obr. 24. Graf závislosti absorbance na vlnočtu 0,4% odstředěného a neodstředěného roztoku HA.



Obr. 25. Graf závislosti absorbance na koncentraci roztoků HA, z infračervené spektroskopie, při dvou různých vlnótech, $1083,798\text{cm}^{-1}$ a $1043,301\text{cm}^{-1}$.

4.3.1 Zhodnocení

Z výsledků ověřování této metody plyne, že stanovení koncentrace HA lze provádět převážně u koncentrace $\geq 0,4\%$. Dále je důležité, aby byl roztok před stanovením odstředěn, abychom docílili co nejmenší koncentrace rozpuštěného kyslíku a oxidu uhličitého ve vzorku. Protože tyto plyny nám pravděpodobně zkreslují výsledné spektrum.

5 ZÁVĚR

Cílem této práce je shrnutí a popis jednotlivých analytických metod pro stanovení kvantity hyaluronanu a vyzkoušení jejich funkčnosti na školním pracovišti. U jednotlivých metod jsou popsány jejich principy a způsoby stanovení. Dále jsou popsány jejich výhody, nevýhody a u vyzkoušených metod je popsána jejich funkčnost na školním pracovišti. Analýza vzorku roztoku hyaluronanu pomocí Infračervená spektroskopie ve vodném roztoku má značné výhody. Nijak neporušuje ani nekontaminuje vzorek a spektrum potlačuje zbytkový efekt krystalizace. V našem stanovení se nám tato metoda jeví jako velice nadějná, jelikož jsme dosáhli lineární kalibrační závislosti ze zvyšující se koncentrací. Tato metoda by se tedy dala použít ke stanovení koncentrace HA, ale nevíme, jak moc ji ovlivňují jiné látky. Metoda UV-viditelné spektroskopie vyniká přesností, rychlostí, citlivostí a experimentální nenáročností. V našem experimentu jsme sice nedosáhli výsledků (píku), jak jsou popsány v literatuře, ale bylo dosaženo uspokojivých lineárních hodnot kalibrační přímky při vlnové délce 220 nm. Dále bylo zjištěno, že na toto stanovení nemá vliv molekulová hmotnost HA, ani iontová síla roztoku, takže se koncentrace HA může stanovovat i v roztoku se zbytkovými chloridy. Zatímco u metody s použitím alciánové modře vysoká koncentrace chloridových iontů ovlivňuje rozbor. U této metody bylo proměřeno hned několik parametrů, ale i tak jsme nedosáhli výsledků, jaké uvádí literatura.

Metody, které nebyly vyzkoušené, jsou zde zmíněny.

Metoda za pomoci fluorescenčního rozboru umožňuje velmi precizní detekci HA, je časově nenáročná a nevyužívá radioaktivní materiály. Stanovení pomocí Rayleighova rozptylu má velkou citlivost a je velmi jednoduché. Pro měření absorpčního spektra se využívá UV-Vis spektrofotometr. Thiobarbiturátový rozbor je enzymatický kolorimetrický test, vhodný pro měření obsahu HA ve směsi glykosaminoglykanů. Stanovení pomocí ELISA kitů se hodí především pro velmi nízké koncentrace. Tyto továrně vyráběné kity velmi usnadňují a zrychlují práci. Jejich velkou výhodou je, že se hodí pro stanovování opravdu malých objemů a jsou velmi citlivé. Nevýhodou je jejich vysoká cena. Uvedené kity mají různý rozsah detekce, citlivost, délku stanovení a podle toho se odvíjí i jejich cena.

6 POUŽITÉ INFORMAČNÍ ZDROJE

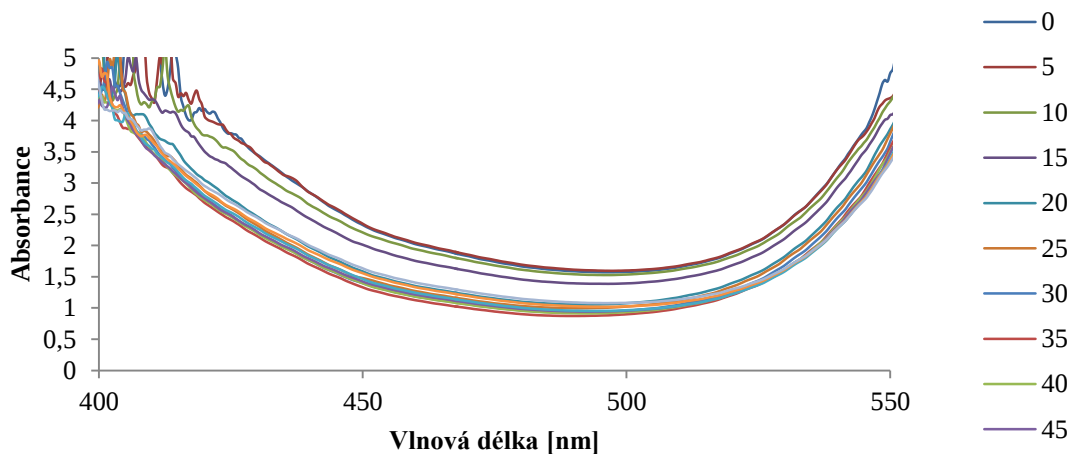
- [1] VELEBNÝ, V. *Hyaluronan – biopolymer pro tkáňové inženýrství*, VUT Brno, 2012 (elektronický text)
- [2] KUO, J.W. *Practical aspects of hyalronan based medical products*. CRC Press, NY, 2006. 217 s. ISBN 0-8493-3324-5
- [3] ORR, S.F.D., *Infra-red spectroscopic studies of some polysaccharides*, Biochim. Biophys. 1954. Acta, 14, 173-181
- [4] CAEL, J.J., ISAAC, D.H., BLACKWELL, J., KOENIG, J.L., *Polarized infrared spectra of crystalline glycosaminoglycans*, 1976. Carbohydr. Res. 50, 169-179
- [5] GILLI, R., *FTIR studies of sodium hyaluronate and its oligomers in the amorphous solid phase and in aqueous solution*, 1994. Carbohydr. Res., 263, 315-326
- [6] GOLD, E.W., A simple spectrophotometric method for estimating glycosaminoglycan concentration, 1979. *Anal. Biochem.*, 99, 183-188
- [7] SCHENK, E. Notes on Technic: Note from the Biological Stain Commission a Newly Certified Dye-Alcian Blue 8GX, 1981 (elektronický text)
- [8] IROUESSAC, Francis a Annick ROUESSAC. *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2nd ed. Hoboken, NJ: John Wiley, c2007, xxiii, 574 p. ISBN 978-047-0859-049.
- [9] DONGHUI, F., BEIBEL, W., ZHENG, X., QISHENG, G., *Determination of hyaluronan by spectroscopic methods*, 2006, Journal of Wuhan University of Technology, vol.21 no.3
- [10] NOVOTNÁ, R., ŠILHA, T., TRÁVNÍČEK, Z., *Spektrální metody*, Olomouc 2011 (elektronický text)
- [11] BILEROVA, H., *Rheology of hyaluronan solutions*, The thesis on faculty of chemistry, VUT Brno, Institute of Physical and Applied Chemistry. The head of the thesis Prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
- [12] FAGNOLA, Matteo, Marco Paolo PAGANI, Silvio MAFFIOLETTI, Silvia TAVAZZI a Antonio PAPAGNI. Hyaluronic acid in hydrophilic contact lenses: Spectroscopic investigation of the content and release in solution. *Contact Lens and Anterior Eye*. 2009, vol. 32, issue 3, s. 108-112.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.clae.2009.02.006>.
- [13] MARTINS, João R.M, Carlo C PASSEROTTI, Rui M.B MACIEL, Lucia O SAMPAIO, Carl P DIETRICH, Helena B NADER, JOHN K. WARD, Mary K. COWMAN, Raniero MENDICHI, J KUO, J KUO, Hiroshi MAEDA, Hiroshi

- FUJITA a Yoshiyuki SAKURA. Practical determination of hyaluronan by a new noncompetitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Analytical Biochemistry*. 2003, vol. 319, issue 1, s. 509-514. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-1-85573-570-5.50296>.
- [14] L UO, Hong Qun, Nian Bing LI a Shao Pu LIU. Resonance Rayleigh scattering study of interaction of hyaluronic acid with ethyl violet dye and its analytical application. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006, vol. 21, issue 7, s. 1186-1194. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2005.04.018>.
- [15] *Fluorometer* [online]. c2013 [cit. 2014-03-13]. Dostupné z: http://openwetware.org/wiki/Citizen_Science/Open_Fluorometer_Project
- [16] Hyaluronic Acid" Expedition: Hyaluronic Acid - This is what I am!. *Seikagaku corporation* [online]. 2012 [cit. 2014-04-15]. Dostupné z: <http://www.seikagaku.co.jp/english/ha/ha02.html>
- [17] PATRIK KANIA, *Infračervená spektroskopie* [online]. c2014 [cit. 2014-04-15]. Dostupné z: http://www.vscht.cz/anl/lach1/7_IC.pdf
- [18] HASCALL, V.C., LAURENT, T. C. *Hyaluronan: Structure and Physical Properties*. Glycoforum [online]. 1997, [cit. 2014-04-19]. Dostupné z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html#VIII>
- [19] MEYER K, PALMER JW: *The polysaccharide of the vitreous humor*. *J. Biol. Chem.* 107, 629-634, 1934.
- [20] SKOOG; et al., *Principles of Instrumental Analysis* (6th ed.), 2007, Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole. pp. 169–173.
- [21] SENO, N., K. ANNO, K. KONDO a S. SAITO. SENO. *Analitical Biochemistry*. (1970).37,197–201.

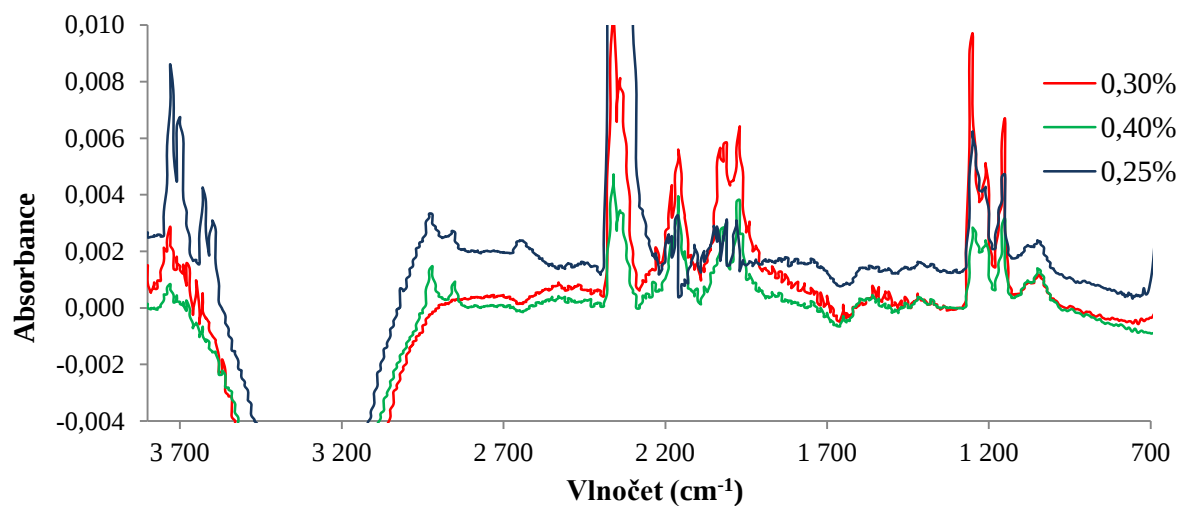
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AB	alciánová modř (alcian blue)
ATR	infračervená spektroskopie, měření na krystalu
Da	Dalton, jednotka molekulové hmotnosti, 1 Da odpovídá 1 g/mol
EV	ethyl violet
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GAG	glykosaminoglykan
HA	hyaluronan sodný – kyselina hyaluronová
HAPB	Specifické protilátky pro hyaluronan
HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
I	intenzita
IČ	infračervená spektroskopie
nm	nanometr
RRS	rezonance Rayleigha rozptylu
T	transmitance
TMB	tetramethylbenzidin
UV	ultrafialové záření
UV-VIS	spektroskopie v oblasti ultrafialové a viditelné oblasti

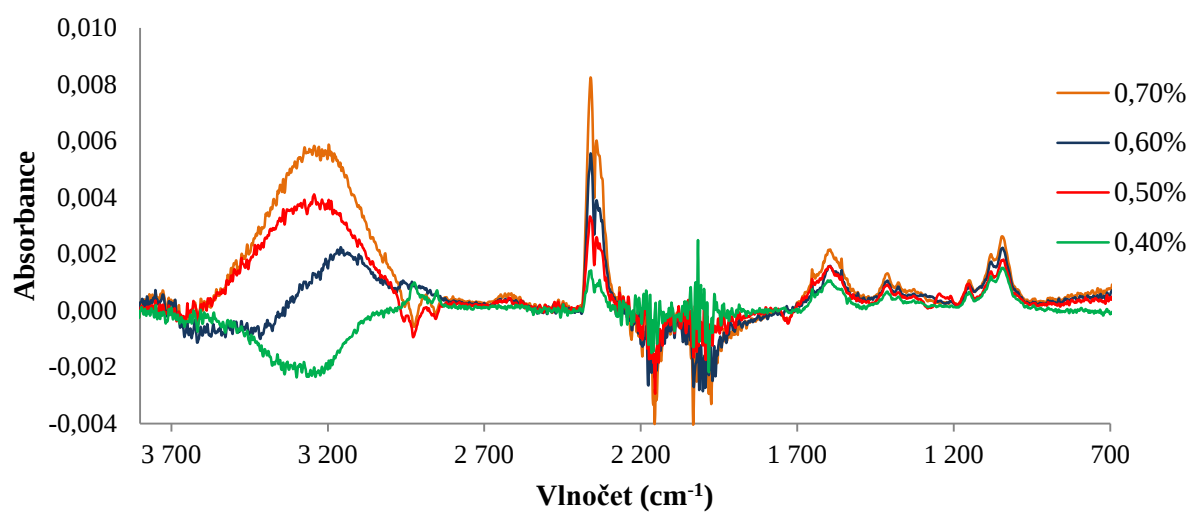
8 PŘÍLOHY



Obr. 26. Graf závislosti absorbance na vlnové délce u alciánové modře (1,4 mg/ml) v octanu sodném v různých časech (min).



Obr. 27. Celé spektrum závislosti absorbance na vlnočtu z IČ pro nižší koncentrace.



Obr. 28. Celé spektrum závislosti absorbance na vlnočtu z IČ pro vyšší koncentrace.