

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Mgr. Petr Kozlík

Moderní trendy ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii a jejich aplikace

Modern Trends in High Performance Liquid Chromatography and Their
Application

Dizertační práce

Vedoucí disertační práce: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce, ani její podstatná část, nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6. 6. 2014

Podpis

Tato dizertační práce vznikla na základě výsledků získaných v letech 2010 až 2014 během mého Ph.D. studia na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 2030, 128 43, Praha 2.

Tato dizertační práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (projekt 1M06011, 285411, MSM0021620857), Grantové agentury České republiky (projekt P505/11/1459), Grantové agentury Karlovy Univerzity v Praze (projekt 356411, 18213, SVV, UNCE) a KONTAKTAM 2010 (projekt LH11018).

Školitel: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.
Katedra analytické chemie
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Školitel-konzultant: Prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie
Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze

Tato dizertační práce je založena na následujících čtyřech vědeckých pracích, které byly publikovány v mezinárodních impaktovaných časopisech:

1. **Kozlík, P.**; Bosáková, Z.; Tesařová, E.; Coufal, P.; Čabala, R.: *Development of a solid-phase extraction with capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of estrogens in environmental water samples*; J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2127-2132.
2. **Kozlík, P.**; Šimová, V.; Kalíková, K.; Bosáková, Z.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E.: *Effect of silica gel modification with cyclofructans on properties of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases*; J. Chromatogr. A 1257 (2012) 58-65.
3. Kalíková, K.; **Kozlík, P.**; Gilar, M.; Tesařová, E.: *Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns*; J. Sep. Sci 36 (2013) 2421-2429.
4. **Kozlík, P.**; Krajíček, J.; Kalíková, K.; Tesařová, E.; Čabala, R.; Exnerová, A.; Štys, P.; Bosáková, Z.: *Hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection applied for analysis of pteridines in two Graphosoma species (Insecta: Heteroptera)*; J. Chromatogr. B 930 (2013) 82-89.

PROHLÁŠENÍ O SPOLUAUTORSTVÍ

Jako zástupce spoluautorů prohlašuji, že se Mgr. Petr Kozlík podílel na níže uvedených publikovaných pracích měrou uvedenou v závorkách:

1. **Kozlík, P.**; Bosáková, Z.; Tesařová, E.; Coufal, P.; Čabala, R.: *Development of a solid-phase extraction with capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of estrogens in environmental water samples*; J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2127-2132. (podíl 80 %)
2. **Kozlík, P.**; Šímová, V.; Kalíková, K.; Bosáková, Z.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E.: *Effect of silica gel modification with cyclofructans on properties of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases*; J. Chromatogr. A 1257 (2012) 58-65. (podíl 70 %)
3. Kalíková, K.; **Kozlík, P.**; Gilar, M.; Tesařová, E.: *Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns*; J. Sep. Sci 36 (2013) 2421-2429. (podíl 55 %)
4. **Kozlík, P.**; Krajíček, J.; Kalíková, K.; Tesařová, E.; Čabala, R.; Exnerová, A.; Štys, P.; Bosáková, Z.: *Hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection applied for analysis of pteridines in two Graphosoma species (Insecta: Heteroptera)*; J. Chromatogr. B 930 (2013) 82-89. (podíl 75 %)

.....
Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

.....
Prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

.....
RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.

Předmětová hesla

Analytická chemie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Klíčová slova

Tandemová hmotnostní spektrometrie, kapilární kapalinová chromatografie, estrogení polutanty, hydrofilní interakční kapalinová chromatografie, charakterizace separačních systémů, model lineárních vztahů volných energií, pteriny, *Graphosoma lineatum*, *Graphosoma semipunctatum*

Subject words

Analytical chemistry, high performance liquid chromatography

Key words

Tandem mass spectrometry, capillary liquid chromatography, estrogenic pollutants, hydrophilic interaction liquid chromatography, characterization of separation systems, linear free energy relationship, pterines, *Graphosoma lineatum*, *Graphosoma semipunctatum*

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych rád poděkoval své školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc. a školitelce-konzultantce Prof. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za věcné připomínky, návrhy, rady, diskuzi a podporu během celé dizertační práce. Velké díky patří RNDr. Květě Kalíkové, Ph.D. za ochotu, pomoc a celkově velmi příjemnou spolupráci během mého Ph.D. studia. Rád bych také poděkoval všem členům Katedry analytické chemie za příjemné pracovní a přátelské prostředí.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině a přítelkyni za podporu a trpělivost, kterou mi věnovali.

ABSTRAKT (CZ)

Dizertační práce se zabývá významnými trendy ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Jedním z těchto trendů je miniaturizace separačních systémů ve spojení s vysokou citlivostí detekce nebo charakterizace a aplikace nových typů stacionárních fází pro separaci polárních látek v systémech vhodných pro hmotnostní detekci, tedy stacionárních fází pro hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii (HILIC).

Pro stanovení pěti estrogenních polutantů ve vzorcích vod byla vyvinuta miniaturizovaná metoda, tedy metoda kapilární kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (cLC-MS/MS). Bylo testováno několik nových sorpčních materiálů pro extrakci tuhou fází (SPE) s ohledem na výtěžnost extrakce. Nejlepší výtěžnosti (95 – 100 %) bylo dosaženo na kolonce Discovery DSC-18Lt. Optimalizovaná SPE-cLC-MS/MS metoda umožňuje stanovení jednotlivých estrogenů ve vzorcích vody v jednotkách až desítkách ng/l.

V HILIC módu byly charakterizovány a porovnány tři stacionární fáze - silikagelová, cyklofruktanová a isopropyl cyklofruktanová. Bylo zjištěno, že na cyklofruktanových stacionárních fázích se uplatňuje vodíková interakce a disperzní síly. U silikagelové fáze jsou tyto interakce méně významné. Ukázalo se, že modifikace silikagelu cyklofruktanem a derivatizovaným cyklofruktanem vede ke zlepšení selektivity stacionární fáze pro separaci pentapeptidů a nonapeptidů.

Byly porovnány dvě amidové kolony XBridge™ Amide a TSK gel Amide-80 v HILIC módu. Pro rozpoznání jednotlivých interakcí byly využity jak jednoduché chromatografické testy, tak model lineárních vztahů volných energií i některé nové přístupy charakterizace separačních systémů. Amidové kolony vykazovaly určité rozdíly v retenci, selektivitě i separační účinnosti.

Nová HILIC metoda s tandemovou hmotnostní spektrometrií byla vyvinuta pro analýzu vybraných polárních pterinů v kutikule ploštic. Za optimalizovaných separačních podmínek, ZIC-HILIC kolona, acetonitril/5 mM octan amonný, pH = 6,80, 85/15 (v/v), průtok mobilní fáze 0,6 ml/min a teplota kolony 30 °C, byly proměřeny extrakty kutikul ploštic druhů *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* a byl určen obsah jednotlivých pterinů.

ABSTRACT (EN)

The dissertation thesis is focused on major trends in high performance liquid chromatography such as miniaturization of separation systems in hyphenation with high-sensitivity detection or characterization of new types of stationary phases for the separation of polar compounds in systems suitable for mass detection. Application of recently developed stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) is also considered.

Capillary liquid chromatography with tandem mass spectrometry (cLC-MS/MS) method was developed for determination of five estrogenic pollutants in samples of water. Several new sorption materials for solid phase extraction (SPE) were compared to obtain sufficient recovery of all the tested analytes. Discovery DSC-18Lt column provided the highest recovery (95 – 100 %). The optimized cLC-MS/MS with SPE was used for determination of estrogens in water samples in the order of units to tens of ng/L.

HILIC separation systems with silica gel, cyclofructan and isopropyl cyclofructan modified silica stationary phases were tested and compared. Ability to donate protons and dispersion interactions are the main interactions that affect retention in HILIC with cyclofructan-based columns while they are less important in separation systems with bare silica stationary phase. Improved separation performance and selectivity of cyclofructan-based stationary phases, as compared with unmodified silica gel, for separation of peptides was demonstrated in HILIC.

Two amide-based HPLC columns XBridge™ Amide column and TSK gel Amide-80 column were characterized in detail and compared in HILIC mode. HPLC separation systems with amide-based columns were characterized by simple chromatographic tests, linear free energy relationship model (LFER) and newly designed approaches. The amide-based columns showed certain differences in retention, selectivity and efficiency.

A new separation method involving HILIC with tandem mass spectrometric detection was developed for the analysis of polar pterines in the integuments of heteropteran insect species. The optimized conditions for the separation of pterines consisted of ZIC-HILIC column and mobile phase composed of acetonitrile/5 mM ammonium acetate, pH 6.80, 85/15 (v/v), flow rate 0.6 mL/min and column temperature 30 °C. The method was applied to the analysis of pterines in the integuments of *Graphosoma lineatum* and *Graphosoma semipunctatum*.

OBSAH

ABSTRAKT (CZ)	7
ABSTRACT (EN).....	8
SEZNAM ZKRATEK A POUŽITÝCH SYMBOLŮ	11
1 ÚVOD	14
2 CÍLE PRÁCE	17
3 STANOVENÍ ESTROGENNÍCH POLUTANTŮ METODOU KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE.....	18
3.1 Teoretický úvod.....	18
3.1.1 Estrogenní látky v životním prostředí	18
3.1.2 Kapilární kapalinová chromatografie	21
3.1.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie – trojitý kvadrupól	22
3.1.4 Povrchově porézní částice	25
3.2 Výsledky a diskuse – komentář k publikaci.....	27
3.2.1 Vývoj metody kapilární kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí ke stanovení estrogenních látek ve vodách - Publikace I	27
3.3 Literatura I	31
PUBLIKACE I	35
4 HYDROFILNÍ INTERAKČNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE A CHARAKTERIZACE SEPARAČNÍCH SYSTÉMŮ	42
4.1 Teoretický úvod.....	42
4.1.1 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie	42
4.1.1.1 Mechanismus separace.....	43
4.1.1.2 Stacionární fáze.....	44
4.1.1.2.1 Noderivatizované silikagelové stacionární fáze.....	44
4.1.1.2.2 Cyklofruktanové stacionární fáze	45
4.1.1.2.3 Amidové stacionární fáze	47
4.1.1.2.4 Sulfoalkylbetainové stacionární fáze.....	49
4.1.2 Charakterizace separačních systémů	50
4.1.2.1 Modely lineárních vztahů volných energií	51
4.1.3 Pteriny	54

4.1.3.1 Chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti	54
4.1.3.2 Význam a funkce	55
4.1.3.3 Metody stanovení	56
4.2 Výsledky a diskuse – komentáře k publikacím	58
4.2.1 Porovnání vlastností silikagelové stacionární fáze a cyklofruktanových stacionárních fází v HILIC - Publikace II	58
4.2.2 Porovnání dvou amidových stacionárních fází v HILIC - Publikace III	63
4.2.3 Analýza pterinů v ploštících <i>Graphosoma lineatum</i> a <i>Graphosoma semipunctatum</i> pomocí HILIC-MS/MS - Publikace IV	67
4.3 Literatura II	71
PUBLIKACE II	79
PUBLIKACE III	88
PUBLIKACE IV	103
5 ZÁVĚR.....	113
SEZNAM PUBLIKACÍ	116
SEZNAM PŘEDNÁŠEK A PLAKÁTOVÝCH SDĚLENÍ	118
PŘÍLOHA I	122
PŘÍLOHA II	127

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

BEH	bridged ethylene hybrid (hybridní sorbent)
C18	oktadecyl
CF	cyklofruktan
cLC	kapilární kapalinová chromatografie
ČOV	čistírna odpadních vod
E1	estron
E3	estriol
ED	endokrinní disruptory
EE2	17 α -ethynylestradiol
ELISA	enzymoimunoanalýza
FD	fluorescenční detektor
GC	plynová chromatografie
GL	<i>Graphosoma lineatum</i>
GS	<i>Graphosoma semipunctatum</i>
HI	index hydrofobicity
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HLB	hydrofilní-lipofilní rovnováha (hydrophilic-lipophilic balanced)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICR	iontová cyklotronová rezonance
IČ	infračervená spektroskopie
IT	iontová past
IT-TOF	iontová past-průletový analyzátor
LC	kapalinová chromatografie
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostně spektrometrickým detektorem
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostně spektrometrickým detektorem
LFER	model lineárních vztahů volných energií
LIT	lineární iontová past

LIT-ICR	lineární iontová past-iontová cyklotronová rezonance
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
M	mestranol
MIP	molekulárně vtištěný polymer
MRM	multiple reaction monitoring (záznam vybraných přechodů mezi prekurzorovými a produktovými ionty)
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
PCA	analýza hlavních komponent
q	kolizní cela
Q	kvadrupól
Q-ICR	kvadrupól-iontová cyklotronová rezonance
Q-IMS-TOF	kvadrupól-iontová mobilita-průletový analyzátor
Q-IT	kvadrupól-iontová past
QqQ	trojitý kvadrupól
QSAR	kvantitativní vztah mezi strukturou a účinností
QSRR	kvantitativní vztah mezi strukturou a retencí
Q-TOF	kvadrupól-průletový analyzátor
RIA	radioimunoanalýza
RP-HPLC	reverzní mód vysokoúčinné kapalinové chromatografie
SDB	styrendivinybenzen
SI	silanolový index
SIM	selected ion monitoring (záznam vybraného iontu)
SP	stacionární fáze
SPE	extrakce tuhou fází
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TOF	průletový analyzátor
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
βE2	17β-estradiol

$\alpha E2$	17 α -estradiol
<i>a</i>	regresní koeficient LFER rovnice
<i>A</i>	celková nebo efektivní acidita vodíkové vazby
<i>b</i>	regresní koeficient LFER rovnice
<i>B</i>	celková nebo efektivní bazicita vodíkové vazby
<i>c</i>	úsek v rovnici LFER
<i>e</i>	regresní koeficient LFER rovnice
<i>E</i>	rozsah molární refrakce
<i>k</i>	retenční faktor
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti a náboje
<i>s</i>	regresní koeficient LFER rovnice
<i>S</i>	parametr dipolarity/polarizibility
<i>v</i>	regresní koeficient LFER rovnice
<i>V</i>	McGowanův charakteristický objem solutu

1 ÚVOD

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z nejčastěji používaných separačních technik. Mezi její hlavní výhody se řadí vysoká spolehlivost, dobrá opakovatelnost a v neposlední řadě její robustnost. Za posledních několik let došlo k podstatnému vývoji v HPLC, a to převážně z hlediska její instrumentace. Trendy ve vývoji HPLC sledují hlavně tyto cíle: zvýšení účinnosti a selektivity separačního procesu, zrychlení analýz, snížení spotřeby organických rozpouštědel a rozšíření aplikačních možností HPLC na co nejširší okruhy různých látek.

Mezi nejzásadnější trendy, které se ujaly v praxi, patří spojení HPLC s hmotnostně spektrometrickými (MS) detektory. HPLC s MS detekcí není nikterak novým počinem, ale obrovský instrumentální vývoj ve sprejovacích ionizačních technikách umožnil bezproblémové zavedení techniky HPLC-MS do rutinních laboratoří. Toto spojení významně zvyšuje selektivitu a citlivost stanovení. Díky MS detektoru jsme schopni získat cenné strukturní informace o látkách vyskytujících se ve vzorku. Spojení HPLC s MS má nezastupitelné místo v analýzách komplexních vzorků, jako jsou biologické a environmentální materiály [1]. HPLC-MS (nejlépe s tandemovým hmotnostním detektorem) je ideální technikou ke stopovým kvantitativním analýzám. V současné době, kdy se velmi dbá na kvalitu prostředí ve kterém žijeme, je pozornost věnována vývoji velmi citlivých a selektivních metod, které by byly schopny stanovit polutanty životního prostředí na koncentračních hladinách, ve kterých se tyto látky reálně vyskytují. Jednou z mnoha skupin látek, které se vyskytují v životním prostředí, jsou estrogenní látky [2]. Tyto sloučeniny patří do skupiny endokrinních disruptorů, které mohou určitým způsobem ovlivňovat hormonální soustavu živočichů [2]. Citlivé a selektivní analytické metody určené ke stanovení těchto látek jsou nutností pro účinné sledování jejich výskytu a koloběhu v životním prostředí, což pomůže získat důležité informace o jejich chování a způsobu odstranění ze životního prostředí.

Dalším patrným trendem v HPLC je tlak na obecné snížení spotřeby organických rozpouštědel. Klasická HPLC používá průtoky mobilní fáze běžně v rozmezí od 0,3 do

1,5 ml/min. Snížení spotřeby organických rozpouštědel je šetrnější k životnímu prostředí, což je v souladu s tzv. „zelenou chemií“. Do popředí se dostává kapilární kapalinová chromatografie (cLC), která používá průtoky mobilní fáze řádově v desítkách mikrolitrů za minutu. Výhoda cLC není jen ve snížení organického odpadu, ale také ve zvýšení účinnosti separace, v nižší spotřebě vzorku, což má význam hlavně u biologických vzorků, a v jednodušším spojení s hmotnostními detektory z důvodu nižších průtoků mobilní fáze [3]. Neméně významným trendem je používání stacionárních fází s částicemi menšími než 2 μm , u kterých se dosahuje vysoké účinnosti separací v podstatně kratším čase než u klasické HPLC, ale zároveň dochází k razantnímu navýšení tlaku v systému. Použití těchto kolon vyžaduje speciální instrumentaci, která je schopna těmto tlakům odolat. Pro kapalinovou chromatografii s těmito kolonami se používá označení ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC). Na poli stacionárních fází pro HPLC se stále častěji používají kolony s povrchově porézními částicemi. Tyto kolony poskytují srovnatelné účinnosti jako kolony s částicemi menšími než 2 μm , ale za podstatně nižších zpětných tlaků. Výhodou je, že se může používat klasická HPLC instrumentace.

Metoda HPLC je nejčastěji používána v reverzním chromatografickém módu, kdy stacionární fáze je méně polární než mobilní fáze. V tomto uspořádání jsou méně polární látky více zadržovány a více polární látky vykazují podstatně nižší retenci. Pro mnoho velmi polárních látek, jako jsou různé metabolity (deriváty aminokyselin, sacharidů, peptidů aj.) a další biologicky aktivní látky, je reverzní chromatografický systém často nevhodný. Některé analyty vykazují velmi nízkou retenci a separační systém má velmi špatnou selektivitu. Pro separaci takovýchto látek se úspěšně začala používat hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC), která vykazuje dostatečnou retenci a selektivitu pro polární látky a dobrou kompatibilitu s hmotnostním detektorem (použití těkavých pufrů a mobilních fází s vysokým obsahem organické složky) [4]. Nejpoužívanějšími stacionárními fázemi v HILIC jsou klasické silikagelové, amidové, diolové, aminové a zwitteriontové stacionární fáze [4]. Vývoj nových stacionárních fází s rozdílnou selektivitou pro použití v HILIC však stále pokračuje. Potenciálními adepty pro širší použití v HILIC se jeví stacionární fáze na bázi cyklofruktanů. Charakterizace kolon pro HILIC (nových i již běžně používaných) z

hlediska interakčních mechanismů, může pomoci jak při vývoji chromatografických metod, tak i při vývoji nových stacionárních fází.

Příkladem využití nových trendů kapalinové chromatografie, a to hydrofilní interakční kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií, pro konkrétní analýzu je v této práci stanovení polárních pterinů v plošticích *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum*.

2 CÍLE PRÁCE

Dizertační práci lze rozdělit do dvou částí, kdy společným jmenovatelem je studium a uplatnění moderních vývojových trendů v kapalinové chromatografii.

Cílem první části práce byl vývoj analytické metody využívající kapilární kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostní detekcí ke stanovení vybraných estrogenních polutantů po extrakci tuhými fázemi.

Druhá část dizertační práce byla zaměřena na hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii. Dílčí cíle druhé části lze rozdělit do několika bodů:

- Charakterizace a porovnání tří stacionárních fází – silikagelové, silikagelové s vázaným nativním cyklofruktanem a silikagelové s vázaným isopropyl cyklofruktanem pro hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii. Určení molekulárních interakcí zodpovědných za retenci a selektivitu v daném separačním systému a aplikace pro separaci směsi penta- a nonapeptidů.
- Prokázání odlišnosti dvou principiálně stejných amidových stacionárních fází od různých výrobců v hydrofilní interakční kapalinové chromatografii z hlediska retenčního mechanismu použitím řady různých chromatografických testů.
- Vývoj analytické metody využívající hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii v kombinaci s tandemovou hmotnostní detekcí ke stanovení vybraných pterinů v kutikule ploštic různých forem *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum*.

3 STANOVENÍ ESTROGENNÍCH POLUTANTŮ METODOU KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE

3.1 Teoretický úvod

3.1.1 Estrogenní látky v životním prostředí

V posledních několika desetiletích dochází ke kontinuálnímu zvyšování znečištění životního prostředí polutanty, které kontaminují důležité přírodní zdroje a mají potenciálně škodlivý vliv na živé organismy [2, 5]. Velmi podstatnou a nebezpečnou skupinou těchto látek, vyskytujících se v životním prostředí, jsou endokrinní disruptory (ED) [6-8]. Jedná se o látky, které jsou schopny napodobovat činnost endogenních hormonů nebo s ní interferovat, mohou narušovat biosyntézu nebo metabolismus steroidů nebo pozměňovat jejich receptorová místa [6]. Mezi ED se počítá řada látek. Důležitými představiteli ED jsou estrogeny, jako 17α -estradiol (α E2), 17β -estradiol (β E2), estriol (E3), estron (E1) a syntetická kontraceptiva mestranol (M) a 17α -ethynylestradiol (EE2). Skupina ED zahrnuje také látky nesteroidní povahy, jako je 4-nonylfenol, bisfenol, diethylstilbestrol, řadu pesticidů a jiných látek [9].

Estrogeny jsou ženské pohlavní hormony, které zastávají řadu rozmanitých funkcí. Mezi hlavní funkce patří zodpovědnost za vývoj ženských sekundárních pohlavních znaků, regulace reprodukčního cyklu a růst tkání. Nepřirozený výskyt estrogenních látek v životním prostředí negativně ovlivňuje organismy. Byly zaznamenány případy klesající plodnosti, feminizace a hermafroditismu samečků vodních živočichů. Tyto jevy se vyskytovaly převážně v prostředí odpadních vod a jejich intenzita byla závislá na koncentraci přítomných estrogenů [7, 10-12]. Existuje podezření, že estrogenní látky se mohou podílet na vzniku rakoviny prsu, vaječníků a prostaty [13]. U mužů mohou mít také podíl na snížení pohyblivosti a kvality spermií [14].

Hlavním zdrojem estrogenních látek v životním prostředí je lidská populace a v menší míře také hospodářská zvířata. Vyloučené množství estrogenních látek lidským organismem závisí na mnoha faktorech, jako je věk, pohlaví, zdravotní stav, používání

různých léčiv zejména kontraceptiv aj. Estrogeny jsou v organismu biotransformovány jaterními enzymy za vzniku glukosiduronátových a sulfátových konjugátů, které již nevykazují estrogenní aktivitu [15, 16]. Tyto konjugáty jsou z organismu vylučovány převážně močí a v menší míře i výkaly. V této formě jsou estrogeny odváděny do čistíren odpadních vod (ČOV). Již při transportu do ČOV, a následně i v ČOV, dochází k hydrolýze konjugátů a uvolnění samotných hormonů v aktivní formě. ČOV využívají různé technologické postupy sloužící k zachycení a následnému odstranění polutantů z odpadních vod. Tyto postupy však nejsou pro estrogenní látky dostatečně účinné, a proto mohou být estrogenní látky nalezeny v říčních a jezerních vodách [5-7, 9, 17]. Existuje celá řada zahraničních studií zabývajících se výskytem estrogenních polutantů ve vodách [2, 11, 18-20]. V České republice se tomuto tématu také věnuje několik vědeckých skupin [21-27].

Jelikož se estrogenní látky vyskytují ve vodných vzorcích životního prostředí ve velmi nízkých koncentracích (desetiny až stovky ng/l) je pro jejich detekci, popřípadě stanovení nutné používat vysoce citlivé a selektivní analytické metody. Během posledních několika let vyšla řada odborných publikací, které přehledným způsobem podávají ucelenou informaci ohledně analytických přístupů zaměřených na stanovení estrogenních látek v životním prostředí [2, 10, 19, 28-30].

Nedílnou součástí analytických metod vhodných ke stanovení estrogenních látek v životním prostředí je předúprava vzorku. Předúprava vzorku hraje zásadní roli v celkové citlivosti analytické metody, odstranění interferujících látek a potlačení matričních efektů. Vzhledem k tomu, že vzorky určené pro analýzu obsahují obvykle velké množství organického materiálu a suspendovaných částic, je prvním krokem přípravy vzorku pro analýzu filtrace [27]. Běžně se používají filtry jako je skelná vata, celulosa a nylon o velikosti pórů mezi 0,22 a 1,20 μm [29, 31]. Poté následuje určitý typ extrakce. V analýze estrogenních polutantů se nejvíce uplatnila extrakce tuhou fází, vzhledem ke své experimentální jednoduchosti, možnosti automatizace, nízké spotřebě nevodných rozpouštědel a v neposlední řadě komerční dostupnosti sorbentů s různou selektivitou. Při extrakci tuhou fází se musí, kromě volby typu SPE sorbentu, optimalizovat řada kroků, mezi které patří kondicionace kolonky, složení a objem elučního činidla a množství nanášeného vzorku. Při analýze estrogenů v životním prostředí byl nejčastěji používaným sorbentem silikagel s navázaným oktadecylovým

řetězcem, styrendivinylnbenzen (SDB) a hydrofilně-lipofilní sorbent s komerčním názvem Oasis HLB sorbent (hydrophilic-lipophilic balanced) [27, 29, 32-34]. U zmiňovaných sorbentů byla výtěžnost extrakce vysoká (65 – 98 %) s dobrou opakovatelností. Jako velmi selektivní sorbenty byly také použity molekulárně vtištěné polymery (MIP) [29]. MIP jsou vysoce zesíťované syntetické polymery, které jsou charakterizovány specifickým rozpoznáním daného analytu. Objem nanášeného vzorku se pohyboval od několika mililitrů až po 4 litry v závislosti na typu matrice, která může ovlivňovat výtěžnost a selektivitu extrakce [27, 35]. Jako eluční činidla byla použita methanol, acetonitril, aceton a ethylacetát, popřípadě jejich kombinace (v závislosti na dané aplikaci) [31-34].

Nejpoužívanější metodou ke stanovení estrogenních polutantů je kapalinová chromatografie (LC), a to převážně ve spojení s hmotnostním detektorem nebo méně často s fluorescenčním detektorem (FD). Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním detektorem (LC-MS) nebo s tandemovým hmotnostním detektorem (LC-MS/MS) poskytuje dostatečnou citlivost a selektivitu. Nevýhodou jsou matriční efekty, které mohou způsobit potlačení nebo naopak podporu signálu sledovaných látek v ionizačním zdroji [30]. Jako stacionární fáze se uplatnily hlavně oktadecylové (C18), fenylové, fenyl-hexylové stacionární fáze v kombinaci s mobilní fází skládající se z acetonitrilu nebo methanolu a roztoků kyseliny octové, mravenčí nebo amoniaku v různých objemových poměrech. Limity detekce (LOD) se pohybovaly v závislosti na extrakčním kroku mezi 0,1 a 100 ng/l [2, 15, 16, 23, 25, 26, 27, 34-37].

Druhou nejpoužívanější metodou pro stanovení estrogenních polutantů je plynová chromatografie (GC) ve spojení s MS nebo MS/MS. I když plynová chromatografie vyniká značnou separační účinností, nízkými provozními náklady a minimální spotřebou organických rozpouštědel (pouze na vzorek), zařadila se v používání až za kapalinovou chromatografii, a to z důvodu nutnosti derivatizace estrogenních látek pro zvýšení jejich těkavosti. LOD pro estrogenní polutanty se pohybovaly v závislosti na extrakčním kroku mezi 0,5 až 100 ng/l [27, 32, 33, 38-41].

Dalším způsobem, jak stanovit estrogenní látky, jsou imunochemické metody. Používá se hlavně ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) a RIA (radioimmunoassay). Tyto metody se vyznačují vysokou citlivostí, jednoduchou použitelností, relativně krátkou dobou potřebnou k analýze a v neposlední řadě i

cenovou dostupností. Vzhledem k vysokým interferencím z matrice a nižší estrogení specifitě se však používají spíše ke screeningovým testům [29, 42].

3.1.2 Kapilární kapalinová chromatografie

Kapilární kapalinová chromatografie je kapalinová chromatografie využívající separační kolony o malých průměrech. cLC používá kolony o vnitřním průměru 0,15 až 0,5 mm a operuje s průtoky desítek mikrolitrů eluentu za minutu. Pro ilustraci je v tabulce 3.1 uveden přehled nomenklatury kapalinových chromatografických metod uspořádaných podle zmenšujícího se vnitřního průměru kolon [43].

Tabulka 3.1 Nomenklatura kapalinových chromatografických metod uspořádaných podle zmenšujícího se vnitřního průměru kolon [43]

Název kapalinové chromatografické metody	Vnitřní průměr kolony
vysokoúčinná kapalinová chromatografie	2,0 – 4,6 mm
mikrokapalinová chromatografie	0,5 – 1,5 mm
kapilární kapalinová chromatografie	0,1 – 0,5 mm
nanokapalinová chromatografie	0,01 – 0,1 mm

Počátky mikrokapalinové chromatografie jsou datovány ke konci 60. let minulého století, kdy Horváthova skupina použila pro separaci ribonukleotidů naplněnou ocelovou kapiláru o vnitřním průměru 1 mm [44]. Následně se stala kapilární kapalinová chromatografie experimentální náplní mnoha významných vědeckých skupin, jako např. Scotta [45], Ishiiho [46-48], Novotného [49, 50] a jiných. Na základě těchto prací byla zahájena miniaturizace ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii.

Miniaturizace v kapalinové chromatografii přináší řadu výhod, ale i některé nevýhody. Mezi výhody se řadí především nižší spotřeba stacionární a mobilní fáze, což umožňuje použití velmi drahých sorbentů a aditiv mobilní fáze. Nízké průtoky mobilní fáze jsou ve shodě s trendem “zelené chemie“, který se snaží eliminovat množství organických odpadů, a tím snížit zatížení životního prostředí. Nižší průtok mobilní fáze

kolonou vede k menšímu naředění analytů eluentem během jejich transportu kolonou k detektoru, což může vést k vyšší citlivosti u některých detektorů. Díky nízké průtokové rychlosti mobilní fáze je cLC vhodná pro spojení s hmotnostním detektorem používajícím sprejovací iontové zdroje. Nevýhody cLC jsou především na straně instrumentace. Menší množství dávkovaného vzorku a nižší průtoky eluentu kladou velké nároky na minimalizaci mimokolonových příspěvků (mrtvých objemů) kapilárního kapalinového systému, chceme-li dokonale využít vyšší separační účinnost, jež kapilární kolony nabízejí. Nejčastějším technickým problémem cLC může být příprava účinné kapilární separační kolony. Přípravě kolon vhodných pro cLC se věnuje řada publikací [3, 51-54]. V současné době je komerčně dostupné velké množství kapilárních kolon se širokou nabídkou různých sorbentů.

I přes své problémy, je cLC hojně využívána v řešení řady analytických problémů. V posledních několika letech nabývá na významu spojení cLC s hmotnostně spektrometrickou detekcí, kde se využívá vysoká separační účinnost společně s citlivou a selektivní detekcí [23, 55, 56].

3.1.3 Tandemová hmotnostní spektrometrie – trojitý kvadrupól

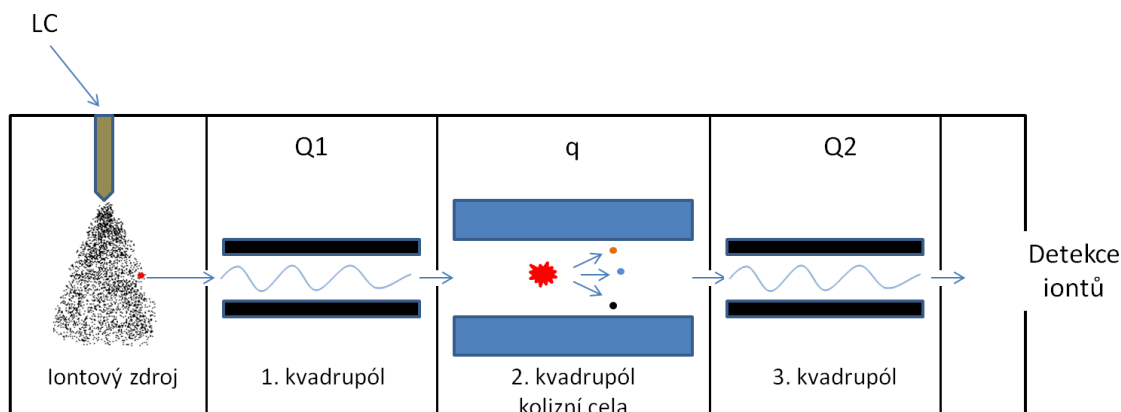
Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, jejíž princip je založen na separaci iontů v elektromagnetickém poli podle jejich poměru hmotnosti ku náboji (m/z). Posledních 20 let bylo ve znamení velkého instrumentálního pokroku v oblasti hmotnostní spektrometrie. Spojení hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií se díky sprejovacím ionizačním technikám stalo běžně používanou metodou téměř ve všech analytických laboratořích s různou oblastí zájmu, např. v potravinářském a farmaceutickém průmyslu, toxikologii, ekologii a v mnoha dalších odvětvích [57-59].

V současné době je komerční trh s MS detektory a LC-MS velmi dynamický a jednotliví výrobci hmotnostních spektrometrů investují velké finanční prostředky do vývoje nových technologií. Tento přístup má kladný efekt na četnost nových produktů a různých technických řešení [1, 57, 58]. Klíčovým prvkem každého MS detektoru je hmotnostní analyzátor. Běžný uživatel může vybírat z řady komerčně dostupných MS

detektorů podle jejich vhodnosti pro danou aplikaci. Mezi základní MS detektory se řadí MS detektor s kvadrupólovým analyzátelem (Q), s iontovou pastí (IT) a s průletovým analyzátelem (TOF). Dále existují MS detektory s magnetickým sektorovým analyzátelem, 3D a lineární iontovou pastí (LIT), orbitrapem a iontovou cyklotronovou rezonancí (ICR). Jednotlivé hmotnostní analyzátory se liší různou rozlišovací schopností, správností určení m/z , hmotnostním rozsahem, dynamickým koncentračním rozsahem a rychlostí záznamu spekter. Parametry jednotlivých komerčních MS detektorů jsou shrnuty v přehledném článku Holčapka [1].

Výhody jednotlivých hmotnostních analyzátorů jsou s úspěchem využity v hybridních hmotnostních spektrometrech, kde jsou zapojeny dva hmotnostní analyzátory do série a navzájem jsou odděleny kolizní celou. To umožňuje provádět fragmentaci jednotlivých iontů a tím získat cenné strukturní informace. Na trhu jsou k dostání tyto hybridní hmotnostní spektrometry: trojitý kvadrupól (QqQ), kvadrupól-iontová past (Q-IT), kvadrupól-průletový analyzátor (Q-TOF), kvadrupól-orbitrap, kvadrupól-iontová cyklotronová rezonance (Q-ICR), kvadrupól-iontová mobilita-průletový analyzátor (Q-IMS-TOF), iontová past-průletový analyzátor (IT-TOF), lineární iontová past-orbitrap a lineární iontová past-iontová cyklotronová rezonance (LIT-ICR) [1, 57, 58, 60].

Jedny z nejpoužívanějších hybridních hmotnostních spektrometrů jsou trojité kvadrupóly. QqQ byl vyvinut již v roce 1978 na Michiganské státní univerzitě Yostem a Enkem [60]. QqQ se skládá ze dvou kvadrupólů (Q1 a Q2), mezi kterými je umístěna kolizní cela (q). Q1 a Q2 slouží jako filtry, které díky vhodně zvolenému napětí propouští pouze ionty o definovaném poměru m/z . Kolizní cela je řešena nejčastěji jako oktapól nebo hexapól a je naplněna kolizním plynem (N_2 , He, Ar nebo Xe). Kolizní plyn slouží k fragmentaci prekurzorového iontu, tj. k tzv. kolizně indukované disociaci. QqQ obecně dosahuje vysoké citlivosti, má široký dynamický koncentrační rozsah (běžně okolo pěti řádů) a vysokou skenovací rychlost, což činí QqQ vhodným nástrojem ke kvantitativním analýzám. Mezi nevýhody QqQ se počítá nižší rozlišovací schopnost, nižší správnost určení poměru m/z a nižší hmotnostní rozsah [57]. Schéma QqQ je uvedeno na obrázku 3.1.



Obrázek 3.1 Schéma trojitého kvadrupólu.

QqQ je schopen pracovat v několika módech. Každý z módů pracuje na trochu jiném principu a je schopen podat různé informace. Základním typem je MS sken, který pracuje v režimu jednoduchého kvadrupólu, kdy na Q2 dochází k filtraci iontů, Q1 a q slouží jako iontová optika. Pomocí tohoto módu získáme celkové hmotnostní spektrum dané látky. Druhým typem módu je monitorování vybraného iontu (SIM – selected ion monitoring). Zde je aktivní Q1, který je nastaven na požadovanou hodnotu m/z , ostatní kvadrupóly slouží opět jako iontová optika. Tímto módem získáme záznam intenzity dané m/z ve vzorku. Třetím typem módu je sken produktových iontů. Tento mód pracuje tak, že Q1 projde definovaná m/z , ta je fragmentována v kolizní cele, vzniklé fragmenty jsou skenovány Q2 a následně dopadají na detektor. Tímto postupem získáme hmotnostní spektrum fragmentů vzniklých štěpením definované m/z . Dalším módem je multiple reaction monitoring mód (MRM), kdy pracuje systém v režimu trojitého kvadrupólu. Prvním kvadrupólem projde definovaná m/z (prekurzorový iont), ta je rozštěpena v kolizní cele, třetím kvadrupólem projde definovaná m/z (produktový iont) a ta je detekována. Tímto skenem získáme vysokou selektivitu, založenou na přechodu mezi prekurzorovým a produktovým iontem sledované látky. Dalším módem je sken prekurzorových iontů. V tomto módu je Q2 nastaven na fixní hodnotu m/z , Q1 propouští ionty v určitém rozsahu m/z , které jsou fragmentovány v kolizní cele. Tímto módem zjistíme, z jakého iontu vzniká námi zvolený produktový iont. Posledním běžným módem používaným u QqQ je sken neutrálních ztrát. Při tomto módu Q1

propouští ionty v určitém rozsahu m/z , které jsou fragmentovány v kolizní cele a Q2 skenuje hmotnostní spektrum vzniklých fragmentů a zaznamenává neutrální posun (např. ztráta vody).

3.1.4 Povrchově porézní částice

V souvislosti se zvyšujícími se nároky na počet analýz za časovou jednotku dochází k neustálému vývoji analytických technik. Tento trend je patrný i v kapalinové chromatografii. V praxi se aplikují celkem dva přístupy jak dosáhnout „rychlé chromatografie“. Prvním z nich je použití separačních kolon s částicemi menšími než 2 μm . Díky těmto kolonám se dosahuje vysoké účinnosti separací, ale zároveň dochází k razantnímu navýšení tlaku v systému (až 100 MPa). Použití těchto kolon vyžaduje speciální instrumentaci, která je schopna těmto tlakům odolat. Pro kapalinovou chromatografii s těmito kolonami se používá označení ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC) [61, 62]. Druhým přístupem „rychlé chromatografie“ je použití kolon monolitických nebo kolon s povrchově porézními částicemi. U těchto kolon se může používat klasická HPLC instrumentace, neboť tlak v systému většinou nepřesahuje 40 MPa [62, 63].

Povrchově porézní částice, v angličtině označovány jako „fused-core silica“ nebo „core-shell particles“, byly představeny Kirklandem a následně komercializovány pod názvem HALO částice [65]. Tyto částice jsou tvořeny neporézním silikovým jádrem o velikosti 1,7 μm , které bylo obaleno 0,5 μm silnou vrstvou slinutých silikových nanočástic. Konečná velikost částice stacionární fáze byla tedy 2,7 μm [65]. Stejně rozměry, nebo velmi podobné lze najít i u dalších kolon, např. Ascentis (Sigma-Aldrich), Poroshell (Agilent) nebo Kinetex (Phenomenex). V současné době jsou na trhu k dostání také kolony s povrchově porézními částicemi o velikosti 5 μm (Ascentis a Kinetex), 1,7 μm (Kinetex), 1,6 μm (Cortecs od firmy Waters) a 1,3 μm (Kinetex). U zmiňovaných kolon lze vybírat z řady různých typů navázaných skupin (C18, C8, C3, fenyl-hexyl, PFP, amid aj.).

Výhodou povrchově porézních částic je možnost dosáhnout srovnatelné účinnosti separace na klasickém HPLC instrumentu jako při použití UHPLC s částicemi menšími než 2 μm . Na rozdíl od porézních částic stejného průměru je difúze analytů u povrchově

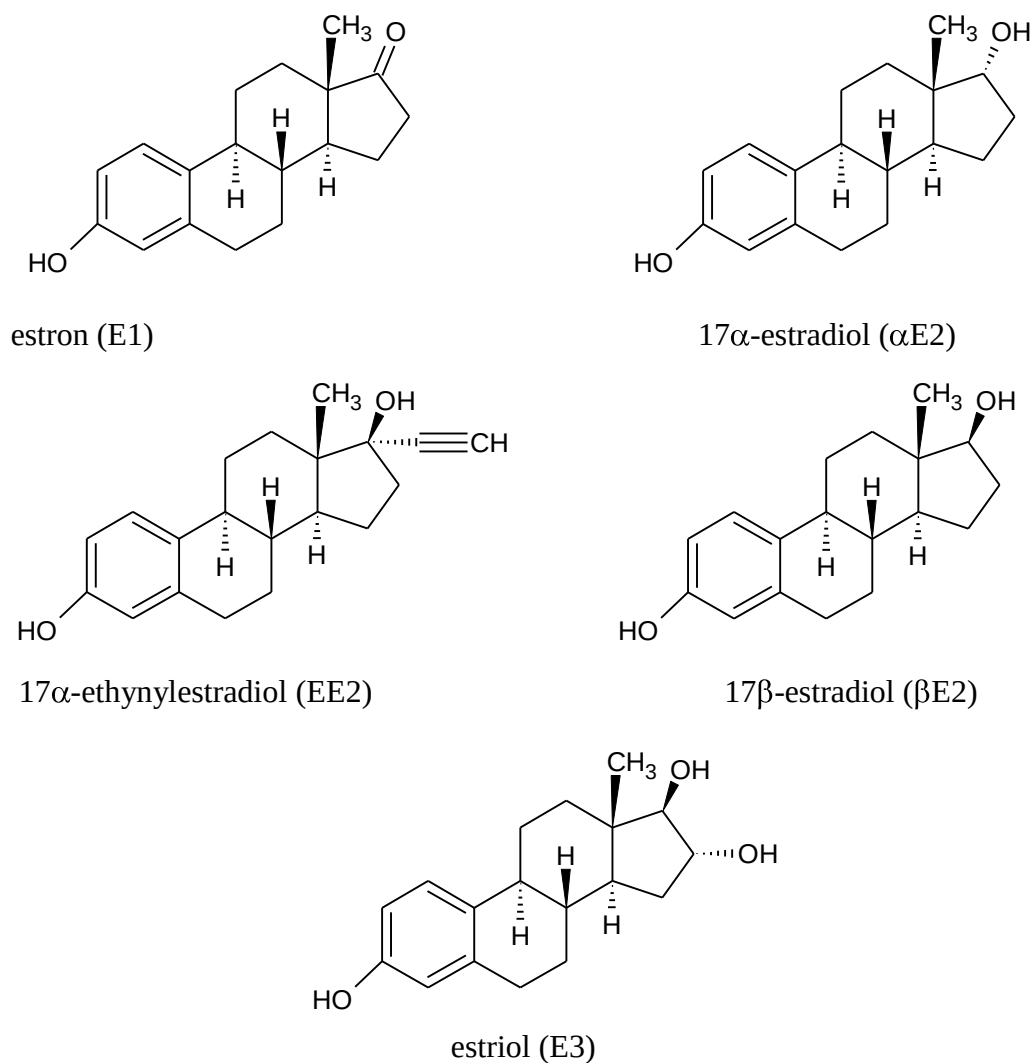
porézních částic mnohem menší. To znamená, že rozmývání chromatografických zón je omezené [63]. Kolony naplněné povrchově porézními částicemi mají užší distribuci velikosti částic a vyšší hustotu naplnění kolony v porovnání s klasickými plně porézními částicemi. To vše se podílí na vysoké separační účinnosti kolon s povrchově porézními částicemi [62, 64, 66, 67].

V rámci studia chromatografického chování sledovaných estrogeních látek (viz obr. 3.2) byly porovnány klasická HPLC separační kolona SunFire (150 mm x 4,6 mm, 5 μ m; Waters, MA, USA) a kapilární kolona Zorbax SB C18 (150 mm x 0,5 mm, 5 μ m; Agilent Technologies, Waldbroon, Německo) s povrchově porézní kolonou Ascentis Express C8 fused core (150 mm x 4,6 mm, 2,7 μ m; Supelco, Bellefonte, USA). Výsledky byly shrnuty a publikovány na konferenci 7th ISC Modern Analytical Chemistry (Praha, 2011). Rozšířený abstrakt shrnující výsledky srovnání výše zmíněných kolon z této konference je uveden v příloze I.

3.2 Výsledky a diskuse – komentář k publikaci

3.2.1 Vývoj metody kapilární kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí ke stanovení estrogenních látek ve vodách – Publikace I

Všechna měření byla prováděna na kapilárním kapalinovém chromatografu Agilent 1200 spojeném s hmotnostním tandemovým trojitým kvadrupólem 6460 (Agilent Technologies, Waldbroon, Německo). Struktura estrogenních polutantů studovaných v této práci je znázorněna na obrázku 3.2.



Obrázek 3.2 Struktura studovaných estrogenů.

Měření byla prováděna v MRM módu. Na základě polaritý studovaných estrogenů byl pro separaci zvolen reverzní chromatografický mód. Separace probíhala na komerčně dostupné kapilární koloně Zorbax SB C18 (150 mm x 0,5 mm, 5 µm; Agilent Technologies, Waldbroon, Německo). Při použití izokratické eluce došlo k separaci všech studovaných estrogenních polutantů, ale současně bylo pozorováno potlačení ionizace estriolu matričními efekty. Proto byla testována gradientová eluce. V tabulce 3.2 je uveden optimalizovaný gradientový profil při průtoku mobilní fáze 18 µl/min, při kterém nedošlo k ovlivnění ionizace žádného studovaného analytu a současně došlo k dostatečné separaci všech studovaných analytů.

Tabulka 3.2 Gradientový profil optimálního složení mobilní fáze. A je acetonitril s 0,1% kys. mravenčí, B je 0,1% roztok kys. mravenčí

Čas (min)	A (%)	B (%)
0	26	74
3	38	62
5	38	62
8	42	58
16	42	58
17	26	74
18	26	74

Při daném složení mobilní fáze poskytovaly studované estrogeny vyšší odezvu v pozitivním módu elektrospreje oproti negativnímu módu, který byl v řadě publikací široce využíván [28]. Proto bylo následně pracováno pouze v pozitivním módu. Hmotnostní spektra z MS skenu a skenu produktového iontu v pozitivním módu jsou pro všechny studované analyty uvedena v příloze II. Předpokládané struktury prekurzorových a produktových iontů jsou převzaty z publikace Bourciera a kol. [68].

SPE studovaných estrogenů byla testována na třech komerčně dostupných extrakčních kolonkách: Sep-Pak C18 (Waters Corporation, Milford, USA), Discovery DSC-18 s polymerně vázaným oktadecylem na silikagelu (Supelco, Bellefonte, USA) a Discovery DSC-18Lt s monomerně vázaným oktadecylem na silikagelu (Supelco, Bellefonte, USA). Nejlepších výsledků z hlediska výtěžnosti a opakovatelnosti extrakce bylo dosaženo na kolonce Discovery DSC-18Lt. Výtěžnost a opakovatelnost extrakce byla testována pro všechny studované analyty na třech koncentračních hladinách, a to 25, 50 a 250 ng/l pro deionizovanou vodu a pro říční vodu odebranou z řeky Úhlavy

v blízkosti města Klatovy, která neobsahovala studované analyty. Výtěžnost extrakce se pohybovala v rozmezí 95 – 100 % s relativní směrodatnou odchylkou nižší než 7,2 %. Statisticky významný rozdíl mezi destilovanou a říční vodou nebyl zaznamenán.

Kvantifikace reálných vzorků byla prováděna na základě kalibrační přímky získané za optimalizovaných separačních, detekčních a extrakčních podmínek. Jako médium byla použita říční voda (Úhlava, Klatovy), u které nebyla zjištěna přítomnost sledovaných polutantů. Limity detekce se pohybovaly v rozmezí 5 – 7 ng/l a limity kvantifikace v rozmezí 10 – 25 ng/l.

Nově vyvinutá cLC-MS/MS metoda s SPE byla použita k analýze 6 vzorků vod odebraných v období září až prosinec 2009. Odběrovými místy byly Vltava (Praha - cca 900 metrů nad centrální čistírnou odpadních vod na Císařském ostrově), Botičský potok (Praha), vstup do čistírny odpadních vod na Císařském ostrově (Praha), výstup z čistírny odpadních vod na Císařském ostrově (Praha), Úhlava (Klatovy) a Úhlava (Plzeň). Výsledky nalezených estrogenních látek a jejich koncentrace jsou uvedeny v tabulce 3.3.

Tabulka 3.3 Výsledky nalezených koncentrací estrogenů ve vzorcích vod z různých lokalit (odebraných v období září až prosinec 2009) a analyzovaných optimalizovanou metodou cLC-MS/MS po SPE. V závorce jsou uvedeny relativní směrodatné odchylky ($n = 9$)

Lokalita	Koncentrace E3 (ng/l)	Koncentrace β E2 (ng/l)	Koncentrace α E2 (ng/l)	Koncentrace EE2 (ng/l)	Koncentrace E1 (ng/l)
Botič (Praha)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Vltava (Praha)	< LOD	13,2 (5,5)	< LOD	< LOD	< LOD
Vstup ČOV Císařský ostrov (Praha)	188,6 (6,8)	21,4 (7,2)	< LOD	100,7 (4,4)	20,5 (8,4)
Výstup ČOV Císařský ostrov (Praha)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Úhlava (Klatovy)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
Úhlava (Plzeň)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

Z tabulky 3.3 je patrné, že estrogení polutanty byly nalezeny pouze ve dvou vzorcích. A to na odběrovém místě Vltava (Praha - cca 900 metrů nad centrální čistírnou odpadních vod na Císařském ostrově) a na vstupu do čistírny odpadních vod na Císařském ostrově (Praha), což může souviset s vysokou zatížeností Prahy. V ostatních vzorcích nebyly nalezeny žádné estrogení látky. Skutečnost, že nebyly nalezeny žádné estrogeny na výstupu z čistírny odpadních vod na Císařském ostrově (Praha) ukazuje na účinný čistící proces této čistírny odpadních vod, který je schopen velmi dobře odstranit estrogení látky z odpadních vod.

3.3 Literatura I

- [1] Holcapek, M., Jirasko, R., Lisa, M.: J. Chromatogr. A 1259 (2012) 3-15.
- [2] Petrovic, M., Hernando, M. D., Diaz-Cruz, M. S., Barcelo, D.: J. Chromatogr. A 1067 (2005) 1-14.
- [3] Svec, F.: J. Sep. Sci. 27 (2004) 1419-1430.
- [4] Hemstrom, P., Irgum, K.: J. Sep. Sci. 29 (2006) 1784-1821.
- [5] Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., Matsuura, T.: Desalination 239 (2009) 229-246.
- [6] Crisp, T. M., Clegg, E. D., Cooper, R. L., Wood, W. P., Anderson, D. G., Baetcke, K. P., Hoffmann, J. L., Morrow, M. S., Rodier, D. J., Schaeffer, J. E., Touart, L. W., Zeeman, M. G., Patel, Y. M.: Environ. Health Perspect. 106 (1998) 11-56.
- [7] Colborn, T., Saal, F. S. V., Soto, A. M.: Environ. Health Perspect. 101 (1993) 378-384.
- [8] Eertmans, F., Dhooge, W., Stuyvaert, S., Comhaire, F.: Toxicol. in Vitro 17 (2003) 515-524.
- [9] Basile, T., Petrella, A., Petrella, M., Boghetich, G., Petruzzelli, V., Colasuonno, S., Petruzzelli, D.: Ind. Eng. Chem. Res. 50 (2011) 8389-8401.
- [10] Giese, R. W.: J. Chromatogr. A 1000 (2003) 401-412.
- [11] Martinovic-Weigelt, D., Minarik, T. A., Curran, E. M., Marchuk, J. S., Pazderka, M. J., Smith, E. A., Goldenstein, R. L., Miresse, C. L., Matlon, T. J., Schultz, M. M., Schoenfuss, H. L.: Environment. International 61 (2013) 127-137.
- [12] Mills, L. J., Chichester, C.: Sci. Total Environ. 343 (2005) 1-34.
- [13] Russo, J., Lareef, M. H., Tahin, Q., Hu, Y. F., Slater, C., Ao, X., Russo, I. H.: J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 80 (2002) 149-162.
- [14] Vidaeff, A. C., Sever, L. E.: Reprod. Toxicol. 20 (2005) 5-20.
- [15] Beck, I. C., Bruhn, R., Gandrass, J., Ruck, W.: J. Chromatogr. A 1090 (2005) 98-106.
- [16] Gross-Sorokin, M. Y., Roast, S. D., Brighty, G. C.: Environ. Health Perspect. 114 (2006) 147-151.

- [17] Campbell, C. G., Borglin, S. E., Green, F. B., Grayson, A., Wozel, E., Stringfellow, W. T.: *Chemosphere* 65 (2006) 1265-1280.
- [18] Rocha, M. J., Cruzeiro, C., Reis, M., Rocha, E., Pardal, M.: *Environ. Monit. Assess.* 185 (2013) 8215-8226.
- [19] Rodriguez-Mozaz, S., de Alda, M. J. L., Barcelo, D.: *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 97-115.
- [20] Gabet-Giraud, V., Miege, C., Choubert, J. M., Ruel, S. M., Coquery, M.: *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 4257-4269.
- [21] Morteani, G., Moller, P., Fuganti, A., Paces, T.: *Environ. Geochem. Health* 28 (2006) 257-264.
- [22] Grabic, R., Jurcikova, J., Tomsejova, S., Ocelka, T., Halirova, J., Hypr, D., Kodes, V.: *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (2010) 550-555.
- [23] Kozlik, P., Bosakova, Z., Tesarova, E., Coufal, P., Cabala, R.: *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2127-2132.
- [24] Jarosova, B., Blaha, L., Vrana, B., Randak, T., Grabic, R., Giesy, J. P., Hilscherova, K.: *Environment International* 45 (2012) 22-31.
- [25] Hajkova, K., Pulkrabova, J., Schurek, J., Hajslova, J., Poustka, J., Napravnikova, M., Kocourek, V.: *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1351-1363.
- [26] Matejicek, D., Houserova, P., Kuban, V.: *J. Chromatogr. A* 1171 (2007) 80-89.
- [27] Kozlik, P.: *Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze* 2010.
- [28] de Alda, M. J. L., Barcelo, D.: *Fresen. J. Anal. Chem.* 371 (2001) 437-447.
- [29] Pacakova, V., Loukotkova, L., Bosakova, Z., Stulik, K.: *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 867-882.
- [30] Tomsikova, H., Aufartova, J., Solich, P., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodriguez, J. J., Novakova, L.: *Trends Anal. Chem.* 34 (2012) 35-58.
- [31] Huang, C. H., Sedlak, D. L.: *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 133-139.
- [32] Fernandez, M. P., Ikonomidou, M. G., Buchanan, I.: *Sci. Total Environ.* 373 (2007) 250-269.
- [33] Gomes, R. L., Avcioglu, E., Scrimshaw, M. D., Lester, J. N.: *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 737-744.
- [34] Higashi, T.: *Chem. Pharm. Bull.* 54 (2006) 1479-1485.

- [35] Isobe, T., Shiraishi, H., Yasuda, M., Shinoda, A., Suzuki, H., Morita, M.: J. Chromatogr. A 984 (2003) 195-202.
- [36] Farre, M., Kuster, M., Brix, R., Rubio, F., de Alda, M. J. L., Barcelo, D.: J. Chromatogr. A 1160 (2007) 166-175.
- [37] Schlusener, M. P., Bester, K.: Rapid Commun. Mass Spectrom. 19 (2005) 3269-3278.
- [38] Mol, H. G. J., Sunarto, S., Steijger, O. M.: J. Chromatogr. A 879 (2000) 97-112.
- [39] Quintana, J. B., Carpinteiro, J., Rodriguez, I., Lorenzo, R. A., Carro, A. M., Cela, R.: J. Chromatogr. A 1024 (2004) 177-185.
- [40] Stanford, B. D., Weinberg, H. S.: J. Chromatogr. A 1176 (2007) 26-36.
- [41] Peng, X. Z., Wang, Z. D., Yang, C., Chen, F. R., Mai, B. X.: J. Chromatogr. A 1116 (2006) 51-56.
- [42] Munro, C. J., Laughlin, L. S., VonSchalscha, T., Baldwin, D. M., Lasley, B. L.: Contraception 54 (1996) 43-53.
- [43] Vissers, J. P. C., Claessens, H. A., Cramers, C. A.: J. Chromatogr. A 779 (1997) 1-28.
- [44] Horvath, C. G., Preiss, B. A., Lipsky, S. R.: Anal. Chem. 39 (1967) 1422-1428.
- [45] Scott, R. P. W., Kucera, P.: J. Chromatogr. 125 (1976) 251-263.
- [46] Ishii, D., Asai, K., Hibi, K., Jonokuchi, T., Nagaya, M.: J. Chromatogr. 144 (1977) 157-168.
- [47] Ishii, D., Hibi, K., Asai, K., Jonokuchi, T.: J. Chromatogr. 151 (1978) 147-154.
- [48] Ishii, D., Hibi, K., Asai, K., Nagaya, M.: J. Chromatogr. 152 (1978) 341-348.
- [49] Tsuda, T., Novotny, M.: Anal. Chem. 50 (1978) 632-634.
- [50] Tsuda, T., Novotny, M.: Anal. Chem. 50 (1978) 271-275.
- [51] Borra, C., Han, S. M., Novotny, M.: J. Chromatogr. 385 (1987) 75-85.
- [52] Franc, M., Vojta, J., Sobotnikova, J., Coufal, P., Bosakova, Z.: Chem. Pap. 68 (2014) 22-28.
- [53] Stulik, K., Pacakova, V., Suchankova, J., Coufal, P.: J. Chromatogr. B 841 (2006) 79-87.
- [54] Svobodova, A., Krizek, T., Sirc, J., Salek, P., Tesarova, E., Coufal, P., Stulik, K.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1544-1547.

- [55] Barroso, A., Gimenez, E., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V.: *Anal. Chim. Acta* 804 (2013) 167-175.
- [56] Fanali, C., Dugo, L., Dugo, P., Mondello, L.: *Trends Anal. Chem.* 52 (2013) 226-238.
- [57] Himmelsbach, M.: *J. Chromatogr. B* 883 (2012) 3-17.
- [58] Liang, Y., Wang, G. J., Xie, L., Sheng, L. S.: *Curr. Drug Metab.* 12 (2011) 329-344.
- [59] Niessen, W. M. A.: *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 407-435.
- [60] Dooley, K. C.: *Clin. Biochem.* 36 (2003) 471-481.
- [61] Yost, R. A., Enke, C. G.: *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 2274-2275.
- [62] DeStefano, J. J., Langlois, T. J., Kirkland, J. J.: *J. Chromatogr. Sci.* 46 (2008) 254-260.
- [63] Svec, F.: *Chem. Listy* 103 (2009) 266-270.
- [64] Salisbury, J. J.: *J. Chromatogr. Sci.* 46 (2008) 883-886.
- [65] Kirkland, J. J.: *Anal. Chem.* 64 (1992) 1239-1245.
- [66] Cavazzini, A., Gritti, F., Kaczmarski, K., Marchetti, N., Guiochon, G.: *Anal. Chem.* 79 (2007) 5972-5979.
- [67] Gritti, F., Cavazzini, A., Marchetti, N., Guiochon, G.: *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 289-303.
- [68] Bourcier, S., Poisson, C., Souissi, Y., Kinani, S., Bouchonnet, S., Sablier, M.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 2999-3010.

PUBLIKACE I

**DEVELOPMENT OF A SOLID-PHASE EXTRACTION WITH CAPILLARY LIQUID
CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY FOR ANALYSIS OF ESTROGENS IN
ENVIRONMENTAL WATER SAMPLES**

Kozlík, P.; Bosáková, Z.; Tesařová, E.; Coufal, P.; Čabala, R.

J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2127-2132.

4 HYDROFILNÍ INTERAKČNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE A CHARAKTERIZACE SEPARAČNÍCH SYSTÉMŮ

4.1 Teoretický úvod

4.1.1 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie

Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie je metoda kapalinové chromatografie, která byla vyvinuta s cílem nalézt vhodnou metodu k separaci velmi polárních látek, jejichž analýza v posledních několika letech nabývá na důležitosti, a které jsou velmi špatně analyzovatelné v jiných separačních módech [1]. Problematické jsou především látky z oblasti bioanalýzy, proteomiky, metabolomiky, toxikologie, farmaceutického průmyslu aj.

Název hydrofilní interakční kapalinová chromatografie se svou zkratkou HILIC byla poprvé navržena Alpertem v roce 1990 [2] pro separační systém, kde se uplatňují interakce směsi aminokyselin s hydrofilní stacionární fází s následnou elucí poměrně hydrofobní mobilní fází s určitým zastoupením vodné složky. Nicméně tato separační technika byla použita již v roce 1975 při separaci sacharidů a oligosacharidů za použití aminoskupinami modifikovaného silikagelu jako stacionární fáze a směsi acetonitrilu s vodou v různém objemovém zastoupení jako mobilní fáze [3].

Pro HILIC je typické použití hydrofilní stacionární fáze a mobilní fáze s vysokým podílem organické složky. Nejčastěji se používá acetonitril s objemovým obsahem v rozmezí 60 až 96 %. Oproti reverznímu chromatografickému módu má vodná složka mobilní fáze vyšší eluční sílu. Eluční pořadí analytů je shodné jako u normálního chromatografického módu [4].

Hlavní výhody HILIC, kromě vyšší retence polárních látek, jsou následující: zvýšení citlivosti v MS detekci z důvodu vyššího obsahu organické složky v mobilní fázi, symetričtější tvary píků bazických látek, možnost přímého dávkování organického eluentu po SPE, možnost použití vyšších průtoků mobilní fáze vzhledem k vyššímu obsahu organické složky v mobilní fázi. Mezi další výhody HILIC patří možnost

nahrazení normálního chromatografického módu, který má řadu nevýhod jako např. komplikované spojení s MS detekcí [1, 5-9].

4.1.1.1 Mechanismus separace

Mechanismus separace v HILIC je stále nedořešeným a diskutovaným tématem, kterým se zabývá řada publikací [10-18]. Jedny z prvních studií, které se snažily popsat separační mechanismus v HILIC, předpokládaly, že retence v HILIC je řízena interakcí hydroxylových skupin studovaných analytů s polárními skupinami stacionární fáze [19, 20]. Stejně tak, jako v normálním chromatografickém módu, předpokládaly, že retence je řízena pouze adsorpcí analytů na povrchu stacionární fáze. Tato teorie byla omezena tím, že se týkala pouze analytů, které ve své struktuře obsahují hydroxylové skupiny, a proto nenašla širší uplatnění. Po experimentech se separací směsi cukrů na samotném silikagelu a na silikagelu derivatizovaném různými aminy byl prokázán i mechanismus rozdělování [21-23].

Komplexnější pohled na separační mechanismus v HILIC vnesl v roce 1990 Alpert [2]. Podle Alperta jsou na polární skupiny stacionární fáze sorbovány molekuly vody z mobilní fáze, které vytvoří vodný film na povrchu stacionární fáze. Analyty jsou na základě své polaritě rozdělovány mezi vodnou vrstvu na povrchu stacionární fáze a mobilní fázi, která obsahuje malé množství vodné složky. Čím jsou analyty polárnější, tím mají větší afinitu k vodné vrstvě navázané na povrchu stacionární fáze oproti mobilní fázi bohaté na organickou složku, což se projeví ve zvýšení jejich retence [2].

Ve svém článku Hemström a Irgum ukázali, že při zvyšujícím se obsahu vodné složky v mobilní fázi dochází ke stírání rozdílů mezi vodnou vrstvou na povrchu stacionární fáze a vodnou složkou v mobilní fázi. To má za následek zvýšení rozpustnosti polárních analytů v mobilní fázi, což se projeví snížením jejich retence. Retence je tedy přímo úměrná polaritě studovaných látek a nepřímo úměrná polaritě mobilní fáze [1].

V řadě publikací bylo prokázáno, že na separačním mechanismu v HILIC se podílejí také slabé vazebné interakce jako elektrostatické interakce, vodíkové interakce nebo dipól-dipól interakce [14, 24-27].

V současné době je separační mechanismus v HILIC stále diskutovaným tématem. Z dosavadních výzkumů je zřejmé, že se jedná o multimodální proces, kdy se při retenci polárních látek uplatňuje jak rozdělování mezi vodnou vrstvu na povrchu stacionární fáze a mobilní fázi, tak i adsorpce na povrchu stacionární fáze [1]. Retenční mechanismus v HILIC se může lišit pro odlišné látky a v závislosti na použité stacionární a mobilní fázi [13, 28].

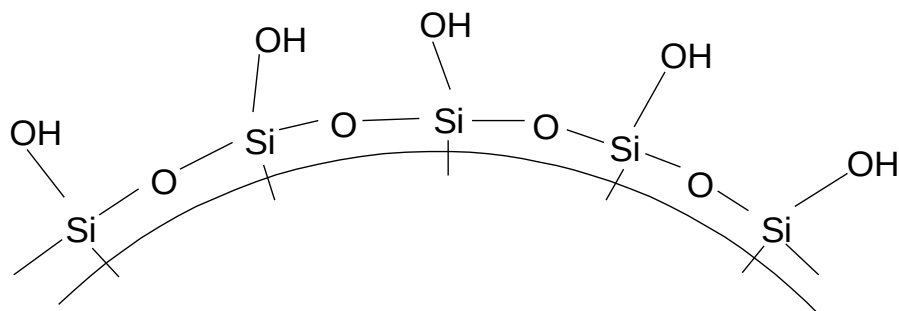
4.1.1.2 Stacionární fáze

V HILIC může být použita jakákoliv polární stacionární fáze, která je schopna na svém povrchu vytvořit vodnou vrstvu. Mohou být použity polární kolony s iontovými i neiontovými polárními skupinami vázanými na povrch silikagelu nebo organických polymerních matric [15]. Jedním z nejpoužívanějších materiálů v HILIC separacích je nederivatizovaný silikagel [29-37]. HILIC separace využívají také stacionární fáze s chemicky vázanými skupinami jako aminopropylové skupiny [38-41], amidové [42-44], diolové [45, 46], cyklodextrinové [47] a jiné. Přehled stacionárních fází používaných v HILIC je uveden v přehledném článku Jandery [15].

V této části dizertační práce zaměřené na HILIC byly použity následující stacionární fáze: nederivatizovaný silikagel, na silikagel vázaný nativní cyklofruktan a cyklofruktan derivatizovaný isopropylenem, amidové a sulfobetainová stacionární fáze.

4.1.1.2.1 Nederivatizované silikagelové stacionární fáze

Silikagelové stacionární fáze jsou na trhu k dostání téměř od každého výrobce chromatografických kolon. Komerčně dostupné silikagelové stacionární fáze se mohou lišit v čistotě použitého silikagelu a ve způsobu přípravy stacionární fáze. V závislosti na výše zmíněných parametrech mohou silikagelové stacionární fáze od různých výrobců poskytovat různou retenci, účinnost a tvar píků [15]. Na obrázku 4.1 je uvedena struktura nederivatizované silikagelové stacionární fáze [4].



Obrázek 4.1 Struktura nederivatizované silikagelové stacionární fáze [4].

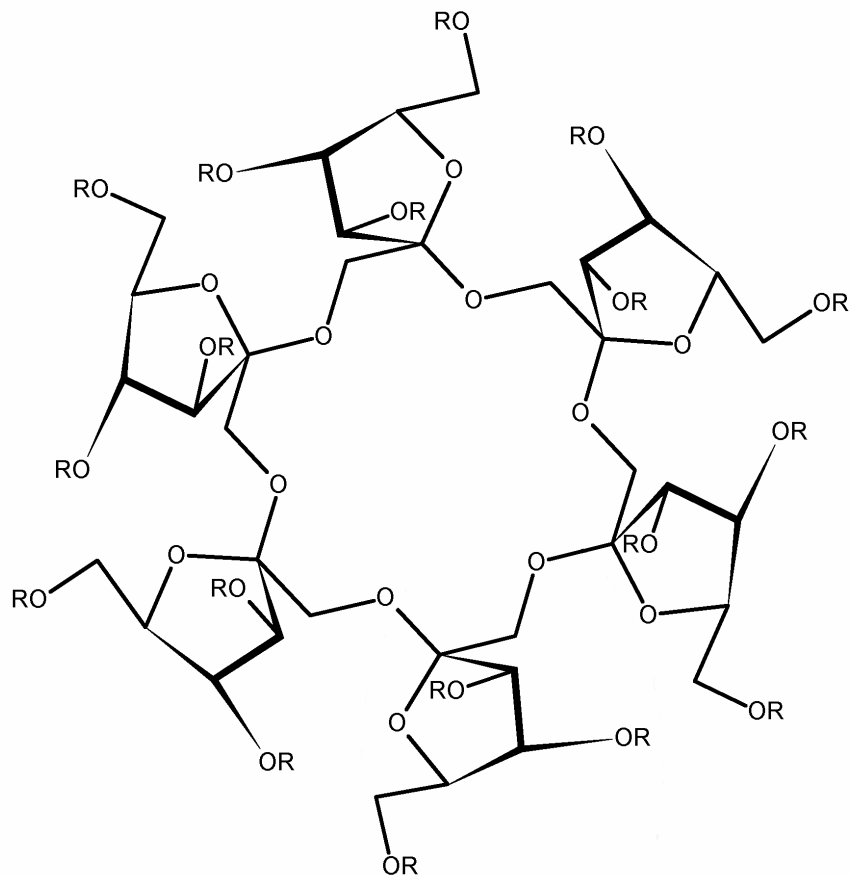
V závislosti na studovaném analytu, složení mobilní fáze a vlastnostech použitého silikagelu se na separačním mechanismu může podílet rozdělování, adsorpce a iontově-výměnné interakce [15]. Při použití pufru o vyšším pH bude docházet k disociaci silanolových skupin, což může způsobit, že iontově výměnná-interakce se bude velmi významně podílet na separačním mechanismu, zvláště pokud budou separovány pozitivně nabitě bazické látky [48].

Výhodou nederivatizovaných silikagelových stacionárních fází oproti chemicky modifikovaným je jejich vyšší stabilita, která se pozitivně projevuje hlavně ve spojení LC-MS, kdy nedochází ke kontaminaci MS uvolněnými ligandy [49]. Hlavní nevýhody nederivatizovaných silikagelových stacionárních fází, které byly zaznamenány v literatuře, jsou velmi silná retence (často ireverzibilní) bazických látek díky elektrostatickým interakcím [50], nereprodukovatelné výsledky [4], špatná symetrie píků některých sloučenin [23] a snadné předávkování kolony [1, 49].

4.1.1.2.2 Cyklofruktanové stacionární fáze

Cyklofruktany jsou cyklické oligosacharidy skládající se ze šesti nebo více D-fruktofuranozových jednotek, navzájem propojených β -(2 $\rightarrow$ 1) vazbou (běžně se používají zkratky CF6, CF7, CF8, které označují počet fruktofuranozových jednotek v makrocyclickém kruhu). Cyklofruktany tvoří centrální „crown“ etherovou strukturu. Každá fruktofuranozová jednotka obsahuje jednu primární a dvě sekundární

hydroxylové skupiny. Tyto hydroxylové skupiny se často využívají k derivatizaci nativních cyklofruktanů. Struktura cyklofruktanu je uvedena na obrázku 4.2 [51].



Obrázek 4.2 Struktura cyklofruktanu 6. R = H nebo derivatizační skupina [51].

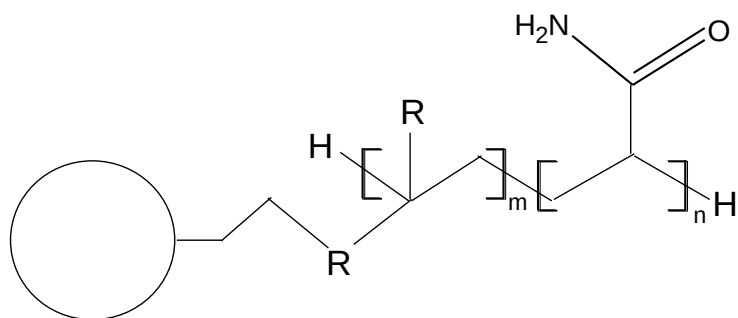
První zmínka o cyklofruktanech je datována do roku 1989, kdy byla zaznamenána produkce cyklofruktanů při fermentaci inulínu za použití extracelulárního enzymu z *Bacillus circulans* [52]. Cyklofruktany byly nejprve používány jako aditiva do různých produktů např. do jídla (potlačení hořkosti) [53], či excipienty ve farmaceutickém průmyslu [53]. Cyklofruktany jako chirální selektory v HPLC byly představeny v roce 2009 profesorem Armstrongem [53]. Od té doby našly cyklofruktany využití v řadě chirálních separací [54-60].

Vzhledem ke své struktuře a polárnímu charakteru mohou být cyklofruktanové stacionární fáze využity také v HILIC separacích. První použití nativní cyklofruktanové stacionární fáze v HILIC separaci bylo uskutečněno skupinou Armstronga [51]. Nativní cyklofruktan byl úspěšně použit k separaci nukleových kyselin, nukleosidů, xantinů, β -blokátorů, kyseliny salicylové a jejích derivátů [51]. K chirální i achirální separaci řady polárních látek v HILIC módu (xantiny, β -blokátory, vitamíny, aminokyseliny, maltooligosacharidy a jiné) byl použit v roce 2011 cyklofruktan derivatizovaný sulfonovými skupinami [27]. Isopropylovaný cyklofruktan byl prvně použit v HILIC v publikaci Kozlíka a kol. [26].

4.1.1.2.3 Amidové stacionární fáze

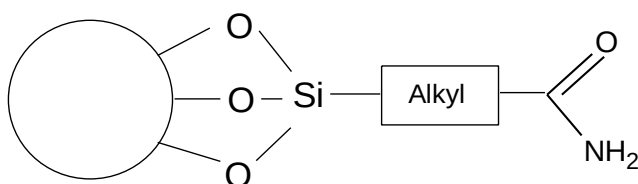
Amidové stacionární fáze obsahují karbamoylové nebo amidové skupiny vázané na silikagelu pomocí krátkého alkylového řetězce [15]. Oproti aminopropylovým skupinám vázaným na silikagelu nemají amidové stacionární fáze bazický charakter, tudíž se v separačním mechanismu méně uplatňují iontově-výměnné interakce [15]. U amidových kolon byla publikována jejich dlouhodobá životnost [4, 15]. HILIC na amidových kolonách byla použita hlavně pro separaci peptidů, oligosacharidů, glykoproteinů a glykosidů [4, 9, 15, 50, 61].

Některé amidové stacionární fáze byly speciálně vyrobeny pro použití v HILIC, jako HILIC TSK gel Amide-80, která se úspěšně uplatnila pro separaci monosacharidů, oligosacharidů, peptidů a aminokyselin [15, 62]. Amide-80 vykazuje vyšší retenci pro řadu polárních látek ve srovnání s nederivatizovaným silikagelem a ostatními polárními stacionárními fázemi za stejných separačních podmínek [12]. Struktura funkční skupiny kolony TSK gel Amide-80 je uvedena na obrázku 4.3 [63].



Obrázek 4.3 Struktura funkční skupiny kolony TSK gel Amide-80 [63].

Další amidovou kolonou, která je určena pro HILIC separace, je kolona XBridge™ Amide. Tato kolona je založena na BEH technologii (bridged ethylene hybrid), která je patentována firmou Waters. Princip BEH technologie spočívá v tom, že mezi silanolové skupiny jsou vloženy hybridní ethylenové můstky, které fungují jednak jako „endcappingové“ skupiny, ale také zpevňují celkovou strukturu takto připravené silikagelové fáze [64]. To způsobuje jednak vyšší mechanickou odolnost potřebnou např. v UHPLC, tak i vysokou odolnost chemickou. A proto lze na takovýchto kolonách pracovat v širokém rozsahu hodnot pH [64, 65]. Navíc jsou kolony založené na BEH technologii odolné vůči tzv. „krvácení kolony“ (z anglického bleeding), nebo-li vymývání ligandu z nosné fáze [65]. Kolona XBridge™ Amide byla použita v řadě HILIC separacích [66-68]. Struktura funkční skupiny kolony XBridge™ Amide je uvedena na obrázku 4.4 [69].

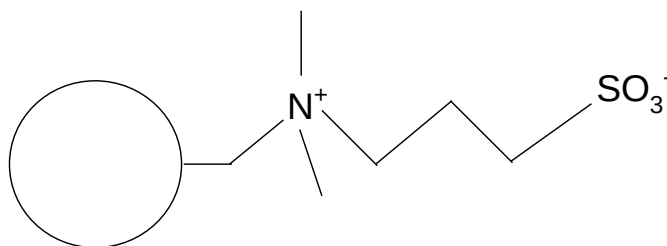


Obrázek 4.4 Struktura funkční skupiny kolony XBridge™ Amide [69].

4.1.1.2.4 Sulfoalkylbetainové stacionární fáze

Sulfoalkylbetainové stacionární fáze patří do skupiny zwitteriontových stacionárních fází, které byly původně zamýšleny k použití v iontově-výměnných separacích [15]. První použití sulfoalkylbetainových stacionárních fází v HILIC separacích bylo uskutečněno při analýzách anorganických solí, malých organických iontových látek a proteinů [70-73].

Zwitteriontová sulfoalkylbetainová stacionární fáze obsahuje jako funkční skupinu sulfoalkylbetain (3-sulfopropyldimethylalkylamoniová sůl), obsahující zároveň silně kyselou sulfonovou skupinu a silně bazickou kvartérní amoniovou skupinu, které jsou vzájemně oddělené krátkým alkylovým řetězcem. Toto uspořádání umožňuje současnou separaci aniontových a kationtových látek. Struktura funkční skupiny sulfoalkylbetainové stacionární fáze je uvedena na obrázku 4.5 [74].



Obrázek 4.5 Struktura funkční skupiny sulfoalkylbetainové stacionární fáze (kolona ZIC-HILIC) [74].

Sulfoalkylbetainové stacionární fáze na svém povrchu velmi silně adsorbují vodu z mobilní fáze. Polární interakce hrají hlavní úlohu v separačním mechanismu na těchto stacionárních fázích, slabé elektrostatické interakce dodávají významnou selektivitu při separaci iontových látek [15]. Sulfoalkylbetainové stacionární fáze jsou na trhu známy pod komerčními názvy ZIC-HILIC (obsahuje sulfoalkylbetain vázaný na silikagelu) a ZIC-*p*HILIC (obsahuje sulfoalkylbetain vázaný na polymeru). ZIC-HILIC kolony jsou široce používány k separaci řady polárních látek, jako jsou metabolity [75, 76], peptidy [77], glykoproteiny [78] a jiné polární látky [79-81].

4.1.2 Charakterizace separačních systémů

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je jednou z nejrozšířenějších analytických technik. Neustálý vývoj v HPLC vede k tomu, že se na trhu objevují nové stacionární fáze s různými vlastnostmi. Výběr vhodné stacionární fáze je nejdůležitějším krokem pro úspěšnou separaci jakéhokoliv vzorku. Známé technické parametry chromatografických kolon nejsou ve většině případů postačující k výběru optimální kolony pro konkrétní separaci [82]. Z tohoto důvodu je žádoucí nalézt vztah mezi chemickou strukturou analytu a fyzikálně-chemickými vlastnostmi stacionárních fází, které by poskytly hlubší pochopení separačního procesu a tím usnadnily vývoj chromatografických metod.

Existuje celá řada testů sloužících k charakterizaci chromatografických kolon. Většina testů byla navržena a zároveň aplikována pro stacionární fáze používané v reverzním chromatografickém módu. Mnoho testů lze úspěšně aplikovat i v jiných chromatografických módech, jako například v HILIC [14, 83, 84]. Mezi základní charakteristiky se řadí určování fyzikálně chemických vlastností stacionární fáze, jako je tvar, homogenita a velikost částic stacionární fáze, specifický povrch, velikost pórů a jiné. Stanovení těchto vlastností a jejich následná kontrola ve výrobním procesu je nutná k přípravě dobře definovaných chromatografických kolon, které poskytují reprodukovatelné výsledky pro různé šarže dané kolony. Různé přístupy charakterizace fyzikálně chemických vlastností stacionární fáze byly diskutovány v řadě publikací [85-87].

Také spektrometrické metody přispívají svým dílem k charakterizaci chromatografických kolon. Jedná se hlavně o infračervenou spektroskopii (IČ) a nukleární magnetickou rezonanci (NMR). IČ spektroskopie je vhodná k charakterizaci silikagelového povrchu a určení obsahu volných silanolových skupin [88]. NMR se používá k určení typu chemicky vázaného ligandu na povrchu stacionární fáze, dále je schopna rozeznat, jakým způsobem je ligand navázán na povrch stacionární fáze a určit různé typy silanolových skupin [88].

K charakterizaci chromatografických kolon se používají i statistická vyhodnocení chromatografických dat. Používá se převážně analýza hlavních komponent (PCA) a faktorová analýza, které jsou schopny zařadit danou chromatografickou kolonu, podle

retenčního chování vybraných látek na dané koloně, do skupiny kolon s podobnými chromatografickými vlastnostmi. To umožňuje jednodušší a rychlejší rozhodování jakou chromatografickou kolonu zvolit pro danou aplikaci [89, 90]. Termodynamické změny entalpie a entropie spojené s přechodem analytu z mobilní fáze do fáze stacionární jsou hodnoceny pomocí van't Hoffovy závislosti [91, 92].

Mezi další testovací metody můžeme zařadit různé empirické testy jako je například Tanakův test [93], Engelhardův test [94], Waltersův test [95] a jiné. Pro tyto testy je typické, že získaná chromatografická informace je závislá na testovaných analytech, pomocí nichž lze popsat určitou vlastnost kolony (např. silanolová aktivita a hydrofobicita). Tyto testy jsou zejména vhodné pro vzájemné porovnání stacionárních fází [88]. Dále se mezi chromatografické testovací metody řadí různé chromatografické modely, které se snaží o bližší a komplexnější popis retenčního chování vybraných analytů, například Horváthův model [96], Galushkův model [97], model lineárních vztahů volných energií (LFER) [55] a jiné.

4.1.2.1 Modely lineárních vztahů volných energií

Modely lineárních vztahů volných energií jsou založeny na měření určité veličiny vztažené ke změně Gibbsovy energie při daném procesu (např. rozpouštění, retence aj.) [98].

Mezi tyto modely se řadí kvantitativní vztah mezi strukturou a účinností (QSAR – quantitative structure-activity relationship) [99]. Model QSAR byl navržen v šedesátých letech dvacátého století Hanschem a Fujitou [100, 101]. QSAR model našel uplatnění především ve farmakologii a toxikologii k predikci účinku léčivých látek, jejich distribuci a eliminaci v organismu [99]. Kvantitativní vztah mezi strukturou a retencí QSRR je založen především na korelaci retence analytu v chromatografickém systému s rozdělovacím koeficientem mezi *n*-oktanolem a vodou ($\log P$) [99].

Výhoda modelu LFER spočívá ve schopnosti tohoto modelu charakterizovat a porovnat celý chromatografický systém (mobilní a stacionární fázi). Model LFER je schopen poskytnout kvalitativní i kvantitativní informace o molekulárních interakcích podílejících se na retenci a separaci v daném chromatografickém systému. Mezi

molekulární interakce patří elektrostatické interakce, vodíková vazba, interakce na bázi přenosu náboje, disperzní síly [98, 102].

V kapalinové chromatografii dochází při retenci k přenosu analytu mezi stacionární a mobilní fází, což je spojeno se změnou Gibbsovy energie. Změna Gibbsovy energie může být rozdělena na příspěvky jednotlivých nezávislých typů molekulárních interakcí zodpovědných za retenci [103]. Rovnice LFER, která byla představena Abrahamem [104], vyjadřuje korelaci logaritmů retenčních faktorů s fyzikálně-chemickými parametry analytů (viz. rovnice (1)).

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (1)$$

Význam jednotlivých členů rovnice je následující:

k...retenční factor

E...rozsah molární refrakce [105]

S...parametr dipolarity/polarizibility [105]

A...celková nebo efektivní acidita vodíkové vazby, popisuje proton donorovou schopnost analytu tvořit vodíkovou vazbu [104]

B...celková nebo efektivní bazicita vodíkové vazby, popisuje proton akceptorovou schopnost analytu tvořit vodíkovou vazbu [104]

V...McGowanův charakteristický objem solutu, popisuje disperzní a kohezivní interakce (schopnost tvorby kavity) analytu v chromatografickém systému [106]

c...úsek rovnice LFER, není vysvětlován pomocí solvatačních parametrů, zahrnuje všechny možné vlivy na retenci, které nejsou popsány pomocí regresních koeficientů

e...rozdíl ve schopnosti stacionární a mobilní fáze interagovat s *n*- a π -elektrony analytu

s...rozdíl v dipolaritě/polarizibilitě mezi stacionární a mobilní fází, poukazuje na schopnost fází účastnit se interakcí dipól-dipól a dipól-indukovaný dipól

a...rozdíl v akceptorové bazicitě vodíkové vazby mezi stacionární a mobilní fází, schopnost působit jako akceptor vodíku pro vodíkovou vazbu

b...rozdíl v donorové aciditě vodíkové vazby mezi stacionární a mobilní fází, schopnost působit jako donor vodíku pro vodíkovou vazbu

v...rozdíl v hydrofobicitě mezi stacionární a mobilní fází, který závisí na rozdílu kohezivity obou fází a na rozsahu disperzních interakcí mezi analytem a stacionární fází a analytem a mobilní fází

Velkými písmeny v rovnici 1 jsou označeny nezávisle proměnné (E , S , A , B , V). Jedná se o deskriptory, které popisují fyzikálně-chemické vlastnosti látek a kvantitativně popisují strukturní odlišnosti mezi nimi. Deskriptory pro širokou škálu látek lze spočítat, popřípadě zjistit pomocí nejrůznějších experimentálních technik [102]. V roce 1993 Abraham publikoval nové deskriptory pro velký počet sloučenin [107]. Tyto deskriptory jsou běžně používány v modelu LFER [24, 55, 108, 109]. Výběr analytů použitých v LFER modelu by měl být reprezentativní a analyty by měly být strukturně odlišné, aby rozložení hodnot jednotlivých deskriptorů bylo rovnoměrné a pokrývalo celou řadu vlastností analytů popsaných pomocí těchto deskriptorů [105].

Malými písmeny jsou označeny regresní koeficienty (e , s , a , b , v) získané multidimenzionální regresní analýzou [109]. Tyto regresní koeficienty popisují rozdíly dané molekulární interakce mezi stacionární a mobilní fází. Daná molekulární interakce je silnější mezi analytem a stacionární fází, pokud daný regresní koeficient nabývá kladné hodnoty, což se projeví jako zvýšení retence. Pokud je daný regresní koeficient záporný, pak daná molekulární interakce je silnější mezi analytem a mobilní fází, a vede tedy ke snížení retence. Výsledná retence je určena součtem všech jednotlivých nezávislých příspěvků [98, 102].

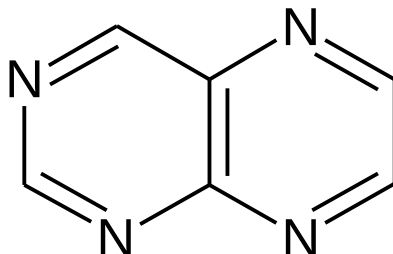
I když většina prací používajících LFER model je zaměřena na reverzní chromatografický mód, v posledních několika letech se objevily publikace, které aplikovaly LFER také na HILIC techniku [14, 24, 26, 84, 110-113].

4.1.3 Pteriny

První záznam o pterinech pochází z roku 1889, kdy Hopkins izoloval žlutý pigment z křídel různých druhů motýlů [114]. Skupina těchto pigmentů následně dostala obecný název pteriny podle řeckého slova „pteron“ (křídlo) [114]. Pteriny se nacházejí v řadě organismů, jako jsou obojživelníci, plazi, ryby, hmyz, a také člověk [115]. Jejich funkce je velmi rozmanitá v závislosti na organismu, ve kterém se vyskytují [114-116].

4.1.3.1 Chemická struktura a fyzikálně-chemické vlastnosti

Pteriny patří do skupiny heterocyklických sloučenin. Základní struktura pterinů je odvozena od bicyklického systému zvaného pteridin, jehož základem je pyrimidin a pyrazin. Struktura pteridinu je uvedena na obrázku 4.6.



Obrázek 4.6 Strukturní vzorec pteridinu.

Deriváty pteridinu se podle substituce pyrimidinového cyklu dělí na pteriny, což jsou deriváty 2-amino-4-oxo-3,4-dihydropteridinu a na lumaziny, což jsou deriváty 2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropteridinu [117]. Dále mohou být deriváty pteridinu rozděleny podle velikosti substituentů na nekonjugované (s relativně malými substituenty, např. neopterin, biopterin, molybdopterin, onkopterin) a konjugované, které obsahují větší substituenty vázané na pteridinový cyklus (např. kyselina listová, riboflavin nebo methanopterin) [114, 117].

Pteriny jsou látky fotosenzitivní, což znamená, že na světle dochází k jejich rozkladu za vzniků různých derivátů pteridinu [114]. Pteriny se mohou vyskytovat v různých oxidačních stavech. Redukované formy pterinů snadno podléhají oxidaci vzdušným kyslíkem, a to zejména v přítomnosti iontů kovů [114, 118]. Pro redukované formy pterinů je typické, že mají velmi silné antioxidační účinky a mohou *in vivo* velmi dobře působit jako lapače reaktivních forem kyslíku [118]. Oxidované formy pterinů vykazují silnou fluorescenci [118]. Pteriny se vyskytují v několika tautomerních formách. Mezi významné tautomerní formy se řadí laktamová a laktimová forma. Z důvodu nižší energetické náročnosti a vyšší stability je rovnováha mezi laktamovou a laktimovou tautomerní formou posunuta ve prospěch laktamové formy [119]. I když se pteridin velmi dobře rozpouští ve vodě a ve většině organických rozpouštědel, tak substituované pteridiny (oxo- a aminopteriny), které jsou asociovány intramolekulárními vodíkovými vazbami, vykazují velmi nízkou rozpustnost jak ve vodě, tak i v organických rozpouštědlech [120].

4.1.3.2 Význam a funkce

Pteriny a jejich deriváty zastávají řadu významných biologických funkcí. Podílejí se na řízení buněčného metabolismu, např. biopterin slouží jako redoxní kofaktor monooxygenas aromatických aminokyselin [121] a NO-synthasy [122]. Biopterin se také účastní řízení buněčného cyklu [123] a regulace melanogeneze [124]. Neopterin je velmi významným indikátorem řady onemocnění. Jeho zvýšená koncentrace v tělních tekutinách (moč a krevní plazma) je ukazatelem řady zánětlivých stavů a imunitních onemocnění, jako jsou například různá virová onemocnění, revmatoidní artritida a atopické astma [125-127].

Relativně vysoké koncentrace derivátů pteridinu se nacházejí ve formě pigmentů u hmyzu, plazů, obojživelníků, krabů a mořského planktonu [115, 128]. Pteriny propůjčují hmyzu typické zabarvení jejich kutikul počínaje od bílé barvy (leukopterin), přes červenou (erythropterin) a žlutou (xanthopterin) až po fluorescenční modrou (biopterin) [129]. Zbarvení způsobené pteriny často slouží jako ochranné zbarvení, které

může být rozděleno na varovné zbarvení (aposematické) a maskovací zbarvení (kryptické) [130, 131].

Aposematismus je antipredační strategie živočicha, která pomocí výstražných signálů informuje predátory o své nevýhodnosti [130]. Cílem těchto výstražných signálů je odradit potenciálního predátora od útoku. Proto by měly být tyto signály dobře srozumitelné a umožnit tak predátorovi jejich snadné rozeznání a dlouhodobé zapamatování [132]. Organismy využívají různé strategie, jimiž se před predátory brání, a to zejména optické, pachové nebo zvukové. Optické signály jsou nejběžnější, jsou založeny na různých variacích barvy, vzoru, kontrastu vůči podkladu, vnitřnímu kontrastu mezi různě zbarvenými partiemi těla, tvaru těla, velikosti, symetrie apod. [132].

V této práci bylo studováno zbarvení kutikul způsobené pteriny v plošticích (Heteroptera). Byly studovány dva druhy, a to *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* z různých lokalit a v různých vývojových stádiích. Fotografie studovaných ploštic jsou uvedeny jako „supplementary data“ publikace IV. Barvy kutikul ploštic se mění během vývojového stádia jedince, ročního období, ale vliv na jejich zbarvení může mít i lokalita výskytu. Odstín zbarvení je pravděpodobně výsledkem přítomnosti určitých pterinů, ale i jejich vzájemného poměru.

4.1.3.3 Metody stanovení

Vzhledem k tomu, že řada pterinů slouží jako markery různých onemocnění, jsou pteriny stanovovány hlavně v moči, plazmě, séru a mozkomíšním moku [114]. Nejběžnější technikou používanou v analýze pterinů je HPLC s různými typy detekce (převážně fluorescenční a hmotnostní detekce) [133-136]. Převážná většina HPLC metod určených ke stanovení pterinů probíhala v reverzním módu HPLC (RP-HPLC). Kvůli vysoké polaritě pterinů a s ní spojené jejich nízké retenci v RP-HPLC byla v řadě publikací použita 100% vodná mobilní fáze. Z tohoto důvodu docházelo ke špatné opakovatelnosti analýz (jak z hlediska retenčních časů, tak i rozlišení) a byla zaznamenána i nižší životnost chromatografických kolon [5, 137, 138]. Jako vhodná alternativa k RP-HPLC pro analýzu polárních pterinů se jeví HILIC [5, 81, 139]. V roce 2010 Nováková a kol. studovali retenční a separační vlastnosti UHPLC hybridních

stacionárních fází na bázi BEH technologie určených pro HILIC v analýze vybraných pterinů (neopterin, biopterin, dihydroneopterin a dihydrobiopterin) [5]. V témže roce Shi a kol. úspěšně použili HILIC na aminopropylové stacionární fázi ve spojení s fluorescenčním detektorem k analýze neopterinu, biopterinu a isoxanthopterinu v moči [139]. K analýze pterinů byla použita i řada jiných instrumentálních technik než HPLC jako například kapilární elektroforéza [140-142] nebo různé spektroskopické metody např. povrchem zesílený Ramanův rozptyl [143] a synchronní fluorescenční spektrometrie [144]. Biopterin a neopterin v séru lze také stanovit metodou ELISA [145].

Pro analýzu derivátů pteridinu v kutikulách hmyzu byla použita hlavně papírová chromatografie, a/nebo tenkovrstvá chromatografie (TLC) [129, 146-151], popřípadě HPLC [152]. Nevýhodou TLC metody v analýze pterinů je její nízká selektivita pro různé deriváty. V roce 2003 Němec a kol. předpověděli, že analýza kutikul hmyzu z pohledu vyskytujících se derivátů pteridinu je mnohem komplexnějším problémem, než bylo do té doby publikováno [129]. Němec také vyjádřil názor, že k analýze pterinů v kutikulách hmyzu by byla vhodná citlivější a selektivnější analytická metoda jako například HPLC v kombinaci s MS detekcí [129]. Aplikace takového přístupu, tedy HPLC-MS/MS, byla použita v rámci této dizertační práce v analýze pterinů obsažených v ploštících *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* [81]. V aktuálních studiích, zabývajících se aposematickým zbarvením různých druhů hmyzu, byla k analýze derivátů pteridinu využita metoda kapilární elektroforézy [153, 154].

4.2 Výsledky a diskuse – komentáře k publikacím

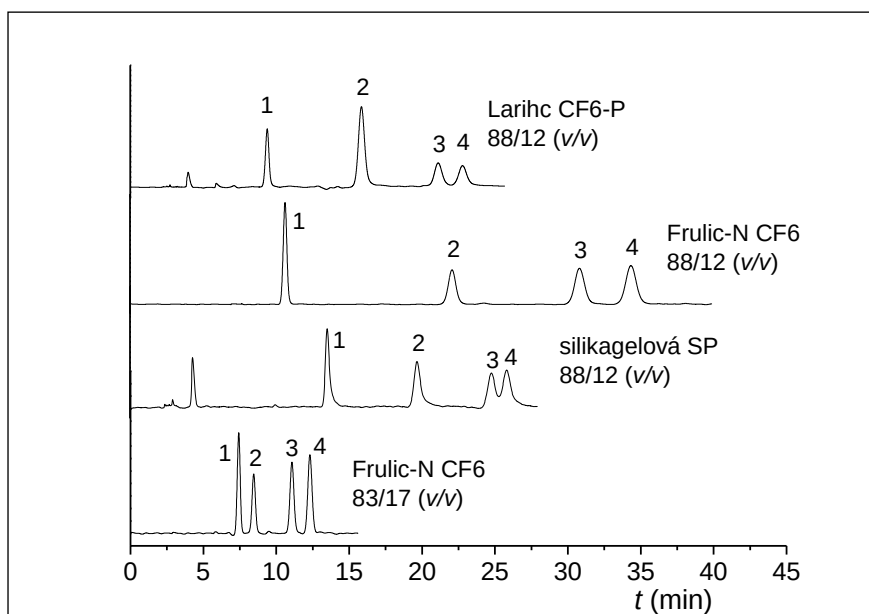
4.2.1 Porovnání vlastností silikagelové stacionární fáze a cyklofruktanových stacionárních fází v HILIC – Publikace II

Klasické silikagelové stacionární fáze patří mezi běžně používané stacionární fáze v HILIC. Modifikace těchto silikagelových stacionárních fází navázáním řady různých ligandů může zásadně změnit jejich separační účinky. Tato část dizertační práce je zaměřena na porovnání separačních vlastností třech stacionárních fází v HILIC. Byly porovnávány tyto chromatografické kolony:

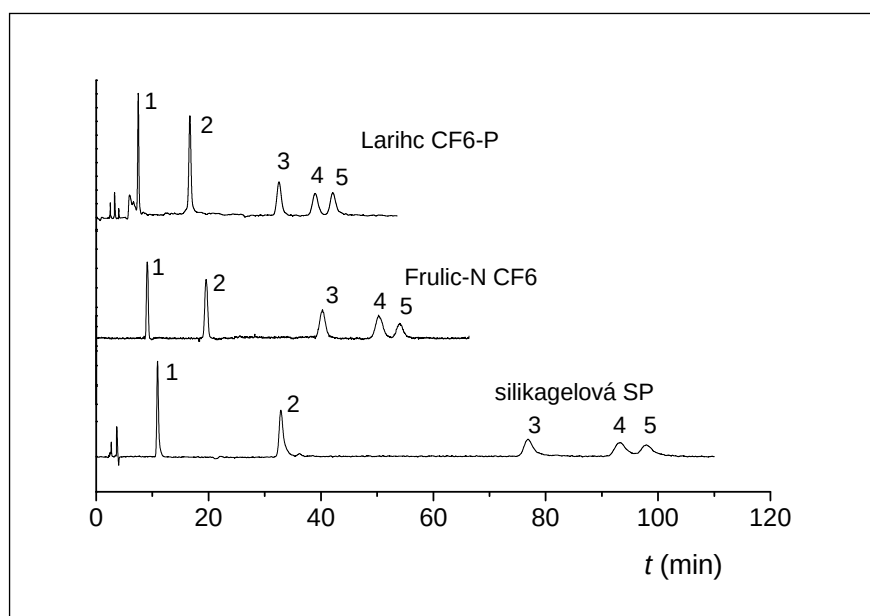
- Kolona Larihc CF6-P; stacionární fáze - isopropylovaný cyklofruktan 6 vázaný na silikagelovém nosiči, velikost částic 5 μm , kolona o rozměrech 250 mm $\times$ 4,6 mm (AZYP, Arlington, USA)
- Kolona Frulic-N CF6; stacionární fáze – nativní cyklofruktan 6 vázaný na silikagelovém nosiči, velikost částic 5 μm , kolona o rozměrech 250 mm $\times$ 4,6 mm (AZYP, Arlington, USA)
- Kolona se silikagelovou stacionární fází - obsahující stejný silikagel, který byl použit při přípravě kolon Larihc CF6-P a Frulic-N CF6, velikost částic 5 μm , kolona o rozměrech 250 mm $\times$ 4,6 mm (Oddělení chemie a biochemie, Texaská univerzita v Arlingtonu, Arlington, USA).

K porovnání a charakterizaci kolon byly použity empirické testy navržené Schoenmakerem [155], Snyderem a Soczewinským [156] sloužící k odhalení, zda se na retenčním mechanismu podílí rozdělování a/nebo adsorpce. K porovnání hydrofobicity a silanolové aktivity testovaných stacionárních fází byl použit Waltersův test. K určení molekulárních interakcí podílejících se na retenci a separaci v daných separačních systémech byla použita LFER metoda. K porovnání selektivity a separační účinnosti výše zmíněných kolon byla optimalizována metoda pro separaci směsi čtyř pentapeptidů a pěti nonapeptidů.

Optimální složení mobilní fáze pro separaci pentapeptidů na koloně Larihc CF6-P bylo následující: acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 88/12 (v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min a teplota kolony 25 °C. Při tomto složení mobilní fáze došlo k dostatečné separaci všech studovaných pentapeptidů, dobré symetrii píků a doba analýzy nepřesáhla 25 minut. Rozlišení všech píků pentapeptidů na základní linii při době analýzy nepřesahující 13 minut bylo dosaženo na koloně Frulic-N CF6 při složení mobilní fáze acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 83/17 (v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min a teplota kolony 25 °C. Silikagelová stacionární fáze (SP) neposkytovala při žádném testovaném složení mobilní fáze dostatečné rozlišení pro leucin enkefalin a [Met⁵]enkefalin a současně všechny píky vykazovaly chvostování. Při změně poměru organické a vodné složky mobilní fáze ve prospěch acetonitrilu došlo k prodloužení retence všech sledovaných pentapeptidů, ale vliv na rozlišení mezi leucin enkefalinem a [Met⁵]enkefalinem byl nepatrný. Optimální složení mobilní fáze pro separaci nonapeptidů na všech třech testovaných chromatografických kolonách bylo následující: acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 80/20 (v/v), průtok mobilní fáze 1 ml/min. Nejrychlejší separace bylo dosaženo na koloně Larihc CF6-P. Na cyklofruktanových stacionárních fázích vykazovaly nonapeptidy symetrické píky a došlo k jejich vzájemnému rozdělení až na základní linii. V případě použití silikagelové stacionární fáze se doba analýzy blížila ke 100 minutám a všechny píky silně chvostovaly. Pro ilustraci jsou na obrázku 4.7 uvedeny chromatogramy separace pentapeptidů za optimalizovaných separačních podmínek a nonapeptidů na obrázku 4.8.



Obrázek 4.7 Chromatogram separace směsi pentapeptidů na třech testovaných chromatografických kolonách. Složení mobilní fáze: acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00; poměr organické a vodné fáze je uveden pod názvem kolony v chromatogramu; průtok 1 ml/min; teplota kolony 25 °C; UV detekce při 220 nm; eluční pořadí analytů: 1, leucin enkefalin amid 2, [D-Ala²]leucin enkefalin 3, leucin enkefalin 4, [Met⁵]enkefalin.



Obrázek 4.8 Chromatogram separace směsi nonapeptidů na třech testovaných chromatografických kolonách. Složení mobilní fáze: acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 80/20 (v/v); průtok 1 ml/min; teplota kolony 25 °C; UV detekce při 220 nm; eluční pořadí analytů: 1, oxytocin 2, [deamino-Cys¹, D-Arg⁸]vasopresin 3, [Arg⁸]vasopresin 4, [Arg⁸]vasotocin 5, [Lys⁸]vasopresin.

Na základě empirických testů navržených Schoenmakerem [155] a Snyderem a Soczewinskim [156] bylo zjištěno, že se na retenčním mechanismu separace pentapeptidů a nonapeptidů podílí jak rozdělování, tak adsorpce, tudíž retence je určována kombinací obou procesů.

Z Waltersova testu je patrné, že indexy hydrofobicity (HI) jsou velmi nízké pro všechny testované stacionární fáze, což je ve shodě s polárním charakterem testovaných kolon. Nejnižší hodnota HI byla získána pro nederivatizovaný cyklofruktan (Frulic-N CF6), neboť tato stacionární fáze má z testovaných kolon nejvíce polární charakter, vzhledem k velkému množství přítomných polárních hydroxylových skupin. Díky derivatizaci hydroxylových skupin isopropylem se sníží polarita stacionární fáze (Larihc CF6-P), což se projeví vzrůstem hodnoty HI. Silanolový index (SI) poskytuje informaci o interakci analytů s volnými silanolovými skupinami. Hodnoty SI jsou pro všechny tři testované kolony srovnatelné a oproti kolonám používaným v RP-HPLC relativně vysoké. Modifikace silikagelové stacionární fáze cyklofruktany nemá významný vliv na hodnoty SI.

Molekulární interakce uplatňující se v daných separačních systémech byly porovnány metodou LFER ve třech mobilních fázích o složení acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00 v různých objemových poměrech: 88/12, 83/17, 80/20 (v/v). Regresní koeficienty byly získány multidimenzionální lineární regresní analýzou retenčních dat sady čtyřiceti testovacích analytů. Korelace experimentálně získaného $\log k$ a předpovězeného $\log k$ podle LFER modelu poskytuje korelační koeficienty vyšší než 0,97 pro cyklofruktanové stacionární fáze. Pro silikagelovou SP se korelační koeficienty pohybovaly od 0,91 do 0,93.

Regresní koeficient e byl statisticky významný pouze u chromatografické kolony Frulic-N CF6 při složení mobilní fáze acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 80/20 (v/v). Jeho negativní hodnota znamená, že analyty, které mají schopnost interagovat pomocí n- a π -elektronů, budou přednostně interagovat s mobilní fází, což povede ke snížení jejich retence.

Regresní koeficient s (udává rozdíl v dipolaritě/polarizibilitě) byl statisticky nevýznamný u silikagelové SP při všech testovaných mobilních fázích, což znamená, že daný typ interakce, který představuje regresní koeficient s , je shodný v mobilní i stacionární fázi, a proto se významně nepodílí na retenci. Regresní koeficient s byl

pozitivní a statisticky významný pro cyklofruktanové stacionární fáze. Je vidět, že s nárůstem obsahu pufru v mobilní fázi roste i regresní koeficient s , což může souviset se sorpcí složek mobilní fáze na povrchu stacionární fáze. Vyšších hodnot regresního koeficientu s bylo dosaženo pro kolonu Frulic-N CF6 v porovnání s kolonou Larihc CF6-P. Derivatizace hydroxylových skupin nativního cyklofruktanu isopropylem snižuje schopnost dipolarity/polarizibility.

Nejvyšší kladné hodnoty pro všechny stacionární fáze dosáhl regresní koeficient b . Z toho vyplývá, že všechny stacionární fáze mají silnou schopnost působit jako donor vodíku pro vodíkovou vazbu. Regresní koeficient b nabýval nejnížší hodnoty pro silikagelovou SP a při změně mobilní fáze se jeho hodnota neměnila. Nativní cyklofruktan obsahuje nejvíce skupin schopných podílet se na daném typu interakce, derivatizace isopropylem snižuje počet těchto interakčních míst, což se projeví snížením koeficientu b .

Regresní koeficient v , který charakterizuje disperzní interakce, byl statisticky nevýznamný u silikagelové SP. U cyklofruktanových stacionárních fází nabýval koeficient v negativní hodnoty pro všechny testované mobilní fáze. Změna disperzních interakcí, v RP-HPLC nazývána hydrofobicita, je ve shodě s výsledky získanými Waltersovým testem, kdy nejnížší hydrofobicity bylo dosaženo pro Frulic-N CF6 kolonu. Se zvyšujícím se obsahem vodné složky v mobilní fázi se zvyšuje záporná hodnota koeficientu v .

Regresní koeficient a byl statisticky nevýznamný pro všechny testované separační systémy.

Na základě provedených testů byl prokázán multimodální retenční mechanismus na všech testovaných kolonách. Bylo ukázáno, že modifikace silikagelové stacionární fáze cyklofruktany přináší další interakční možnosti, zvyšuje separační účinnost a selektivitu v hydrofilní interakční kapalinové chromatografii.

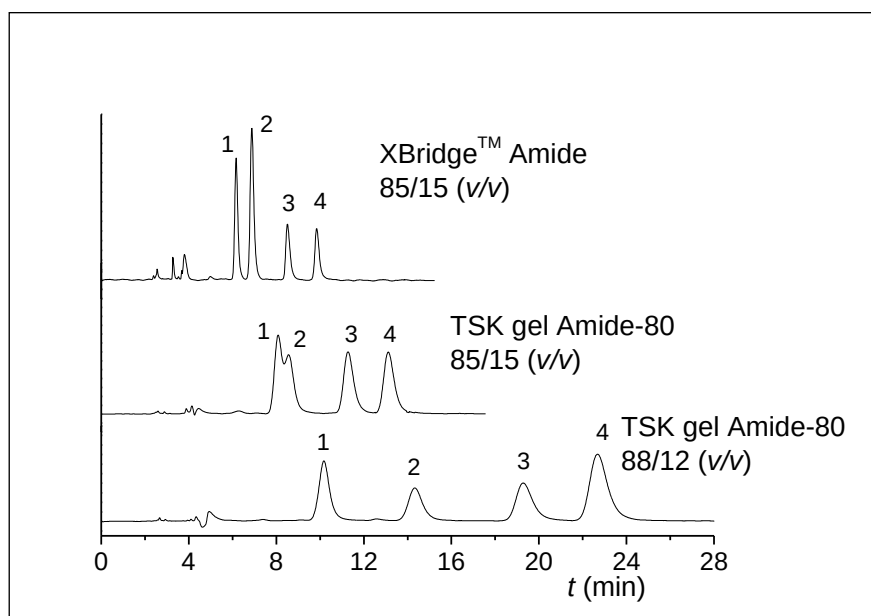
4.2.2 Porovnání vlastností dvou amidových stacionárních fázi v HILIC – Publikace III

Velmi často používané fáze v HILIC systémech jsou amidové stacionární fáze. Vzhledem k tomu, že se obecně vlastnosti „stejných“ chromatografických kolon od různých výrobců mohou lišit, byly charakterizovány a porovnány dvě amidové fáze. Konkrétně byly studovány tyto chromatografické kolony:

- Kolona XBridgeTM Amide o rozměrech 250 mm × 4,6 mm, s velikostí částic 3,5 µm a velikostí pórů 130 nm (Waters, Milford, USA)
- Kolona TSK gel Amide-80 o rozměrech 250 mm × 4,6 mm, s velikostí částic 5 µm a velikostí pórů 80 nm (Tosoh, Tokyo, Japonsko).

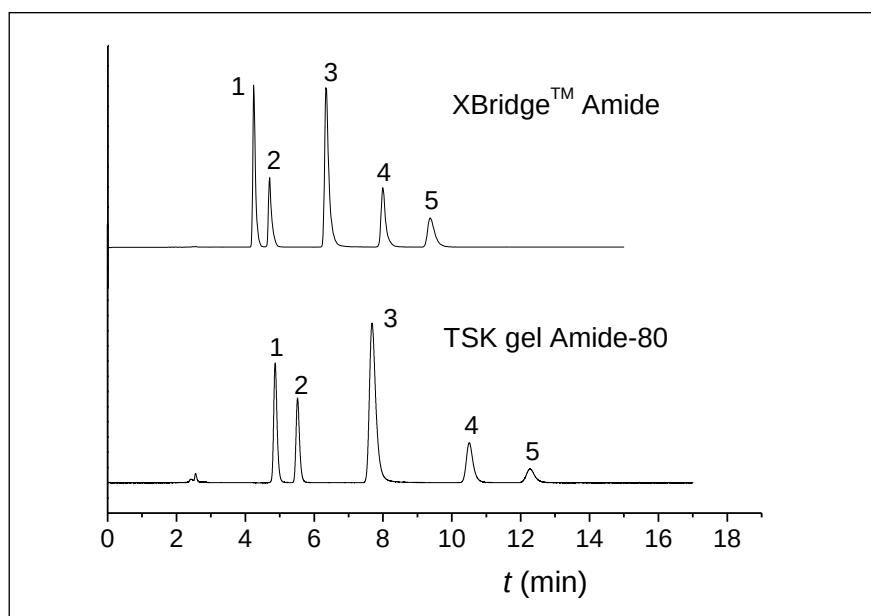
I když obě kolony obsahují shodný ligand, mohou, díky různým technologiím přípravy, poskytovat různé retenční vlastnosti a různou selektivitu. Ke komplexní charakterizaci studovaných separačních systémů byla použita řada testů. K porovnání separační účinnosti byly vybrány modelové látky zastupující biologicky zajímavé malé molekuly, a to vybrané pentapeptidy a nukleobáze. Pro porovnání a charakterizaci obou kolon byla dále použita metoda LFER, testy selektivity pro různé funkční skupiny, test bazických látek a vliv teploty na separaci.

Optimální složení mobilní fáze pro separaci směsi pentapeptidů na koloně XBridgeTM Amide bylo acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 85/15 (v/v). Při tomto složení mobilní fáze došlo k separaci všech studovaných analytů až na základní linii, doba analýzy nepřesáhla 10 minut. Při separaci pentapeptidů na koloně TSK gel Amide-80 za použití stejné mobilní fáze došlo ke koeluci leucin enkefalinu a [D-Ala³]leucin enkefalinu. Rozlišení všech studovaných pentapeptidů na druhé koloně bylo dosaženo při složení mobilní fáze acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 88/12 (v/v). Kolona XBridgeTM Amide poskytuje vyšší separační účinnost, ke které výrazně přispívá menší zrněné stacionární fáze (3,5 µm) oproti koloně TSK gel Amide-80 (5 µm). Chromatogramy pro porovnání separace směsi pentapeptidů jsou uvedeny na obrázku 4.9.



Obrázek 4.9 Chromatogramy separace směsi pentapeptidů na koloně XBridge™ Amide a TSK gel Amide-80. Složení mobilní fáze: acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00; poměr organické a vodné fáze je uveden pod názvem kolony; průtok 1 ml/min; teplota kolony 25 °C; UV detekce při 220 nm; eluční pořadí analytů: 1, leucin enkefalin amid 2, [D-Ala²]leucin enkefalin 3, leucin enkefalin 4, [Met⁵]enkefalin.

Druhou skupinou látek, strukturně odlišných od pentapeptidů, separovaných na amidových kolonách byly nukleobáze (thymin, uracil, adenin, cytosin, guanin). Optimální složení mobilní fáze pro separaci nukleobází bylo shodné pro obě testované kolony: acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 85/15 (v/v). Při tomto složení mobilní fáze došlo k separaci všech testovaných nukleobází až na základní linii na obou stacionárních fázích. Kolona XBridge™ Amide však poskytovala vyšší účinnost vzhledem k menší velikosti částic. Chromatogramy separace nukleobází jsou uvedeny na obrázku 4.10.



Obrázek 4.10 Chromatogramy separace nukleobází na kolonách XBridge™ Amide a TSK gel Amide-80. Složení mobilní fáze: acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 85/15 (v/v); průtok 1 ml/min; teplota kolony 25 °C; UV detekce při 220 nm; eluční pořadí analytů: 1, thymin 2, uracil 3, adenin 4, cytosin 5, guanin.

Na základě vyhodnocení závislostí mezi retencí a eluční silou mobilní fáze navržených Schoenmakerem [155] a Snyderem a Soczewinským [156] bylo zjištěno, že retenční mechanismus separace pentapeptidů, nonapeptidů a nukleobází je multimodální proces, na kterém se podílí jak rozdělování, tak adsorpce.

K porovnání amidových kolon metodou LFER byla zvolena mobilní fáze acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 85/15 (v/v). Regresní koeficienty LFER rovnice byly získány proměřením sady 39 testovacích analytů. Korelační koeficient byl pro obě testované kolony vyšší než 0,96, což naznačuje velmi dobrou korelaci s experimentálními daty. Regresní koeficient v je záporný a srovnatelný pro obě testované stacionární fáze, proto se hydrofóbnější látky budou za daných separačních podmínek méně zdržovat. Regresní koeficienty e a s jsou statisticky nevýznamné, což znamená, že se jimi popsané interakce za daných separačních podmínek nepodílejí na retenci. Regresní koeficienty a a b , které vyjadřují schopnost interagovat pomocí vodíkových vazeb, nabývají statisticky významných pozitivních hodnot u obou kolon.

Podle LFER modelu vykazuje kolona TSK gel Amide-80 vyšší hodnoty regresních koeficientů a a b , což odpovídá vyšší schopnosti interagovat pomocí vodíkových interakcí.

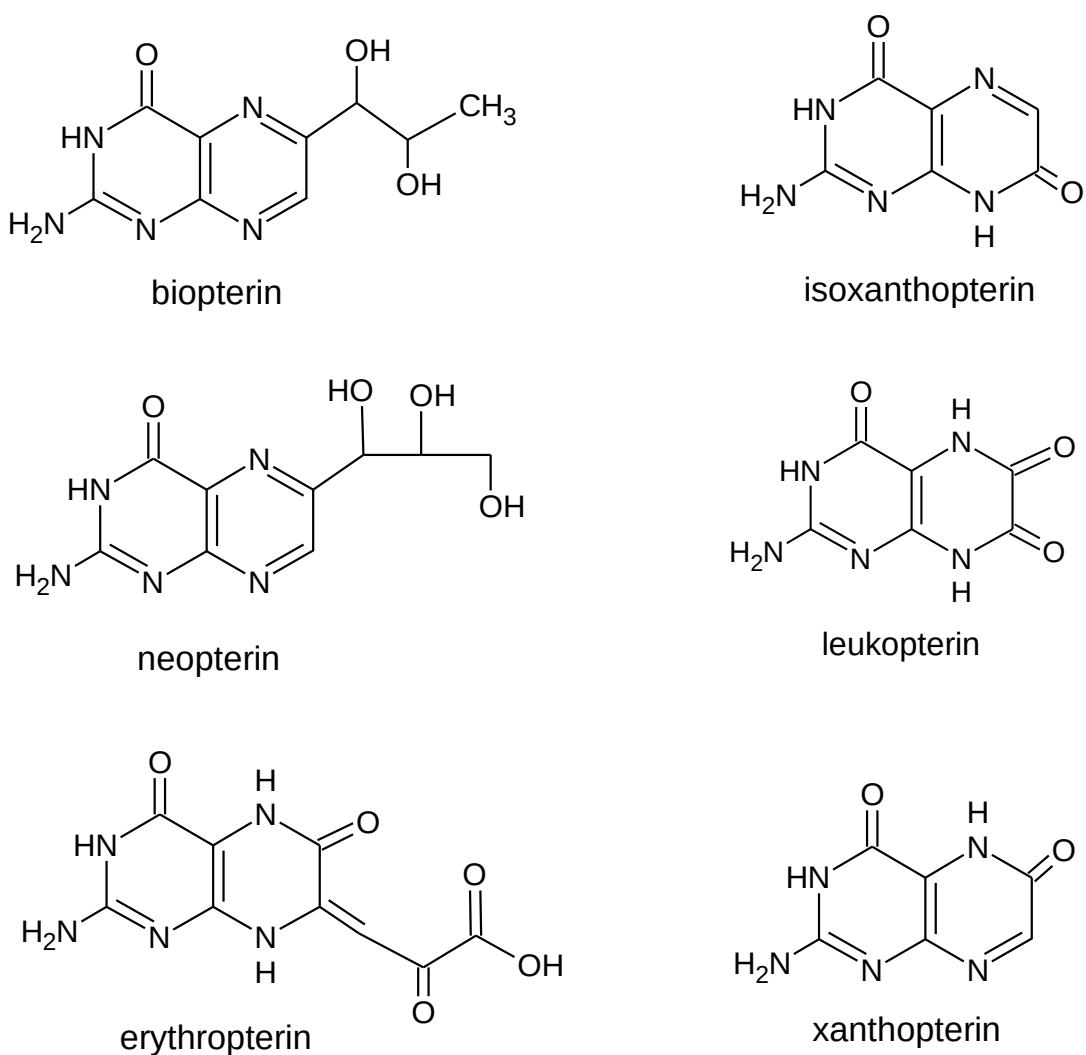
Z výsledků testů selektivity pro hydroxylovou skupinu vyplývá, že obě separační kolony poskytují shodnou selektivitu pro hydroxylovou skupinu. Větší selektivita pro aminoskupinu byla prokázána na koloně TSK gel Amide-80, což je ve shodě s LFER výsledky (vyšší hodnota regresního koeficientu b), neboť aminoskupiny mohou interagovat pomocí vodíkových interakcí.

Iontové interakce byly testovány pomocí vybraných bazických látek. Při složení mobilní fáze acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00, 85/15 (v/v) poskytovala kolona TSK gel Amide-80 větší možnosti uplatnění iontově-výměnné (kation-výměnné) interakce oproti koloně XBridgeTM Amide.

Je známo, že teplota kolony může mít vliv na retenci a selektivitu separačního procesu. Na základě studia vlivu teploty na retenci vybraných analytů nebyl zaznamenán zásadní rozdíl mezi testovanými kolonami. U testovaných analytů docházelo ke snižování retence se zvyšující se teplotou na koloně. Se změnou teploty nedocházelo ke změně retenčního mechanismu.

4.2.3 Analýza pterinů v ploštících *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* pomocí HILIC-MS/MS – Publikace IV

Aplikační možnosti separačního systému HILIC v kombinaci s vhodnou detekcí ukazuje publikace IV. Cílem bylo nalézt vhodnou LC metodu k identifikaci a ke stanovení šesti pterinů, jmenovitě biopterinu, isoxanthopterinu, xanthopterinu, leukopterinu, neopterinu a erythropterinu, jejichž struktury jsou uvedeny na obrázku 4.11, v různých formách ploštic *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum*.



Obrázek 4.11 Struktura studovaných pterinů.

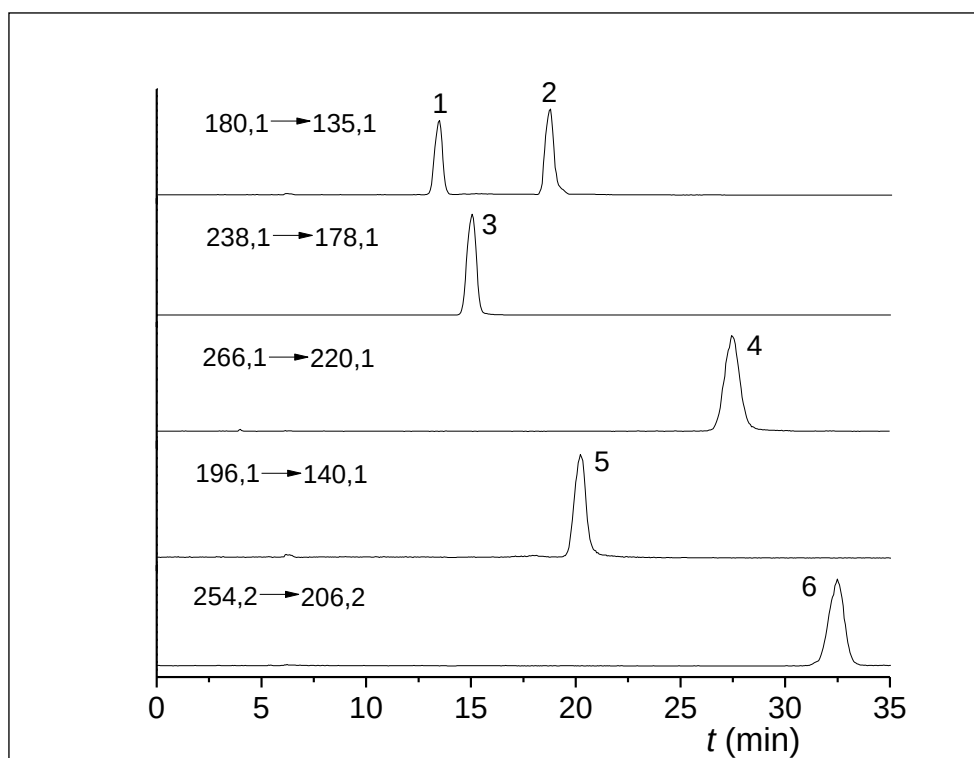
Vzhledem k vysoké polaritě studovaných analytů byla k separaci zvolena hydrofilní interakční kapalinová chromatografie. Byly testovány dvě komerčně dostupné chromatografické kolony určené pro HILIC:

- Atlantis HILIC Silica o rozměrech 150 mm × 4,6 mm, s velikostí částic 3 µm (Waters, Milford, USA)
- ZIC-HILIC o rozměrech 150 mm × 4,6 mm, s velikostí částic 3,5 µm (Merck, Darmstadt, Německo).

K detekci byla zvolena tandemová hmotnostní spektrometrie (trojitý kvadrupól). Podle literatury nebyl takový přístup v analýze pterinů v kutikulách hmyzu doposud použit.

Bylo optimalizováno nastavení hmotnostního spektrometru. Měření byla prováděna v MRM módu, proto byly nejdříve nalezeny vhodné prekurzorové a produktové ionty studovaných analytů. Bylo optimalizováno nastavení parametrů elektrospreje s „Jet stream“ technologií v závislosti na složení a průtoku mobilní fáze.

Největší vliv na retenci a separaci studovaných pterinů na obou kolonách měla změna poměru organické a vodné složky v mobilní fázi. Na základě optimalizace separace studovaných pterinů s ohledem na tandemovou hmotnostní detekci byl zvolen separační systém skládající se z kolony ZIC-HILIC a mobilní fáze acetonitril/5 mM octan amonný, pH = 6,80, 85/15 (v/v), průtok mobilní fáze 0,5 ml/min a teplota kolony 30 °C. Výsledky analýzy standardů studovaných pterinů za optimálních LC a MS podmínek ukazuje obrázek 4.12.



Obrázek 4.12 Chromatogramy separace standardů pterinů o koncentraci = 625 ng/ml na koloně ZIC-HILIC. Složení mobilní fáze: acetonitril/5 mM octan amonný, pH = 6,80, 85/15 (v/v); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; MS/MS detekce v MRM módu; označení analytů: 1, isoxanthopterin 2, xanthopterin 3, biopterin 4, erythropterin 5, leukopterin 6, neopterin.

Kvantifikace byla prováděna na základě kalibrační přímky sestavené pomocí vážené lineární regrese ($1/x^2$) závislosti velikosti ploch píků na koncentraci analytů. Limity detekce se pohybovaly od 0,1 ng/ml pro biopterin až po 6,2 ng/ml pro erythropterin. Matriční efekty byly vyhodnoceny na základě srovnání výsledků obsahu pterinů v červené formě *Graphosoma lineatum* získaných metodou kalibrační křivky a metodou standardního přídatku. Při analýze pterinů v kutikule *Graphosoma lineatum* nedocházelo k ovlivnění ionizace matričními efekty. Dále byla ověřována selektivita, přenos vzorku, denní a mezidenní přesnost a správnost. Přesnost měření dané metody se pohybovala od 0,79 % do 8,09 % a správnost měření se pohybovala od 1,85 % do 9,63 %.

Nově vyvinutá a validovaná metoda HILIC-MS/MS byla použita ke stanovení vybraných pterinů ve čtyřech formách *Graphosoma lineatum* (larvální, světlá, žlutá a červená) a jedné formě *Graphosoma semipunctatum* (oranžová). Výsledky analýzy

obsahu pterinů jednotlivých forem *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* jsou uvedeny v tabulce 4.1.

Tabulka 4.1 Množství pterinů, vyjádřené jako množství analytu v µg na 1 mg integumentu, v různých formách *Graphosoma lineatum* (GL.) and *Graphosoma semipunctatum* (GS.); relativní standardní odchylka je uvedena v závorce

Analyt	GL. červená forma	GS. oranžová forma	GL. žlutá forma	GL. světlá forma	GL. larvální forma
biopterin	0,77 (5,19)	5,24 (6,53)	1,18 (4,82)	-	0,14 (7,22)
neopterin	-	-	3,98 (3,14)	-	-
xanthopterin	-	-	-	-	-
isoxanthopterin	12,01 (11,23)	211,88 (13,21)	30,34 (8,09)	11,03 (11,28)	2,63 (9,02)
erythropterin	190,76 (9,65)	29,43 (6,86)	136,05 (8,33)	16,44 (4,99)	-
leukopterin	119,67 (12,11)	127,60 (10,76)	51,16 (7,38)	256,17 (5,92)	-

Z tabulky 4.1 je vidět, že xanthopterin nebyl nalezen v žádné analyzované formě. Neopterin se vyskytoval pouze u žluté formy. Isoxanthopterin se vyskytoval ve všech studovaných formách v různém množství. Larvální forma obsahovala pouze isoxanthopterin a malé množství biopterinu. Z uvedených výsledků je vidět, že jednotlivé formy *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* mají rozdílné obsahy studovaných pterinů, což ovlivňuje zabarvení ploštic.

4.3 Literatura II

- [1] Hemstrom, P., Irgum, K.: J. Sep. Sci. 29 (2006) 1784-1821.
- [2] Alpert, A. J.: J. Chromatogr. 499 (1990) 177-196.
- [3] Linden, J. C., Lawhead, C. L.: J. Chromatogr. 105 (1975) 125-133.
- [4] Buszewski, B., Noga, S.: Anal. Bioanal. Chem. 402 (2012) 231-247.
- [5] Novakova, L., Kaufmannova, I., Janska, R.: J. Sep. Sci. 33 (2010) 765-772.
- [6] Bernal, J., Ares, A. M., Pol, J., Wiedmer, S. K.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 7438-7452.
- [7] Li, R. P., Guo, Y. L., Yuan, Q.: J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 34 (2011) 1112-1132.
- [8] Ares, A. M., Bernal, J.: Cent. Eur. J. Chem. 10 (2012) 534-553.
- [9] Gama, M. R., Silva, R. G. D., Collins, C. H., Bottoli, C. B. G.: Trends Anal. Chem. 37 (2012) 48-60.
- [10] Berthod, A., Chang, S. S. C., Kullman, J. P. S., Armstrong, D. W.: Talanta 47 (1998) 1001-1012.
- [11] Gritti, F., Guiochon, G.: J. Chromatogr. A 1099 (2005) 1-42.
- [12] Guo, Y., Gaiki, S.: J. Chromatogr. A 1074 (2005) 71-80.
- [13] Hao, Z., Xiao, B., Weng, N.: J. Sep. Sci. 31 (2008) 1449-1464.
- [14] Chirita, R. I., West, C., Zubrzycki, S., Finaru, A. L., Elfakir, C.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5939-5963.
- [15] Jandera, P.: Anal. Chim. Acta 692 (2011) 1-25.
- [16] McCalley, D. V.: J. Chromatogr. A 1171 (2007) 46-55.
- [17] McCalley, D. V., Neue, U. D.: J. Chromatogr. A 1192 (2008) 225-229.
- [18] Yoshida, T.: J. Biochem. Biophys. Methods 60 (2004) 265-280.
- [19] Boumahraz, M., Davydov, V. Y., Kiselev, A. V.: Chromatographia 15 (1982) 751-756.
- [20] Majors, R. E.: J. Chromatogr. Sci. 18 (1980) 488-511.
- [21] Orth, P., Engelhardt, H.: Chromatographia 15 (1982) 91-96.
- [22] Verhaar, L. A. T., Kuster, B. F. M.: J. Chromatogr. 234 (1982) 57-64.
- [23] Nikolov, Z. L., Reilly, P. J.: J. Chromatogr. 325 (1985) 287-293.

- [24] Kalikova, K., Kozlik, P., Gilar, M., Tesarova, E.: J. Sep. Sci. 36 (2013) 2421-2429.
- [25] Karatapanis, A. E., Fiamegos, Y. C., Stalikas, C. D.: Chromatographia 71 (2010) 751-759.
- [26] Kozlik, P., Simova, V., Kalikova, K., Bosakova, Z., Armstrong, D. W., Tesarova, E.: J. Chromatogr. A 1257 (2012) 58-65.
- [27] Padivitage, N. L. T., Armstrong, D. W.: J. Sep. Sci. 34 (2011) 1636-1647.
- [28] Jandera, P., Hajek, T.: J. Sep. Sci. 32 (2009) 3603-3619.
- [29] Guo, Y., Gaiki, S.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5920-5938.
- [30] Chauve, B., Guillarme, D., Cleon, P., Veuthey, J.L.: J. Sep. Sci. 33 (2010) 752-764.
- [31] Kirkland, J. J., Dilks, C. H., Destefano, J. J.: J. Chromatogr. 635 (1993) 19-30.
- [32] Li, R. P., Huang, J. X.: J. Chromatogr. A 1041 (2004) 163-169.
- [33] Strege, M. A.: Anal. Chem. 70 (1998) 2439-2445.
- [34] Huang, H. X., Guo, H. Y., Xue, M. Y., Liu, Y. J., Yang, J. J., Liang, X. M., Chu, C. H.: Talanta 85 (2011) 1642-1647.
- [35] Jia, S., Park, J. H., Lee, J., Kwon, S. W.: Talanta 85 (2011) 2301-2306.
- [36] Kovarikova, P., Stariat, J., Klimes, J., Hruskova, K., Vavrova, K.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 416-426.
- [37] Liu, Q. X., Xu, L. Y., Ke, Y. X., Jin, Y., Zhang, F. F., Liang, X. M.: J. Pharm. Biomed. Anal. 54 (2011) 623-628.
- [38] Gezici, O., Kara, H.: Talanta 85 (2011) 1472-1482.
- [39] Kobe, R., Ishihara, Y., Takano, J., Kitami, H.: Bunseki Kagaku 60 (2011) 859-863.
- [40] Schuster, G., Lindner, W.: Anal. Bioanal. Chem. 400 (2011) 2539-2554.
- [41] Singer, D., Kuhlmann, J., Muschket, M., Hoffmann, R.: Anal. Chem. 82 (2010) 6409-6414.
- [42] Gilar, M., Jaworski, A.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 8890-8896.
- [43] Gilar, M., Yu, Y. Q., Ahn, J., Xie, H. W., Han, H. H., Ying, W. T., Qian, X. H.: Anal. Biochem. 417 (2011) 80-88.
- [44] Chen, P., Li, W., Li, Q., Wang, Y. H., Li, Z. G., Ni, Y. F., Koike, K.: Talanta 85 (2011) 1634-1641.
- [45] Gupta, P. K., Brown, J., Biju, P. G., Thaden, J., Deutz, N. E., Kumar, S., Hauer-Jensen, M., Hendrickson, H. P.: Anal. Methods 3 (2011) 1759-1768.

- [46] Karatapanis, A. E., Fiamegos, Y. C., Stalikas, C. D.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2871-2879.
- [47] Feng, J. T., Guo, Z. M., Shi, H., Gu, J. P., Jin, Y., Liang, X. M.: Talanta 81 (2010) 1870-1876.
- [48] Pack, B. W., Risley, D. S.: J. Chromatogr. A 1073 (2005) 269-275.
- [49] Dejaegher, B., Heyden, Y. V.: J. Sep. Sci. 33 (2010) 698-715.
- [50] Jandera, P.: J. Sep. Sci. 31 (2008) 1421-1437.
- [51] Qiu, H. X., Loukotkova, L., Sun, P., Tesarova, E., Bosakova, Z., Armstrong, D. W.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 270-279.
- [52] Kawamura, M., Uchiyama, T., Kuramoto, T., Tamura, Y., Mizutani, K.: Carbohydr. Res. 192 (1989) 83-90.
- [53] Sun, P., Wang, C. L., Breitbach, Z. S., Zhang, Y., Armstrong, D. W.: Anal. Chem. 81 (2009) 10215-10226.
- [54] Janeckova, L., Kalikova, K., Vozka, J., Armstrong, D. W., Bosakova, Z., Tesarova, E.: J. Sep. Sci. 34 (2011) 2639-2644.
- [55] Kalikova, K., Janeckova, L., Armstrong, D. W., Tesarova, E.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1393-1398.
- [56] Sun, P., Wang, C. L., Padivitage, N. L. T., Nanayakkara, Y. S., Perera, S., Qiu, H. X., Zhang, Y., Armstrong, D. W.: Analyst 136 (2011) 787-800.
- [57] Vozka, J., Kalikova, K., Janeckova, L., Armstrong, D. W., Tesarova, E.: Anal. Lett. 45 (2012) 2344-2358.
- [58] Gondova, T., Petrovaj, J., Kutschy, P., Armstrong, D. W.: J. Chromatogr. A 1272 (2013) 100-105.
- [59] Perera, S., Na, Y. C., Doundoulakis, T., Ngo, V. J., Feng, Q., Breitbach, Z. S., Lovely, C. J., Armstrong, D. W.: Chirality 25 (2013) 133-140.
- [60] Zhang, Y. J., Huang, M. X., Zhang, Y. P., Armstrong, D. W., Breitbach, Z. S., Ryoo, J. J.: Chirality 25 (2013) 735-742.
- [61] Yoshida, T.: Anal. Chem. 69 (1997) 3038-3043.
- [62] Karlsson, G., Winge, S., Sandberg, H.: J. Chromatogr. A 1092 (2005) 246-249.
- [63] Propagační materiál Tosoh Bioscience: *TSKgel Amide-80 Columns for Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*; dostupné na URL:

<http://www.separations.eu.tosohbioscience.com/NR/rdonlyres/2FABDA77-D538-4AA4-AD22-451871C64870/0/B07L03A_TSKgelAmide80_HILIC_brochure.pdf>

[cit. 15.4.2014].

[64] Propagační materiál Waters: *A Review of Waters Hybrid Particle Technology*; dostupné naURL:

<<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001159en.pdf>>

[cit.15.4.2014].

[65] Olsovska, J., Jurkova, M.: Kvasny Prum. 58 (2012) 30-35.

[66] Ivesic, M., Babic, S., Krivohlavek, A., Smit, Z.: Anal. Methods 5 (2013) 5188-5194.

[67] Kokotou, M. G., Thomaidis, N. S.: Chromatographia 75 (2012) 457-467.

[68] Zhao, H. Q., Wang, X., Li, H. M., Yang, B., Yang, H. J., Huang, L. Q.: Molecules 18 (2013) 9755-9769.

[69] Propagační materiál Waters: *XBridge Amide Column*; dostupné naURL:

<<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003232en.pdf>>

[cit.15.4.2014].

[70] Jiang, W., Irgum, K.: Anal. Chem. 71 (1999) 333-344.

[71] Viklund, C., Irgum, K.: Macromolecules 33 (2000) 2539-2544.

[72] Jiang, W., Irgum, K.: Anal. Chem. 74 (2002) 4682-4687.

[73] Wikberg, E., Verhage, J. J., Viklund, C., Irgum, K.: J. Sep. Sci. 32 (2009) 2008-2016.

[74] Propagační materiál Merck: *A Practical Guide to HILIC*; dostupné naURL:

<http://www.sequant.com/files/documents/support/MerckSeQuant.ZIC-HILIC.Technical_Guide.A_Practical_Guide_to_HILIC.pdf>

[cit.15.4.2014].

[75] Arora, B., Narayanasamy, A., Nirmal, J., Halder, N., Patnaik, S., Ravi, A. K., Velpandian, T.: J. Chromatogr. B 944 (2014) 49-54.

[76] Sriboonvorakul, N., Leepipatpiboon, N., Dondorp, A. M., Pouplin, T., White, N. J., Tarning, J., Lindegardh, N.: J. Chromatogr. B 941 (2013) 116-122.

[77] Di Palma, S., Boersema, P. J., Heck, A. J. R., Mohammed, S.: Anal. Chem. 83 (2011) 3440-3447.

- [78] Neue, K., Mormann, M., Peter-Katalinic, J., Pohlentz, G.: *J. Proteome Res.* 10 (2011) 2248-2260.
- [79] Marrubini, G., Pedrali, A., Hemstrom, P., Jonsson, T., Appelblad, P., Massolini, G.: *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 3493-3502.
- [80] Sentkowska, A., Biesaga, M., Pyrzynska, K.: *Talanta* 115 (2013) 284-290.
- [81] Kozlik, P., Krajicek, J., Kalikova, K., Tesarova, E., Cabala, R., Exnerova, A., Stys, P., Bosakova, Z.: *J. Chromatogr. B* 930 (2013) 82-89.
- [82] Tan, L. C., Carr, P. W., Abraham, M. H.: *J. Chromatogr. A* 752 (1996) 1-18.
- [83] Kawachi, Y., Ikegami, T., Takubo, H., Ikegami, Y., Miyamoto, M., Tanaka, N.: *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5903-5919.
- [84] Schuster, G., Lindner, W.: *J. Chromatogr. A* 1301 (2013) 98-110.
- [85] Neue, V. D.: *HPLC columns, theory, technology and practice*, New York 1997.
- [86] Unger, K. K.: *Packings and stationary phases in chromatographic techniques*, New York 1990.
- [87] Schott, R. P. W.: *Silica Gel and Bonded Phases. Their Production, Properties and Use in LC*, New York 1993.
- [88] Claessens, H. A., van Straten, M. A., Cramers, C. A., Jezierska, M., Buszewski, B.: *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 135-156.
- [89] Euerby, M., Petersson, P.: *J. Chromatogr. A* 994 (2003) 13-36.
- [90] Cruz, E., Euerby, M. R., Johnson, C. M., Hackett, C. A.: *Chromatographia* 44 (1997) 151-161.
- [91] Cole, L. A., Dorsey, J. G.: *Anal. Chem.* 64 (1992) 1317-1323.
- [92] Cole, L. A., Dorsey, J. G., Dill, K. A.: *Anal. Chem.* 64 (1992) 1324-1327.
- [93] Kimata, K., Iwaguchi, K., Onishi, S., Jinno, K., Eksteen, R., Hosoya, K., Araki, M., Tanaka, N.: *J. Chromatogr. Sci.* 27 (1989) 721-728.
- [94] Engelhardt, H., Jungheim, M.: *Chromatographia* 29 (1990) 59-68.
- [95] Walters, M. J.: *J. AOAC Int.* 70 (1987) 465-469.
- [96] Nahum, A., Horvath, C.: *J. Chromatogr.* 203 (1981) 53-63.
- [97] Galushko, S. V.: *Chromatographia* 36 (1993) 39-42.
- [98] Vitha, M., Carr, P. W.: *J. Chromatogr. A* 1126 (2006) 143-194.
- [99] Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A.: *Chromatographia* 76 (2013) 211-226.
- [100] Fujita, T., Hansch, C., Iwasa, J.: *J. Am. Chem. Soc.* 86 (1964) 5175-5180.

- [101] Hansch, C., Fujita, T.: J. Am. Chem. Soc. 86 (1964) 1616-1626.
- [102] Poole, C. F., Poole, S. K.: J. Chromatogr. A 965 (2002) 263-299.
- [103] Sandi, A., Nagy, M., Szepeszy, L.: J. Chromatogr. A 893 (2000) 215-234.
- [104] Abraham, M. H., Whiting, G. S., Doherty, R. M., Shuely, W. J.: J. Chromatogr. 587 (1991) 213-228.
- [105] Abraham, M. H., Andonianhaftvan, J., Whiting, G. S., Leo, A., Taft, R. S.: Perkin Trans. 2 (1994) 1777-1791.
- [106] Abraham, M. H., McGowan, J. C.: Chromatographia 23 (1987) 243-246.
- [107] Abraham, M. H.: Chem. Soc. Rev. 22 (1993) 73-83.
- [108] Janeckova, L., Kalikova, K., Bosakova, Z., Tesarova, E.: J. Sep. Sci. 33 (2010) 3043-3051.
- [109] Kalikova, K., Lokajova, J., Tesarova, E.: J. Sep. Sci. 29 (2006) 1476-1485.
- [110] Quiming, N. S., Denola, N. L., Saito, Y., Catabay, A. P., Jinno, K.: Chromatographia 67 (2008) 507-515.
- [111] Quiming, N. S., Denola, N. L., Saito, Y., Jinno, K.: Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 1693-1706.
- [112] Jandera, P., Hajek, T., Skerikova, V., Soukup, J.: J. Sep. Sci. 33 (2010) 841-852.
- [113] Michel, M., Baczek, T., Studzinska, S., Bodzioch, K., Jonsson, T., Kaliszan, R., Buszewski, B.: J. Chromatogr. A 1175 (2007) 49-54.
- [114] Tomandl, J.: Chem. Listy 92 (1998) 689-697.
- [115] Bel, Y., Porcar, M., Socha, R., Nemec, V., Ferre, J.: Arch. Insect Biochem. Physiol. 34 (1997) 83-98.
- [116] Tomsikova, H., Tomsik, P., Solich, P., Novakova, L.: Bioanalysis 5 (2013) 2307-2326.
- [117] White, R. H.: Biochemistry 35 (1996) 3447-3456.
- [118] Armarego, W. L. F., Randles, D.: *Chemistry and Biochemistry of Pteridines*, New York 1983.
- [119] Soniat, M., Martin, C. B.: Pteridines 19 (2008) 120-124.
- [120] Albert, A., Brown, D. J., Cheeseman, G.: J. Chem. Soc. (1952) 4219-4232.
- [121] Schuttelkopf, A. W., Hardy, L. W., Beverley, S. M., Hunter, W. N.: J. Mol. Biol. 352 (2005) 105-116.

- [122] Takeda, T., Hamazaki, T., Wakahara, R., Fujioka, H., Niihira, S., Shintaku, H.: Pteridines 23 (2012) 104-109.
- [123] Rubenstein, M., Muchnik, S., Garber, S. L., Arruda, J. A. L., Dunea, G.: Int. J. Biochem. 25 (1993) 1873-1880.
- [124] Wood, J. M., Schallreuterwood, K. U., Lindsey, N. J., Callaghan, S., Gardner, M. L. G.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 206 (1995) 480-485.
- [125] Krut, J. J., Mellberg, T., Price, R. W., Hagberg, L., Fuchs, D., Rosengren, L., Nilsson, S., Zetterberg, H., Gisslen, M.: PLoS One 9 (2014) 1-7.
- [126] Price, R. W., Peterson, J., Fuchs, D., Angel, T. E., Zetterberg, H., Hagberg, L., Spudich, S., Smith, R. D., Jacobs, J. M., Brown, J. N., Gisslen, M.: J. Neuroimmune Pharmacol. 8 (2013) 1147-1158.
- [127] Weitgasser, R., Lechleitner, M., Koch, T., Galvan, G., Muhlmann, J., Steiner, K., Hoppichler, F.: Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 111 (2003) 127-131.
- [128] Copikova, J., Uher, M., Lapcik, O., Moravcova, J., Drasar, P.: Chem. Listy 99 (2005) 802-816.
- [129] Nemec, V., Breuer, M., De Loof, A.: Eur. J. Entomol. 100 (2003) 19-23.
- [130] Johansen, A. I., Exnerova, A., Svadova, K. H., Stys, P., Gamberale-Stille, G., Tullberg, B. S.: Ecol. Entomol. 35 (2010) 602-610.
- [131] Tullberg, B. S., Gamberale-Stille, G., Bohlin, T., Merilaita, S.: Behav. Ecol. Sociobiol. 62 (2008) 1389-1396.
- [132] Ruxton, G. D., Sherratt, T. N., Speed, M. P.: *Avoiding Attack: The Evolutionary Ecology of Crypsis, Warning Signals and Mimicry*, Oxford University Press, New York 2004.
- [133] Canada-Canada, F., Espinosa-Mansilla, A., Munoz de la Pena, A., Mancha de Llanos, A.: Anal. Chim. Acta 648 (2009) 113-122.
- [134] Espinosa-Mansilla, A., Munoz de la Pena, A., Canada-Canada, F., Mancha de Llanos, A.: Talanta 77 (2008) 844-851.
- [135] Flavall, E. A., Crone, E. M., Moore, G. A., Gieseg, S. P.: J. Chromatogr. 863 (2008) 167-171.
- [136] Stea, B., Halpern, R. M., Halpern, B. C., Smith, R. A.: Clin. Chim. Acta 113 (1981) 231-242.
- [137] Majors, R. E.: LC GC N. Am. 24 (2006) 16-20.

- [138] Walter, T. H., Iraneta, P., Capparella, M.: *J. Chromatogr. A* 1075 (2005) 177-183.
- [139] Shi, Z.-G., Wu, Y.-B., Luo, Y.-B., Feng, Y.Q.: *Chromatographia* 71 (2010) 761-768.
- [140] Gamagedara, S., Gibbons, S., Ma, Y.: *Clin. Chim. Acta* 412 (2011) 120-128.
- [141] Gibbons, S. E., Stayton, I., Ma, Y.: *Electrophoresis* 30 (2009) 3591-3597.
- [142] Koslinski, P., Bujak, R., Daghir, E., Markuszewski, M. J.: *Electrophoresis* 32 (2011) 2044-2054.
- [143] Stevenson, R., Stokes, R. J., MacMillan, D., Armstrong, D., Faulds, K., Wadsworth, R., Kunuthur, S., Suckling, C. J., Graham, D.: *Analyst* 134 (2009) 1561-1564.
- [144] Wan, Y. Q., Tang, L. J., Tan, T.: *J. Fluoresc.* 20 (2010) 1191-1198.
- [145] Craig, D. G., Lee, P., Pryde, E. A., Hayes, P. C., Simpson, K. J.: *Aliment. Pharm. Therap.* 38 (2013) 1395-1404.
- [146] Melber, C., Schmidt, G. H.: *Comp. Bioch. Phys. B* 108 (1994) 79-94.
- [147] Merlini, L., Nasini, G.: *J. Insect Physiol.* 12 (1966) 123-127.
- [148] Niva, C. C., Takeda, M.: *Comp. Bioch. Phys. B* 132 (2002) 653-660.
- [149] Smith, R. L., Forrest, H. S.: *J. Insect Physiol.* 15 (1969) 953-957.
- [150] Socha, R., Nemec, V.: *Acta Entomol. Bohemos.* 89 (1992) 195-203.
- [151] Socha, R., Nemec, V.: *Eur. J. Entomol.* 93 (1996) 525-534.
- [152] Porcar, M., Bel, Y., Socha, R., Nemec, V., Ferre, J.: *J. Chromatogr. A* 724 (1996) 193-197.
- [153] Fabricant, S. A., Kemp, D. J., Krajicek, J., Bosakova, Z., Herberstein, M. E.: *PLoS One* 8 (2013) 1-8.
- [154] Krajicek, J., Kozlik, P., Exnerova, A., Stys, P., Bursova, M., Cabala, R., Bosakova, Z.: *J. Chromatogr. A* 1336 (2014) 94-100.
- [155] Schoenmakers, P. J., Billiet, H. A. H., Degalan, L.: *J. Chromatogr.* 218 (1981) 261-284.
- [156] Snyder, L. R., Poppe, H.: *J. Chromatogr.* 184 (1980) 363-413.

PUBLIKACE II

EFFECT OF SILICA GEL MODIFICATION WITH CYCLOFRUCTANS ON PROPERTIES OF HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY STATIONARY PHASES

Kozlík, P.; Šimová, V.; Kalíková, K.; Bosáková, Z.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E.

J. Chromatogr. A 1257 (2012) 58-65.

PUBLIKACE III

PROPERTIES OF TWO AMIDE-BASED HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY COLUMNS

Kalíková, K.; Kozlík, P.; Gilar, M.; Tesařová, E.

J. Sep. Sci 36 (2013) 2421-2429.

PUBLIKACE IV

**HYDROPHILIC INTERACTION LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH TANDEM MASS
SPECTROMETRIC DETECTION APPLIED FOR ANALYSIS OF PTERIDINES IN TWO
GRAPHOSOMA SPECIES (INSECTA: HETEROPTERA)**

Kozlík, P.; Krajíček, J.; Kalíková, K.; Tesařová, E.; Čabala, R.; Exnerová, A.; Štys, P.;
Bosáková, Z.

J. Chromatogr. B 930 (2013) 82-89.

5 ZÁVĚR

Předkládaná dizertační práce je tvořena komentovaným souborem čtyř publikací, které vyšly v mezinárodních impaktovaných časopisech a které reflektují důležité trendy v moderní vysokoúčinné kapalinové chromatografii. První část dizertační práce se zabývá možností spojení miniaturizované kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí pro environmentální analýzu. Druhá, rozsáhlejší část dizertační práce, je zaměřena na hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii. Pro charakterizaci a porovnání několika rozdílných stacionárních fází v HILIC byl zvolen komplexní přístup, založený na jejich testování odlišnými chromatografickými způsoby. HILIC byla využita i pro vývoj HPLC-MS/MS metody určené ke stanovení vybraných pterinů v kutikule ploštic.

Získané výsledky mohou být shrnuty do následujících bodů:

- Byla vyvinuta nová, miniaturizovaná, vysokoúčinná separační metoda, využívající cLC-MS/MS, ke stanovení vybraných estrogenních polutantů ve vodách. Vývoj metody byl zaměřen na dosažení úplné separace všech pěti sledovaných estrogenů za minimalizace matričních efektů, které by ovlivňovaly ionizaci jednotlivých analytů. Optimalizovaný separační systém se skládal z kapilární kolony Zorbax SB C18 a mobilní fáze tvořené acetonitrilem a vodou, kdy obě složky obsahovaly 0,1% kyselinu mravenčí. Byla použita gradientová eluce. Celková doba analýzy nepřesáhla 18 minut. K zakoncentrování a přečištění vzorků byla použita SPE na kolonce Discovery DSC-18Lt s monomerně vázaným oktadecylem na silikagelu. S tímto systémem bylo dosaženo pro všechny studované analyty vysoké výtěžnosti extrakce pohybující se mezi 95 – 100 % s relativní směrodatnou odchylkou nižší než 7,2 %. Kombinací SPE s cLC-MS/MS bylo dosaženo velmi nízkých hodnot LOD (5 – 7 ng/l) a LOQ (10 – 25 ng/l). Nově vyvinutá cLC-MS/MS metoda s SPE byla úspěšně použita k analýze reálných vzorků vod z různých lokalit České republiky.
- Za použití vybraných modelových analytů (peptidů) byly porovnány tři HILIC stacionární fáze, silikagelová, silikagelová s vázaným nativním cyklofruktanem a silikagelová s vázaným isopropyl cyklofruktanem, z hlediska jejich separační

účinnosti a interakčních možností. Nejnižší separační účinnosti pro vybrané peptidy bylo dosaženo na koloně s nemodifikovanou silikagelovou stacionární fází. Vyšší separační účinnost a selektivitu poskytovaly cyklofruktanové stacionární fáze, přičemž nepatrně vyšší selektivitu vykazovala nativní cyklofruktanová stacionární fáze. Na všech třech testovaných stacionárních fázích byl prokázán multimodální retenční mechanismus. Podle Waltersova testu byl silanolový index pro všechny testované kolony srovnatelný. Nejnižší hydrofobicita byla prokázána pro stacionární fázi s nativním cyklofruktanem a nejvyšší pro silikagelovou stacionární fázi. Z LFER výsledků vyplývá, že v případě silikagelové stacionární fáze se při retenci a separaci uplatňují pouze interakce pomocí vodíkové vazby. Interakce na cyklofruktanových stacionárních fázích byly z kvalitativního hlediska shodné. Na retenčním mechanismu se podílely vodíkové interakce, dipolarita/polarizibilita a disperzní interakce. Bylo prokázáno, že derivatizací hydroxylových skupin silikagelové stacionární fáze polárními cyklofruktany může být zvýšena její separační účinnost a selektivita pro analýzu polárních látek v HILIC módu.

- Dvě amidové HILIC kolony, kolona XBridgeTM Amide a kolona TSK gel Amide-80, byly porovnány z hlediska separačních a interakčních vlastností. Při separaci vybraných peptidů a nukleobází byl na obou kolonách prokázán multimodální retenční mechanismus. Vyšší separační účinnosti bylo dosaženo na koloně XBridgeTM Amide, což je způsobeno zejména menší velikostí částic dané kolony. Na základě testů selektivity a LFER metody bylo zjištěno, že kolona TSK gel Amide-80 má větší schopnost interagovat pomocí vodíkových vazeb. Kolona TSK gel Amide-80 poskytovala vyšší retenci pro bazické látky, což ukazuje na větší uplatnění iontově-výměnných interakcí. Sledování vlivu teploty na retenci vybraných analytů neprokázalo zásadní rozdíl mezi testovanými kolonami. I když jsou si obě amidové separační kolony velmi podobné, provedené testy prokázaly jejich určitou rozdílnost vedoucí k poněkud odlišné retenci a separaci testovaných analytů.
- Nová metoda využívající hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostní spektrometrií byla vyvinuta k analýze vybraných pterinů v kutikule ploštic (Heteroptera). Optimální separační podmínky byly následující: kolona ZIC-HILIC, mobilní fáze: acetonitril/5 mM octan amonný, pH = 6,80, 85/15 (v/v); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; MS/MS detekce v MRM módu. Tato

metoda byla validována a aplikována ke stanovení vybraných pterinů ve čtyřech formách *Graphosoma lineatum* a jedné formě *Graphosoma semipunctatum*. Bylo zjištěno, že jednotlivé formy obsahují rozdílné množství jednotlivých pterinů, což ovlivňuje jejich zbarvení.

SEZNAM PUBLIKACÍ

- I. **Kozlák, P.**; Bosáková, Z.; Tesařová, E.; Coufal, P.; Čabala, R.: *Development of a solid-phase extraction with capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of estrogens in environmental water samples*; J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2127-2132.
- II. **Kozlák, P.**; Šimová, V.; Kalíková, K.; Bosáková, Z.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E.: *Effect of silica gel modification with cyclofructans on properties of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases*; J. Chromatogr. A 1257 (2012) 58-65.
- III. Širc, J.; Kubínová, S.; Hobzová, R.; Stránská, D.; **Kozlák, P.**; Bosáková, Z.; Mareková, D.; Holáň, V.; Syková, E.; Michálek, J.: *Controlled gentamicin release from multi-layered electrospun nanofibrous structures of various thicknesses*; Int. J. Nanomedicine 7 (2012) 5315-5325.
- IV. Matějčec, P.; Uchman, M.; Lepšík, M.; Srnec, M.; Zedník, J.; **Kozlák, P.**; Kalíková, K.: *Preparation and separation of telechelic carborane-containing poly(ethylene glycol)s*; ChemPlusChem 78 (2013) 528-535.
- V. **Kozlák, P.**; Krajíček, J.; Kalíková, K.; Tesařová, E.; Čabala, R.; Exnerová, A.; Štys, P.; Bosáková, Z.: *Hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection applied for analysis of pteridines in two Graphosoma species (Insecta: Heteroptera)*; J. Chromatogr. B 930 (2013) 82-89.
- VI. Kalíková, K.; **Kozlák, P.**; Gilar, M.; Tesařová, E.: *Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns*; J. Sep. Sci. 36 (2013) 2421-2429.

- VII. Seydlová, G.; Fišer, R.; Čabala R.; **Kozlík, P.**; Svobodová, J.; Pátek M.: *Surfactin Production Enhances the Level of Cardiolipin in the Cytoplasmic Membrane of Bacillus subtilis*; BBA - Biomembranes 1828 (2013) 2370-2378.
- VIII. Krajíček, J.; **Kozlík, P.**; Exnerová, A.; Štys, P.; Bursová, M.; Čabala, R.; Bosáková, Z.: *Capillary electrophoresis of pterin derivatives responsible for the warning coloration of Heteroptera*; J. Chromatogr. A 1336 (2014) 94-100.

SEZNAM PŘEDNÁŠEK A PLAKÁTOVÝCH SDĚLENÍ

Přednášky

- **Kozlík, P.;** Bosáková, Z.; Tesařová, E.: *Analýza estrogenních polutantů ve vodných vzorcích životního prostředí pomocí kapilární kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií po extrakci tuhou fází*; 2. ročník konference PGS studentů Ústavu pro životní prostředí; Česká republika, Praha, 25. 5. 2011.
- **Kozlík, P.:** *Vývoj analytické metody pro stanovení estrogenních polutantů ve vodách pomocí kapilární kapalinové chromatografie*; Zentiva, Česká republika, Praha, 29. 8. 2011.
- **Kozlík, P.;** Adamusová, H.; Bosáková, Z.; Tesařová, E.: *Comparison of high performance liquid chromatography and capillary liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection for analysis of estrogen pollutants*; 7th International Students Conference “Modern Analytical Chemistry”; Česká republika, Praha, 29. - 30. 9. 2011.
- **Kozlík, P.;** *Trojité kvadrupol QqQ 6460 na katedře analytické chemie*; Dny pokročilých technik ve Viničné 7 - Hmotnostní spektrometrie; Česká republika, Praha, 28. 06. 2012.
- **Kozlík, P.;** Bosáková, Z.: *Study of separation of selected pteridines in hydrophilic interaction liquid chromatography*; 8th International Students Conference “Modern Analytical Chemistry”; Česká republika, Praha, 24. – 25. 9. 2012.
- **Kozlík, P.;** Kalíková, K.; Tesařová, E.; Bosáková, Z.: *Characterization and comparison of cyclofructan and amide based stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography*; 9th International Students Conference “Modern Analytical Chemistry”; Česká republika, Praha, 23. - 24. 9. 2013.
- **Kozlík, P.:** *Cyclofructan-based stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography*; Zentiva, Česká republika, Prague, 20. 2. 2014.

Plakátová sdělení

- **Kozlík, P.**; Bosáková, Z.; Janečková, L.; Tesařová, E.; Coufal, P.; Čabala, R.: *Identification and quantification of selected estrogens in water matrix by capillary liquid chromatography with MS-MS detection*; 24th International Symposium on Microscale Bioseparations; Dalian, Čína, 18. - 22. 10. 2009.
- Bosáková, Z.; **Kozlík, P.**; Janečková, L.; Tesařová, E.; Čabala, R.; Coufal, P.: *Application of HPLC-MS/MS with jet stream thermal gradient focusing for identification and quantification of estrogen pollutants in natural water samples*; 35th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques; Boston, USA, 19. – 24. 6. 2010.
- Širc, J.; Munzarová, M.; Lhotka, M.; **Kozlík, P.**; Hobzová, R.; Michálek, J.: *Electrospun Nanofibers as Scaffolds: Morphology and Drug Delivery*; 23rd European Conference on Biomaterials; Tampere, Finsko, 11. – 15. 9. 2010.
- **Kozlík, P.**; Krajíček, J.; Tesařová, E.; Čabala, R.; Bosáková, Z.: *HPLC-MS-MS Analysis of Pteridines in Graphosoma Lineatum by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*; 36th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques; Budapešť, Maďarsko, 19. - 23. 6. 2011.
- **Kozlík, P.**; Bosáková, Z.: *Kritické porovnání kapilární kapalinové chromatografie a klasické vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí pro analýzu estrogenních polutantů ve vodné matrici po extrakci tuhou fází*; 63. Sjezd chemiků; Vysoké Tatry, Slovensko, 5. – 9. 9. 2011.
- Adamusová, H.; Bosáková, Z.; **Kozlík, P.**; Hortová, K.: *Use of HPLC-MS/MS for monitoring of residual concentrations of 17 β -estradiol during mouse sperm capacitation in vitro*; Separation Science Europe 2011; Londýn, Velká Británie, 10. – 11. 10. 2011.

- **Kozlák, P.**; Kalíková, K.; Šímová, V.; Bosáková, Z.; Tesařová, E.: *Study of separation of peptides on cyclofructan-based stationary phases in HILIC mode*; Advances in chromatography and electrophoresis 2012 and Chiranal 2012; Olomouc, Česká republika, 11. – 14. 6. 2012.
- Adamusová, H.; **Kozlák, P.**; Repko, P.; Tesařová, E.; Bosáková, Z.: *HPLC enantioseparation and quantitation of FMOC-derivatized branched amino acids*; Advances in chromatography and electrophoresis 2012 and Chiranal 2012; Olomouc, Česká republika, 11. – 14. 6. 2012.
- Kalíková, K.; **Kozlák, P.**; Šímová, V.; Tesařová, E.: *Cyclofructan-based stationary phases in HILIC*; 24th International Symposium on Chirality (Chirality 2012); Fort Worth, Texas, USA, 10. – 13. 6. 2012.
- Kalíková, K.; **Kozlák, P.**; Gilar, M.; Tesařová, E.: *Characterization and comparison of Amide HILIC stationary phases*; 29th International Symposium on Chromatography; Torun, Polsko, 9. – 13. 9. 2012.
- Širc, J.; **Kozlák, P.**; Stránská, D.; Kubínová, Š.; Hobzová, R.; Michálek, J.: *Multilayer nanofibrous constructs with incorporated gentamicin for controlled drug release*; 14th Annual Conference Yucomat 2012; Herceg Novi, Černá Hora, 3. – 7. 9. 2012.
- **Kozlák, P.**; Krajíček, J.; Kalíková, K.; Tesařová, E.; Bosáková, Z.: *Development of a hydrophilic interaction liquid chromatography method with tandem mass spectrometric detection for the analysis of pteridines in two Graphosoma species (Insecta: Heteroptera)*; 39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques; Amsterdam, Nizozemsko, 16. – 20. 6. 2013.
- Kalíková, K.; **Kozlák, P.**; Gilar, M.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E.: *Cyclofructan and amide based stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography*; 39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques; Amsterdam, Nizozemsko, 16. – 20. 6. 2013.

- Adamusová, H.; Bosáková, Z.; **Kozlík, P.**; Hortová, K.: *Monitoring of residual concentrations of 17 β -estradiol during mouse sperm capacitation in vitro by HPLC-MS/MS*; 9th Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods; Siófok, Maďarsko, 4. – 6. 9. 2013.
- Krajíček, J.; **Kozlík, P.**; Bosáková, Z.: *Development of capillary zone electrophoresis for analysis of pterine derivatives in various kinds of bugs*; 20th International symposium on Electro- and Liquid Phase- separation techniques; Puerto de la Cruz, Tenerife, Španělsko, 6. - 9. 10. 2013.
- Bosáková, Z.; Krajíček, J.; **Kozlík, P.**; Čabala, R.: *Analysis of bug defensive chemistry by HILIC-MS/MS and SPME-GC-MS techniques*; 41th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques; New Orleans, Louisiana, USA, 11. – 15. 5. 2014.

Příloha I

Proceedings of 7th ISC Modern Analytical Chemistry
Prague 2011

Příloha II

Hmotnostní spektra z MS skenu a skenu produktového iontu v pozitivním módu pro všechny studované analyty (struktury viz obr. 3.2) v publikaci I.