

**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta**

**Katedra analytické chemie**

Doktorský studijní program: Analytická chemie

Autoreferát dizertační práce



# **Moderní trendy ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii a jejich aplikace**

**Mgr. Petr Kozlík**

Školitel: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Školitel-konzultant: Prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Praha, 2014



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.

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:

**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.

**Kozlík, P.;** Šimová, V.; Kalíková, K.; Bosáková, Z.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E.: *Effect of silica gel modification with cyclodextrins on properties of hydrophilic interaction liquid chromatography stationary phases*; J. Chromatogr. A 1257 (2012) 58-65.

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.

**Kozlík, P.;** Krajčíček, 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.

## ABSTRAKT

Dizertační práce řeší významné trendy ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii jako je snaha po miniaturizaci separačních systémů ve spojení s vysokou citlivostí detekce nebo charakterizaci a aplikaci 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 vodných vzorcích 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 dělení směsí 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 derivátů.

## OBSAH

ABSTRAKT .....	3
SEZNAM ZKRATEK .....	5
<b>1 ÚVOD .....</b>	<b>6</b>
<b>2 CÍLE PRÁCE .....</b>	<b>9</b>
<b>3 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>10</b>
3.1 Vývoj metody kapilární kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí ke stanovení estrogenních látek ve vodách.....	10
3.2 Porovnání vlastností silikagelové stacionární fáze a cyklofruktanových stacionárních fází v HILIC .....	11
3.3 Porovnání vlastností dvou amidových stacionárních fází v HILIC .....	14
3.4 Analýza pterinů v <i>Graphosoma lineatum</i> a <i>Graphosoma semipunctatum</i> pomocí HILIC-MS/MS .....	17
<b>5 ZÁVĚR.....</b>	<b>19</b>
<b>6 LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
ŽIVOTOPIS .....	23
SEZNAM PUBLIKACÍ .....	25
SEZNAM PŘEDNÁŠEK A PLAKÁTOVÝCH SDĚLENÍ .....	26

## SEZNAM ZKRATEK

ACN	acetonitril
CF	cyklofruktan
cLC	kapilární kapalinová chromatografie
ED	endokrinní disruptory
<i>GL</i>	<i>Graphosoma lineatum</i>
<i>GS</i>	<i>Graphosoma semipunctatum</i>
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LFER	model lineárních vztahů volných energií
MRM	multiple reaction monitoring (záznam vybraných přechodů mezi prekurzorovými a produktovými ionty)
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
RSD	relativní směrodatná odchylka
SP	stacionární fáze
SPE	extrakce tuhou fází

## 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.

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 [1]. Spojení HPLC s MS má nezastupitelné místo v analýzách komplexních vzorků, jako jsou biologické a environmentální materiály [1]. V současné době, kdy se velmi dbá na kvalitu prostředí, ve kterém žijeme, je věnována pozornost vývoji velmi citlivých a selektivních metod, které by byly schopny stanovit polutanty životního prostředí na koncentračních hladinách, ve kterých se tyto látky reálně vyskytují [2]. Jednou z mnoha skupin látek, které se vyskytují v životním prostředí, jsou estrogenní látky [3-5]. Tyto látky patří do skupiny endokrinních disruptorů (ED), které mohou určitým způsobem ovlivňovat hormonální soustavu živočichů. Byly zaznamenány případy klesající plodnosti, feminizace a hermafroditismu sameček vodních živočichů [4]. Existuje také podezření, že estrogenní látky se mohou podílet na vzniku rakoviny prsu, vaječníků, prostaty a na snížení pohyblivosti a kvality spermií [7, 8]. V rámci této práce byl studován výskyt vybraných estrogenních látek, a to estriolu, estronu,  $17\alpha$ -estradiolu,  $17\alpha$ -ethinylestradiolu a  $17\beta$ -estradiolu, v environmentálních vzorcích vody.

Dalším patrným trendem v HPLC je tlak na obecné snížení spotřeby organických rozpouštědel. Klasická HPLC používá průtoky mobilní fáze cca 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 desítky mikrolitrů eluentu 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 [9, 10].

Metoda HPLC je nejčastěji používána v reverzním chromatografickém módu, kdy stacionární fáze je méně polární než mobilní fáze. Pro mnoho velmi polárních látek, jako jsou různé metabolity (deriváty aminokyselin, sacharidů, peptidů aj.) a další biologicky aktivní látky, je reverzní chromatografický systém nevhodný. Tyto analyty obvykle vykazují velmi nízkou retenci a separační systém má velmi nízkou selektivitu. Pro separaci takovýchto látek se úspěšně začala používat hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC), která vykazuje dostatečnou retenci a selektivitu pro polární látky [11]. Pro HILIC je typické použití hydrofilní stacionární fáze a mobilní fáze s vysokým podílem organické složky [12]. Nejpoužívanějšími stacionárními fázemi v HILIC jsou klasické silikagelové fáze, amidové, diolové, aminové popřípadě zwitteriontové stacionární fáze [13]. 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 [14]. Cyklofruktany jako chirální selektory v HPLC byly představeny v roce 2009 profesorem Armstrongem [15]. Od té doby našly využití v řadě chirálních separací [16, 17]. První použití nativní cyklofruktanové stacionární fáze v HILIC bylo uskutečněno v roce 2011 [18]. K vývoji chromatografické metody pro danou aplikaci, a také při vývoji nových stacionárních fází, může pomoci charakterizace separačních systémů z hlediska interakčních mechanismů.

Příkladem využití nových trendů kapalinové chromatografie, a to hydrofilní interakční kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií, pro konkrétní analýzu v této práci je stanovení polárních pterinů v plošticích *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum*. Pteriny propůjčují hmyzu typické zabarvení jejich kutikul počínaje od bílé barvy (leukopterin), přes červenou (erythropterin) a žlutou (xanthopterin) až po fluorescenční modrou (biopterin) [19]. Barvy kutikul studovaných ploštic *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* se mění během vývojového stádia jedince, ročního období, ale vliv na jejich zabarvení může mít i lokalita výskytu. Odstín zabarvení je pravděpodobně

výsledkem přítomnosti určitých pterinů, ale i jejich vzájemného poměru [20].  
Vzhledem ke špatné selektivitě separace polárních pterinů pomocí reverzní HPLC a komplexnosti studovaných vzorků je HILIC-MS/MS ideální metodou k jejich analýze.

## 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 tuhou fází.

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.
- 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 VÝSLEDKY A DISKUZE**

#### **3.1 Vývoj metody kapilární kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí ke stanovení estrogenních látek ve vodách**

Všechna měření byla prováděna na kapilárním kapalinovém chromatografu Agilent 1200 spojeném s hmotnostním tandemovým trojitým kvadrupólem 6460 (Agilent Technologies, Waldbroon, Německo). Měření byla prováděna v multiple reaction monitoring módu (MRM). Byla použita ionizace elektrosprejem v pozitivním módu, neboť v tomto módu poskytovaly studované estrogény vyšší odezvu než v negativním módu. Separace probíhala na kapilární koloně Zorbax SB C18 (150 mm x 0,5 mm, 5  $\mu$ m; Agilent Technologies, Waldbroon, Německo). Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a vody, kdy obě složky obsahovaly 0,1% mravenčí kyselinu. Pro separaci studovaných estrogenů byla testována isokratická a gradientová eluce. Dostatečné retence nepolárnějšího analytu (estriolu), dobrého rozlišení všech studovaných estrogenů, dostatečné citlivosti detekce a žádného vlivu matričních efektů bylo dosaženo za gradientové eluce.

Dále byla optimalizována extrakce tuhou fází. Byly testovány různé SPE sorbenty, objem nanášeného vzorku, průtok vzorku, eluční činidla a rychlost eluce. Byly zkoušeny a porovnány nové sorbenty obsahující monomerně nebo polymerně vázané oktadecylové funkční skupiny na silikagelu. Nejlepších výsledků z hlediska výtěžnosti a opakovatelnosti extrakce bylo dosaženo na kolonce Discovery DSC-18Lt. Výtěžnost extrakce se pohybovala v rozmezí 95 – 100 % s relativní směrodatnou odchylkou nižší než 7,2 %.

Kvantifikace reálných vzorků byla prováděna na základě kalibrační přímky získané za optimalizovaných extrakčních, separačních a detekčních 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 vody 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) a Úhlava (Klatovy a Plzeň). Estrogeny byly nalezeny pouze ve dvou vzorcích. 17 $\beta$ -Estradiol o koncentraci 13,2 ng/l (RSD 5,5 %) byl nalezen ve Vltavě (Praha - cca 900 metrů nad centrální čistírnou odpadních vod na Císařském ostrově). Na vstupu do čistírny odpadních vod na Císařském ostrově (Praha) byly nalezeny všechny studované estrogeny kromě 17 $\alpha$ -estradiolu. Koncentrace (ng/l) nalezených estrogenů byly následující: estron 20,5 (RSD 8,4%), 17 $\beta$ -estradiol 21,4 (RSD 7,2%), 17 $\alpha$ -ethinylestradiol 100,7 (RSD 4,4%) a estriol 188,6 (RSD 6,8%).

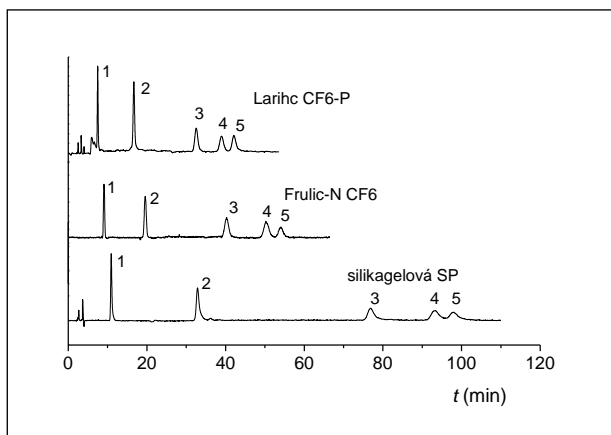
Získané limity detekce nově vyvinutou cLC-MS/MS metodou, pohybující se v rozmezí jednotek až desítek ng/l, jsou srovnatelné s limity detekce dosaženými klasickou HPLC-MS/MS metodou. Obsah nalezených estrogenních polutantů v této práci je srovnatelný s obsahem estrogenních polutantů nalezených v říčních vodách v Japonsku a Španělsku a v povrchových vodách Baltského moře [21-23].

### **3.2 Porovnání vlastností silikagelové stacionární fáze a cyklofruktanových stacionárních fází v HILIC**

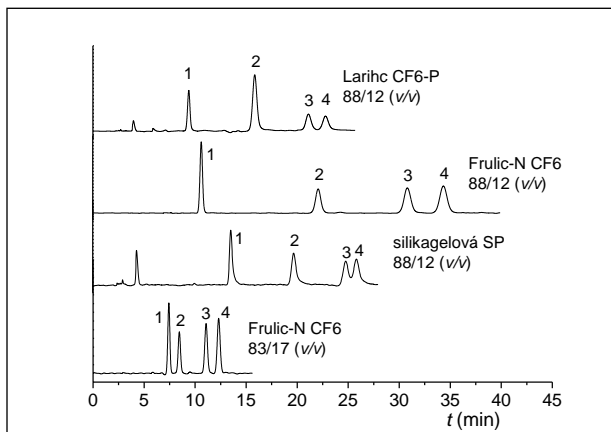
Klasické silikagelové stacionární fáze (SP) patří mezi běžně používané stacionární fáze v HILIC. Modifikace těchto silikagelových stacionárních fází navázáním řady různých ligandů může zásadně změnit jejich separační schopnosti. V této části práce byly porovnány separační vlastnosti tří stacionárních fází, silikagelové, silikagelové s vázaným nativním cyklofruktanem (kolona Frulic-N CF6) a silikagelové s vázaným isopropyl cyklofruktanem (kolona Larihc CF6-P), z hlediska separace vybraných peptidů a molekulárních interakcí podílejících se na retenci a separaci.

Byla optimalizována separace směsí pěti nonapeptidů a čtyř pentapeptidů. Na obrázku 1 jsou uvedeny chromatogramy separace nonapeptidů za optimalizovaného složení mobilní fáze: ACN/20 mM octan amonný, pH 4,00, 80/20 (v/v). Nejrychlejší separace bylo dosaženo na koloně Larihc CF6-P. Na cyklofruktanových stacionárních fázích vykazovaly nonapeptidy symetrické

píky a došlo k jejich vzájemnému rozlišení až na základní linii. V případě použití silikagelové stacionární fáze se doba analýzy blížila ke 100 minutám a všechny píky silně chvostovaly. Chromatogramy separace pentapeptidů jsou uvedeny na obrázku 2. Na koloně Larihc CF6-P došlo k rozdělení všech pentapeptidů na základní linii během 25 minut při složení mobilní fáze ACN/20 mM octan amonný, pH= 4,00, 88/12 (v/v) a na koloně Frulic-N CF6 během 13 minut při složení mobilní fáze ACN/20 mM octan amonný, pH= 4,00, 83/17 (v/v). Silikagelová stacionární fáze neposkytovala při žádném testovaném složení mobilní fáze dostatečné rozlišení pro leucin enkefalin a [Met<sup>5</sup>]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 [Met<sup>5</sup>]enkefalinem byl nepatrný.



Obrázek 1 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-Cys<sup>1</sup>, D-Arg<sup>8</sup>]vasopresin 3, [Arg<sup>8</sup>]vasopresin 4, [Arg<sup>8</sup>]vasotocin 5, [Lys<sup>8</sup>]vasopresin.



Obrázek 2 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 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-Ala<sup>2</sup>]-leucin enkefalin 3, leucin enkefalin 4, [Met<sup>5</sup>]enkefalin.

Na základě studia interakčního mechanismu peptidů bylo zjištěno, že se na retenčním mechanismu podílí jak rozdělování, tak adsorpce. Pomocí Waltersova testu byla určena hydrofobicita a silanolová aktivita testovaných stacionárních fází. Silanolová aktivita byla pro studované SP srovnatelná. Hydrofobicita byla podle očekávání nízká. Silikagelová SP vykazovala nejvyšší hodnotu hydrofobicity. Nejnižší hodnota byla získána pro nederivatizovaný cyklofruktan (Frulic-N CF6), vzhledem k velkému množství přítomných polárních hydroxylových skupin.

Molekulární interakce uplatňující se v daných separačních systémech byly porovnány metodou lineárních vztahů volných energií (LFER). Z 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, interakce dipól-

dipól a dipól-indukovaný dipól a disperzní interakce, které byly upřednostňovány v mobilní fázi.

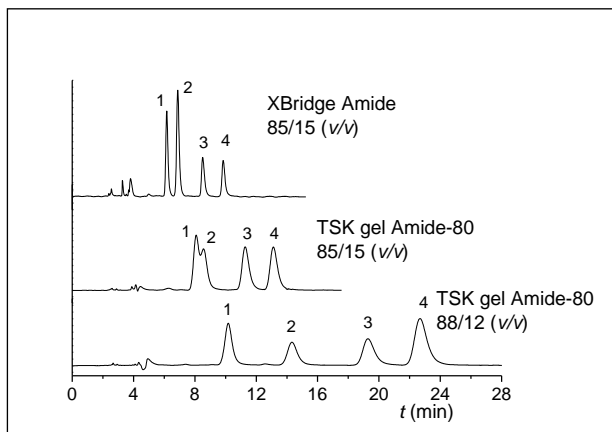
Navzdory faktu, že silikagelové stacionární fáze jsou široce používány v HILIC, bylo prokázáno, že derivatizací hydroxylových skupin silikagelové stacionární fáze polárními cyklofruktany může být zvýšena její separační účinnost a selektivita pro analýzu polárních látek v HILIC módu.

### **3.3 Porovnání vlastností dvou amidových stacionárních fází v HILIC**

Různé stacionární fáze vykazují rozdílné separační vlastnosti a selektivitu. I stacionární fáze obsahující stejný typ ligandu mohou, vzhledem k různým technologiím přípravy, poskytovat různé retenční a separační vlastnosti. V této části práce byly charakterizovány a porovnány dvě amidové stacionární fáze od různých výrobců, a to kolona XBridge<sup>TM</sup> Amide (Waters, Milford, USA) a kolona TSK gel Amide-80 (Tosoh, Tokyo, Japonsko). Ke komplexní charakterizaci studovaných separačních systémů byla použita řada testů. K porovnání separačních vlastností byly vybrány modelové látky zastupující biologicky zajímavé malé molekuly, tj. 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.

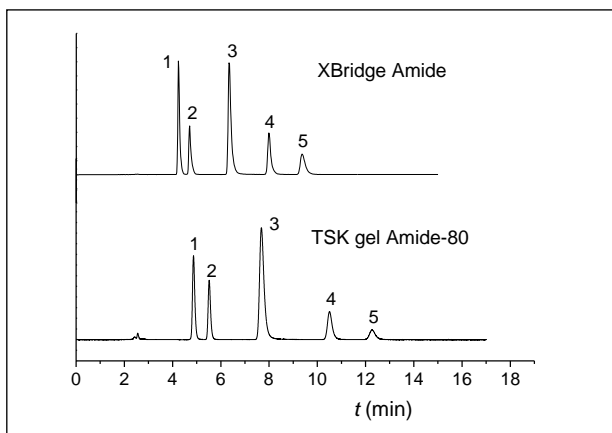
Chromatogramy separace pentapeptidů jsou uvedeny na obrázku 3. Za stejného složení mobilní fáze ACN/20 mM octan amonný, pH= 4,00, 85/15 (v/v) bylo dosaženo lepší separace pentapeptidů na koloně XBridge<sup>TM</sup> Amide, což je způsobeno její vyšší separační účinností (kolona XBridge<sup>TM</sup> Amide obsahuje částice o velikosti 3,5  $\mu\text{m}$  a kolona TSK gel Amide-80 5  $\mu\text{m}$  částice). Rozlišení všech studovaných pentapeptidů na koloně TSK gel Amide-80 bylo dosaženo při složení mobilní fáze acetonitril/20 mM octan amonný, pH= 4,00, 88/12 (v/v). Doba analýzy nepřesáhla 25 min.





Obrázek 3 Chromatogramy separace směsi pentapeptidů na koloně XBridge Amide<sup>TM</sup> a TSK gel Amide-80. Složení mobilní fáze: acetonitril/20 mM octan amonný, pH = 4,00 poměr organické a vodné fáze 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-Ala<sub>2</sub>]-leucin enkefalin 3, leucin enkefalin 4, [Met<sup>5</sup>]enkefalin.

Druhou skupinou látek separovaných na amidových kolonách byly nukleobáze. 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<sup>TM</sup> Amide však opět poskytovala vyšší účinnost vzhledem k menší velikosti částic. Chromatogramy separace nukleobází jsou uvedeny na obrázku 4.



Obrázek 4 Chromatogramy separace směsi nukleobází na kolonách XBridge<sup>TM</sup> 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, adeni 4, cytosin 5, guanin.

Na základě studia retenčního chování peptidů a nukleobází bylo zjištěno, že se na retenčním mechanismu podílí jak rozdělování, tak adsorpce.

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 pomocí van't Hoffových závislostí neprokázalo zásadní rozdíl mezi testovanými kolonami v HILIC módu.

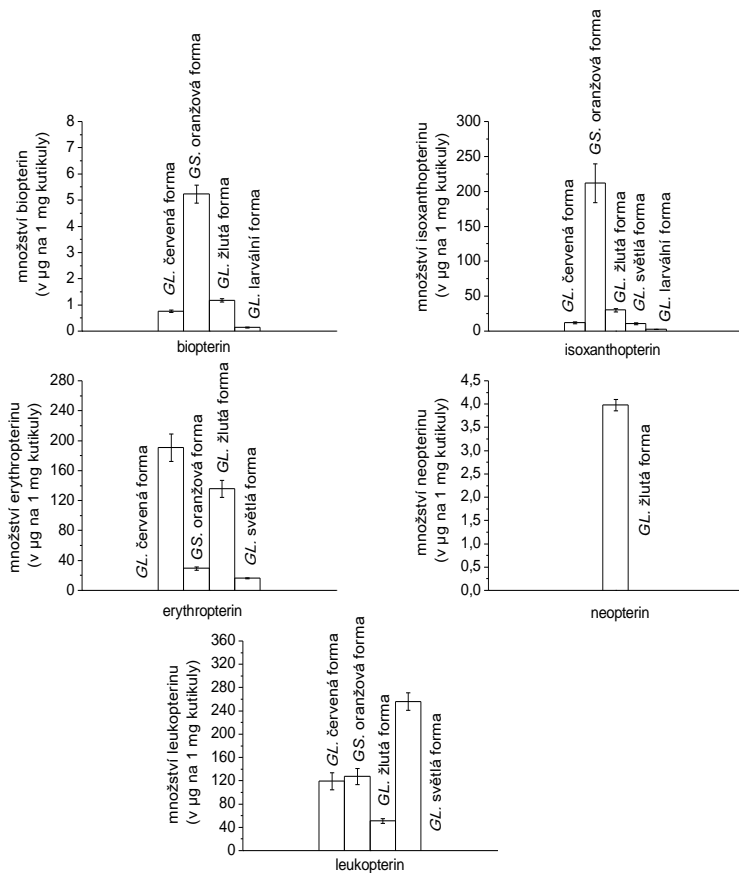
### 3.4 Analýza pterinů v *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* pomocí HILIC-MS/MS

Tato část práce byla zaměřena na vývoj nové separační metody využívající hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostní spektrometrií k analýze pterinů, jmenovitě biopterinu, isoxanthopterinu, xanthopterinu, leukopterinu, neopterinu a erythropterinu v různých formách ploštic *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum*.

Byly testovány HILIC chromatografické kolony Atlantis HILIC Silica (Waters, Milford, USA) a ZIC-HILIC (Merck, Darmstadt, Německo). Byl studován vliv obsahu organické složky v mobilní fázi, typ pufru, iontová síla a pH mobilní fáze na retenční a separační chování pterinů. Na koloně ZIC-HILIC bylo dosaženo vyšší retence pterinů. Tato kolona poskytovala vyšší selektivitu a účinnost separace pterinů oproti koloně Atlantis HILIC Silica. 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).

Kvantifikace pterinů v extraktech kutikul ploštic *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* byla prováděna na základě kalibrační přímky. Metoda byla validována z hlediska linearitu, limitů detekce a kvantifikace, správnosti, přesnosti, selektivity, přenosu vzorku a matričních efektů. Přesnost měření dané metody se pohybovala od 0,8 % do 8,1 % a správnost měření se pohybovala od 1,9 % do 9,6 %.

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). K extrakci pterinů z kutikul byl použit dimethyl sulfoxid. Výsledky analýzy obsahu pterinů v jednotlivých formách *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* jsou uvedeny na obrázku 5.



Obrázek 5 Množství pterinů, vyjádřené jako množství analytu v µg na 1 mg kutikuly, v různých formách *Graphosoma lineatum* (GL.) and *Graphosoma semipunctatum* (GS.)

Z obrázku 5 je vidět, že xanthopterin nebyl nalezen v žádné analyzované formě. Neopterín se vyskytoval pouze u žluté formy. Isoxanthopterin se vyskytoval ve všech studovaných formách *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum*. Larvální forma *Graphosoma lineatum* obsahovala pouze isoxanthopterin a malé množství biopterinu.

## 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 možnostmi 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 s extrakcí tuhou fází, ke stanovení vybraných estrogenních polutantů ve vodách. Tato metoda byla úspěšně použita k analýze reálných vzorků vody z různých lokalit České republiky.
- Byly porovnány tři HILIC stacionární fáze, silikagelová, silikagelová s vázaným nativním cyklofruktanem a silikagelová s vázaným isopropyl cyklofruktanem. Nejnižší separační účinnosti pro vybrané peptidy bylo dosaženo na koloně s nemodifikovanou silikagelovou stacionární fází. Vyšší separační účinnost a selektivitu poskytovaly cyklofruktanové stacionární fáze. Z LFER výsledků vyplývá, že v případě silikagelové stacionární fáze se při retenci a separaci uplatňují pouze interakce pomocí vodíkové vazby. Na retenčním mechanismu cyklofruktanových stacionárních fází 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.
- Byly porovnány dvě amidové HILIC kolony: kolona XBridge<sup>TM</sup> Amide a kolona TSK gel Amide-80. Vyšší separační účinnosti bylo dosaženo na

koloně XBridge<sup>TM</sup> Amide, což je způsobeno především menší velikostí částic sorbentu. Bylo zjištěno, že na koloně TSK gel Amide-80 se více uplatňují iontově-výměnné interakce a že má větší schopnost interagovat pomocí vodíkových vazeb. 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.

- Byla vyvinuta nová metoda využívající hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii s tandemovou hmotnostní spektrometrií k analýze vybraných pterinů v kutikule ploštic (Heteroptera). Tato metoda byla validována a aplikována ke stanovení vybraných pterinů ve čtyřech formách *Graphosoma lineatum* a jedné formě *Graphosoma semipunctatum*.

## 6 LITERATURA

- [1] Holcapek, M., Jirasko, R., Lisa, M.: J. Chromatogr. A 1259 (2012) 3-15.
- [2] Kozlik, P., Bosakova, Z., Tesarova, E., Coufal, P., Cabala, R.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2127-2132.
- [3] Eertmans, F., Dhooge, W., Stuyvaert, S., Comhaire, F.: Toxicol. in Vitro 17 (2003) 515-524.
- [4] Kozlik, P.: Diplomá práce, Univerzita Karlova v Praze 2010.
- [5] Pacakova, V., Loukotkova, L., Bosakova, Z., Stulik, K.: J. Sep. Sci. 32 (2009) 867-882.
- [6] Mills, L. J., Chichester, C.: Sci. Total Environ. 343 (2005) 1-34.
- [7] 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.
- [8] Vidaeff, A. C., Sever, L. E.: Reprod. Toxicol. 20 (2005) 5-20.
- [9] Barroso, A., Gimenez, E., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V.: Anal. Chim. Acta 804 (2013) 167-175.
- [10] Fanali, C., Dugo, L., Dugo, P., Mondello, L.: Trends Anal. Chem. 52 (2013) 226-238.
- [11] Hemstrom, P., Irgum, K.: J. Sep. Sci. 29 (2006) 1784-1821.
- [12] Buszewski, B., Noga, S.: Anal. Bioanal. Chem. 402 (2012) 231-247.
- [13] Jandera, P.: Anal. Chim. Acta 692 (2011) 1-25.
- [14] Kozlik, P., Simova, V., Kalikova, K., Bosakova, Z., Armstrong, D. W., Tesarova, E.: J. Chromatogr. A 1257 (2012) 58-65.
- [15] Sun, P., Wang, C. L., Breitbach, Z. S., Zhang, Y., Armstrong, D. W.: Anal. Chem. 81 (2009) 10215-10226.
- [16] Kalikova, K., Janeckova, L., Armstrong, D. W., Tesarova, E.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1393-1398.
- [17] Vozka, J., Kalikova, K., Janeckova, L., Armstrong, D. W., Tesarova, E.: Anal. Lett. 45 (2012) 2344-2358.
- [18] Qiu, H. X., Loukotkova, L., Sun, P., Tesarova, E., Bosakova, Z., Armstrong, D. W.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 270-279.
- [19] Nemeč, V., Breuer, M., De Loof, A.: Eur. J. Entomol. 100 (2003) 19-23.
- [20] 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.

- [21] Sole, M., de Alda, M. J. L., Castillo, M., Porte, C., Ladegaard-Pedersen, K., Barcelo, D.: Environ. Sci. Technol. 34 (2000) 5076-5083.
- [22] Mitani, K., Fujioka, A., Kataoka, H.: J. Chromatogr. A 1081 (2005) 218-224.
- [23] Beck, I. C., Bruhn, R., Gandraas, J., Ruck, W.: . Chromatogr. A 1090 (2005) 98-106.



## ŽIVOTOPIS

### OSOBNÍ INFORMACE

---

Jméno Petr Kozlík  
Datum narození 27.10.1985  
Místo narození Kutná Hora, Česká republika  
Kontakt [kozlik@natur.cuni.cz](mailto:kozlik@natur.cuni.cz)

### VZDĚLÁNÍ

---

**2010 – dosud** Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta,  
Katedra analytické chemie; Obor: Analytická chemie

**2008 – 2010** Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta,  
Katedra analytické chemie; Obor: Klinická a toxikologická  
analýza; Dosažený titul: Mgr.

**2005 – 2008** Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta,  
Katedra analytické chemie; Obor: Klinická a toxikologická  
analýza; Dosažený titul: Bc.

### PRACOVNÍ ZKUŠENOSTI

---

**02/2013 – dosud** Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta,  
Katedra analytické chemie  
Pozice: Vědecký pracovník  
Náplň práce: Studium využití kapalinové chromatografie  
ke stanovení biologicky aktivních látek

**05/2013 – dosud** Zentiva, k. s., Oddělení pevné fáze  
Pozice: Specialista  
Náplň práce: Fyzikálně-chemická charakterizace  
farmaceuticky aktivních látek, vývoj ultra vysokoúčinných  
kapalinových chromatografických metod, degradační  
studie farmaceuticky aktivních látek a lékových forem

**10/2011 – 05/2013** Zentiva, k. s., Oddělení analytického vývoje  
Pozice: Analytický chemik  
Náplň práce: Vývoj ultra vysokoúčinných kapalinových  
chromatografických metod, degradační studie  
farmaceuticky aktivních látek a lékových forem, disoluční  
testování

**05/2008 – 10/2011** Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta,  
Katedra analytické chemie  
Pozice: Laboratorní technik  
Náplň práce: Analýza polutantů životního prostředí

#### **GRANTOVÉ PROJEKTY**

---

**2013 – dosud** Účast na řešení výzkumného projektu Grantové agentury České republiky GAČR 13-01440S: Chirální supramolekulární polymery založené na derivatizovaných cyklodextrinech jako nové prostředí pro kapilární separační techniky

**2013 – dosud** Účast na řešení výzkumného projektu Grantové agentury Univerzity Karlovy GAUK 18213: Komplexní analýza výstražných a obraných látek ploštic vysokoúčinnými separačními technikami spojenými s hmotnostní detekcí

**2008 – 2011** Účast na řešení výzkumného projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy: Centrum molekulárních metod monitorování difúzního znečištění životního prostředí č. 1M06011

#### **JAZYKOVÉ ZNALOSTI**

---

Anglický jazyk      Certifikát Preliminary English Test

Německý jazyk      Začátečník

## SEZNAM PUBLIKACÍ

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. Širc, J.; Kubínová, S.; Hobzová, R.; Stránská, D.; **Kozlík, 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.
4. Matějčíček, P.; Uchman, M.; Lepšík, M.; Srnec, M.; Zedník, J.; **Kozlík, P.**; Kalíková, K.: *Preparation and separation of telechelic carborane-containing poly(ethylene glycol)s*; ChemPlusChem 78 (2013) 528-535.
5. **Kozlík, P.**; Krajiček, 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.
6. 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.

7. 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.
8. 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

1. **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 studentu Ústavu pro životní prostředí; Česká republika, Praha, 25. 5. 2011.
2. **Kozlík, P.**: *Vývoj analytické metody pro stanovení estrogenních polutantů ve vodách pomocí kapilární kapalinové chromatografie*; Zentiva, Česká republika, Praha, 29. 8. 2011.
3. **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*; 7<sup>th</sup> International Students Conference “Modern Analytical Chemistry“; Česká republika, Praha, 29. - 30. 9. 2011.
4. **Kozlík, P.**: *Trojité kvadrupol QqQ 6460 na katedře analytické chemie*; Dny pokročilých technik ve Viničné 7- Hmotnostní spektrometrie; Česká republika, Praha, 28. 06. 2012.

5. **Kozlík, P.**; Bosáková, Z.: *Study of separation of selected pteridines in hydrophilic interaction liquid chromatography*; 8<sup>th</sup> International Students Conference “Modern Analytical Chemistry“; Česká republika, Praha, 24. - 25. 9. 2012.
6. **Kozlík, P.**; Kalíková, K.; Tesařová, E.; Bosáková, Z.: *Characterization and comparison of cyclofructan and amide based stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography*; 9<sup>th</sup> International Students Conference “Modern Analytical Chemistry“; Česká republika, Praha, 23. - 24. 9. 2013.
7. **Kozlík, P.**: *Cyclofructan-based stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography*; Zentiva, Česká republika, Praha, 20. 2. 2014.

#### **Plakátová sdělení**

1. **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*; 24<sup>th</sup> International Symposium on Microscale Bioseparations; Dalian, Čína, 18. - 22. 10. 2009.
2. 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*; 35<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques; Boston, USA, 19. – 24. 6. 2010.
3. Širc, J.; Munzarová, M.; Lhotka, M.; **Kozlík, P.**; Hobzová, R.; Michálek, J.: *Electrospun Nanofibers as Scaffolds: Morphology and Drug Delivery*; 23<sup>rd</sup> European Conference on Biomaterials; Tampere, Finsko, 11. – 15. 9. 2010.

4. **Kozlík, P.**; Krajčůček, J.; Tesařová, E.; Čabala, R.; Bosáková, Z.: *HPLC-MS-MS Analysis of Pteridines in Graphosoma Lineatum by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*; 36<sup>th</sup> International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques; Budapešť, Maďarsko, 19. - 23. 6. 2011.
5. **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.
6. Adamusová, H.; Bosáková, Z.; **Kozlík, P.**; Hortová, K.: *Use of HPLC-MS/MS for monitoring of residual concentrations of 17 $\beta$ -estradiol during mouse sperm capacitation in vitro*; Separation Science Europe 2011; Londýn, Velká Británie, 10. – 11. 10. 2011.
7. **Kozlík, P.**; Kalíková, K.; Šimová, 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.
8. Adamusová, H.; **Kozlík, 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.
9. Kalíková, K.; **Kozlík, P.**; Šimová, V.; Tesařová, E.: *Cyclofructan-based stationary phases in HILIC*; 24<sup>th</sup> International Symposium on Chirality (Chirality 2012); Fort Worth, Texas, USA, 10. – 13. 6. 2012.
10. Kalíková, K.; **Kozlík, P.**; Gilar, M.; Tesařová, E.: *Characterization and comparison of Amide HILIC stationary phases*; 29<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography; Torun, Polsko, 9. – 13. 10. 2012.

11. Širc, J.; **Kozlík, P.**; Stránská, D.; Kubinová, 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.
12. **Kozlík, 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)*; 39<sup>th</sup> International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques; Amsterdam, Nizozemsko, 16. – 20. 6. 2013.
13. Kalíková, K.; **Kozlík, P.**; Gilar, M.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E.: *Cyclofructan and amide based stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography*; 39<sup>th</sup> International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques; Amsterdam, Nizozemsko, 16. – 20. 6. 2013.
14. Adamusová, H.; Bosáková, Z.; **Kozlík, P.**; Hortová, K.: *Monitoring of residual concentrations of 17 $\beta$ -estradiol during mouse sperm capacitation in vitro by HPLC-MS/MS*; 9<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods; Siófok, Maďarsko, 4. – 6. 9. 2013.
15. Krajíček, J.; **Kozlík, P.**; Bosáková, Z.: *Development of capillary zone electrophoresis for analysis of pterine derivatives in various kinds of bugs*; 20<sup>th</sup> International symposium on Electro- and Liquid Phase- separation techniques; Puerto de la Cruz, Tenerife, Španělsko, 6. - 9. 10. 2013.
16. Bosáková, Z.; Krajíček, J.; **Kozlík, P.**; Čabala, R.: *Analysis of bug defensive chemistry by HILIC-MS/MS and SPME-GC-MS techniques*; 41<sup>th</sup> International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques; New Orleans, Louisiana, USA, 11. – 15. 5. 2014.

**Charles University in Prague, Faculty of Science**

**Department of Analytical Chemistry**

Ph.D. study program: Analytical Chemistry

Summary of the Ph.D. thesis



# **Modern Trends in High Performance Liquid Chromatography and Their Application**

**Mgr. Petr Kozlík**

Supervisor: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Supervisor-consultant: Prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Prague, 2014





The thesis summarizes the results obtained in the years 2010 – 2014 during my Ph.D. studies at the Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague.

This work was financially supported by the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (project 1M06011, 285411, MSM0021620857), Grant Agency of the Czech Republic (project P505/11/1459), Grant Agency of the Charles University in Prague (project 356411, 18213, SVV, UNCE) and KONTAKTAM 2010 (project LH11018).

Supervisor: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.  
Department of Analytical Chemistry  
Faculty of Science, Charles University in Prague

Supervisor-consultant: Prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.  
Department of Physical and Macromolecular  
Chemistry  
Faculty of Science, Charles University in Prague

The presented Ph.D. thesis is based on following four scientific articles, which were published in international journals.

**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.

**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.

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.

**Kozlík, P.;** Krajiček, 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.

## ABSTRACT

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) was developed and used for determination of five estrogenic pollutants in aqueous samples. 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 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*.

## TABLE OF CONTENTS

ABSTRACT .....	3
LIST OF ABBREVIATIONS.....	5
<b>1 INTRODUCTION .....</b>	<b>6</b>
<b>2 AIMS OF THE WORK .....</b>	<b>9</b>
<b>3 RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>10</b>
3.1 Development of capillary liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection for analysis of estrogens in water .....	10
3.2 Comparison of properties of silica gel stationary phase and cyclofructan-based stationary phases in HILIC .....	11
3.3 Comparison of properties of amide-based stationary phases in HILIC.....	14
3.4 Analysis of pterines in <i>Graphosoma lineatum</i> and <i>Graphosoma semipunctatum</i> by HILIC-MS/MS.....	17
<b>5 CONCLUSIONS.....</b>	<b>19</b>
<b>6 REFERENCES .....</b>	<b>21</b>
CURICULLUM VITAE.....	23
LIST OF PUBLICATIONS.....	25
LIST OF LECTURES AND POSTERS .....	26

## LIST OF ABBREVIATIONS

ACN	acetonitrile
CF	cyclofructan
cLC	capillary liquid chromatography
ED	endocrine disruptors
<i>GL</i>	<i>Graphosoma lineatum</i>
<i>GS</i>	<i>Graphosoma semipunctatum</i>
HILIC	hydrophilic interaction liquid chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography
LFER	linear free energy relationship
MRM	multiple reaction monitoring
MS	mass spectrometry
MS/MS	tandem mass spectrometry
RSD	relative standard deviation
SP	stationary phase
SPE	solide phase extraction

## 1 INTRODUCTION

High performance liquid chromatography (HPLC) is one of the most widely used separation techniques. The main advantages of HPLC are high reliability, good repeatability and robustness. Over the last years, substantial developments of HPLC have been made, mainly in terms of its instrumentation.

HPLC with mass spectrometric (MS) detection belongs to the most important trends applicable in practice. HPLC with MS is not a novel technique but an enhancement of spray ionization techniques has allowed the introduction of HPLC/MS techniques into routine laboratories [1]. The combination of HPLC with MS has a unique position in the analysis of complex samples, such as biological and environmental materials [1]. At the present time, the emphasis is put on the development of highly sensitive and selective methods that would be able to determine environmental pollutants at concentration levels, in which these substances are actually present [2]. One of the many polluting substances are estrogenic substances. These compounds, called endocrine disruptors (ED), may imitate the activities of endogenous hormones or may interfere with them. Changes in the sex and in the reproduction functions for amphibians, crustaceans and fishes caused by the presence of estrogens in the environment have been proved [4]. It is suspected that the estrogenic substances may be involved in breast, ovarian, prostate cancer and reduction of moving sperm count and its quality [7]. The presence of the selected estrogens, namely estriol, estrone, 17 $\alpha$ -estradiol, 17 $\alpha$ -ethynylestradiol, 17 $\beta$ -estradiol, in natural water was studied in this work.

The contemporary trends in analytical chemistry lead to efforts concerning the introduction of approaches that are friendly to the environment (the green chemistry), involving limited use of organic solvents. The classical HPLC uses mobile phase flow rate of about 0.3 to 1.5 mL/min. Therefore capillary liquid chromatography (cLC) has gained a considerable interest due to the flow rates of microliters per minute. There are several advantages of cLC, which include not only reduction of organic waste but also increase of separation efficiency, lower sample consumption, which is important mainly for biological samples, and easy connection with MS detectors [9, 10].

The HPLC is usually used in the reversed phase chromatographic mode, where the stationary phase is less polar than the mobile phase. The reversed phase chromatography is not suitable for polar analytes such as metabolites (different amino acid derivatives, carbohydrates, peptides, etc.) and other biologically active substances. These analytes usually exhibit very low retention and separation system has very poor selectivity towards them. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) offers very good possibilities for separation of these polar compounds [11]. Under the HILIC conditions, stationary phase is of polar character and mobile phase contains high percentage of an organic solvent particularly acetonitrile [12]. The basic types of HILIC stationary phases consist of classical bare silica or silica gel modified with various polar functional groups (e.g. amide-, diol, amino- or sulfoalkylbetaine-) [13]. Various stationary phases are commercially available, however, development of new sorbents suitable for HILIC systems still continues. Potential candidates for wider use in HILIC are cyclofructan-based stationary phases [14]. Cyclofructans as chiral selectors in HPLC were introduced by Armstrong in 2009 [15]. Since then, cyclofructans have been used in many chiral separations [16, 17]. Qui et al. firstly employed native cyclofructan as a new HILIC stationary phase in 2011 [18]. The characterization of separation systems in terms of interaction mechanism may be useful for the development of chromatographic methods and also in the development of new stationary phases.

In this work determination of polar pterines in *Graphosoma lineatum* and *Graphosoma semipunctatum* by hydrophilic interaction liquid chromatography with mass spectrometric detection is an example of the use of new trends in liquid chromatography. Pterines are one of the families of pigmentary colors of insect cuticle. They have various colors (structure based), ranging from white (leucopterin), or yellow (xanthopterin) over red (erythropterin) to fluorescent blue under ultraviolet light (biopterin) [19]. The coloration of cuticle of the *Graphosoma* species changes during the evolution of the specimen, sometimes also according to the season and sometimes also varies geographically. The shade of the coloration is probably the result of the presence of certain pterin derivatives and their mutual ratios [20]. Due to poor



selectivity for the separation of polar pterines by reversed phase HPLC and complexity of the studied samples, HILIC-MS/MS is an ideal method for the analysis of pterines.

## 2 AIMS OF THE WORK

This work is aimed to study and application of modern trends in liquid chromatography. It can be divided into two parts.

The goal of the first part was the development of a solid-phase extraction combined with capillary liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of estrogens in environmental water samples.

The second part was focused on hydrophilic interaction liquid chromatography. The particular objectives of this part were as follows:

- Characterization and comparison of three stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography – silica gel, native cyclodextran chemically bonded to silica gel and isopropyl carbamate cyclodextran chemically bonded to silica gel.
- Characterization and comparison of the separation systems composed of two amide-based HPLC columns from two producers in hydrophilic interaction liquid chromatography. Multiple testing approaches were used in order to reveal subtle differences between the amide based columns.
- Development of an analytical method using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry for identification and quantification of selected pterines in integuments of *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum*.

### **3 RESULTS AND DISCUSSION**

#### **3.1 Development of capillary liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection for analysis of estrogens in water**

All measurements were performed using Series 1200 Capillary Liquid Chromatograph with a Triple Quad LC/MS 6460 tandem mass spectrometer (Agilent Technologies, Waldbroon, Germany). Mass spectrometer was set to multiple reaction monitoring mode (MRM). Electrospray ionisation operated in positive mode because the signals attained for the test analytes in this mode were higher than for negative one. The Zorbax SB C18 capillary column (150 mm x 0.5 mm, 5  $\mu$ m; Agilent Technologies, Waldbroon, Germany) was selected for study of retention and separation of estrogens. A binary mixture of acetonitrile and water, containing 0.1% formic acid in both components, was used as the mobile phase. The system was optimized under the conditions of isocratic and gradient elutions. Under gradient elution the optimum composition of the mobile phase was tuned according to attain a sufficient retention of the most polar analyte - estriol, an acceptable resolution of all the estrogens, sufficient detection sensitivity and insignificant matrix effect.

The solid phase extraction was optimized considering the SPE sorbent type, the sample volume, the sample flow rate, the elution solvent and its flow rate. New C18-based sorption materials bound to the silica support by monomeric and polymeric mechanisms were compared and tested with respect to optimization of preconcentration yield. Application of an endcapped, monomer-bound preconcentration Discovery DSC-18Lt column under the optimized conditions provided yields in the range from 95 to 100% with a high repeatability ( $n = 3$ ,  $RSD \leq 7.2\%$ ).

Under the optimized preconcentration and separation conditions, the calibration curves were measured for all the five estrogens in spiked river water (Uhlava, Klatovy) which did not contain any estrogens. The detection limits were in the range from 5 to 7 ng/L and the quantification limits in the range from 10 to 25 ng/L.

The optimized procedures for the determination of estrogens were applied to six real aqueous samples collected between September and December, 2009

at various sites, namely, Vltava river (about 900 m beyond the Prague wastewater treatment plant), the Botič stream (Prague), Uhlava river (Klatovy, Pilsen), wastewater entering and leaving the Imperial Island Prague wastewater treatment plant. Only two samples yielded positive results for the presence of estrogens. Vltava river sample (Prague) contained 13.2 ng/L (RSD 5.5%) of 17 $\beta$ -estradiol. The wastewater inlet into the wastewater treatment plant contained all the studied estrogens, except 17 $\alpha$ -estradiol. The concentrations (ng/L) were 20.5 for estrone (RSD 8.4%), 21.4 for 17 $\beta$ -estradiol (RSD 7.2%), 100.7 for 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (RSD 4.4%) and 188.6 for estril (RSD 6.8%).

The results obtained correspond to those published for classical HPLC-MS/MS analysis. The detection limits for HPLC-MS/MS analysis range from units to tens of ng/L of free estrogens and this fully agrees with LOD values obtained in this study. The estrogen contents in river and wastewater found in our study are also comparable with the results published for Japanese and Spanish river and surface water of the Baltic Sea [21-23].

### **3.2 Comparison of properties of silica gel stationary phase and cyclofructan-based stationary phases in HILIC**

Silica gel stationary phases (SPs) are widely used in HILIC. The modification of bare silica gel can improve the separation ability. HILIC separation systems with bare silica gel, native cyclofructan (Frulic-N CF6 column) and isopropyl cyclofructan (Larihc CF6-P column) modified silica stationary phases were investigated and compared in terms of separation performance of peptides and interaction abilities that determine retention mechanism.

The separations of two sets of analytes, five nonapeptides and four pentapeptides, were optimized. Figure 1 shows separation of nonapeptides under optimized mobile phase composition: ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 80/20 (v/v). The shortest time of analysis was obtained on Larihc CF6-P column. Cyclofructan-based stationary phases provided good peak symmetry and separation performance. The longest analysis time (100 min) was obtained for bare silica gel stationary phase and was accompanied by

peak tailing. Chromatograms of separation of the set of pentapeptides are shown in Figure 2. The set of pentapeptides was baseline resolved within 25 min using Larihc CF6-P column and mobile phase composed of ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 88/12 (v/v) and within 13 min using Frulic-N CF6 column under mobile phase composed of ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 83/17 (v/v). The bare silica column was not suitable for separation of pentapeptides because Leucine enkephalin and [Met<sup>5</sup>]Enkephalin were not separated at any mobile phase composition and other analytes exhibited peak tailing. The change of ACN/buffer ratio in the mobile phase only affected the retention but had negligible impact on resolution of the critical pair of pentapeptides.

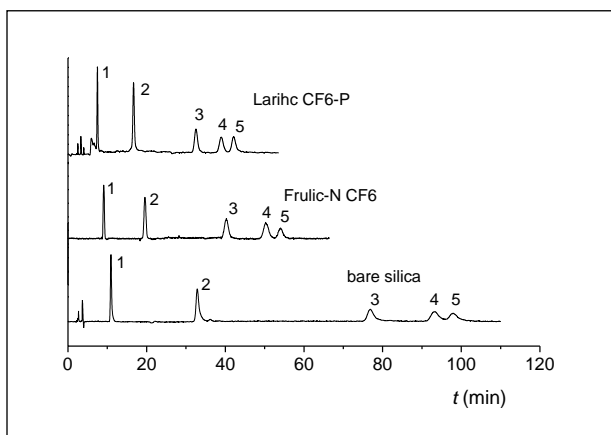


Figure 1 Chromatograms of separation of five nonapeptides on the three tested columns. Mobile phase composition: ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 80/20 (v/v); flow rate 1 mL/min; column temperature 25 °C; UV detection 220 nm. Elution order: 1, Oxytocin 2, [deamino-Cys<sup>1</sup>, D-Arg<sup>8</sup>]Vasopressin 3, [Arg<sup>8</sup>]Vasopressin 4, [Arg<sup>8</sup>]Vasotocin 5, [Lys<sup>8</sup>]Vasopressin.

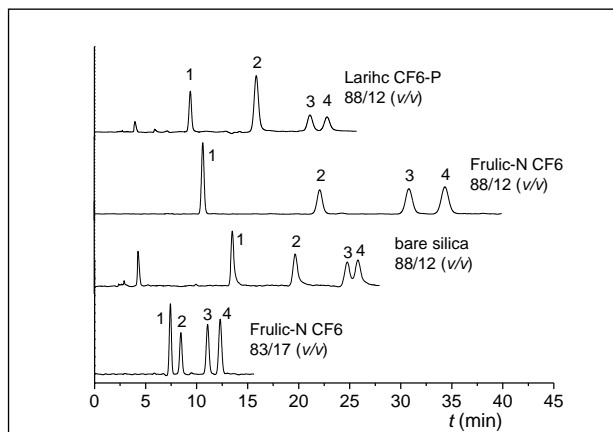


Figure 2 Chromatograms of separation of four pentapeptides on the three tested columns. Mobile phase composition: ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, ratio of organic to buffer phase is written under column name; flow rate 1 mL/min; column temperature 25 °C; UV detection 220 nm. Elution order: 1, Leucine enkephalinamide 2, [D-Ala<sup>2</sup>]-Leucine enkephalin 3, Leucine enkephalin 4, [Met<sup>5</sup>]Enkephalin.

The detailed study of interaction mechanism of peptides revealed that partitioning and adsorption participate in the retention and separation mechanism with these stationary phases. The Walters test was used for determination of hydrophobicity and silanol activity of the SPs. Silanol index values were similar for all these SPs. Hydrophobicity resulting from the Walters test was low, as could be expected. The bare silica column exhibited the highest hydrophobicity. The lowest hydrophobicity offered the underivatized CF-based SP (Frulic-N CF6 column) because it contains many additional polar groups.

The interactions participating in the retention and separation mechanism were identified and quantified using linear free energy relationship method (LFER). From the qualitative point of view interaction abilities of both CF-based SPs are similar whereas the bare silica SP shows only one interaction type. The adsorption mechanism is controlled only by hydrogen bond acidity

there. LFER results denoted that the main role in the adsorption mechanism on the CF-based SPs play hydrogen bond acidity and dipolarity/polarizability, while dispersion interactions are preferred in the mobile phase.

Despite the fact that bare silica gel is often used as stationary phase in HILIC our study shows that modification of the silica gel with polar cyclofructan groups can substantially improve its separation performance for polar compounds in HILIC.

### **3.3 Comparison of properties of amide-based stationary phases in HILIC**

Different stationary phases usually display different retention characteristics and separation selectivity. Even sorbents based on the same type of ligand can display unequal interaction possibilities (*e.g.* due to different chemical binding or base sorbent support), and thus different chromatographic properties. This work was focused on characterization and comparison of the separation systems of two amide-based HPLC columns from two producers, *i.e.* XBridge™ Amide column (Waters, Milford, USA) and TSK gel Amide-80 column (Tosoh, Tokyo, Japan). A systematic approach for characterization of the separation systems was used. Sets of peptides, nucleobases, and small molecules were selected as model compounds with the intent to probe the chromatographic interactions of the chosen SPs and demonstrate their applicability for separation of biologically important compounds. LFER model, general tests for characterization of the stationary phases *e.g.* Walters test, selectivity for different groups, basic compounds testing approach, and study of the effect of separation temperature were also employed.

The separation of four pentapeptides on both columns is shown in Figure 3. Better separation was obtained on XBridge™ Amide column compared to TSK gel Amide-80 column at the same mobile phase composition: ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 85/15 (v/v). This is in part due to higher chromatographic efficiency of the former column (particle size 3.5 µm for XBridge™ Amide column and 5 µm for TSK gel Amide-80 column). The baseline resolution of peptides on TSK gel Amide-80 column can be achieved

by increasing the ACN percentage in the mobile phase to 88%; however, the analysis time increases to 25 minutes.

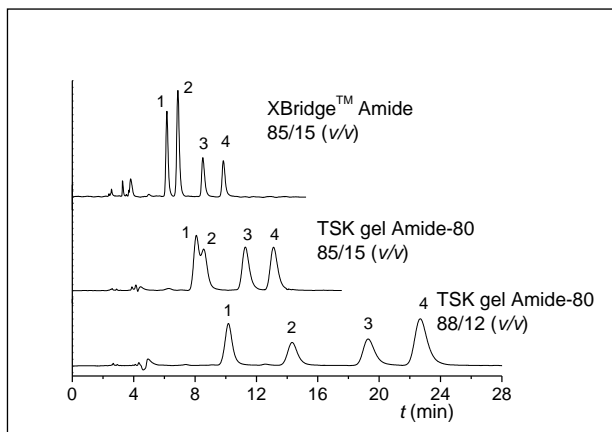


Figure 3 Chromatograms of separation of four pentapeptides on two amide-based columns. Mobile phase composition: ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, ratio of organic to buffer phase is written under column name; flow rate 1 mL/min; column temperature 25 °C; UV detection 220 nm. Elution order: 1, Leucine enkephalinamide 2, [D-Ala<sup>2</sup>]-Leucine enkephalin 3, Leucine enkephalin 4, [Met<sup>5</sup>]Enkephalin.

The chromatographic behavior of nucleobases was also evaluated. The optimal composition of the mobile phase was the same for both columns: ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 85/15 (v/v). All five nucleobases were baseline resolved on both columns. Higher efficiency was observed with XBridge™ Amide column. The difference in separation efficiency should also be attributed to the different particle size. Chromatograms of separation of nucleobases are shown in Figure 4.



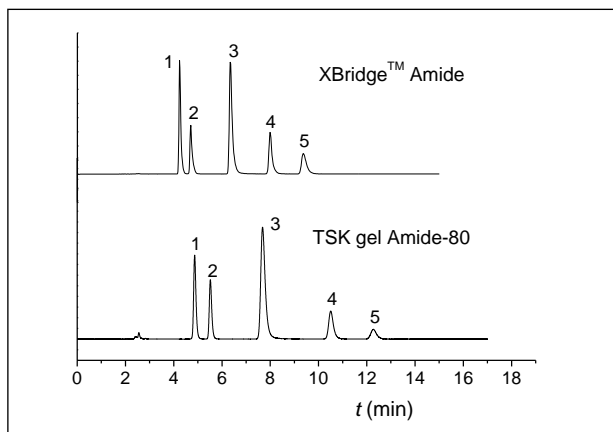


Figure 4 Chromatograms of separation of five nucleobases on two amide-based columns. Mobile phase composition: ACN/20 mM ammonium acetate buffer, pH 4.00, 85/15 (v/v); flow rate 1 mL/min; column temperature 25 °C; UV detection 220 nm. Elution order: 1, Thymine 2, Uracil 3, Adenine 4, Cytosine 5, Guanine.

Chromatographic behavior of selected analytes (peptides and nucleobases) indicated that multimodal mechanism (partitioning and adsorption) was responsible for retention and separation on these columns.

Group selectivity testing and LFER method indicated stronger degree of hydrogen bonding interactions, namely H-bond acidity and basicity, on TSK gel Amide-80 column. Higher absolute and relative retention of basic compounds indicated a moderately higher cation-exchange activity on TSK gel Amide-80 column. Van't Hoff plots showed that the effect of temperature in the studied range was not essential for the amide-based columns in HILIC mode.

### 3.4 Analysis of pterines in *Graphosoma lineatum* and *Graphosoma semipunctatum* by HILIC-MS/MS

This work was focused on development of a new separation method involving hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometric detection for the analysis of pterines, namely biopterin, isoxanthopterin, leucopterin, neopterin, xanthopterin and erythropterin in the cuticle of *Graphosoma lineatum* and *Graphosoma semipunctatum*.

Two columns, Atlantis HILIC Silica (Waters, Milford, USA) and ZIC-HILIC (Merck, Darmstadt, Germany) were tested for the separation of these pterines. The effect of organic modifier content, buffer type, concentration and pH in mobile phase on retention and separation behavior of the selected pterines was studied. The ZIC-HILIC column provided stronger retention of pterines and higher selectivity and efficiency of separation than Atlantis HILIC Silica. Based on the optimization of separation of pterines and with respect to mass spectrometry detection, the optimal separation system was found to be the ZIC-HILIC column and mobile phase ACN/5 mM ammonium acetate, pH 6.80, 85/15 (v/v), flow rate 0.5 mL/min and column temperature 30 °C.

The calibration curve method was used for determining pterines in *Graphosoma lineatum* and *Graphosoma semipunctatum*. The method was validated for linearity, limits of detection and quantitation, accuracy, precision, selectivity, carry-over effect and matrix effects. Precisions of the method ranged from 0.8 to 8.1%, and accuracy was within  $\pm 9.6\%$ . The optimized LC-MS/MS method was used for determining the selected pterines in four forms of *Graphosoma lineatum*, namely larvae, pale, red, and yellow adult forms; and orange adult form of *Graphosoma semipunctatum*. Dimethyl sulfoxide was used for the extraction of pterines from the insect integuments. Obtained results of the analysis of pterines in different forms of *Graphosoma lineatum* and *Graphosoma semipunctatum* are summarized in Figure 5.

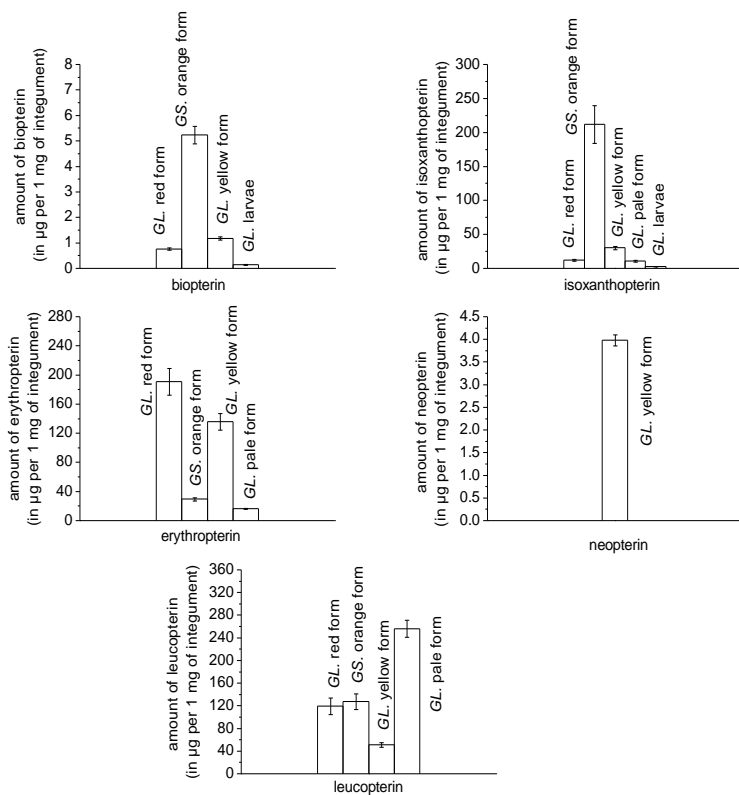


Figure 5 Comparison of the amounts of pterines found in different forms of *Graphosoma lineatum* (GL.) and *Graphosoma semipunctatum* (GS.)

It is evident that xanthopterin was not found in any of studied forms. Neopterin was only found in the yellow form. Isoxanthopterin was the only pterine present in all forms of *Graphosoma lineatum* and *Graphosoma semipunctatum*. Larvae of *Graphosoma lineatum* contains only a small amount of biopterin and isoxanthopterin.

## 5 CONCLUSIONS

This dissertation thesis is a commented collection of four papers published in respected journals with impact factors. These papers reflect important modern trends in high performance liquid chromatography.

The first part of the thesis deals with the ability to connect miniaturized liquid chromatography with tandem mass spectrometry for environmental analysis. The second part of the thesis is focused on hydrophilic interaction liquid chromatography. A complex approach based on different chromatographic tests was used for characterization and comparison of several different stationary phases in HILIC. HILIC was also used for the development of HPLC-MS/MS method for the determination of selected pterins in the cuticle of bugs.

The results can be summarized in the following points:

- A new, miniaturized separation procedure employing cLC-MS/MS with solid phase extraction was developed for the determination of selected estrogen pollutants in water. This method was successfully applied to the analysis of real natural water samples from different locations in the Czech Republic.
- HILIC separation systems with silica gel, cyclofructan and isopropyl cyclofructan modified silica stationary phases were characterized and compared. The bare silica column showed the lowest selectivity for the tested peptides. Modification of silica gel with cyclofructans resulted in improved selectivities. The LFER results showed that the adsorption mechanism is controlled only by hydrogen bond acidity for bare silica SP while the main role on the CF-based SPs play hydrogen bond acidity and dipolarity/polarizability with dispersion interactions preferred in the mobile phase. Modification of silica gel with cyclofructans and their derivatives indicates that CFs can serve as promising modulators for preparation of HILIC SPs of desired properties, interaction abilities and selectivities for separation of biologically active compounds.
- Two amide-based HPLC columns XBridge<sup>TM</sup> Amide column and TSK gel Amide-80 column were characterized and compared in HILIC mode. Higher

separation efficiency was achieved for XBridge™ Amide column mainly due to smaller particle size. TSK gel Amide-80 column had a greater ability to interact through hydrogen bonding interactions and provided a more significant cation-exchange type of interaction compared to the XBridge™ Amide column. While amide-based SPs are very similar, based on the tests used in this study differences in retention, selectivity and plate counts were proved.

- A new separation method involving hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometric detection has been developed for the analysis of pterines in the cuticle of heteropteran insect species. This method was validated and applied for determination of selected pterines in four forms of *Graphosoma lineatum* and one form of *Graphosoma semipunctatum*.

## 6 REFERENCES

- [1] Holcapek, M., Jirasko, R., Lisa, M.: J. Chromatogr. A 1259 (2012) 3-15.
- [2] Kozlik, P., Bosakova, Z., Tesarova, E., Coufal, P., Cabala, R.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 2127-2132.
- [3] Eertmans, F., Dhooge, W., Stuyvaert, S., Comhaire, F.: Toxicol. in Vitro 17 (2003) 515-524.
- [4] Kozlik, P.: Diploma thesis, Charles University in Prague 2010.
- [5] Pacakova, V., Loukotkova, L., Bosakova, Z., Stulik, K.: J. Sep. Sci. 32 (2009) 867-882.
- [6] Mills, L. J., Chichester, C.: Sci. Total Environ. 343 (2005) 1-34.
- [7] 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.
- [8] Vidaeff, A. C., Sever, L. E.: Reprod. Toxicol. 20 (2005) 5-20.
- [9] Barroso, A., Gimenez, E., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V.: Anal. Chim. Acta 804 (2013) 167-175.
- [10] Fanali, C., Dugo, L., Dugo, P., Mondello, L.: Trends Anal. Chem. 52 (2013) 226-238.
- [11] Hemstrom, P., Irgum, K.: J. Sep. Sci. 29 (2006) 1784-1821.
- [12] Buszewski, B., Noga, S.: Anal. Bioanal. Chem. 402 (2012) 231-247.
- [13] Jandera, P.: Anal. Chim. Acta 692 (2011) 1-25.
- [14] Kozlik, P., Simova, V., Kalikova, K., Bosakova, Z., Armstrong, D. W., Tesarova, E.: J. Chromatogr. A 1257 (2012) 58-65.
- [15] Sun, P., Wang, C. L., Breitbach, Z. S., Zhang, Y., Armstrong, D. W.: Anal. Chem. 81 (2009) 10215-10226.
- [16] Kalikova, K., Janeckova, L., Armstrong, D. W., Tesarova, E.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 1393-1398.
- [17] Vozka, J., Kalikova, K., Janeckova, L., Armstrong, D. W., Tesarova, E.: Anal. Lett. 45 (2012) 2344-2358.
- [18] Qiu, H. X., Loukotkova, L., Sun, P., Tesarova, E., Bosakova, Z., Armstrong, D. W.: J. Chromatogr. A 1218 (2011) 270-279.
- [19] Nemeč, V., Breuer, M., De Loof, A.: Eur. J. Entomol. 100 (2003) 19-23.
- [20] 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.

- [21] Sole, M., de Alda, M. J. L., Castillo, M., Porte, C., Ladegaard-Pedersen, K., Barcelo, D.: Environ. Sci. Technol. 34 (2000) 5076-5083.
- [22] Mitani, K., Fujioka, A., Kataoka, H.: J. Chromatogr. A 1081 (2005) 218-224.
- [23] Beck, I. C., Bruhn, R., Gandraas, J., Ruck, W.: . Chromatogr. A 1090 (2005) 98-106.

## CURRICULUM VITAE

### PERSONAL INFORMATION

---

Name Petr Kozlík  
Date of birth 27.10.1985  
Place of birth Kutná Hora, Czech Republic  
Contact [kozlik@natur.cuni.cz](mailto:kozlik@natur.cuni.cz)

### EDUCATION

---

**2010 – present** Charles University in Prague, Faculty of Science, Dept. of Analytical Chemistry; Study program: Analytical chemistry  
**2008 – 2010** Charles University in Prague, Faculty of Science, Dept. of Analytical Chemistry; Study program: Clinical and Toxicological Analysis; Degree: master  
**2005 – 2008** Charles University in Prague, Faculty of Science, Dept. of Analytical Chemistry; Study program: Clinical and Toxicological Analysis; Degree: bachelor

### WORK EXPERIENCES

---

**02/2013 – present** Charles University in Prague, Faculty of Science, Dept. of Analytical Chemistry  
Position: Researcher  
Responsibility: Working on application of liquid chromatography in analysis of biological active compounds  
**05/2013 – present** Zentiva, k. s., Solid State Department  
Position: Specialist  
Responsibilities: Chemical characterization of pharmaceutical active ingredients, development of ultra high performance liquid chromatographic methods, degradation study of pharmaceutical active ingredients and dosage forms



**10/2011 – 05/2013** Zentiva, k. s., Analytical Development

Position: Analytical Chemist

Responsibilities: Development of ultra high performance liquid chromatographic methods, degradation study of pharmaceutical active ingredients and dosage forms, dissolution testing

**05/2008 – 10/2011** Charles University in Prague, Faculty of Science, Dept. of Analytical Chemistry

Position: Laboratory technician

Responsibilities: Analysis of environmental pollutants

#### GRANTS

---

**2013 – present** Participating in project of Czech Science Foundation GACR 13-01440S: Chiral molecular polymers based on derivatized cyclodextrins as a new environment for capillary separation techniques

**2013 – present** Participating in project of Grant Agency of Charles University GAUK 18213: Comprehensive analysis of warning and defensive substances of bugs by high performance separation techniques hyphenated with mass spectrometric detection

**2008 – 2011** Participating in project of Ministry of Education Youth and Sports: Centrum of molecular method of monitoring of diffused pollution of environment 1M06011

#### LANGUAGE SKILLS

---

English Cambridge Certificate Preliminary English Test (PET)

German Beginner

## LIST OF PUBLICATIONS

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. Širc, J.; Kubínová, S.; Hobzová, R.; Stránská, D.; **Kozlík, 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.
4. Matějčíček, P.; Uchman, M.; Lepšík, M.; Srnec, M.; Zedník, J.; **Kozlík, P.**; Kalíková, K.: *Preparation and separation of telechelic carborane-containing poly(ethylene glycol)s*; ChemPlusChem 78 (2013) 528-535.
5. **Kozlík, P.**; Krajiček, 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 in two Graphosoma species (Insecta: Heteroptera)*; J. Chromatogr. B 930 (2013) 82-89.
6. 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.

7. 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.
8. 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.

## LIST OF LECTURES AND POSTERS

### Lectures

1. **Kozlík, P.**; Bosáková, Z.; Tesařová, E.: *Analyzá estrogenních polutantů ve vodných vzorcích životního prostředí pomocí kapilární kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií po extrakci tuhou fází*; 2<sup>th</sup> Students Conference of Institute for Environmental Studies; Czech Republic, Prague, 25. 5. 2011.
2. **Kozlík, P.**: *Vývoj analytické metody pro stanovení estrogenních polutanů ve vodách pomocí kapilární kapalinové chromatografie*; Zentiva, Czech Republic, Prague, 29. 8. 2011.
3. **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*; 7<sup>th</sup> International Students Conference “Modern Analytical Chemistry”; Czech Republic, Prague, 29. - 30. 9. 2011.
4. **Kozlík, P.**: *Trojité kvadrupol QqQ 6460 na katedře analytické chemie*; Days of advanced techniques in Viničná 7 – Mass Spectrometry; Czech Republic, Prague, 28. 06. 2012.

5. **Kozlík, P.**; Bosáková, Z.: *Study of separation of selected pteridines in hydrophilic interaction liquid chromatography*; 8<sup>th</sup> International Students Conference “Modern Analytical Chemistry“; Czech Republic, Prague, 24. - 25. 9. 2012.
6. **Kozlík, P.**; Kalíková, K.; Tesařová, E.; Bosáková, Z.: *Characterization and comparison of cyclofructan and amide based stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography*; 9<sup>th</sup> International Students Conference “Modern Analytical Chemistry“; Czech Republic, Prague, 23. - 24. 9. 2013.
7. **Kozlík, P.**: *Cyclofructan-based stationary phases in hydrophilic interaction liquid chromatography*; Zentiva, Czech Republic, Prague, 20. 2. 2014.

#### **Posters**

1. **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*; 24<sup>th</sup> International Symposium on Microscale Bioseparations; Dalian, China, 18. - 22. 10. 2009.
2. 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*; 35<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques; Boston, USA, 19. – 24. 6. 2010.
3. Širc, J.; Munzarová, M.; Lhotka, M.; **Kozlík, P.**; Hobzová, R.; Michálek, J.: *Electrospun Nanofibers as Scaffolds: Morphology and Drug Delivery*; 23<sup>rd</sup> European Conference on Biomaterials; Tampere, Finland, 11. – 15. 9. 2010.

4. **Kozlík, P.**; Krajiček, J.; Tesařová, E.; Čabala, R.; Bosáková, Z.: *HPLC-MS-MS Analysis of Pteridines in Graphosoma Lineatum by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*; 36<sup>th</sup> International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques; Budapest, Hungary, 19. - 23. 6. 2011.
5. **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<sup>th</sup> Meeting of Chemists; High Tatras, Slovakia, 5. – 9. 9. 2011.
6. Adamusová, H.; Bosáková, Z.; **Kozlík, P.**; Hortová, K.: *Use of HPLC-MS/MS for monitoring of residual concentrations of 17 $\beta$ -estradiol during mouse sperm capacitation in vitro*; Separation Science Europe 2011; London, Great Britain, 10. – 11. 10. 2011.
7. **Kozlík, 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 Chiralal 2012; Olomouc, Czech Republic, 11. – 14. 6. 2012.
8. Adamusová, H.; **Kozlík, P.**; Repko, P.; Tesařová, E.; Bosáková, Z.: *HPLC enantioseparation and quantitation of Fmoc-derivatized branched amino acids*; Advances in chromatography and electrophoresis 2012 and Chiralal 2012; Olomouc, Czech Republic, 11. – 14. 6. 2012.
9. Kalíková, K.; **Kozlík, P.**; Šímová, V.; Tesařová, E.: *Cyclofructan-based stationary phases in HILIC*; 24<sup>th</sup> International Symposium on Chirality (Chirality 2012); Fort Worth, Texas, USA, 10. – 13. 6. 2012.
10. Kalíková, K.; **Kozlík, P.**; Gilar, M.; Tesařová, E.: *Characterization and comparison of Amide HILIC stationary phases*; 29<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography; Torun, Poland, 9. – 13. 10. 2012.

11. Širc, J.; **Kozlík, P.**; Stránská, D.; Kubinová, Š.; Hobzová, R.; Michálek, J.: *Multilayer nanofibrous constructs with incorporated gentamicin for controlled drug release*; 14th Annual Conference Yucomat 2012; Herceg Novi, Montenegro, 3. – 7. 9. 2012.
12. **Kozlík, P.**; Krajiček, 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)*; 39<sup>th</sup> International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques; Amsterdam, Netherlands, 16. – 20. 6. 2013.
13. Kalíková, K.; **Kozlík, P.**; Gilar, M.; Armstrong, D. W.; Tesařová, E.: *Cyclofructan and amide based stationary phases for hydrophilic interaction liquid chromatography*; 39<sup>th</sup> International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques; Amsterdam, Netherlands, 16. – 20. 6. 2013.
14. Adamusová, H.; Bosáková, Z.; **Kozlík, P.**; Hortová, K.: *Monitoring of residual concentrations of 17 $\beta$ -estradiol during mouse sperm capacitation in vitro by HPLC-MS/MS*; 9<sup>th</sup> Balaton Symposium on High-Performance Separation Methods; Siófok, Hungary, 4. – 6. 9. 2013.
15. Krajiček, J.; **Kozlík, P.**; Bosáková, Z.: *Development of capillary zone electrophoresis for analysis of pterine derivatives in various kinds of bugs*; 20<sup>th</sup> International symposium on Electro- and Liquid Phase- separation techniques; Puerto de la Cruz, Tenerife, Spain, 6. - 9. 10. 2013.
16. Bosáková, Z.; Krajiček, J.; **Kozlík, P.**; Čabala, R.: *Analysis of bug defensive chemistry by HILIC-MS/MS and SPME-GC-MS techniques*; 41<sup>th</sup> International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques; New Orleans, Louisiana, USA, 11. – 15. 5. 2014.