

UNIVERZITA KARLOVA  
Přírodovědecká fakulta

---



RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

HYDROFILNÍ INTERAKČNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE:  
OD SEPARAČNÍHO MECHANISMU PŘES ANALÝZU MALÝCH  
MOLEKUL KE GLYKOPROTEOMICKÉ ANALÝZE

Hydrophilic interaction liquid chromatography: From separation  
mechanism through analysis of small molecules to glycoproteomic  
analysis

Habilitační práce

Praha 2023

# OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	3
<b>PŘEDMLUVA</b> .....	5
<b>1 ÚVOD</b> .....	6
<b>2 HYDROFILNÍ INTERAKČNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRRAFIE</b> .....	8
2.1 MECHANISMUS RETENCE A SEPARACE V HILIC .....	9
2.1.1 Cyklofruktany jako stacionární fáze v HILIC .....	12
2.1.2 Porovnání amidových kolon v HILIC.....	15
2.1.3 Vliv typu kationtu pufru mobilní fáze na retenci aminokyselin a dipeptidů.....	16
2.1.4 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie s iontově-výměnnou chromatografií .....	17
2.2 HILIC ANALÝZA MALÝCH MOLEKUL.....	21
2.2.1 Stanovení efedrinu v pevné lékové formě .....	21
2.2.2 Stanovení alantoinu v lidském séru .....	22
2.2.3 Stanovení pterinů v kutikule ploštic .....	23
2.3 HILIC V GLYKOPROTEOMICKÉ ANALÝZE.....	25
2.3.1 Glykoproteiny .....	25
2.3.2 Glykoproteomická analýza .....	28
2.3.3 Chromatografické chování N-glykopeptidů v RP-LC módu .....	29
2.3.4 HILIC v separaci glykopeptidů.....	32
2.3.5 Vliv obsahu acetonitrilu v nástřikovém solventu na rozpustnost glykopeptidů .....	36
2.3.6 Vliv typu stacionární fáze na separaci glykopeptidů hemopexinu a IgG v HILIC ...	38
2.3.7 Separace glykopeptidů IgG za použití HILIC/IEC .....	40
2.3.8 Predikce retenčních oken glykopeptidů v HILIC .....	42
<b>3 ZÁVĚR</b> .....	44
<b>4 PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ</b> .....	46
4.1 Původní vědecké práce v impaktovaných časopisech.....	46
4.2 Přehledové články v impaktovaných časopisech.....	52
4.3 Jiné články v časopisech .....	52
<b>LITERATURA</b> .....	53
<b>PŘÍLOHY</b> .....	62

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A2G2	dvojramenná glykoforma
A2G2F1	dvojramenná glykoforma s jednou fukosou
A2G2S1	dvojramenná glykoforma s jednou sialovou kyselinou
BMI	index tělesné hmotnosti
BTMA	benzyltrimethylamonium chlorid
C18	oktadecyl
CF6	silikagel modifikovaný nativním cyklofruktanem 6
CF6-P	silikagel modifikovaný isopropylovaným cyklofruktanem 6
CID	kolizně indukovaná disociace
CZE	kapilární zónová elektroforéza
ETD	disociace přenosem elektronů
EThcD	vysokoenergetická disociace přenosem elektronů
Fuc	fukosa
Gal	galaktosa
GalNAc	N-acetylgalaktosamin
Glc	glukosa
GlcNAc	N-acetylglukosamin
HIC	hydrofobní interakční chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční kapalinová chromatografie
HILIC-A	kolona obsahující nemodifikovaný silikagel
HILIC-B	kolona obsahující aminopropylové skupiny vázané na silikagelu
HILIC-N	kolona obsahující polyhydroxylový řetězec vázaný na silikagelu
H-Phe-Trp	fenylalanyl-tryptofan
H-Phe-Tyr	fenylalanyl-tyrosin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
H-Trp-Phe	tryptofanyl-fenylalanin
H-Tyr-Phe	tyrosyl-fenylalanin
IEC	iontově-výměnná chromatografie
IgG	imunoglobulin G
IRMPD	infračervená multifotonová disociace
LC	kapalinová chromatografie
LFER	model lineárních vztahů volných energií
Man	manosa
MF	mobilní fáze
MLC	micelární kapalinová chromatografie

MRM	monitorování více reakcí mezi prekurzorovým a produktovým iontem
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NP-LC	kapalinová chromatografie s normálními fázemi
PGC	porézní grafitizovaný uhlík
Q	kvadrupól
RBD	porucha chování v REM fázi spánku
REM	rychlé pohyby očí
RP-LC	kapalinová chromatografie s reverzními fázemi
RRT	relativní retenční čas
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
SEC	molekulová vylučovací chromatografie
SF	stacionární fáze
SHGB	globulin vázající sexuální hormony
Sia	sialová kyselina
SPE	extrakce na tuhé fázi
SRM	monitorování vybraných reakcí mezi prekurzorovým a produktovým iontem
TEA	triethylamin
ToF	analyzátor doby letu
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialová oblast spektra
A	acidita vodíkové vazby (donor vodíku)
$A_s$	plocha na povrchu stacionární fáze obsazená molekulami analytu
B	bazicita vodíkové vazby (akceptor vodíku)
E	schopnost analytu interagovat pomocí n- a $\pi$ - elektronů
$k$	retenční faktor
$N_w$	molární zlomek vodné složky v mobilní fázi
$n_w$	plocha na povrchu stacionární fáze obsazená molekulami vody
R	rozlišení
S	parametr dipolarity/polarizability popisující interakce dipól-dipól
V	McGowanův charakteristický objem popisující disperzní a kohezní interakce
$\varphi$	objemový zlomek vodné složky mobilní fáze

## PŘEDMLUVA

Kapalinová chromatografie (LC) provází mou profesní dráhu již od počátku studií na vysoké škole, kdy jsem se věnoval vývoji LC metody vhodné ke stanovení estrogenních látek ve vodách. Má pozornost se následně ubírala směrem analýzy polárních látek, pro které je vhodné používat hydrofilní interakční kapalinovou chromatografii (HILIC). Touto metodou jsem se zabýval po celou dobu mé dosavadní vědecké dráhy, a proto je tato habilitační práce zaměřena na studium separačního mechanismu a aplikačního potenciálu HILIC.

Habilitační práce je založena na patnácti vybraných odborných člancích publikovaných v impaktovaných odborných časopisech v letech 2012-2022 a skládá se ze tří částí. První část je zaměřena na studium separačního mechanismu v HILIC a charakterizaci tohoto chromatografického módu. Druhá část práce ukazuje aplikační potenciál HILIC v analýze malých polárních molekul, a to konkrétně stanovení efedrinu v pevných lékových formách, alantoinu v lidském séru a pterinů v kutikulách ploštic. Poslední, třetí, část práce je zaměřena na HILIC v glykoproteomické analýze. V této části práce jsou ukázány výhody použití HILIC oproti systému s reverzními fázemi v analýze intaktních glykopeptidů. Dále je ukázán a porovnán separační potenciál různých HILIC stacionárních fází, a také je ilustrován koncept predikčního modelu retenčních oken pro jednotlivé glykopeptidy v HILIC. Na konci práce jsou přiloženy odborné články, které jsou označeny římskými číslicemi.

Tato habilitační práce vychází z experimentálních výsledků získaných během mé vědecké práce na Katedře analytické chemie PřF UK, ale také z výsledků získaných během mého postdoktorandského pobytu u prof. Radoslava Goldmana na Georgetownské univerzitě (Washington DC, USA). Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří se jakkoliv podíleli na vzniku publikací, které tvoří základ předkládané habilitační práce. Dále bych chtěl poděkovat celé Katedře analytické chemie PřF UK za příjemné a přátelské pracovní prostředí a v neposlední řadě též děkuji své rodině za trpělivost a toleranci, kterou vůči mně chovají.

# 1 ÚVOD

Analytická chemie hraje nezastupitelnou roli v řadě oblastí lidské činnosti. Vhodné analytické metody slouží ke kontrole vstupních surovin a výsledných produktů, i celých technologických procesů v různém průmyslovém odvětví (farmaceutický, potravinářský, automobilový, kosmetický průmysl atd.) [1]. Bez analytické chemie by se neobešlo zdravotnictví, kdy na základě výsledků analýz obsahu specifických biomarkerů v různém biologickém materiálu (krev, moč, stolice aj.) dochází k diagnostice onemocnění daného pacienta a následnému návrhu způsobu léčby [1, 2]. Stanovení obsahu určitých látek v biologickém materiálu se též uplatňuje ve sportu (dopingová kontrola), nebo v soudnictví (určení obsahu omamných látek) [2]. Velice významnou oblastí, kde analytická chemie nachází uplatnění, je ochrana životního prostředí (sledování kontaminace jednotlivých složek životního prostředí různými polutanty). Bez nadsázky můžeme říci, že vývoj a výzkum v řadě vědních oborů a aplikovaných výzkumných odvětvích by nebyl možný bez analytické chemie [2].

V současné době je poptávka po analýzách složitých a komplexních vzorků, které mohou obsahovat tisíce různorodých látek. Analýza komplexních vzorků je nelehkým úkolem a ve většině případů musíme použít určitou separační techniku, abychom rozdělili jednotlivé složky vzorku a tím docílili požadované selektivity [3]. Mezi hlavní separační techniky řadíme plynovou chromatografii, kapalinovou chromatografii, kapilární elektroforézu, nebo superkritickou fluidní chromatografii [3].

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) je bezesporu nejpoužívanější separační technikou, ale je také považována za nejvýznamnější a nejrozšířenější metodu v analytických laboratořích vůbec (po vážení a měření pH) [4]. Objev kapalinové chromatografie je připisován Michailu Semjonoviči Cvětovi, který začátkem dvacátého století prováděl separaci rostlinných barviv (chlorofyly, xantofyly a karotenoidy) v sloupci uhličitanu vápenatého a jako mobilní fázi použil petrolether [5]. Zásadní rozvoj HPLC probíhal v šedesátých a sedmdesátých letech dvacátého století, kdy docházelo k hlubšímu pochopení teoretických aspektů separace v kapalinové chromatografii a zároveň došlo k uvedení prvních komerčních

kapalinových chromatografů na trh [4]. V průběhu posledních let sledoval vývoj v HPLC několik hlavních cílů, a to zvýšení účinnosti a selektivity separace, zkrácení doby analýzy a zvýšení citlivosti. Za jeden z hlavních pokroků, které našly uplatnění v praxi, můžeme považovat spojení HPLC s hmotnostní detekcí (MS), čímž došlo k zvýšení citlivosti a selektivity analýz. Druhým významným pokrokem bylo zmenšení částic chromatografického sorbentu pod 2  $\mu\text{m}$ , což jde ruku v ruce se zlepšením instrumentace, která je schopna odolat zvýšenému zpětnému tlaku. V roce 2004 mohl být díky tomu uveden na trh první přístroj pro ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (UHPLC). V neposlední řadě k pokrokům v HPLC patří používání povrchově porézních částic, monolitických kolon, dvoudimenzionální chromatografie a miniaturizace v LC (kapilární a nanoLC) [4-6].

Na základě typu stacionární fáze (SF) a mobilní fáze (MF) a interakce mezi analytem a SF rozeznáváme různé separační módy LC, kterých existuje relativně široká paleta – systém s normálními fázemi (NP-LC), systém s reverzními fázemi (RP-LC), hydrofilní interakční kapalinová chromatografie (HILIC), iontově-výměnná chromatografie (IEC), iontově-párová chromatografie, hydrofobní interakční chromatografie (HIC), micelární kapalinová chromatografie (MLC), afinitní chromatografie, vícemodální chromatografie, molekulová vylučovací chromatografie (SEC) a chirální chromatografie [4, 5]. Nejpoužívanějším a nejprobádanějším separačním módem je RP-LC. Tento mód je vhodný pro separaci nepolárních až středně polárních látek. Velmi polární látky mají v tomto separačním módu nízkou retenci a selektivitu. Pro takové látky je daleko vhodnější použití HILIC módu, ve kterém vykazují dobrou retenci [7]. Mezi vyzdvihoaná pozitiva HILIC patří dobrá kompatibilita MF obsahující vysoké množství acetonitrilu s MS detekcí, nízká viskozita MF (nízký zpětný tlak) a možnost přímého nástřiku extraktu po extrakci na tuhé fázi (SPE) v RP módu. Na druhou stranu, HILIC má také své nevýhody, a to zejména relativně dlouhou dobu ekvilibrace chromatografických kolon, významný vliv rozpouštědla vzorku na tvar chromatografického píku a složitý a zatím ne zcela objasněný mechanismus separace [7]. Vzhledem ke komplexnosti separačního mechanismu v HILIC a velkému množství SF použitelných v tomto separačním módu je nutné studovat fyzikálně-chemické děje, které se při procesu retence/separace uplatňují. Popis a pochopení těchto dějů může napomoci při tvorbě obecnějších

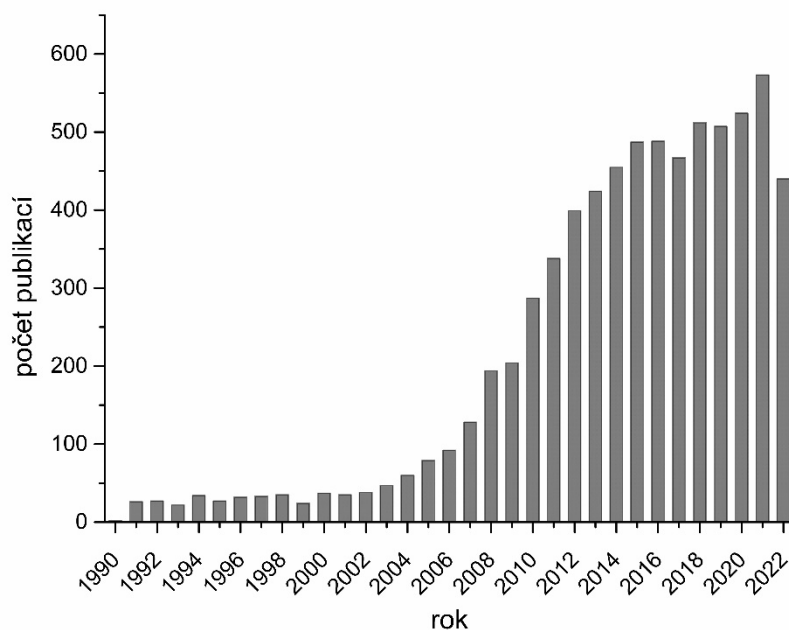
pravidel, kterými se řídí retence a separace v HILIC a tím zjednodušit a zrychlit proces vývoje HILIC chromatografických metod pro konkrétní účely. V neposlední řadě je důležité prozkoumat aplikační potenciál HILIC pro analyty, které jsou velmi těžce analyzovány/separovány v jiných separačních módech.

## **2 HYDROFILNÍ INTERAKČNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE**

Pojem hydrofilní interakční kapalinová chromatografie byl poprvé použit v roce 1990 Alpertem při separaci aminokyselin na polární SF s relativně nepolární mobilní fází, kde vodná složka sloužila jako silné eluční činidlo [8]. S HILIC módem se ale pravděpodobně setkáváme již v počátcích rozvoje kapalinové chromatografie, kdy Martin a Synge separovali aminokyseliny na silikagelové SF s mobilní fází obsahující vodu a chloroform. Dle autorů docházelo k rozdělování analytů mezi vodnou vrstvu sorbovanou na SF a chloroform [9]. HILIC systém z pohledu složení mobilní a stacionární fáze tak, jak ho známe dnes, byl použit již v roce 1975 při separaci sacharidů a oligosacharidů (polární SF – v tomto případě aminopropyl, MF: voda/acetonitril) [10]. Obliba HILIC z pohledu počtu vědeckých publikací v posledních letech je dokumentována na Obr. 1. Do roku 2002 byl počet publikací do 50 za jeden rok. Od roku 2003 dochází k velkému rozmachu HILIC, kdy poslední roky se počet publikací týkajících se HILIC pohybuje kolem 500 za rok. Tento nárůst pravděpodobně souvisí se zvyšujícím se zájmem o analýzu polárních látek, pro které RP-LC neposkytuje dostatečnou selektivitu, a s dobrou kompatibilitou HILIC mobilních fází s MS detekcí [11].

V HILIC se používají polární SF. Těmi nejběžnějšími jsou silikagel, nebo silikagel modifikovaný polárními skupinami (aminopropyl, amid, diol, sulfobetain atd.) [12-14]. MF se skládá z vodné (voda nebo vodný pufr) a organické složky (nejčastěji acetonitril), přičemž organická složka musí být v nadbytku (alespoň 60 objemových %) a vodná složka by měla tvořit alespoň 2,5 objemových % [7, 15-17].





Obr. 1 Počet publikací v letech 1990–2022 obsahujících pojem „HILIC“, nebo „hydrophilic interaction liquid chromatography“, nebo „hydrophilic interaction chromatography“ podle databáze Web of Science ke dni 8.4.2023.

## 2.1 MECHANISMUS RETENCE A SEPARACE V HILIC

I když se popisu mechanismu retence a separace v HILIC věnuje velké množství publikací, je zřejmé, že HILIC mechanismus není stále zcela objasněn [14]. Mezi nejuznávanější princip HILIC mechanismu v chromatografické komunitě patří předpoklad, že dochází k adsorpci vodné složky z MF na povrch polární SF [8]. Tím dojde k vytvoření imobilizované vodné vrstvy a vzniku difúzní vrstvy s gradientem obsahu vody od povrchu SF do MF [14]. Analyty jsou zadržovány na základě své polariry a to tak, že čím je analyt polárnější, tím má vyšší retenci, neboť má vyšší afinitu k vodné vrstvě imobilizované na SF [7]. Při zvyšování obsahu vodné složky v MF se polarita MF přibližuje polaritě vodné vrstvy imobilizované na SF, a tím dochází ke snižování retence [7]. Přítomnost imobilizované vodné vrstvy byla prokázána řadou metod, jako je nukleární magnetická rezonance [18], coulometrická titrace [19], metoda frontální analýzy spojená s titrací dle Karla Fischera [20], molekulárně dynamické simulace [21, 22], nebo měřením retence hydrofobních látek (benzen a toluen) [23]. Ukázalo se, že SF neslouží pouze jako inertní materiál, na který

se váže vodná složka z MF, ale může se též aktivně podílet na retenci polárních analytů v závislosti na zvolených chromatografických podmínkách pomocí dalších typů interakcí, jako jsou například vodíkové vazby, elektrostatické interakce, dipólové interakce atd. [14]. Z výše zmíněného vyplývá, že retenční mechanismus v HILIC je komplexním procesem, na kterém se podílí jak rozdělování analytů mezi imobilizovanou vodnou vrstvu na povrchu SF, tak interakce se samotnou SF, a je silně závislý na použitých chromatografických podmínkách (typ analytu, SF a složení MF) [24-27].

Popis a charakterizace chromatografických systémů napomáhá nejen k pochopení celého separačního procesu, ale také přispívá k zrychlení vývoje chromatografických metod (výběr vhodné SF a MF pro konkrétní analyty). Existuje celá řada testů a modelů, které slouží k popisu chromatografických systémů. Pro jednodušší testy je typické, že se sleduje retence konkrétní sady analytů za daného složení MF a z výsledků se usuzuje například na selektivitu pro hydrofilní a hydrofobní skupiny, iontové interakce nebo stérickou selektivitu [28]. Mezi složitější přístupy, které se ujal při popisu HILIC systémů, můžeme zařadit Snyder-Soczewinského rovnici (rovnice 1), která slouží k popisu adsorpce analytů na povrchu SF [29].

$$\log k = \log k_w - \frac{A_s}{n_w} \log N_w \quad (1)$$

kde  $k$  je retenční faktor,  $k_w$  označuje retenční faktor, kdy MF je tvořena pouze vodnou složkou,  $A_s$  je plocha na povrchu SF obsazená molekulami analytu,  $n_w$  je plocha na povrchu SF obsazená molekulami vody a  $N_w$  je molární zlomek vodné složky v MF. Pokud se uplatňuje adsorpční mechanismus retence, vynesení závislosti  $\log k$  na  $\log N_w$  by mělo poskytovat lineární závislost.

Rozdělovací mechanismus můžeme naopak popsat dle rovnice navržené Schoenmakersem (rovnice 2), která vyjadřuje polynomickou závislost logaritmu retenčního faktoru na objemovém zlomku  $\varphi$  vodné složky MF [30, 31].

$$\log k = A\varphi^2 + B\varphi + C \quad (2)$$

kde  $k$  je retenční faktor a  $A$ ,  $B$ ,  $C$  jsou konstanty.

V popisu HILIC mechanismu se též uplatnily vícemodální modely, které kombinují adsorpční mechanismus a mechanismus rozdělování (rovnice 3) [32]. Tyto modely více korelují s experimentálními daty v porovnání s výše zmíněnými modely [32, 33].

$$\log k = A + B \ln \varphi + C \varphi \quad (3)$$

kde  $k$  je retenční faktor,  $A$  je parametr související s interakční energií mezi analytem a stacionární/mobilní fází,  $B$  se vztahuje k interakci analyt-stacionární fáze,  $C$  označuje parametr týkající se interakce mezi analytem a rozpouštědlem a  $\varphi$  je objemový zlomek vodné složky MF.

Mezi často používané modely, jimiž se dají popsat chromatografické systémy, patří modely lineárních vztahů volných energií (LFER) [12, 13, 17, 34]. Tyto modely jsou založeny na změně Gibbsovy energie systému, ke které dochází přenosem analytu z MF do SF, tedy změnou retenčního faktoru. Tato změna Gibbsovy energie se skládá z příspěvků jednotlivých molekulárních interakcí, které ovlivňují zadržování analytů v daném chromatografickém systému [35]. Pro charakterizaci chromatografického systému metodou LFER musíme mít vhodnou sadu analytů, které jsou popsány tzv. deskriptory  $E$ ,  $S$ ,  $A$ ,  $B$  a  $V$  popisujícími následující molekulární interakce:  $E$  je schopnost analytu interagovat pomocí  $n$ - a  $\pi$ -elektronů;  $S$  je parametr dipolarity/polarizability popisující interakce dipól-dipól;  $A$  je acidita vodíkové vazby (donor vodíku);  $B$  je bazicita vodíkové vazby (akceptor vodíku);  $V$  je McGowanův charakteristický objem popisující disperzní a kohezní interakce (někdy označován jako hydrofobicita). Deskriptory pro různorodé analyty je možné buď spočítat, nebo stanovit řadou experimentálních technik a určují schopnost daného analytu podílet se na jednotlivých typech interakcí [36, 37]. Základní rovnice LFER vyjadřuje korelaci logaritmu retenčního faktoru s danými deskriptory (rovnice 4) [35, 38].

$$\log k = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (4)$$

kde  $e$ ,  $s$ ,  $a$ ,  $b$  a  $v$  jsou regresní koeficienty získané multivariační regresní analýzou a korespondují s danými molekulárními interakcemi. Koeficient  $c$  vyjadřuje vliv ostatních interakcí, které nejsou zahrnuty v rovnici 4, a graficky odpovídá úseku na ose  $y$ . Kladná hodnota regresního koeficientu ukazuje silnější interakci se stacionární

fází, což se projeví zvýšením retence. Naopak záporná hodnota ukazuje silnější interakci analytu s mobilní fází, což vede ke snížení retence. Rovnice 4 může být rozšířena i o další příspěvky jako například příspěvky iontové výměny, stereoselektivity atd. [39, 40]. Modely LFER se úspěšně uplatnily v charakterizaci řady HILIC systémů [26, 27, 41-46].

### 2.1.1 Cyklofruktany jako stacionární fáze v HILIC

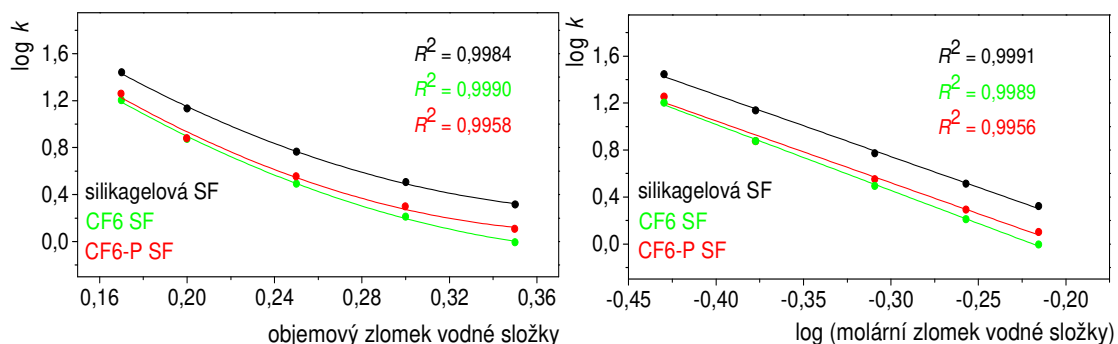
V kapalinové chromatografii obecně platí, že výběr SF má zásadní vliv na separaci. V HILIC existuje velké množství různorodých SF, což je dáno tím, že jakákoliv polární SF schopná vázat na svém povrchu vodnou vrstvu, může být použita v HILIC módu. Každá z HILIC SF, v závislosti na složení mobilní fáze, může na svém povrchu vázat jiné množství vodné složky a upřednostňovat rozdílné molekulární interakce [43, 47]. To má za následek, že různé SF mohou poskytovat naprosto odlišnou retenci a selektivitu pro shodné analyty [7, 12, 13].

Jedním z nedávno popsaných typů SF pro HILIC jsou cyklofruktanové fáze. Cyklofruktany se řadí mezi cyklické oligosacharidy obsahující šest a více D-fruktofuranózových jednotek [48]. Jejich polární charakter z nich činí vhodný materiál k použití v HILIC. První použití cyklofruktanu jako SF v HILIC bylo uskutečněno v roce 2011 při separaci řady polárních látek např. cukrů, nukleových kyselin, xantinů atd. [48]. V naší první studii (Příloha I) věnované HILIC jsme se zaměřili na charakterizaci a porovnání interakčních a separačních vlastností tří SF, a to nemodifikovaného silikagelu, silikagelu modifikovaného nativním cyklofruktanem 6 (CF6) a silikagelu modifikovaného isopropylovaným cyklofruktanem 6 (CF6-P).

Jako první jsme testovali, zda se v daných HILIC systémech uplatňuje při retenci rozdělování a/nebo adsorpce. Jako modelové analyty byly použity čtyři pentapeptidy a pět nonapeptidů. Sledovali jsme vliv obsahu vodné složky v MF skládající se z acetonitrilu a octanu amonného (20 mM; pH 4,00) na retenci jednotlivých peptidů.

Vynesení závislosti  $\log k$  jednotlivých peptidů na logaritmu molárního zlomku vodné složky a proložení dat přímkou dle rovnice 1 a vynesení závislosti  $\log k$  na objemovém zlomku vodné složky a proložení dat polynomem dle rovnice 2 poskytlo vysoké hodnoty koeficientů determinace pro všechny tři testované kolony. Z toho vyplývá, že na retenci testovaných peptidů se podílí jak rozdělování, tak i adsorpce.

Pro ilustraci jsou na Obr. 2 uvedeny tyto závislosti pro nonapeptid [deamino-Cys<sup>1</sup>, D-Arg<sup>8</sup>]-Vasopressin.

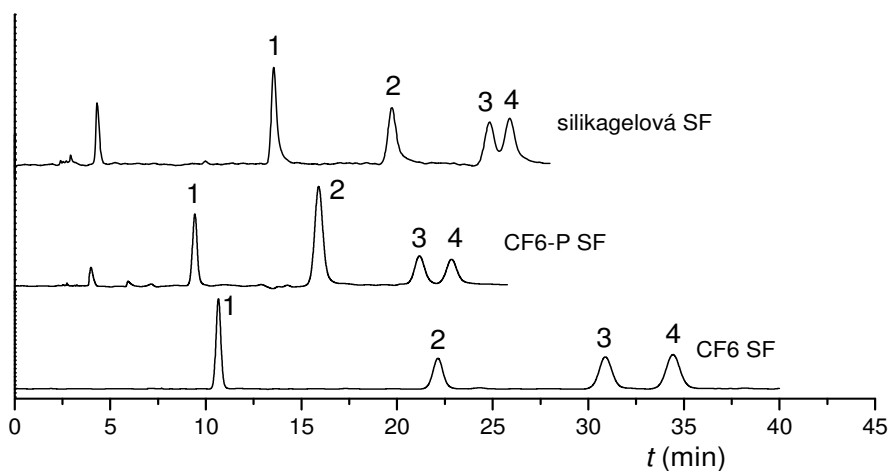


Obr. 2 Závislost logaritmu  $k$  nonapeptidu [deamino-Cys<sup>1</sup>, D-Arg<sup>8</sup>]-Vasopressinu na objemovém zlomku vodné složky a na logaritmu molárního zlomku vodné složky. Vodná složka: octan amonný (20 mM; pH 4,00), organická složka: acetonitril (převzato a upraveno z Přílohy I).

K identifikaci molekulárních interakcí uplatňujících se při retenci v daných chromatografických systémech byla použita metoda LFER. Měření bylo provedeno v MF skládajících se z acetonitrilu a octanu amonného (20 mM; pH 4,00) o různém objemovém poměru, a to 88/12, 83/17 a 80/20 (v/v). Ukázalo se, že u silikagelové SF se na retenci významně podílí pouze jeden typ molekulární interakce, a to schopnost interagovat pomocí vodíkové vazby, kdy SF slouží jako donor vodíku (regresní koeficient  $b$  v rovnici 4). Tato interakce nebyla významně ovlivněna změnou poměru vodné a organické složky v MF a byla slabší než u cyklofruktanových SF. U systémů s cyklofruktanovými SF se uplatňují tři hlavní molekulární interakce, a to dipól-dipól a dipól-indukovaný dipól (regresní koeficient  $s$  v rovnici 4), schopnost působit jako donor vodíku (regresní koeficient  $b$  v rovnici 4) a disperzní a kohezní interakce (regresní koeficient  $v$  v rovnici 4). Kladné regresní koeficienty  $b$  a  $s$  říkají, že dané molekulární interakce jsou silnější mezi SF a analytem než mezi analytem a MF, což má za následek zvýšení retence. Vyšší hodnoty těchto regresních koeficientů byly u CF6 než u CF6-P, což znamená, že se dané interakce více uplatňují u nederivatizovaného cyklofruktanu. U obou cyklofruktanových SF je pozorován

shodný trend, a to rostoucí uplatnění těchto interakcí se vzrůstajícím obsahem vodné složky v MF. Naopak disperzní a kohezní interakce (záporný regresní koeficient  $v$ ) jsou silnější mezi MF a analytem, což snižuje retenci. Z hodnot regresního koeficientu  $v$  plyne, že nižší hydrofobicitu vykazuje CF6, což je ve shodě s provedeným Waltersovým testem popisujícím hydrofobicitu stacionárních fází [49]. Vyšší obsah vodné složky v MF podporuje tyto interakce u obou systémů.

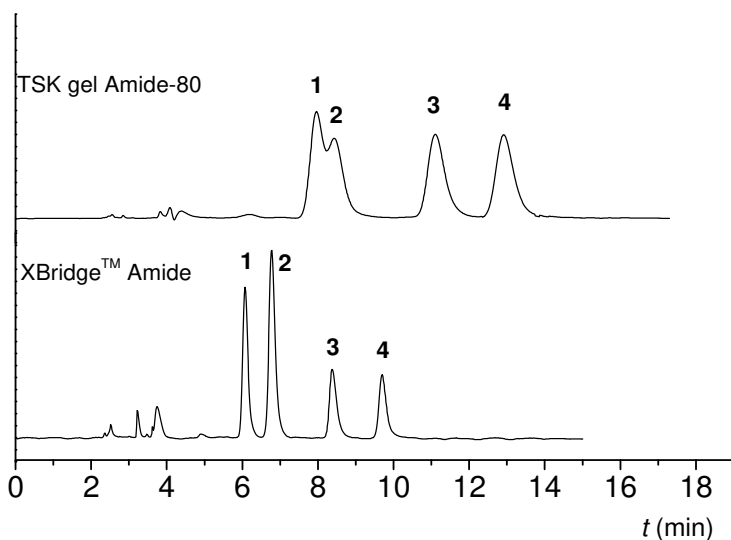
Selektivita studovaných SF byla porovnána při separaci směsi pentapeptidů a nonapeptidů. Na Obr. 3 vidíme porovnání separace směsi pentapeptidů při složení MF: acetonitril/octan amonný (20 mM; pH 4,00), 88/12 (v/v). Z obrázku je zřejmé, že ve srovnání se silikagelovou SF vykazují cyklofruktanové SF vyšší selektivitu u kritického páru analytů 3 a 4. Ani vyšší obsah acetonitrilu v MF nezlepšil separaci analytů 3 a 4 u silikagelové SF (došlo pouze k prodloužení retence). Naopak u CF6 SF při zvýšení eluční síly MF (změna poměru acetonitril/octan amonný na 83/17 (v/v)) došlo k zrychlení analýzy (celková doba analýzy byla 13 minut) při současné separaci všech čtyř analytů na základní linii. Můžeme konstatovat, že modifikace silikagelové SF cyklofruktany, popřípadě derivatizovanými cyklofruktany, přináší řadu dalších interakčních možností a ukázala se jako vhodná pro separaci peptidů v HILIC módu.



Obr. 3 Chromatogram separace směsi pentapeptidů. MF: acetonitril/octan amonný (20 mM; pH 4,00), 88/12 (v/v). Eluční pořadí: 1, leucin enkefalinamid, 2, [D-Ala<sup>2</sup>]-leucin enkefalin, 3, leucin enkefalin, 4, [Met<sup>5</sup>]enkefalin (převzato a upraveno z Přílohy I).

## 2.1.2 Porovnání amidových kolon v HILIC

Stacionární fáze obsahující shodný ligand mohou poskytovat rozdílnou selektivitu, retenci a separační účinnost v závislosti na výrobci dané chromatografické kolony. Může to být způsobeno rozdílnou technologií výroby, typem a čistotou silikagelového nosiče, popřípadě způsobem navázání daného ligandu. V naší druhé studii (Příloha II) jsme se zaměřili na porovnání dvou komerčních amidových HILIC kolon, a to kolony XBridge™ Amide (Waters, Milford, USA) a kolony TSK gel Amide-80 (Tosoh, Tokyo, Japonsko), řadou chromatografických testů. Studium vlivu obsahu vodné složky v mobilní fázi na retenci peptidů a nukleobasí dle rovnic 1 a 2 jsme prokázali, že retenční mechanismus u obou kolon je komplexní a podílí se na něm jak rozdělování, tak adsorpce. Při separaci peptidů bylo vyšší separační účinnosti dosaženo na koloně XBridge™ Amide, kdy bylo dosaženo separace na základní linii během 10 minut při složení MF acetonitril/octan amonný (20 mM; pH 4,00), 85/15 (v/v), jak ukazuje Obr. 4. Za shodného složení MF docházelo na koloně TSK gel Amide-80 ke koeluci analytů 1 a 2. Separace peptidů na základní linii na koloně TSK gel Amide-80 bylo dosaženo zvýšením obsahu acetonitrilu v MF na 88 obj. % za současného prodloužení doby analýzy na 25 minut. Separace nukleobasí na základní linii bylo dosaženo na obou kolonách za shodného složení MF (acetonitril/octan amonný (20 mM; pH 4,00), 85/15 (v/v)).



Obr. 4 Chromatogram separace směsi pentapeptidů. MF: acetonitril/octan amonný (20 mM; pH 4,00), 85/15 (v/v). Eluční pořadí: 1, leucin enkefalinamid, 2, [D-Ala<sup>2</sup>]-leucin enkefalin, 3, leucin enkefalin, 4, [Met<sup>5</sup>]enkefalin (převzato a upraveno z Přílohy II).

Kolona XBridge™ Amide vykazovala při separaci obou sad strukturně odlišných analytů (peptidy a nukleobase) vyšší účinnost, což zcela jistě souvisí s menší velikostí částic (3,5 μm) oproti koloně TSK gel Amide-80 (5 μm). Naopak kolona TSK gel Amide-80 vykazovala vyšší retenci pro dané analyty. Metodou LFER jsme zjistili, že kolona TSK gel Amide-80 má vyšší schopnost interagovat pomocí vodíkových vazeb (vyšší hodnoty regresních koeficientů  $a$  a  $b$  v rovnici 4), což je ve shodě s vyšší retencí peptidů a nukleobasí. Výsledky modelu LFER potvrzují také testy selektivity. Test selektivity pro methylenovou skupinu [28] (poměr retenčních faktorů uridinu a 5-methyluridinu) poskytl shodné hodnoty pro obě kolony, což koresponduje se shodným regresním koeficientem  $v$  indikujícím podobnou hydrofobicitu obou kolon. Test selektivity pro aminoskupinu (poměr retenčních faktorů aminokyseliny a její N-blokované formy) poskytl vyšší hodnotu pro kolonu TSK gel Amide-80, což odpovídá vyššímu regresnímu koeficientu  $b$ . Na základě retence bazických látek s rozdílnými disociačními konstantami, které slouží jako vhodné indikátory iontových interakcí [50], se ukázalo, že kolona TSK gel Amide-80 poskytuje významnější možnosti uplatnění kation-výměnné interakce v porovnání s kolonou XBridge™ Amide. Z výše uvedených výsledků je zřejmé, že obě amidové kolony poskytují podobné, ale ne totožné interakční možnosti.

### **2.1.3 Vliv typu kationtu pufru mobilní fáze na retenci aminokyselin a dipeptidů**

Druhým nejzásadnějším způsobem (po výběru SF), jak lze ovlivnit separaci v HILIC, je složení MF. Existuje řada studií popisujících vliv obsahu vodné a organické složky v MF, pH a koncentrace pufru v MF na retenci a separaci řady analytů [13, 14, 17, 51-53]. Ale pouze několik prací se věnovalo popisu vlivu typu kationtu v mobilní fázi [54-56]. Náš další příspěvek byl proto zaměřen na studium vlivu typu kationtu a jeho koncentrace v MF na retenci vybraných aminokyselin (tyrosin, tryptofan, fenylalanin) a dipeptidů (tyrosyl-fenylalanin (H-Tyr-Phe), fenylalanyl-tyrosin (H-Phe-Tyr), fenylalanyl-tryptofan (H-Phe-Trp) a tryptofanyl-fenylalanin (H-Trp-Phe) a jejich N-blokovaných analogů na amidové a silikagelové stacionární fázi (Příloha III). Bylo testováno pět pufrů o pH 4,00 a různé koncentraci



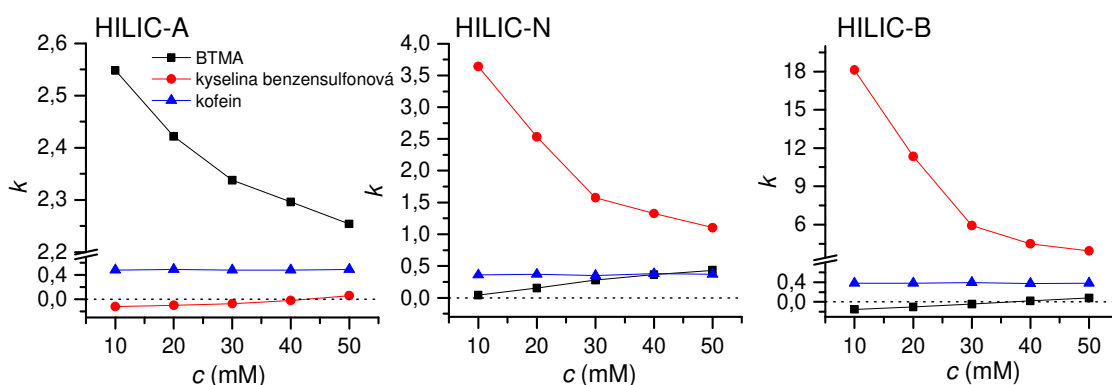
kationtu (5 – 50 mM), a to tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)/kyselina octová, triethylamin (TEA)/kyselina octová,  $\text{NH}_4^+$ /kyselina octová,  $\text{Li}^+$ /kyselina octová a  $\text{Ba}^{2+}$ /kyselina octová.

N-blokované aminokyseliny vykazovaly nižší retenci ve všech testovaných pufrech než neblokované analogy vzhledem k jejich nižší polaritě. Se vzrůstající koncentrací pufru vzrůstá i jejich retence, což může být vysvětleno nárůstem polarity vodné vrstvy na povrchu SF s rostoucí koncentrací pufru [57]. Zajímavé je, že u amidové SF bylo dosaženo nejnižších retencí N-blokovaných aminokyselin u pufru obsahujícího TEA, naopak u silikagelové SF bylo dosaženo nejnižších retencí u pufru obsahujícího  $\text{Li}^+$ . Nejvyšších retencí, jak N-blokovaných aminokyselin, tak i neblokovaných analogů, bylo dosaženo na obou stacionárních fázích u pufru obsahujícího  $\text{Ba}^{2+}$ . Retence neblokovaných aminokyselin se zvyšovala, snižovala, nebo se neměnila s koncentrací pufru v závislosti na typu kationtu. Například zvýšení koncentrace pufru obsahujícího Tris způsobilo nárůst retence, naopak u pufru s TEA docházelo ke snížení retence. Toto snížení retence s rostoucí koncentrací TEA pufru může souviset s potlačením přitažlivých elektrostatických interakcí mezi neblokovanými aminokyselinami a částečně disociovanými volnými silanolovými skupinami. Velmi podobné trendy byly zaznamenány v retenci dipeptidů a N-blokovaných dipeptidů. Překvapivě při použití MF obsahující  $\text{Ba}^{2+}$  došlo ke změně elučního pořadí dipeptidů ( $\text{H-Phe-Tyr} > \text{H-Tyr-Phe} > \text{H-Phe-Trp} > \text{H-Trp-Phe}$ ) vzhledem k elučnímu pořadí v ostatních pufrech ( $\text{H-Tyr-Phe} > \text{H-Phe-Tyr} > \text{H-Trp-Phe} > \text{H-Phe-Trp}$ ) na obou stacionárních fázích. V této práci bylo ukázáno, že různá koncentrace a typ pufru v MF může sloužit jako vhodný nástroj k ovlivnění retence i selektivity v HILIC.

#### **2.1.4 Hydrofilní interakční kapalinová chromatografie s iontově-výměnnou chromatografií**

V posledních několika letech se objevila snaha využívat při separacích komplexních vzorků několik různých separačních mechanismů současně [58-60]. Takovéto separace se nazývají vícemodální separace a je pro ně typické, že kombinují tradiční chromatografické módy. Mezi vícemodální chromatografií zařazujeme kombinaci RP/IEC, RP/HILIC, HILIC/IEC, popřípadě RP/HILIC/IEC [61, 62]. Pro

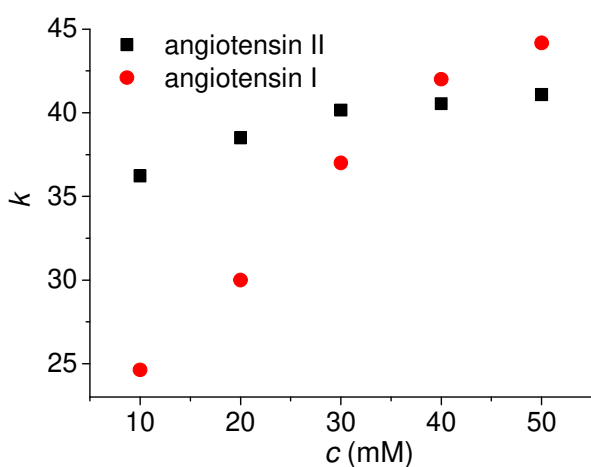
vícemodální chromatografii existují speciální komerčně dostupné SF. Mezi relativně nové komerční chromatografické kolony vhodné pro HILIC a HILIC/IEC patří tzv. ACE HILIC kolony. Jedná se o tři kolony s různými stacionárními fázemi, a to kolonu HILIC-A obsahující nemodifikovaný silikagel, kolonu HILIC-B obsahující aminopropylové skupiny vázané na silikagelu a kolonu HILIC-N obsahující polyhydroxylový řetězec vázaný na silikagelu. V této studii (Příloha IV) jsme se zaměřili na porovnání a aplikační potenciál ACE HILIC kolon v analýze biologicky aktivních peptidů. Byl testován vliv obsahu vodné složky, pH a koncentrace pufru MF na chromatografické chování sedmi peptidů. Jako první byl testován potenciál kolon podílet se na iontových interakcích. K tomu byly zvoleny tři modelové analyty – kofein (neutrální látka), kyselina benzensulfonová (negativně nabitá látka) a benzyltrimethylamonium chlorid (BTMA, pozitivně nabitá látka). Při sledování retence těchto látek v závislosti na koncentraci pufru (10–50 mM) a jeho pH (2,10; 3,50; 5,50) při isokratickém složení MF acetonitril/mravenčan amonný 83/17 (v/v) se ukázalo, že kolona HILIC-A může v závislosti na pH nést na svém povrchu negativní náboj (disociace silanolových skupin) a kolona HILIC-B může v závislosti na pH nést na svém povrchu pozitivní náboj (pozitivně nabité aminopropylové skupiny). U kolony HILIC-N, která dle výrobce obsahuje neutrální polyhydroxylový řetězec, byl zaznamenán shodný trend v retenčním chování modelových analytů jako u kolony HILIC-B, jak je dokumentováno na Obr.5.



Obr. 5 Závislost retenčního faktoru  $k$  modelových analytů na koncentraci pufru vodné složky. MF: acetonitril/mravenčan amonný (pH 3,50), 83/17 (v/v). Tečkovaná linie značí mrtvý čas (převzato a upraveno z Přílohy IV).

Ze závislosti retenčního faktoru na koncentraci pufru je patrné, že retence neutrálního kofeinu se významně nemění. Retence negativně nabité benzensulfonové kyseliny na koloně HILIC-B rapidně klesá se zvyšující se koncentrací pufru z důvodu potlačení přitažlivých iontových interakcí mezi pozitivně nabitou SF a negativně nabitou kyselinou. Naopak pozitivně nabitý BTMA je na této koloně elektrostaticky odpuzován (nízká retence) do té míry, že při nízké koncentraci pufru eluuje dokonce před markerem mrtvého času kolony. Opačné retenční chování nabitých analytů bylo pozorováno na koloně HILIC-A.

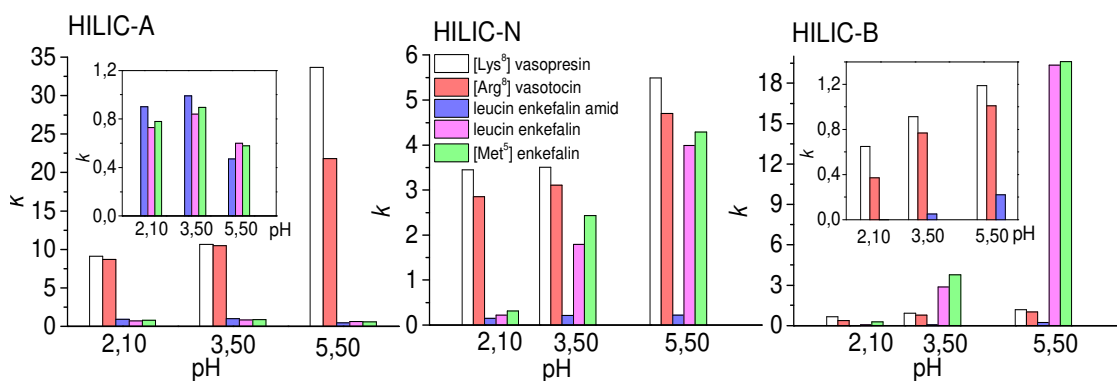
U studované sady peptidů byl nejprve sledován vliv obsahu vodné složky v MF na jejich retenci. S klesajícím obsahem vodné složky v MF docházelo ke zvyšování retence všech peptidů. Vynesením závislostí dle rovnic 1, 2 a 3 bylo zjištěno, že retenční mechanismus je vícemodální. V závislosti na pH MF mohou testované peptidy nést více nábojů. Změna koncentrace pufru a pH MF hraje významnou roli v retenci peptidů, jelikož ovlivňuje sílu elektrostatické interakce. Při složení MF acetonitril/mravenčan amonný pH 3,50 83/17 (v/v) docházelo u pozitivně nabitých peptidů ([Lys<sup>8</sup>] vasopresin, [Arg<sup>8</sup>] vasotocin a leucin enkefalin amid) ke zvyšování retence s nárůstem koncentrace pufru v MF na kolonách HILIC-B a HILIC-N. Naopak u peptidů leucin enkefalinu a [Met<sup>5</sup>] enkefalinu (celkový náboj 0, částečně disociovaná C-terminální karboxylová skupina) docházelo ke snížení retence. Na koloně HILIC-A byl efekt opačný, i když v mnohem menší míře, neboť při pH 3,50 nejsou silanolové skupiny silikagelu plně disociovány, a proto se elektrostatické interakce uplatní v menší míře. Vícemodální retenční mechanismus je názorně dokumentován na retenci angiotensinů na koloně HILIC-N (Obr. 6).



Obr. 6 Závislost retenčního faktoru  $k$  angiotensinu I a II na koncentraci pufru vodné složky na koloně HILIC-N. MF: acetonitril/mravenčan amonný (pH 3,50), 83/17 (v/v) (převzato a upraveno z Přílohy IV).

Při daném složení MF angiotensin I nese čtyři kladné a dva částečně negativní náboje a angiotensin II nese tři kladné a dva částečně negativní náboje. Z Obr. 6 lze vidět, že se zvyšující se koncentrací pufru dochází ke zvýšení retence obou angiotensinů a zároveň ke změně jejich elučního pořadí. Angiotensin I, který nese vyšší kladný náboj, je při nízké koncentraci více elektrostaticky odpuzován, a proto má nižší retenci než angiotensin II. Se zvyšující se koncentrací dochází k odstínění elektrostatické repulze mezi analyty a SF a více se projeví mechanismus rozdělování, což má za následek vyšší retenci obou angiotensinů a změnu elučního pořadí.

Vliv pH byl studován při složení MF acetonitril/10 mM mravenčan amonný nebo 10 mM octan amonný 83/17 (v/v). Při vyšším pH (5,50) došlo k plné disociaci silanolových skupin u kolony HILIC-A, což se projevilo výrazným nárůstem retence u pozitivně nabitých peptidů (Obr. 7).



Obr. 7 Závislost retenčního faktoru  $k$  vybraných peptidů na pH pufru vodné složky. MF: acetonitril/10 mM mravenčan amonný (pH 2,10 a 3,50) nebo 10 mM octan amonný (pH 5,50), 83/17 (v/v) (převzato a upraveno z Přílohy IV).

Vzhledem k nízké retenci leucin enkefalinamidu, leucin enkefalinu a [Met<sup>5</sup>] enkefalinu na koloně HILIC-A nebyl pozorován žádný významný trend v jejich retenci. Na koloně HILIC-B došlo k razantnímu nárůstu retence leucin enkefalinu a [Met<sup>5</sup>] enkefalinu se zvyšujícím se pH, neboť při vyšším pH převládne přitažlivá elektrostatická interakce mezi pozitivně nabitou SF a disociovanými karboxylovými skupinami peptidů, zatímco v nízkém pH převládá elektrostatická repulze mezi pozitivním nábojem N-koncových aminoskupin (karboxylové skupiny jsou nedisociované) a SF. Stejně retenční chování, i když v menší míře, bylo pozorováno i

u ostatních peptidů. Tak jako u modelových analytů při testování vlivu pH, tak i u peptidů, byl zaznamenán obdobný trend v retenčním chování na koloně HILIC-N jako na koloně HILIC-B.

Při porovnání separace studovaných peptidů za isokratické eluce se ukázalo, že nejvyšší selektivitu vykazuje kolona HILIC-N a nejnižší kolona HILIC-A. Nicméně při optimalizaci gradientového programu pro každou kolonu došlo k separaci všech peptidů na základní linii na všech kolonách. Dané kolony ukázaly potenciál v separaci biologicky aktivních peptidů v HILIC/IEC módu. Bylo ukázáno, jak koncentrace a pH pufru efektivně ovlivňují retenci peptidů.

## **2.2 HILIC ANALÝZA MALÝCH MOLEKUL**

V posledních několika letech se HILIC stal běžně používaným chromatografickým módem v analýzách malých polárních látek, které jsou špatně separovány v ostatních chromatografických módech (hlavně v RP-LC). HILIC se uplatňuje zejména v oblastech metabolomiky [63], životního prostředí [64, 65], farmaceutického průmyslu [15, 66, 67], potravinářství [68-70] atd.

### **2.2.1 Stanovení efedrinu v pevné lékové formě**

V současném globálním světě není problém na internetu zakoupit téměř jakékoliv léčivo. Mezi jedny z nejvíce poptávaných a prodávaných farmaceutických preparátů patří anabolické androgenní steroidy [71-73]. Zdravotní riziko pro uživatele takto na internetu zakoupených látek nespočívá „pouze“ v samotné účinné látce, ale i v tom, že v řadě případů se jedná o padělky pochybné kvality a pochybného složení (jiná účinná látka, vyšší nebo nižší obsah deklarované látky). Další látkou oblíbenou u uživatelů anabolických androgenních steroidů je efedrin. Svou popularitu si získal díky stimulačnímu efektu na centrální nervovou soustavu a termogenním vlastnostem. Proto je hojně používán jako přípravek vhodný ke spalování tuků [74]. I když se pro stanovení efedrinu běžně používá RP-LC, tak vzhledem k jeho chemické povaze (velmi polární amin), není tento chromatografický mód zcela vhodný z důvodu nízké retence, širokých a chvostujících píků [75]. Vhodnějším módem pro analýzu efedrinu je HILIC [75, 76].

V naší studii (Příloha V) jsme vyvinuli velmi rychlou a selektivní HILIC-MS/MS metodu pro stanovení obsahu efedrinu v pevné lékové formě. Byla optimalizována řada chromatografických parametrů (typ kolony a složení MF). Optimální LC podmínky byly následující: Kolona Acquity BEH Amide (100 × 2,1 mm; 1,7 μm) a MF: acetonitril/mravenčan amonný (5 mM, pH 3,00) 88/12 (v/v). Průtok MF byl 0,4 ml/min a teplota kolony byla 30 °C. Detekce probíhala v MS/MS módu (sledování specifického přechodu mezi prekurzorovým a produktovým iontem). Daná metoda byla validována a ukázala se jako robustní, dostatečně citlivá (limit detekce byl 1 ng/ml a limit kvantifikace 3 ng/ml), selektivní, přesná (RSD do 1,22 %) a správná (relativní chyba do 1,36 %). Tato metoda byla následně použita k analýze 20 vzorků zakoupených na internetu. Ukázalo se, že devět přípravků mělo odlišný obsah efedrinu od deklarované hodnoty. Pět z nich neobsahovalo žádný efedrin. Tři vzorky obsahovaly značně nižší množství, než bylo deklarováno, naopak u jednoho vzorku byl obsah efedrinu poměrně vyšší, než bylo deklarováno. Vzhledem k rychlosti analýzy, která trvala 1,5 minuty a vysoké přesnosti a správnosti stanovení, je tato HILIC-MS/MS metoda vhodná pro analýzu velkého množství vzorků, a tudíž použitelná například ve státních kontrolních a regulačních orgánech.

### **2.2.2 Stanovení alantoinu v lidském séru**

Alantoin je prokázaným biomarkerem oxidativního stresu u lidí jakožto hlavní produkt oxidace kyseliny močové reaktivními formami kyslíku [77, 78]. Stanovení alantoinu v biologických matricích je poměrně náročné vzhledem k jeho nízkým koncentracím, vysoké polaritě a nepřítomnosti chromoforu pro UV detekci. Většina dosavadních metod používá různé časově náročné derivatizační kroky, které se potýkají s nižší robustností a nedostatečnou citlivostí, nebo vyžadují vyšší množství vzorku [79-82]. Naším cílem v této studii (Příloha VI) bylo vyvinout jednoduchou, dostatečně citlivou a robustní analytickou metodu vhodnou ke stanovení alantoinu v lidském krevním séru, která by mohla být implementována do klinických laboratoří. Při vývoji metody se jako zásadní ukázalo aditivum vodné složky MF, které sice nijak významně neovlivňovalo retenci alantoinu v HILIC systému, ale mělo velký vliv na jeho ionizaci v MS. Nejvyšší ionizace bylo dosaženo při použití 0,1% kyseliny mravenčí, naopak pufrы mravenčan nebo octan amonný poskytovaly zhruba

pětinasobně nižší odezvu. Oproti metodám v literatuře [81, 83], které pracovaly v negativním módu MS, bylo vyšší odezvy a poměru signálu k šumu dosaženo v pozitivním módu. Z pohledu rychlosti analýzy a přenositelnosti do jiných laboratoří byla použita isokratická eluce se složením MF acetonitril/0,1 % kyselina mravenčí 90/10 (v/v) a průtokem 0,3 ml/min a jako kolona sloužila UHPLC kolona Acquity BEH Amide (100 × 2,1 mm; 1,7 μm). Celková doba analýzy byla pouhé čtyři minuty. Aby se předešlo kontaminaci MS, tak první dvě minuty a poslední jednu minutu analýzy byl eluent odkloněn do odpadu. Vzhledem k jednoduchosti provedení a nízké spotřebě vzorku byla k úpravě séra před vlastní HILIC-MS/MS analýzou použita precipitace proteinů v nadbytku acetonitrilu. Celkem se pracovalo s 20 μl séra, ke kterým se přidávalo 60 μl acetonitrilu obsahujícího isotopicky značený standard. Celý analytický postup byl následně validován. Výsledná HILIC-MS/MS metoda byla schopná pracovat v lineárním rozsahu 0,05 – 100 μM koncentrace alantoinu v séru s mezidenní správností do 6 % (relativní chyba) a přesností do 11 % (RSD). Tato HILIC-MS/MS metoda splňuje všechny klinické požadavky z pohledu citlivosti, správnosti, přesnosti, rychlosti a nízké spotřeby vzorku ke stanovení koncentrace alantoinu v lidském séru a je vhodná pro měření velkého souboru vzorků. V rámci této studie byla stanovena koncentrace alantoinu v séru u 71 pacientů trpících chronickou dnou, přičemž nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v hladinách alantoinu v rámci věkových skupin, ani ve skupinách dle indexu tělesné hmotnosti (BMI). Tuto metodiku jsme následně využili ve studii zaměřené na porovnání hladiny alantoinu a kyseliny močové u pacientů trpících RBD (porucha chování v REM fázi spánku) ve spolupráci s doc. MUDr. Petrem Duškem, Ph.D. z Neurologické kliniky 1. lékařské fakulty UK a VFN [84]. V této studii byla zjištěna zvýšená hladina alantoinu a poměru alantoin/kyselina močová u RBD pacientů v porovnání se zdravými jedinci, což koresponduje se zvýšeným oxidativním stresem prodromální synukleinopatie.

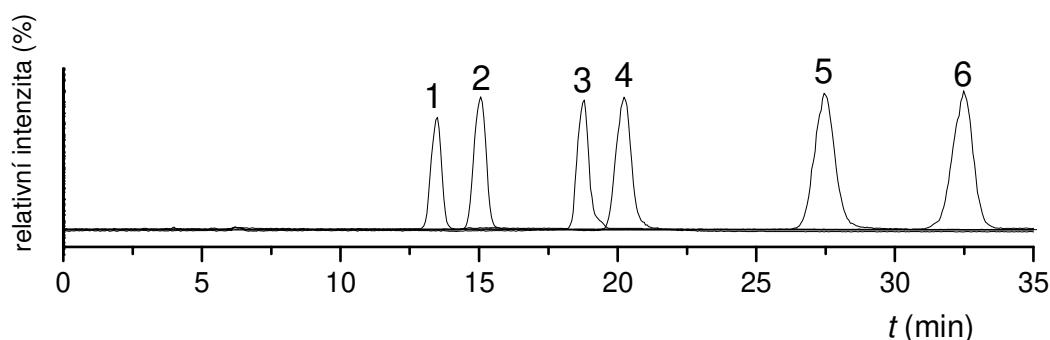
### **2.2.3 Stanovení pterinů v kutikule ploštic**

Pteriny a jejich deriváty zastávají řadu významných biologických funkcí. Podílejí se na důležitých procesech buněčného metabolismu, jako jsou například hydroxylační reakce, konverze tyrosinu na 3,4-dihydroxyfenylalanin, hrají roli v buněčném transportu elektronů atd. [85, 86]. Pteriny se také podílejí na

pigmentovém zbarvení kutikul hmyzu [85, 87]. Jednotlivé pteriny jsou zodpovědné za různé barvy: žlutá (xanthopterin), červená (erythropterin), bílá (leukopterin) atd. [88]. Jednou z funkcí zbarvení kutikul je funkce ochranná. Z pohledu ochranné funkce můžeme zbarvení dělit na varovné nebo maskovací [89-91]. Zbarvení kutikul se mění s vývojovým stádiem hmyzu, ročním obdobím a je také závislé na lokalitě výskytu a složení potravy. V rámci spolupráce s prof. RNDr. Pavlem Štysem, CSc. z katedry zoologie PřF UK vznikla studie zabývající se vývojem HILIC-MS/MS metody vhodné ke stanovení jednotlivých pterinů (biopterin, isoxanthopterin, leukopterin, neopterin, xanthopterin a erythropterin) v kutikulách ploštic (Příloha VII). Stanovení pterinů v kutikulách bylo provedeno na dvou druzích ploštic, a to *Graphosoma lineatum* a *Graphosoma semipunctatum* z různých lokalit a v různých vývojových stádiích.

HILIC systém byl zvolen kvůli vysoké polaritě pterinů a MS/MS detekce pro zajištění dostatečné citlivosti a selektivity. V rámci optimalizačního procesu metody byly nalezeny vhodné MRM přechody pro jednotlivé analyty. HILIC metoda byla optimalizována s cílem dostatečné separace pterinů, symetrického tvaru píků, minimálního vlivu matrice na ionizaci analytů a maximální odezvy pterinů v MS detektoru. Optimalizované podmínky byly následující: Kolona ZIC-HILIC (150 × 4,6 mm, 3,5 μm), MF acetonitril/octan amonný (5 mM, pH 6,80) 85/15 (v/v), průtok mobilní fáze 0,5 ml/min a teplota kolony 30 °C. Za těchto podmínek bylo dosaženo dostatečné retence analytů (retenční faktor byl vyšší než 1), dobré separace (rozlišení bylo vyšší než 1,3), uspokojivého tvaru píků (faktor symetrie se pohyboval mezi 0,9 a 1,2) a dostatečné citlivosti. Na Obr. 8 je ukázána separace standardů studovaných pterinů o koncentraci 625 ng/ml. Jelikož nebyly dostupné isotopicky značené standardy, ani matrice extraktu kutikul, která by neobsahovala pteriny, tak byla kalibrační závislost naměřena v čistých rozpouštědlech. K ověření, zda data získaná kalibrační závislostí jsou správná, byla použita metoda přídavku standardu. K tomuto účelu byla použita kutikula *Graphosoma lineatum* červené formy, v které byl obsah pterinů stanoven oběma přístupy. Nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl mezi výsledky získanými z kalibrační závislosti v čistých rozpouštědlech a metodou přídavku standardu. Z toho je zřejmé, že nedocházelo k významnému vlivu matrice na ionizaci pterinů, a proto mohla být dále používána kalibrační závislost.





Obr. 8 Překryté MRM chromatogramy standardů pterinů ( $c = 625 \text{ ng/ml}$ ). SF: ZIC-HILIC. MF: acetonitril/octan amonný (5 mM, pH = 6,80) 85/15 (v/v); analyt.: 1, isoxanthopterin 2, biopterin 3, xanthopterin 4, leukopterin 5, erythropterin 6, neopterin (převzato a upraveno z Přílohy VII).

Tato optimalizovaná metoda byla použita ke stanovení pterinů ve čtyřech formách *Graphosoma lineatum* (larvální, světlá, žlutá a červená) a jedné formě *Graphosoma semipunctatum* (oranžová). Z výsledků je patrné, že jednotlivé formy ploštic obsahují rozdílné pteriny o různém relativním zastoupení. To má za následek jejich rozdílné zbarvení. Tato metoda byla převzata a úspěšně použita při objasňování mechanismu zbarvení u želvy síťované [92].

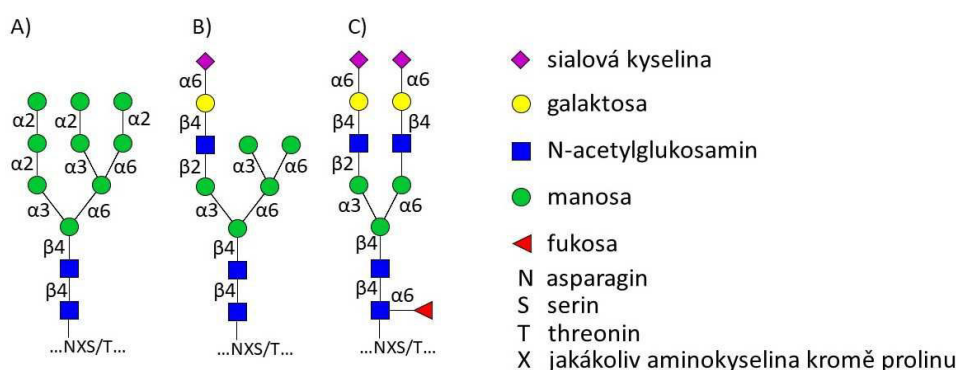
## 2.3 HILIC V GLYKOPROTEOMICKÉ ANALÝZE

### 2.3.1 Glykoproteiny

Glykoproteiny jsou biomolekuly, které se skládají z proteinů, na které je kovalentně vázána sacharidová část neboli glykan. Glykosylace se řadí mezi jednu z nejvýznamnějších post-translačních modifikací proteinů a předpokládá se, že více jak 50 % proteinů je glykosylovaných [93, 94]. Glykosylace proteinů hraje zásadní roli v mnoha významných biologických procesech jako například v buněčném vývoji [95], lektinem zprostředkované komunikaci mezi buňkami [96], imunitní odpovědi [97-99] atd. Podílí se také na správné konformaci proteinů a ovlivňuje jejich rozpustnost a náchylnost k proteolytickému štěpení [100, 101]. Změna v glykosylaci proteinů, ať už přítomnost neobvyklých glykanových struktur, nebo jejich zvýšená/snížená koncentrace v biologických tekutinách, je spojena s řadou různých onemocnění, jako je např. rakovina [102, 103], neurodegenerativní onemocnění [104], plicní

onemocnění [105], infekce a zánět [106, 107], popřípadě schizofrenie [108]. Správná glykosylace je také klíčová pro správnou a efektivní funkci biofarmaceutik, jejichž základem jsou glykoproteiny [109, 110].

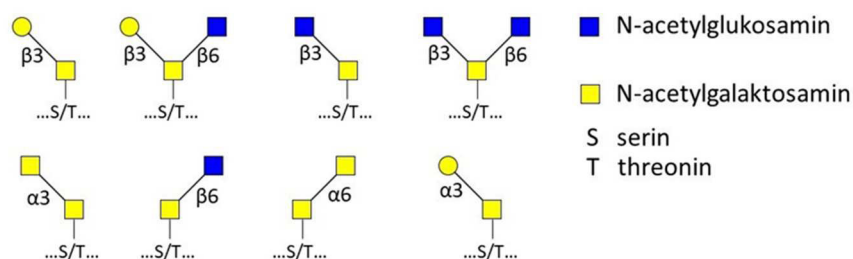
Glykoproteiny jsou z chemického pohledu strukturně velmi rozmanité biomolekuly. Na základě toho, jakým způsobem je glykan připojen k peptidovému řetězci proteinu, rozeznáváme dva základní typy glykosylace: N-glykosylaci a O-glykosylaci [94]. Biosyntéza obou typů glykanů je řízena enzymatickou kaskádou glykosyltransferas. Tato biosyntéza se neřídí zcela jasnou šablonou, a proto může vznikat veliké množství strukturně podobných glykanů. U eukaryotických organismů začíná biosyntéza N-glykanů v endoplazmatickém retikulu. Jako první vzniká glykan skládající se ze dvou N-acetylglukosaminů (GlcNAc), devíti manos (Man) a třech glukos (Glc). Tento glykan je připojen na peptidový řetězec a napomáhá správnému sbalení proteinu. Po sbalení proteinu dochází k odštěpení glukos a postupnému odstranění manos a k následnému přidávání různých monosacharidů. Tento proces probíhá jak v endoplazmatickém retikulu, tak v Golgiho aparátu. Mezi nejběžnější monosacharidy, které můžeme v glykanech nalézt patří N-acetylglukosamin, manosa, galaktosa (Gal), N-acetylgalaktosamin (GalNAc), fukosa (Fuc), a sialová kyselina (Sia). N-glykany mají společné tzv. jádro, které se skládá ze dvou N-acetylglukosaminů a třech manos. Na toto jádro se vážou další monosacharidové jednotky [94]. Rozeznáváme tři nejběžnější skupiny N-glykanů: vysoce manosový typ, hybridní typ a komplexní typ. Jednotlivé typy N-glykanů jsou ukázány na Obr. 9.



Obr. 9 Základní typy N-glykanů: A) vysoce manosový B) hybridní C) komplexní (převzato a upraveno z [111]).

Pro vysoce manosový typ je charakteristické, že se na jádro glykanu vážou jen manosy. Z  $\alpha 3$  ramena jádra je vázán jednoduchý řetězec manos, přičemž u  $\alpha 6$  ramena dochází k větvení manos. Vysoce manosový typ obvykle obsahuje 5 až 9 manos. U komplexního N-glykanového typu vycházejí z jádra ramena tvořená GlcNAc-Gal. Ta bývají často zakončena sialovými kyselinami. Na  $\alpha 3$  a  $\alpha 6$  manose může docházet k větvení za vzniku víceramenných komplexních N-glykanů. Posledním běžným typem je hybridní typ. U tohoto typu je na  $\alpha 3$  manosu vázán GlcNAc-Gal (může docházet k větvení) a rameno  $\alpha 6$  je větveno pouze dalšími manosami. Na GlcNAc, a to jak jaderné, tak i ramenné, se běžně váže fukosa. N-glykany se kovalentně vážou na peptidovou kostru N-glykosidovou vazbou na postranní řetězec asparaginu, který musí být součástí sekvence asparagin-X-serin/threonin, kde X představuje jakoukoliv aminokyselinu kromě prolinu. Přítomnost tohoto motivu však nezaručuje, že konkrétní místo bude glykosylované, což se označuje jako makroheterogenita glykoproteinu. Na základě regulace biosyntézy se jednotlivé N-glykany mohou na jednom glykosylačním místě lišit v délce a složení jednotlivých ramen a také ve vazbě monosacharidů mezi sebou, což se nazývá mikroheterogenita glykoproteinu [94, 111].

O-glykany jsou připojeny na peptidový řetězec O-glykosidovou vazbou mezi GalNAc a hydroxylovou skupinou serinu nebo threoninu. Na rozdíl od N-glykanů pro ně neexistuje jasný motiv v sekvenci proteinu, který by určoval místo jejich navázání na peptidový řetězec. O-glykany jsou strukturně velmi rozmanité. Nejběžnější a nejvíce prostudované jsou O-glykany mucinového typu. V současné době je popsáno osm typů jader, která se následně mohou větvit a prodlužovat dalšími monosacharidy [94, 112]. Těchto osm jader je ukázáno na Obr. 10.



Obr. 10 Osm typů jader mucinových O-glykanů (převzato a upraveno z [111]).

### 2.3.2 Glykoproteomická analýza

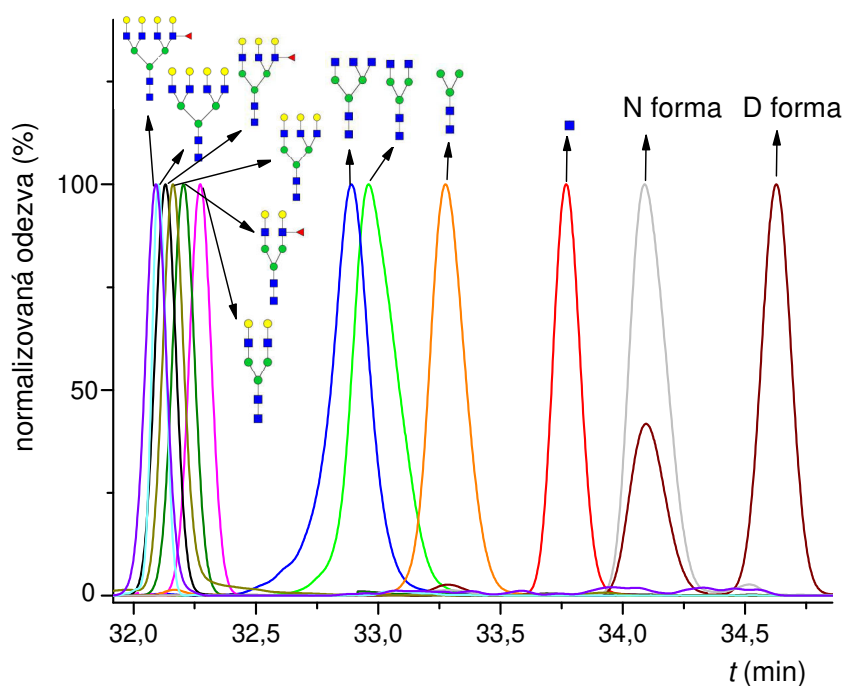
Vzhledem k vysoké strukturní diverzitě glykanů, mikro- a makroheterogenitě glykoproteinů, velmi rozdílným koncentračním hladinám jednotlivých glykoforem a komplexnosti biologických materiálů je glykoproteomická analýza ne zcela jednoduchým analytickým úkolem. Obecně rozeznáváme dva základní přístupy v analýze glykoproteinů. První přístup je založen na uvolnění glykanů z peptidového řetězce. N-glykany se nejčastěji odštěpují od peptidu enzymaticky pomocí PNGasy F, zatímco O-glykany jsou odštěpeny chemicky, a to nejčastěji  $\beta$ -eliminací. Vzorek je následně přečištěn pomocí extrakce na tuhé fázi ( $C_{18}$ , HILIC, nebo kolonky s porézním grafitizovaným uhlíkem (PGC)). Uvolněné glykany jsou analyzovány buď přímo LC-MS/MS, nebo jsou derivatizovány s cílem zvýšení ionizační účinnosti, např. permethylací nebo derivatizací 2-aminobenzamidem. Deglykosylované proteiny jsou podrobeny tryptickému štěpení a analyzovány LC-MS/MS. Tímto způsobem získáváme informaci o jednotlivých typech glykanů a aminokyselinové sekvenci v daném glykoproteinu, ale zároveň ztrácíme informaci ohledně charakteru glykosylace na určitém glykosylačním místě. Druhý přístup je založen na štěpení glykoproteinu peptidasou (nejčastěji trypsin). Tím se získají tzv. intaktní glykopeptidy, tedy peptidy nesoucí glykany, a ty jsou analyzovány LC-MS/MS. Tím získáváme informaci o daném glykanu a aminokyselinové sekvenci a zároveň máme informaci o glykosylačním místě. Přístupy ke glykoproteomické analýze jsou přehledně a detailně shrnuty v řadě článků [111, 113-117].

Klíčovou analytickou technikou v glykoproteomické analýze je MS, a to kvůli své citlivosti, rychlosti, a hlavně schopnosti poskytovat strukturní informace o jednotlivých glykoformách [111, 114]. Mezi nejpoužívanější MS instrumenty v glykoproteomické analýze patří hybridní MS kombinující několik analyzátorů za sebou, jako je např. Q-ToF a Q-orbitrap. I když je stále nejběžnějším typem fragmentace kolizně indukovaná disociace (CID), stále více se v glykoproteomické analýze prosazují alternativní typy fragmentací, jako je disociace přenosem elektronů (ETD), infračervená multifotonová disociace (IRMPD), popřípadě vysokoenergetická disociace přenosem elektronů (ETHcD). Těmito typy fragmentací se dosahuje komplexnějších fragmentačních spekter jak peptidové kostry proteinu, tak i daných glykanů. Pokroky v technice MS v rámci glykoproteomické analýzy jsou

přehledně shrnuty v řadě přehledových článků [111, 114]. Ačkoliv je MS silným analytickým nástrojem, potýká se s řadou problémů: nižší ionizační účinnost glykopeptidů ve srovnání s peptidy, nekompletní fragmentační spektra, a to jak peptidů, tak i glykanů, fragmentace ve zdroji spojená se ztrátou sialových kyselin a nízká schopnost rozlišit jednotlivé isoformy glykanů [111, 113, 118]. Z těchto důvodů je výhodné spojit MS s vhodnou separační technikou. V glykoproteomické analýze se nejčastěji využívá spojení LC-MS, popřípadě spojení MS s kapilární zónovou elektroforézou (CZE). Retenční, popřípadě migrační čas, velmi dobře doplňuje informaci získanou z MS a může napomoci ve správné identifikaci jednotlivých glykopeptidů. Použití těchto dvou separačních technik v analýze glykanů a glykopeptidů shrnujeme v našem přehledovém článku (Příloha VIII).

### **2.3.3 Chromatografické chování N-glykopeptidů v RP-LC módu**

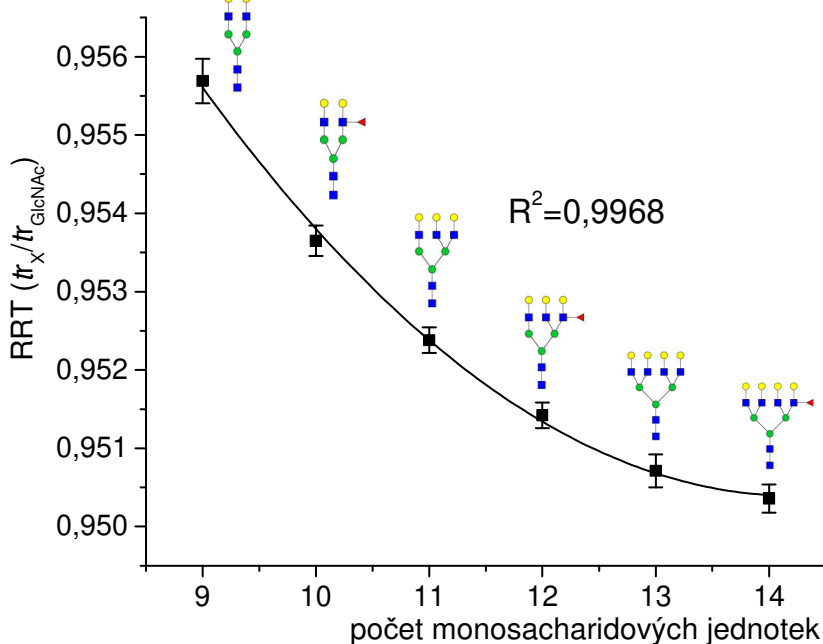
Nejběžnějším chromatografickým módem v analýze glykopeptidů je mód RP-LC za použití stacionární fáze obsahující řetězce C<sub>18</sub>. Obecně platí, že glykan vázaný na peptid zvyšuje polaritu glykopeptidu, a tudíž snižuje jeho retenci v RP-LC módu [119-121]. V naší první studii (Příloha IX) zaměřené na glykoproteomickou analýzu jsme se věnovali vlivu neutrálních monosacharidů glykanu na retenční chování glykopeptidů hemopexinu, haptoglobinu a globulinu vázajícího sexuální hormony (SHBG) v nanoRP-LC. Od každého proteinu byly vybrány dva tryptické peptidy s jedním glykosylačním místem. Celkem bylo od každého peptidu následným štěpením specifickými glykosidasami získáno osm až deset glykoforem. Retence N-glykopeptidů v RP-LC módu je řízena hlavně peptidovou kostrou. Retence jednotlivých deglykosilovaných peptidů odpovídala jejich polaritě, kdy nejvíce polární peptid (SHEIWITHSCPQSPGDGTDASH) eluoval jako první, naopak nejméně polární peptid (MVSHHDLTTGATLINEQWLLTTAK) eluoval jako poslední. Separace jednotlivých glykoforem haptoglobínového peptidu VVLHPNYSQVDIGLIK je ukázána na Obr. 11.



Obr. 11 Normalizovaný chromatogram extrahovaných iontů (EIC) jednotlivých glykoforem peptidu haptoglobinu VVLHPNYSQVDIGLIK v RP-LC módu. Symboly monosacharidů (viz Obr. 9), N forma – peptidová kostra glykopeptidu obsahující asparagin, D forma - peptidová kostra glykopeptidu obsahující kyselinu asparagovou (konverze asparaginu po odštěpení N-glykanu PNGasou F) (převzato a upraveno z Přílohy IX).

Z tohoto obrázku je zřejmé, že čím větší je N-glykan, tím více se snižuje retence. V tomto případě bylo nejnižší retence dosaženo pro monofukosylovaný čtyřramenný N-glykan, naopak nejmenší retenční posun od neglykosylovaného peptidu (N forma) byl zaznamenán pro glykoformu obsahující jeden GlcNAc. Zároveň platí, že přidavek fukosy ke komplexnímu N-glykanu se projeví výraznějším retenčním posunem u menších N-glykanů než u větších. Důvodem je, že větší N-glykan má vyšší polaritu, a tudíž přidavek jedné polární fukosy se na celkové polaritě projeví méně než u menších N-glykanů. Stejně retenční chování bylo pozorováno u všech studovaných glykopeptidů ostatních proteinů.

Retenční čas jednotlivých glykoforem je výhodné vyjádřit pomocí relativního retenčního času (RRT), kdy vztahujeme retenci různých glykoforem k jedné určité glykoformě. Na Obr. 12 vidíme závislost RRT přirozeně se vyskytujících glykoforem peptidu VVLHPNYSQVDIGLIK (vztažené k retenci glykoformy obsahující jeden GlcNAc) na počtu monosacharidových jednotek. Závislost můžeme proložit polynomem druhého stupně s koeficientem determinace 0,9968.



Obr. 12 Polynomická závislost druhého stupně RRT ( $t_{rX}/t_{r\text{GlcNAc forma}}$ ) na počtu monosacharidových jednotek přirozeně se vyskytujících glykoforem peptidu VVLHPNYSQVDIGLIK. Symboly monosacharidů (viz. Obr. 9) (převzato a upraveno z Přílohy II).

Uvažujeme-li všechny glykoformy uvedené na Obr. 11 (jak přirozeně se vyskytující, tak i získané štěpením glykosidasami), tak regresní analýzou polynomem druhého stupně získáme koeficient determinace 0,9151. Významné snížení koeficientu determinace je způsobeno relativně velkým retenčním posunem mezi galaktosylovanými a negalaktosylovanými glykoformami, jak je patrné na Obr. 11. Toto chování by mohlo pravděpodobně souviset s rozdílnou polaritou galaktosy ( $\log P = -2,6$ ) a N-acetylglukosaminu ( $\log P = -1,7$ ) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>). Vzhledem k této skutečnosti byla

nalezena nejlepší korelace mezi RRT jednotlivých glykoforem v závislosti na složení glykanu pomocí dvouparametrické rovnice:

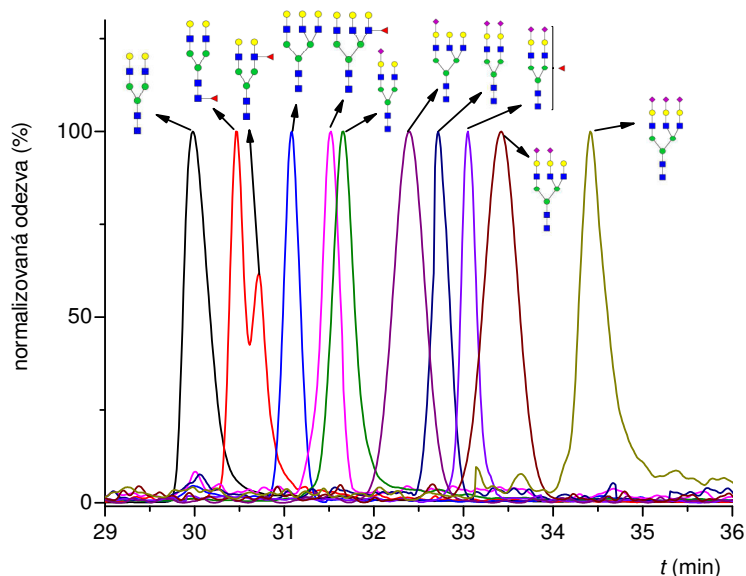
$$RRT = a \cdot N(\text{sacch} - \text{gal})^2 + b \cdot N(\text{sacch} - \text{gal}) + c \cdot N(\text{gal})^2 + d \cdot N(\text{gal}) + e \quad (5)$$

kde  $N(\text{sacch} - \text{gal})$  představuje celkový počet monosacharidových jednotek glykanu mínus počet galaktos a  $N(\text{gal})$  představuje celkový počet galaktos v glykanu. Tento kvadratický model zlepšil koeficient determinace u glykoforem peptidu VVLHPNYSQVDIGLIK na 0,9959. Tato rovnice byla aplikována na všechny studované glykopeptidy a poskytla velmi vysokou shodu mezi predikovanými a naměřenými daty. Testování vlivu různých gradientových programů ukázalo, že ačkoliv se absolutní retence glykopeptidů mění se změnou gradientového programu, tak RRT se výrazně nemění a odpovídá hodnotě získané dle výše popsané rovnice.

### 2.3.4 HILIC v separaci glykopeptidů

Ačkoliv je RP-LC mód stále první volbou v analýze glykopeptidů, tak jak bylo ukázáno výše, neposkytuje dostatečnou selektivitu pro separaci jednotlivých glykoforem. Alternativou k RP-LC v analýze glykopeptidů je HILIC. HILIC systém byl úspěšně použit k zakoncentrování glykopeptidů pomocí HILIC SPE [122, 123] a k analýze uvolněných glykanů [124, 125]. Naopak analýza intaktních glykopeptidů metodou HILIC není zcela běžná a existuje relativně malý počet publikací na toto téma [126-128]. Metodou HILIC byly také úspěšně separovány isomerní formy glykanů [118, 128-130]. V naší další práci (Příloha X) jsme se zaměřili na analýzu glykopeptidů hemopexinu v HILIC. Změny glykosylace obecně a zejména zvýšená fukosylace byly navrženy jako markery pro sledování onemocnění jater [131]. V nedávné studii byla ukázána změna v koncentraci fukosylované isoformy hemopexinového glykopeptidu v séru v souvislosti s jaterním onemocněním [132]. Cílem naší studie bylo zjistit, zda by HILIC systém neposkytl účinnější separaci jednotlivých glykoforem hemopexinu než RP-LC, a nebyl tedy vhodnější pro kvantifikaci jednotlivých glykoforem. Analýza probíhala v nanoměřítku na čipu, kdy jako stacionární fáze byl použit čistý silikagel (kolona HALO HILIC (150 × 0,075 mm, 2,7 μm)). Na Obr. 13 je ukázán chromatogram separace glykoforem peptidu SWPAVGDCSSALR za optimalizovaných HILIC podmínek.





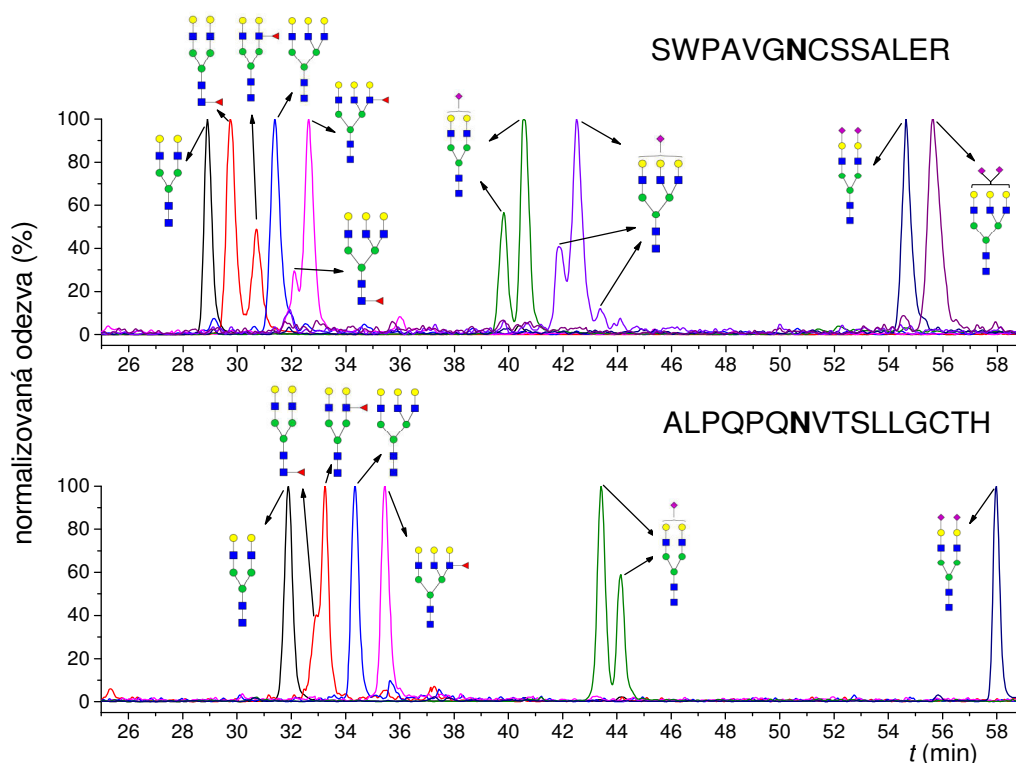
Obr. 13 Normalizovaný SRM chromatogram jednotlivých glykoforem peptidu hemopexinu SWPAVGDCSSALR získaný za optimalizovaných HILIC podmínek (gradientová eluce; MF: A: 0,1% kyselina mravenčí B: acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí). Symboly monosacharidů (viz Obr. 9) (převzato a upraveno z Přílohy X).

Eluční pořadí glykopeptidů s neutrálními monosacharidy je založeno na jejich polaritě, tedy nejméně polární glykopeptid (dvojamenný glykan) eluuje jako první a přidávek další monosacharidové jednotky zvyšuje polaritu molekuly a tím dochází ke zvýšení retence (opačný trend než u RP-LC). HILIC v porovnání s RP-LC poskytuje výrazně vyšší rozlišení jednotlivých glykopeptidů s neutrálními monosacharidy. Na druhou stranu u RP-LC bylo možné od sebe separovat glykopeptidy obou studovaných peptidů (SWPAVGDCSSALR a ALPQPQNVTSLLGCTH), neboť jejich retence je založena hlavně na peptidové kostře. To se u HILIC nepodařilo a docházelo k částečné koeluci některých glykopeptidů obou peptidů, kdy glykopeptidy peptidu SWPAVGDCSSALR eluovaly v retenčním okně 29,5 – 35,5 min a glykopeptidy peptidu ALPQPQNVTSLLGCTH v retenčním okně 31,5 – 36,0 min.

Z Obr. 13 je patrné, že u dvojamenného fukosylovaného peptidu byly získány částečně oddělené dva píky ( $R_s = 0,44$ ) při jednom SRM přechodu, což naznačovalo, že by se mohlo jednat o separaci isoformů lišících se vazbou. Pro potvrzení nebo vyvrácení této hypotézy jsme použili specifické fukosidasy, a to  $\alpha$ 1-2 a  $\alpha$ 1-3,4 fukosidasy, které neštěpí fukosu vázanou na jaderný GlcNAc (vázána vazbou  $\alpha$ 1-6), a naopak odštěpují fukosu vázanou na ramenní GlcNAc. V chromatogramu takto

upraveného vzorku se menší z dvou píků dvojranného fukosylovaného peptidu již nevyskytoval. Tudíž první pík odpovídá glykanu, kde je fukosa vázána na jaderný GlcNAc a druhý pík odpovídá fukose lokalizované na ramenním GlcNAc. Tímto způsobem bylo také prokázáno, že většina fukosylovaného trojranného glykopeptidu je ve formě s fukosou vázanou na ramenu. HILIC tedy má potenciál v separaci fukosylovaných isoform glykopeptidů hemopexinu. Výhoda chromatografické separace těchto isoform spočívá v možnosti přímé analýzy bez nutnosti dalšího glykosidického štěpení.

Na základě výše ukázaného potenciálu HILIC v separaci intaktních glykopeptidů byla testována stacionární fáze HALO penta-HILIC pro separaci glykopeptidů hemopexinu (Příloha XI). Tato stacionární fáze obsahuje povrchově porézní částice s pentahydroxylovaným ligandem vázaným na silikagelu, a tudíž může vykazovat odlišnou selektivitu od předchozí HILIC kolony. Na Obr. 14 je zobrazena separace hemopexinových glykopeptidů tryptických peptidů SWPAVGCSSALR a ALPQPQNVTSLGCTH za optimalizovaných podmínek.



Obr. 14 Normalizovaný SRM chromatogram jednotlivých glykoforem tryptických peptidů hemopexinu získaný za optimalizovaných nanoHILIC podmínek (gradientová eluce; MF: A: 0,1% kyselina mravenčí B: acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí). Symboly monosacharidů (viz Obr. 9) (převzato a upraveno z Přílohy XI).

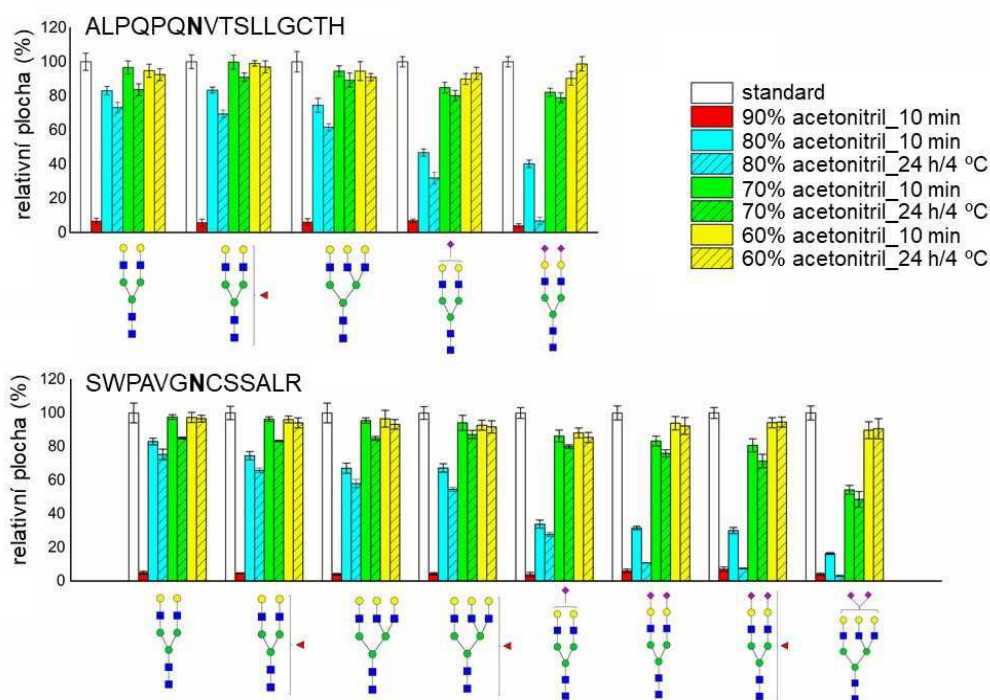
Opět platí, že s rostoucí velikostí glykanu dochází ke zvýšení retence, ale ve srovnání s kolonou HALO HILIC vykazovala kolona HALO penta-HILIC vyšší selektivitu i rozlišení pro jednotlivé glykoformy. Zajímavé je, že přítomnost sialové kyseliny výrazně prodlužuje retenci dané glykoformy. U fukosylovaných a mono-sialovaných glykoform bylo zaznamenáno více píků pro jeden specifický SRM přechod. To indikuje možnou separaci isomerických forem. Tak jako v předchozím případě jsme pro rozlišení fukosylovaných glykoform použili specifické fukosidasy. Bylo zjištěno, že první pík fukosylované dvojramenné glykoformy peptidu SWPAVGDCSSALR patří fukose vázané na jaderný GlcNAc a druhý pík patří fukose vázané na ramenní GlcNAc. Stejně rozložení fukosy bylo prokázáno u trojramenné formy téhož peptidu, tj. dříve eluující pík obsahuje fukosu vázanou na jádro a později eluující pík fukosu vázanou na rameno. U fukosylované dvojramenné glykoformy peptidu ALPQPQNVTSLGCTH byla zaznamenána částečná separace, kdy jako první eluuje opět glykoforma obsahující fukosu vázanou na jádro a jako druhá eluuje glykoforma s fukosou vázanou na rameno. Fukosylovaná trojramenná glykoforma tohoto peptidu je ve formě s fukosou vázanou na rameno. U glykoform obsahujících jednu sialovou kyselinu vázanou na dvouramenný glykan obou peptidů jsme obdrželi dva dobře rozdělené píky a u trojramenné glykoformy s jednou sialovou kyselinou peptidu SWPAVGDCSSALR byly získány tři píky. Předpokládalo se, že separaci způsobuje rozdílná vazba sialové kyseliny na galaktosu, kdy se může vázat buď  $\alpha$ 2-3 nebo  $\alpha$ 2-6 vazbou. Pro potvrzení této domněnky byla použita  $\alpha$ 2-3 neuraminidasa, která odštěpuje z glykanu sialové kyseliny vázané pouze  $\alpha$ 2-3 vazbou. Analýza vzorku po štěpení  $\alpha$ 2-3 neuraminidasou však ukázala, že ani jedna sialová kyselina není vázána  $\alpha$ 2-3 vazbou. Naopak po použití  $\alpha$ 2-3,6,8,9 neuraminidasy se již v chromatogramu nevyskytovaly žádné sialové glykoformy. To prokazuje, že všechny sialové kyseliny jsou vázány vazbou  $\alpha$ 2-6. S největší pravděpodobností se jedná o separaci isoform, které se liší v umístění sialové kyseliny, a to buď na  $\alpha$ 3 nebo na  $\alpha$ 6 rameně. Tři chromatografické píky trojramenné glykoformy s jednou sialovou kyselinou peptidu SWPAVGDCSSALR mohou odpovídat separaci isoform lišících se v lokalizaci sialové kyseliny na větveném  $\alpha$ 6 rameně nebo na větveném  $\alpha$ 3 rameně větvicím se dále  $\beta$ 2 nebo  $\beta$ 4 vazbou.

Dále jsme v rámci této studie zkoumali vliv složení mobilní fáze na retenci a separaci glykopeptidů. Bylo zjištěno, že složení vodné složky MF má zásadní vliv na jejich retenci a separaci. Výše zmíněné separace jednotlivých glykopeptidů a jejich isomerů byly prováděny s 0,1% kyselinou mravenčí jako vodnou složkou MF. Při použití mravenčanu amonného (20 mM, pH 4,00) jako vodné složky MF došlo k výraznému nárůstu retence pro všechny neutrální glykoformy, například u dvojramenné glykoformy peptidu SWPAVGDCSSALR došlo ke zvýšení retence z původních 28,9 min na 48,3 min. U glykopeptidů obsahujících sialovou kyselinu nebyl nárůst retence tak výrazný, naopak u některých sialo-glykoforem došlo ke snížení retence. Mravenčan amonný způsobil také významné zhoršení separace jednotlivých fukosylovaných isoform a koeluci sialových isoform. Bylo ukázáno, že složením MF se dá velmi efektivně ovlivňovat retence, selektivita a separace glykopeptidů v HILIC a že HILIC má velký potenciál v separaci isomerů intaktních glykopeptidů.

### **2.3.5 Vliv obsahu acetonitrilu v nástřikovém solventu na rozpustnost glykopeptidů**

V naší předchozí studii [133] byly zaznamenány nižší odezvy pro jednotlivé glykopeptidy v HILIC v porovnání s RP-LC. Tento jev by mohl být způsoben odlišnou ionizační účinností v ESI při odlišném složení MF, ale také možnou nižší rozpustností glykopeptidů v rozpouštědlech s vysokým obsahem organické složky. Z tohoto důvodu jsme testovali vliv obsahu acetonitrilu (90, 80, 70 a 60 objemových %) v nástřikovém solventu na rozpustnost glykopeptidů hemopexinu a haptoglobinu (Příloha XII). Jako referentní standard byl použit solvent skládající se z 0,1% kyseliny mravenčí v 2% acetonitrilu, kde jsou glykopeptidy plně rozpustné. Vzorky glykopeptidů byly zředěny acetonitrem tak, aby obsah acetonitrilu odpovídal zmíněným objemovým procentům. Finální koncentrace proteinů ve všech vzorcích byla 0,05 µg/µl. Jedna část vzorků byla ponechána po dobu 10 minut za laboratorní teploty a druhá část byla ponechána 24 hodin při 4 °C (simulace podmínek v autosampleru), přičemž vzorky v 90% acetonitrilu byly testovány pouze za laboratorní teploty po dobu 10 minut. Před analýzou byly vzorky odstředěny na centrifuze a supernatant byl 5× zředěn MF (analýza probíhala pomocí RP-LC). Na Obr. 15 vidíme výsledky pro glykopeptidy hemopexinu. Data jsou vyjádřena jako

relativní plocha dané glykoformy v solventu obsahujícím různé množství acetonitrilu vztahená k referenci (standard v solventu složeném z 0,1% kyseliny mravenčí v 2% acetonitrilu).



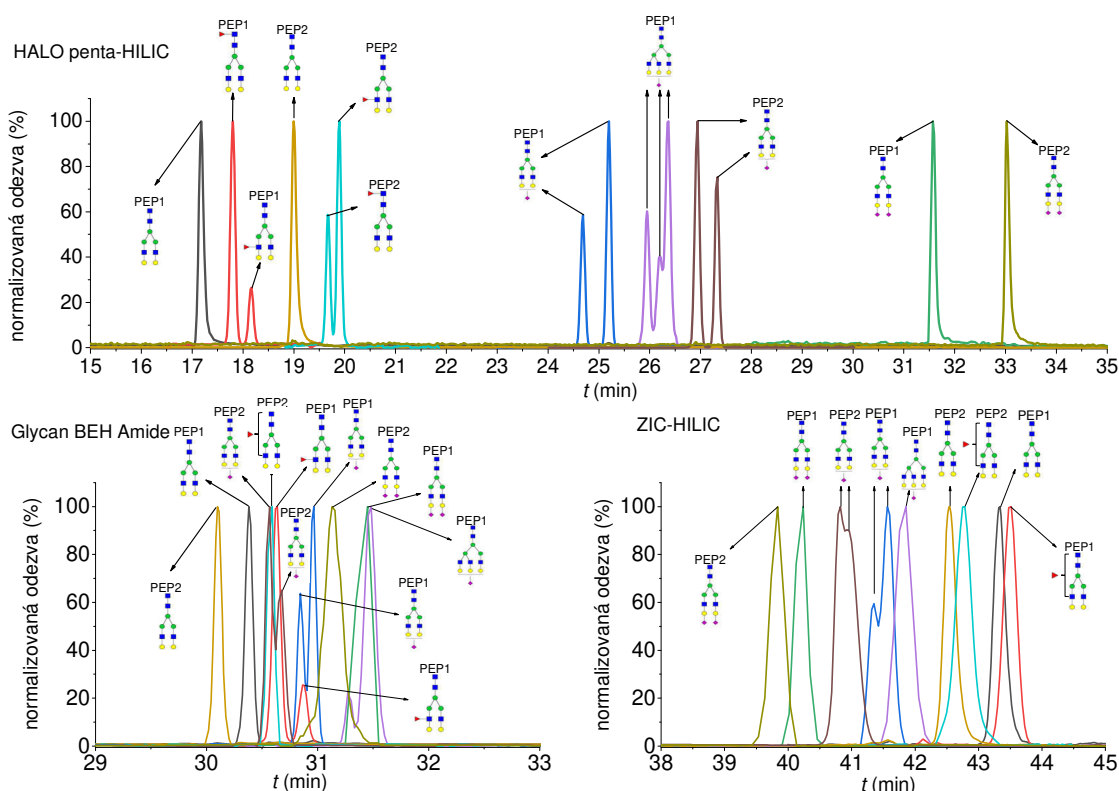
Obr. 15 Vliv množství acetonitrilu v nástřikovém solventu na precipitaci glykopeptidů hemopexinu. Symboly monosacharidů (viz Obr. 9) (převzato a upraveno z Přílohy XII).

Z obrázku je zřejmé, že u 90% acetonitrilu došlo k významné precipitaci všech glykoform. Dále je vidět, že čím větší je glykan, k tím významnější precipitaci dochází, jak je patrné u 80% acetonitrilu, a také, že při nižší teplotě (4 °C) mají glykopeptidy nižší rozpustnost. Přítomnost sialové kyseliny výrazně snižuje rozpustnost glykopeptidů v acetonitrilu. Stejné chování bylo pozorováno i u haptoglobinových glykopeptidů. Složení nástřikového solventu v HILIC nemusí ovlivnit pouze rozpustnost glykopeptidů, ale má také významný vliv na chromatografické parametry, jak jsme ukázali v naší předchozí studii (Příloha X) [133], kdy snížení obsahu acetonitrilu v nástřikovém solventu z 80 obj.% na 70 obj.% způsobilo posuny v retenčních časech glykopeptidů hemopexinu a snížení na 60 obj.% acetonitrilu způsobilo rozdělení chromatografických píků. Je zřejmé, že složení nástřikového solventu je významným parametrem, který se musí v HILIC

glykopeptidů pečlivě optimalizovat, aby nedocházelo k negativnímu ovlivnění separace a zkreslení dat v kvantitativní analýze způsobenému precipitací specifických glykoforem.

### 2.3.6 Vliv typu stacionární fáze na separaci glykopeptidů hemopexinu a IgG v HILIC

Jak již bylo ukázáno výše, hlavním parametrem ovlivňujícím separaci v HILIC je výběr stacionární fáze. V následující studii (Příloha XIII) jsme porovnali separační potenciál tří různých HILIC kolon, a to HALO penta-HILIC, ZIC-HILIC (zwitteriontová sulfoalkylbetainová stacionární fáze) a Glycan BEH Amide v analýze vybraných glykopeptidů hemopexinu a IgG. Separace hemopexinových glykopeptidů získaná za gradientové eluce (MF: A: 0,1% kyselina mravenčí, B: acetonitril s 0,1% kyselinou mravenčí) na jednotlivých kolonách je ukázána na Obr. 16.



Obr. 16 Normalizované chromatogramy glykopeptidů hemopexinu získané za gradientové eluce na kolonách HALO penta-HILIC, Glycan BEH Amide a ZIC HILIC. PEP1 je peptid SWPAVGNCSALR a PEP2 je peptid ALPQPQNVTSLGCTH. Symboly monosacharidů (viz Obr. 9) (převzato a upraveno z Přílohy XIII).

Z tohoto obrázku je patrné, že nejlepší separace bylo dosaženo na koloně HALO penta-HILIC, kdy došlo k separaci většiny glykopeptidů téměř na základní linii. Kolony Glycan BEH Amide a ZIC-HILIC poskytovaly výrazně horší separaci, kdy řada glykopeptidů koeluovala. Studované kolony se lišily též elučním pořadím některých glykopeptidů, kdy například na koloně HALO penta-HILIC jako první eluovala dvojramenná glykoforma (A2G2) peptidu SWPAVGNCSSALR a u kolony Glycan BEH Amide eluovala jako druhá. Sialová kyselina výrazně prodlužovala retenci u kolony HALO penta-HILIC, zatímco u kolony Glycan BEH Amide nebyl její vliv tak markantní. Naopak u kolony ZIC-HILIC docházelo vlivem elektrostatické repulze mezi negativně nabitou sulfonovou skupinou sulfoalkylbetainu a negativně nabitou sialovou kyselinou ke snižování retence. Kolona HALO penta-HILIC jako jediná byla schopna velmi dobře separovat fukosylované isoformy dvojramenného glykopeptidu (A2G2F1; fukosa na jádře nebo na rameně) u obou peptidů. U kolony Glycan BEH Amide bylo dosaženo separace fukosylovaných isoform glykopeptidu A2G2F1 pouze u peptidu SWPAVGNCSSALR, zatímco u druhého peptidu docházelo k úplné koeluci obou isoform. Kolona ZIC-HILIC neposkytovala žádnou separaci fukosylovaných isoform. Také u isoform obsahujících sialovou kyselinu bylo nejlepší separace dosaženo na koloně HALO penta-HILIC, kdy byly monosialované isoformy dvojramenných glykopeptidů (A2G2S1) odděleny až na základní linii. U kolony Glycan BEH Amide docházelo pouze k částečné separaci (rozlišení 1,02 pro isoformu A2G2S1 peptidu SWPAVGNCSSALR a 0,82 pro stejnou isoformu peptidu ALPQPQNVTSLGCTH) a nejhorší separace bylo dosaženo na koloně ZIC-HILIC (rozlišení 0,74 pro formu A2G2S1 peptidu SWPAVGNCSSALR a 0,43 pro stejnou formu peptidu ALPQPQNVTSLGCTH). Při separaci glykopeptidů IgG bylo nejlepší separace dosaženo na koloně HALO penta-HILIC, naopak nejhorší na koloně ZIC-HILIC. Kolony HALO penta-HILIC a Glycan BEH Amide byly schopné částečně separovat isoformy dvojramenného glykopeptidu s jednou galaktosou (A2G1F1) lišící se v pozici galaktosy (umístění na  $\alpha 3$  nebo  $\alpha 6$  rameně). V případě kolony ZIC-HILIC tyto isoformy eluovaly v jednom píku. V této studii bylo ukázáno, že výběr správné stacionární fáze je zásadní při optimalizaci HILIC metody určené k charakterizaci glykoproteinů a jejich isomerů.

### 2.3.7 Separace glykopeptidů IgG za použití HILIC/IEC

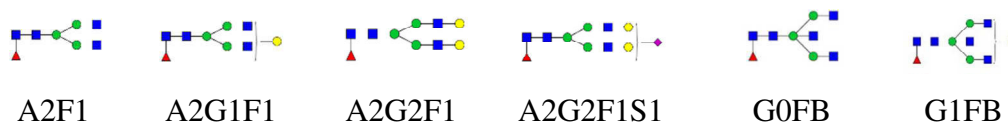
V této studii (Příloha XIV) jsme zkoumali separační potenciál kolon ACE HILIC v analýze glykopeptidů IgG. Peptidová kostra studovaných glykopeptidů IgG má dva kladné náboje, jeden na argininu, druhý na terminální aminoskupině, a tři záporné náboje, které nesou dvě glutamové kyseliny a C-terminální karboxylová skupina. V MF skládající se z acetonitrilu a 0,1% kyseliny mravenčí jsou však tyto karboxylové skupiny pouze částečně disociované. Za optimalizovaných gradientových podmínek bylo nejnižších retencí glykopeptidů dosaženo na koloně HILIC-A, což může být způsobeno elektrostatickou repulzí mezi částečně disociovanými silanolovými skupinami SF a třemi částečně disociovanými karboxylovými kyselinami peptidové kostry IgG. Naopak u kolony HILIC-B došlo ke zvýšení retence v porovnání s kolonou HILIC-A vlivem přitažlivých elektrostatických interakcí. Tento efekt byl nejvýraznější u glykopeptidů obsahujících sialovou kyselinu. Opět bylo zaznamenáno podobné retenční chování na koloně HILIC-N a koloně HILIC-B, jak již bylo popsáno v kapitole 2.1.4. Na základě porovnání rozlišení jednotlivých glykopeptidů lze pozorovat určité trendy. V tabulce 1 je uvedeno porovnání rozlišení glykopeptidů obsahujících shodný glykan vázaný jednou na IgG1 (sekvence EEQYNSTYR) a podruhé na IgG2 (sekvence EEQFNSTFR). Nejvyšší rozlišení těchto glykopeptidů bylo dosaženo na koloně HILIC-N, naopak nejhorší na koloně HILIC-A.

Tabulka 1 Rozlišení glykopeptidů obsahujících shodný glykan vázaný na rozdílný peptid (IgG1 a IgG2),  $R$  ( $R = (t_{R,2} - t_{R,1})/0,5 \times (w_1 + w_2)$ );  $t_{R,1}$  – retenční čas dříve eluujícího píku,  $t_{R,2}$  – retenční čas později eluujícího píku,  $w_1$  šířka píku při základně dříve eluujícího píku,  $w_2$  šířka píku při základně později eluujícího píku. Schéma studovaných glykanů je uvedeno na Obr. 17.

	HILIC-A	HILIC-B	HILIC-N
	$R$		
A2F1: IgG1/IgG2	0,56	1,35	3,38
G0FB: IgG1/IgG2	0,48	1,90	3,26
A2G1F1: IgG1/IgG2	0,32	1,13	2,29
G1FB: IgG1/IgG2	0,31	1,25	2,08
A2G2F1: IgG1/IgG2	0,35	1,26	2,96
A2G2F1S1: IgG1/IgG2	0,33	1,02	1,71



Obr. 17 Schéma studovaných glykanů z Tabulky 1. Symboly monosacharidů (viz Obr. 9).



Jednotlivé monosacharidy glykanu mají vliv na fyzikálně-chemické vlastnosti celého glykopeptidu. V této práci bylo testováno celkem šest párů glykopeptidů lišících se o galaktosu, čtyři páry lišící se o N-acetylglukosamin a dva páry lišící se o sialovou kyselinu. Nejlepší rozlišení glykopeptidů lišících se o galaktosu bylo dosaženo na koloně HILIC-A, naopak nejhorší u kolony HILIC-B, jak je patrné z tabulky 2. Kolona HILIC-A také vykazovala nejlepší rozlišení u glykopeptidů lišících se o N-acetylglukosamin. Naopak nejvyšší rozlišení glykopeptidů lišících se přítomností sialové kyseliny bylo dosaženo na koloně HILIC-N.

Tabulka 2 Rozlišení glykopeptidů lišících se o určitou monosacharidovou jednotku,  $R$  ( $R = (t_{R,2} - t_{R,1})/0,5 \times (w_1 + w_2)$ );  $t_{R,1}$  – retenční čas dříve eluujícího píku,  $t_{R,2}$  – retenční čas později eluujícího píku,  $w_1$  šířka píku při základně dříve eluujícího píku,  $w_2$  šířka píku při základně později eluujícího píku. Schéma studovaných glykanů je uvedeno na Obr. 18.

	HILIC-A	HILIC-B	HILIC-N
<b>rozdíl o galaktosu</b>	$R$		
IgG1: A2G1F1/A2F1	2,07	0,75	1,48
IgG1: A2G2F1/A2G1F1	2,18	0,82	1,46
IgG1: G1FB/G0FB	1,31	0,57	1,48
IgG2: A2G1F1/A2F1	2,00	0,58	1,97
IgG2: A2G2F1/A2G1F1	2,26	0,50	1,52
IgG2: G1FB/G0FB	2,28	0,69	1,41
<b>rozdíl o N-acetylglukosamin</b>			
IgG1: G0FB/A2F1	1,91	0,54	1,24
IgG1: G1FB/A2G1F1	1,16	0,44	0,86
IgG2: G0FB/A2F1	2,12	0,56	1,45
IgG2: G1FB/A2G1F1	1,59	0,38	0,65
<b>rozdíl o sialovou kyselinu</b>			
IgG1: A2G2F1S1/A2G2F1	3,12	11,90	17,89
IgG2: A2G2F1S1/A2G2F1	3,63	11,08	23,32

Obr. 18 Schéma studovaných glykanů lišících se o určitou monosacharidovou jednotku z Tabulky 2. Symboly monosacharidů (viz Obr. 9).

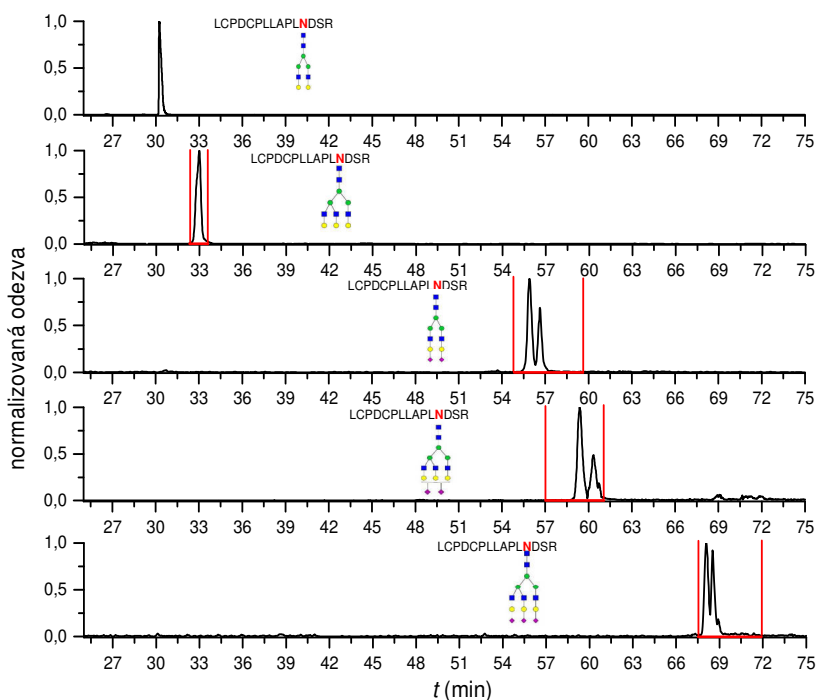


Pouze na koloně HILIC-A bylo možné částečně separovat isoformy glykanu A2G1F1 na obou peptidech (IgG1,  $R = 0,37$  a IgG2,  $R = 0,51$ ), zatímco na koloně HILIC-N byly částečně separovány tyto isoformy pouze na peptidu IgG2 ( $R = 0,45$ ). U kolony HILIC-B nedocházelo k žádné separaci isoformem. Na základě výsledků se ukázalo, že každá z testovaných kolon je vhodná pro separaci určité skupiny glykopeptidů.

### 2.3.8 Predikce retenčních oken glykopeptidů v HILIC

V posledních několika letech byla vyvinuta řada glykoproteomických programů, které umožňují identifikaci glykopeptidů na základě porovnání naměřených MS/MS dat s in silico databází teoretických kombinací glykanů a peptidů [134-136]. Tyto programy poskytují relativně vysoké množství falešně pozitivních nebo negativních identifikací vzhledem k tomu, že ne vždy se podaří získat MS/MS spektrum odpovídající kvality, popřípadě vzorek obsahuje glykany nebo modifikované peptidy, které program nezná [134, 137]. Retenční chování glykopeptidů v LC může sloužit jako doplňující informace k MS spektrům a zanesení této informace do glykoproteomických algoritmů může vést ke snížení množství nesprávně identifikovaných glykopeptidů [121, 138, 139]. Studie zabývající se predikcí retenčních oken (Příloha XV) vzešla z poznatku, že RRT jednotlivých glykoforem v HILIC se významně nemění v závislosti na peptidové kostře, i když absolutní retence glykopeptidů je v řadě případů velmi rozdílná. Měření byla prováděna na koloně HALO penta-HILIC v nanoměřítku. Pro výpočet RRT jednotlivých glykopeptidů byla použita dvojramenná glykoforma A2G2 ( $RRT = t_{r(\text{glykoforma } x)}/t_{r(\text{glykoforma } A2G2)}$ ), která se u mnoha plasmatických glykoproteinů vyskytuje ve vysokém zastoupení a k její identifikaci není potřeba žádná další enzymatická úprava. Predikce absolutních retenčních časů glykopeptidů v HILIC není zcela jednoduchým úkolem, a proto byla použita predikce RRT. Namísto predikce přesné hodnoty RRT bylo predikováno retenční okno – úzký časový interval, ve kterém eluuje daná glykoforma. K určení

retenčních oken byly použity RRT glykopeptidů získaných tryptickým štěpením plasmatických glykoproteinů haptoglobinu, hemopexinu a SHBG. Následně byl vypočten medián a standardní odchylka (SD) RRT pro danou glykoformu. Za předpokladu Gaussova rozdělení RRT byly určeny hranice daného retenčního okna jako medián RRT  $\pm 3 \times SD$ , což představuje 99,7% pravděpodobnost výskytu dané glykoformy. Na Obr. 19 je na proteinu fetuinu demonstrováno, jak daný koncept RRT funguje v případě glykopeptidů peptidu LCPDCPLLAPLNDSR. Nejprve byla identifikována glykoforma A2G2 daného peptidu pomocí LC-MS/MS (horní chromatogram). Pomocí retence této glykoformy byla určena horní a dolní hranice retenčního okna ostatních glykoforem (na chromatogramu označeno červenými liniemi). Z obrázku je patrné, že všechny identifikované glykoformy daného peptidu eluovaly v predikovaných retenčních oknech („rozdvojené“ píky u sialoglykoforem odpovídají částečné separaci isoform  $\alpha 2-3$  nebo  $\alpha 2-6$  vázané sialové kyseliny), což zvyšuje spolehlivost identifikace daného glykopeptidu. I když byl koncept retenčních oken v HILIC testován na omezeném množství glykopeptidů, ukázal se jako funkční a vhodný k začlenění do glykoproteomických programů s cílem zlepšení spolehlivosti identifikace glykopeptidů.



Obr. 19 SRM chromatogramy glykopeptidů LCPDCPLLAPLNDSR fetuinu s označenými retenčními okny (červené linie) predikovanými dle RRT modelu (převzato a upraveno z Přílohy XV).

### 3 ZÁVĚR

V předkládané habilitační práci byly shrnuty výsledky mé výzkumné činnosti v oblasti hydrofilní interakční kapalinové chromatografie z let 2012 až 2022.

První část práce je zaměřena na popis mechanismu separace v HILIC. Řadou chromatografických testů jsme charakterizovali a porovnali různé HILIC systémy. Ukázali jsme, že ve studovaných systémech dochází ke komplexnímu mechanismu retence/separace a identifikovali jsme hlavní interakce, které se v daných systémech uplatňují. Cyklofruktanové SF vykazovaly vyšší selektivitu a separační potenciál při analýze polárních peptidů ve srovnání s klasickou silikagelovou SF a mohou tedy sloužit jako vhodné SF v HILIC. Na základě řady chromatografických testů jsme prokázali, že dvě kolony se shodným ligandem (amidové SF) vykazují podobné, ale ne totožné interakční možnosti. Perspektivním LC módem je HILIC/IEC. Nedávno představené stacionární fáze (ACE HILIC kolony) schopné pracovat v HILIC/IEC módu byly porovnány z hlediska uplatnění iontových interakcí a byl demonstrován jejich potenciál pro separaci biologicky aktivních peptidů. Opomíjeným ale významným parametrem, kterým lze ovlivňovat retenci a selektivitu v HILIC, je typ a koncentrace kationtu pufry MF, jak bylo prokázáno při analýzách vybraných aminokyselin, dipeptidů a jejich N-blokovaných analogů na amidové a silikagelové SF.

Vzhledem ke komplexnímu a stále ne zcela objasněnému separačnímu mechanismu HILIC, a s tím spojené horší predikci retenčního chování polárních analytů, není HILIC při vývoji chromatografických metod stále tak populární jako RP-LC. I přesto je ve druhé části práce ukázán aplikační potenciál HILIC v analýze malých molekul. Podařilo se vyvinout robustní, přesné a dostatečně citlivé HILIC-MS/MS metody pro stanovení konkrétních analytů ve třech různých oblastech, a to stanovení efedrinu v pevných lékových formách, stanovení alantoinu v lidském séru a stanovení pterinů v kutikulách ploštic.

Třetí část práce je věnována HILIC v glykoproteomické analýze. Z porovnání RP-LC a HILIC v analýze intaktních glykopeptidů plyne, že HILIC poskytuje vyšší rozlišení pro jednotlivé glykoformy téhož peptidu a vykazuje vysoký potenciál v separaci isomerních struktur. Hlavním parametrem ovlivňujícím separaci

glykopeptidů v HILIC je výběr SF. Ze všech testovaných SF bylo dosaženo nejvyššího rozlišení jednotlivých glykopeptidů na koloně HALO penta-HILIC. Zároveň tato kolona poskytovala nejvyšší rozlišení fukosylovaných a sialovaných isoform. Významným parametrem ovlivňujícím HILIC analýzu glykopeptidů je složení nástřikového solventu, které se musí pečlivě optimalizovat. Při vysokém obsahu acetonitrilu může docházet k precipitaci určitých glykoform a naopak při nízkém obsahu může docházet k posunu retenčních časů, popřípadě až k rozdělení chromatografických píků. V poslední studii zahrnuté v habilitační práci je ilustrováno využití retenčního chování glykopeptidů v HILIC k vytvoření predikčního modelu retenčních oken pro jednotlivé glykopeptidy. Inkorporace retenčních oken do glykoproteomických programů může významně snížit falešnou pozitivitu nebo negativitu identifikace glykopeptidů na základě MS spekter.

I když vývoj HILIC metod nebývá z řady důvodů rychlým a jednoduchým úkolem, tak zcela jistě má HILIC své pevné místo v analýzách polárních látek. Pro HILIC je dostupné velké množství SF. To na jednu stranu poskytuje velké množství možností při vývoji metody, ale na druhou stranu je to komplikace při výběru SF vhodné pro konkrétní účely. Z tohoto důvodu je nutné studovat, popsat a pochopit procesy, které se při HILIC uplatňují. V současné době se zabýváme popisem vlivu iontových interakcí v HILIC/IEC v separaci intaktních glykopeptidů pomocí derivatizace ionizovatelných funkčních skupin glykopeptidů a dále se zaměřujeme na pochopení a objasnění separace isomerů glykopeptidů v HILIC. Tento směr výzkumu bude přínosný v oblasti glykoproteomiky, charakterizace biologických léčiv a objevování biomarkerů charakteristických pro různá onemocnění.

# PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH PRACÍ

## 4.1 Původní vědecké práce v impaktovaných časopisech

1. Šalamúnová, P., Krejčí, T., Ryšánek, P., Saloň, I., Kroupová, J., Hubatová-Vacková, A., Petřík, J., Grus, T., Lukáč, P., **Kozlík, P.**, Křížek, T., Dammer, O., Beránek, J., Šíma, M., Slanař, O., Štěpánek, F.: Serum and lymph pharmacokinetics of nilotinib delivered by yeast glucan particles per os. *International Journal of Pharmaceutics* 634 (2023) 122627.
2. Jelínek, P., Roušarová, J., Ryšánek, P., Ježková, M., Havlůjová, T., Pozniak, J., **Kozlík, P.**, Křížek, T., Kučera, T., Šíma, M., Slanař, O., Šoóš, M.: Application of Oil-in-Water Cannabidiol Emulsion for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Cannabis and Cannabinoid Research* (2022) DOI: 10.1089/can.2022.0176.
3. Petřík, J., Rycheký, O., Krejčí, T., Becherová, L., Trunov, D., Prachař, M., Navrátil, O., Žvátora, P., Krejčík, L., Dammer, O., Beránek, J., **Kozlík, P.**, Křížek, T., Šoóš, M., Heřt, J., Bissola, S., Berto, S., Štěpánek, F.: Pharmaceutical Product Characterization and Manufacturability of Surfactant-Enriched Oil Marbles with Abiraterone Acetate. *AAPS PharmSciTech* 23 (2022) 274.
4. Tomnikova, A., **Kozlík, P.**, Křížek, T.: Monosaccharide profiling of glycoproteins by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis* 43 (2022) 1963-1970.
5. **Kozlík, P.\***, Molnárová, K., Ječmen, T., Křížek, T., Bosáková, Z.: Prediction of Intact N-Glycopeptide Retention Time Windows in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Molecules* 27 (2022) 3723.
6. Hriňova, E., Skořepová, E., Černá, I., Královičová, J., **Kozlík, P.**, Křížek, T., Roušarová, J., Ryšánek, P., Šíma, M., Slanař, O., Šoóš, M.: Explaining dissolution properties of rivaroxaban cocrystals. *International Journal of Pharmaceutics* 622 (2022) 121854.
7. **Kozlík, P.**, Širc, J., Cocarta, Al., Bosáková, Z: A novel highly sensitive UHPLC-MS/MS method for monitoring vincristine in plasma and vitreous humor samples with potential application in retinoblastoma therapy. *Microchemical Journal* 178 (2022) 107337.

8. Královičová, J., Bartůněk, A., Hofmann, J., Křížek, T., **Kozlík, P.**, Roušarová, J., Ryšánek, P., Šíma, M., Slanař, O.: Pharmacokinetic Variability in Pre-Clinical Studies: Sample Study with Abiraterone in Rats and Implications for Short-Term Comparative Pharmacokinetic Study Designs. *Pharmaceutics* 14 (2022) 643.
9. Vymyslický, F., Křížek, T., **Kozlík, P.**, Kubíčková, A., Heřt, J., Bartosińska, E.: Alternative method for canagliflozin oxidation analysis using an electrochemical flow cell-Comparative study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 207 (2022) 114341.
10. Kadlecová, Z., **Kozlík, P.**, Tesařová, E., Gilar, M., Kalíková, K.: Characterization and comparison of mixed-mode and reversed-phase columns; interaction abilities and applicability for peptide separation. *Journal of Chromatography A* 1648 (2021) 462182.
11. Šanda, M., Ahn, J., **Kozlík, P.**, Goldman, R.: Analysis of site and structure specific core fucosylation in liver cirrhosis using exoglycosidase-assisted data-independent LC-MS/MS. *Scientific Reports* 11 (2021) 23273.
12. Li, J. W., Fernandez-Alvarez, R., Tošner, Z., **Kozlík, P.**, Štěpánek, M., Zhigunov, A., Urbanová, M., Brus, J., Uchman, M., Matějíček, P.: Polynorbornene-Based Polyelectrolytes with Covalently Attached Metallacarboranes: Synthesis, Characterization, and Lithium-Ion Mobility. *Macromolecules* 54 (2021) 6867-6877.
13. Nesměrák, K., Štícha, M., Beliansky, M., Červený, V., **Kozlík, P.**, Kudláček, K., Kunešová, J.: Laudanum opiatum caesareum: authentication of the composition of a historical pharmaceutical preparation from the eighteenth century using a multianalytical approach. *Monatshefte fur Chemie* 152 (2021) 1089-1096.
14. Roušarova, J., Šíma, M., **Kozlík, P.**, Křížek, T., Slanař, O.: Changes in Rosuvastatin Pharmacokinetics During Postnatal Ontogenesis in Rats. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 25 (2021) 1-8.
15. Ryšánek, P., Grus, T., Lukač, P., **Kozlík, P.**, Křížek, T., Pozniak, J., Roušarová, J., Královičova, J., Canová, N. K., Boleslavská, T., Bosák, J., Štěpánek, J., Šíma, M., Slanař, O.: Validity of cycloheximide chylomicron flow blocking method for the evaluation of lymphatic transport of drugs. *British Journal of Pharmacology* 178 (2021) 4663-4674.

16. Hasíková, L., Závada, J., Serranová, T., Kotačková, L., **Kozlík, P.**, Kalíková, K., Trnka, J., Zogala, D., Šonka, K., Růžička, E., Dušek, P.: Patients with REM sleep behavior disorder have higher serum levels of allantoin. *Parkinsonism and Related Disorders* 90 (2021) 38-43.
17. **Kozlík, P.\***, Vaclová, J., Kalíková, K.: Mixed-mode hydrophilic interaction/ion-exchange liquid chromatography - Separation potential in peptide analysis. *Microchemical Journal* 165 (2021) 106158.
18. Molnárová, K., Ďuriš, A., Ječmen, T., **Kozlík, P.\***: Comparison of human IgG glycopeptides separation using mixed-mode hydrophilic interaction/ion-exchange liquid chromatography and reversed-phase mode. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 413 (2021) 4321-4328.
19. Bartosińska, E., **Kozlík, P.**, Kubičková, A., Heřt, J., Fischer, J., Křížek, T.: Comparison of static and dynamic mode in the electrochemical oxidation of fesoterodine with the use of experimental design approach. *Talanta* 226 (2021) 122141.
20. Galba, J., Piešťanský, J., Kováč, A., Olešová, D., Cehlár, O., Kertys, M., **Kozlík, P.**, Chalová, P., Tirčová, B., Slíž, K., Mikuš, P.: Fast and Sensitive Screening of Oxandrolone and Its Major Metabolite 17-Epi-Oxandrolone in Human Urine by UHPLC-MS/MS with On-Line SPE Sample Pretreatment. *Molecules* 26 (2021) 480.
21. Hartinger, J. M., Lukáč, P., Mlček, M., Popková, M., Suchý, T., Šupová, M., Chlup, H., Horný, L., Závora, J., Adámková, V., Slanař, O., **Kozlík, P.**, Molnárová, K., Honsová, E., Lambert, L., Grus, T.: Rifampin-Releasing Triple-Layer Cross-Linked Fresh Water Fish Collagen Sponges as Wound Dressings. *Biomed Research International* 2020 (2020) 3841861.
22. Molnárová, K., **Kozlík, P.\***: Comparison of Different HILIC Stationary Phases in the Separation of Hemopexin and Immunoglobulin G Glycopeptides and Their Isomers. *Molecules* 25 (2020) 4655.
23. Pinkas, D., Fišer, R., **Kozlík, P.**, Dolejšová, T., Hryzáková, K., Konopásek, I., Mikušová, G.: Bacillus subtilis cardiolipin protects its own membrane against surfactin-induced permeabilization. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1862 (2020) 183405.



24. Boleslavská, T., Rychecý, O., Krov, M., Žvátora, P., Dammer, O., Beránek, J., **Kozlík, P.**, Křížek, T., Hořinková, J., Ryšánek, P., Roušarova, J., Canová, N. K., Šíma, M., Slanař, O., Štěpánek, F.: Bioavailability Enhancement and Food Effect Elimination of Abiraterone Acetate by Encapsulation in Surfactant-Enriched Oil Marbles. *AAPS Journal* 22 (2020) 122.
25. **Kozlík, P.\***, Molnárová, K., Ječmen, T., Křížek, T., Goldman, R.: Glycan-specific precipitation of glycopeptides in high organic content sample solvents used in HILIC. *Journal of Chromatography B* 1150 (2020) 122196.
26. Nesměrák, K., Kudláček, K., Čambal, P., Štícha, M., **Kozlík, P.**, Červený, V.: Authentication of senna extract from the eighteenth century and study of its composition by HPLC-MS. *Monatshefte fur Chemie* 151 (2020) 1241-1248.
27. Boleslavská, T., Světlík, S., Žvátora, P., Bosák, J., Dammer, O., Beránek, J., **Kozlík, P.**, Křížek, T., Canová, N. K., Šíma, M., Slanař, O., Štěpánek, F.: Preclinical evaluation of new formulation concepts for abiraterone acetate bioavailability enhancement based on the inhibition of pH-induced precipitation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 151 (2020) 81-90.
28. Křížek, T., **Kozlík, P.\***, Hodek, O., Štěpánová, E., Nesměrák, K.: Lidocaine adsorption to ethylene-vinyl acetate infusion bags decreases its availability in del Nido cardioplegia solution. *Monatshefte fur Chemie* 151 (2020) 1217-1223.
29. Nesměrák, K., Kudláček, K., **Kozlík, P.**, Štícha, M., Vašíčková, P., Babica, J.: Dlouhodobá stabilita alkaloidů v pevných lékových formách. *Chemické listy* 114 (2020) 52-57.
30. **Kozlík, P.\***, Hasíková, L., Stibůrková, B., Závada, J., Kalíková, K.: Rapid and reliable HILIC-MS/MS method for monitoring allantoin as a biomarker of oxidative stress. *Analytical Biochemistry* 589 (2020) 113509.
31. Folprechtová, D., Kalíková, K., **Kozlík, P.**, Tesařová, E.: The degree of substitution affects the enantioselectivity of sulfobutylether- $\beta$ -cyclodextrin chiral stationary phases. *Electrophoresis* 40 (2019) 1972-1977.
32. Nesměrák, K., Kudláček, K., Štícha, M., **Kozlík, P.**, Červený, V., Kunesova, J.: Degradation of the opium alkaloids in pharmaceutical relics from the eighteenth century. *Monatshefte fur Chemie* 150 (2019) 1593-1602.

33. Nesměrák, K., Kudláček, K., Štícha, M., **Kozlík, P.**, Babica, J.: HPLC–MS/MS analysis of degradation products of neosalvarsan in a 76-year-old injection preparation. *Monatshefte fur Chemie* 150 (2019) 1611-1615.
34. Hasíkova, L., Pavlíková, M., Hůlejšová, H., **Kozlík, P.**, Kalíková, K., Mahajan, A., Herrmann, M., Stibůrková, B., Závada, J.: Serum uric acid increases in patients with systemic autoimmune rheumatic diseases after 3 months of treatment with TNF inhibitors. *Rheumatology International* 39 (2019) 1749-1757.
35. Tirčová, B., Bosáková, Z., **Kozlík, P.\***: Development of an ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of anabolic steroids currently available on the black market in the Czech Republic and Slovakia. *Drug Testing and Analysis* 11 (2019) 355-360.
36. Kudláček, K., Nesměrák, K., Štícha, M., **Kozlík, P.**, Babica, J.: Degradation of ouabain in 80-year-old injection solution studied by HILIC-MS. *Monatshefte fur Chemie* 149 (2018) 1555-1560.
37. **Kozlík, P.**, Goldman, R., Šanda, M.: Hydrophilic interaction liquid chromatography in the separation of glycopeptides and their isomers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410 (2018) 5001-5008.
38. Taraba, L., Křížek, T., **Kozlík, P.**, Hodek, O., Coufal, P.: Protonation of polyaniline-coated silica stationary phase affects the retention behavior of neutral hydrophobic solutes in reversed-phase capillary liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 41 (2018) 2886-2894.
39. Kalíková, K., Boublík, M., Kučerová, G., **Kozlík, P.**: The effect of buffer concentration and cation type in the mobile phase on retention of amino acids and dipeptides in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Chemical Papers* 72 (2018) 139-147.
40. **Kozlík, P.**, Šanda, M., Goldman, R.: Nano reversed phase versus nano hydrophilic interaction liquid chromatography on a chip in the analysis of hemopexin glycopeptides. *Journal of Chromatography A* 1519 (2017) 152-155.
41. **Kozlík, P.**, Goldman, R., Šanda, M.: Study of structure-dependent chromatographic behavior of glycopeptides using reversed phase nanoLC. *Electrophoresis* 38 (2017) 2193-2199.

42. Kudláček, K., Nesměrák, K., Štícha, M., **Kozlík, P.**, Babica, J.: Historical injection solutions of quinine analyzed by HPLC/MS. *Monatshefte für Chemie* 148 (2017) 1613-1618.
43. Širc, J., Hampejsová, Z., Trnovská, J., **Kozlík, P.**, Hřib, J., Hobzová, R., Zajícová, A., Holan, V., Bosáková, Z.: Cyclosporine A Loaded Electrospun Poly(D,L-Lactic Acid)/Poly(Ethylene Glycol) Nanofibers: Drug Carriers Utilizable in Local Immunosuppression. *Pharmaceutical Research* 34 (2017) 1391-1401.
44. Tirčová, B., **Kozlík, P.**: HILIC-MS/MS Method for Analysis of Ephedrine in Internet-available Drugs. *Chromatographia* 80 (2017) 523-528.
45. Gonzalez, A. G., Taraba, L., Hraníček, J., **Kozlík, P.\***, Coufal, P.: Determination of dasatinib in the tablet dosage form by ultra high performance liquid chromatography, capillary zone electrophoresis, and sequential injection analysis. *Journal of Separation Science* 40 (2017) 400-406.
46. **Kozlík, P.\***, Tirčová, B.: Development of the fast, simple and fully validated high performance liquid chromatographic method with diode array detector for quantification of testosterone esters in an oil-based injectable dosage form. *Steroids* 115 (2016) 34-39.
47. 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. *Journal of Chromatography A* 1336 (2014) 94-100.
48. 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*. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1828 (2013) 2370-2378.
49. Kalíková, K., **Kozlík, P.**, Gilar, M., Tesařová, E.: Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns. *Journal of Separation Science* 36 (2013) 2421-2429.
50. **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). *Journal of Chromatography B* 630 (2013) 82-89.

51. Matějček, 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.
52. **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. *Journal of Chromatography A* 1257 (2012) 58-65.
53. Širc, J., Kubínová, S., Hobzová, R., Stránská, D., **Kozlík, P.**, Bosáková, Z., Mareková, D., Holan, V., Syková, E., Michálek, J.: Controlled gentamicin release from multi-layered electrospun nanofibrous structures of various thicknesses. *International Journal of Nanomedicine* 7 (2012) 5315-5325.
54. **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. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011) 2127-2132.

#### 4.2 Přehledové články v impaktovaných časopisech

1. Molnářová, K., Čokrtová, K., Tomníková, A., Křížek, T., **Kozlík, P\***: Liquid chromatography and capillary electrophoresis in glycomic and glycoproteomic analysis. *Monatshefte für Chemie* 153 (2022) 659-686.

#### 4.3 Jiné články v časopisech

1. Hořínková, J., **Kozlík, P.**, Křížek, T., Michaličková, D., Šíma, M., Slanař, O.: Post-mortem Redistribution of Alprazolam in Rats. *Prague Medical Report* 121 (2020) 244-253.

\* korespondenční autor

## LITERATURA

- [1] M. Valcarcel, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408 (2016) 13-21.
- [2] F. Adams, M. Adriaens, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412 (2020) 3525-3537.
- [3] D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch: *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9<sup>th</sup> edition, Belmont, Cengage Learning, 2014.
- [4] L. Novakova, M. Dousa, P. Cesla: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.*, 2<sup>nd</sup> edition, Moravany u Brna, Česká chromatografická škola, 2021.
- [5] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.W. Dolan: *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3<sup>rd</sup> edition, New Jersey, Wiley, 2009.
- [6] F. Svec, *Chemické Listy*, 115 (2021) 185-187.
- [7] P. Hemstrom, K. Irgum, *Journal of Separation Science*, 29 (2006) 1784-1821.
- [8] A.J. Alpert, *Journal of Chromatography*, 499 (1990) 177-196.
- [9] A.J. Martin, R.L. Synge, *Biochem J*, 35 (1941) 1358-1368.
- [10] J.C. Linden, C.L. Lawhead, *Journal of Chromatography*, 105 (1975) 125-133.
- [11] L.A. Kartsova, E.A. Bessonova, V.D. Somova, *Journal of Analytical Chemistry*, 74 (2019) 415-424.
- [12] P. Jandera, *Analytica Chimica Acta*, 692 (2011) 1-25.
- [13] P. Jandera, P. Janas, *Analytica Chimica Acta*, 967 (2017) 12-32.
- [14] Y. Guo, *Biomedical Chromatography*, 36 (2022) 25.
- [15] B. Dejaegher, Y.V. Heyden, *Journal of Separation Science*, 33 (2010) 698-715.
- [16] Y. Guo, *Analyst*, 140 (2015) 6452-6466.
- [17] D.V. McCalley, *Journal of Chromatography A*, 1523 (2017) 49-71.
- [18] E. Wikberg, T. Sparrman, C. Viklund, T. Jonsson, K. Irgum, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 6630-6638.
- [19] N.P. Dinh, T. Jonsson, K. Irgum, *Journal of Chromatography A*, 1320 (2013) 33-47.
- [20] J. Soukup, P. Jandera, *Journal of Chromatography A*, 1374 (2014) 102-111.
- [21] S.M. Melnikov, A. Holtzel, A. Seidel-Morgenstern, U. Tallarek, *Analytical Chemistry*, 83 (2011) 2569-2575.

- [22] S.M. Melnikov, A. Holtzel, A. Seidel-Morgenstern, U. Tallarek, *Angewandte Chemie-International Edition*, 51 (2012) 6251-6254.
- [23] D.V. McCalley, U.D. Neue, *Journal of Chromatography A*, 1192 (2008) 225-229.
- [24] A. Kumar, J.C. Heaton, D.V. McCalley, *Journal of Chromatography A*, 1276 (2013) 33-46.
- [25] D.V. McCalley, *Journal of Chromatography A*, 1483 (2017) 71-79.
- [26] P. Kozlik, V. Simova, K. Kalikova, Z. Bosakova, D.W. Armstrong, E. Tesarova, *Journal of Chromatography A*, 1257 (2012) 58-65.
- [27] K. Kalikova, P. Kozlik, M. Gilar, E. Tesarova, *Journal of Separation Science*, 36 (2013) 2421-2429.
- [28] Y. Kawachi, T. Ikegami, H. Takubo, Y. Ikegami, M. Miyamoto, N. Tanaka, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 5903-5919.
- [29] L.R. Snyder, H. Poppe, *Journal of Chromatography*, 184 (1980) 363-413.
- [30] P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. Degalan, *Journal of Chromatography*, 218 (1981) 261-284.
- [31] P. Cesla, N. Vankova, J. Krenkova, J. Fischer, *Journal of Chromatography A*, 1438 (2016) 179-188.
- [32] G.W. Jin, Z.M. Guo, F.F. Zhang, X.Y. Xue, Y. Jin, X.M. Liang, *Talanta*, 76 (2008) 522-527.
- [33] P. Kozlik, J. Vaclova, K. Kalikova, *Microchemical Journal*, 165 (2021) 8.
- [34] D. Sykora, J. Vozka, E. Tesarova, *Journal of Separation Science*, 39 (2016) 115-131.
- [35] M. Vitha, P.W. Carr, *Journal of Chromatography A*, 1126 (2006) 143-194.
- [36] M.H. Abraham, G.S. Whiting, R.M. Doherty, W.J. Shuely, *Journal of Chromatography*, 587 (1991) 213-228.
- [37] M.H. Abraham, *Chemical Society Reviews*, 22 (1993) 73-83.
- [38] M.H. Abraham, A. Ibrahim, A.M. Zissimos, *Journal of Chromatography A*, 1037 (2004) 29-47.
- [39] R.I. Chirita, C. West, S. Zubrzycki, A.L. Finaru, C. Elfakir, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 5939-5963.
- [40] C. West, G. Guenegou, Y.R. Zhang, L. Morin-Allory, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 2033-2057.

- [41] M. Taraji, P.R. Haddad, R.L. Amos, M. Talebi, R. Szucs, J.W. Dolan, C.A. Pohl, *Journal of Chromatography A*, 1507 (2017) 53-62.
- [42] X. Subirats, M.H. Abraham, M. Roses, *Analytica Chimica Acta*, 1092 (2019) 132-143.
- [43] L. Redon, X. Subirats, M. Roses, *Analytica Chimica Acta*, 1130 (2020) 39-48.
- [44] C. West, E. Auroux, *Journal of Chromatography A*, 1461 (2016) 92-97.
- [45] G. Schuster, W. Lindner, *Journal of Chromatography A*, 1273 (2013) 73-94.
- [46] G. Schuster, W. Lindner, *Journal of Chromatography A*, 1301 (2013) 98-110.
- [47] L. Redon, X. Subirats, M. Roses, *Journal of Chromatography A*, 1656 (2021) 11.
- [48] H.X. Qiu, L. Loukotkova, P. Sun, E. Tesarova, Z. Bosakova, D.W. Armstrong, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 270-279.
- [49] M.J. Walters, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 70 (1987) 465-469.
- [50] D. Sykora, E. Tesarova, M. Popl, *Journal of Chromatography A*, 758 (1997) 37-51.
- [51] C.D. Iverson, X.Y. Gu, C.A. Lucy, *Journal of Chromatography A*, 1458 (2016) 82-89.
- [52] G. Paglia, O. D'Apolito, F. Tricarico, D. Garofalo, G. Corso, *Journal of Separation Science*, 31 (2008) 2424-2429.
- [53] K.J. Fountain, J. Xu, D.M. Diehl, D. Morrison, *Journal of Separation Science*, 33 (2010) 740-751.
- [54] M. Dousa, J. Srbeek, Z. Stransky, P. Gibala, L. Novakova, *Journal of Separation Science*, 37 (2014) 739-747.
- [55] D.V. McCalley, *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 3408-3417.
- [56] A.J. Alpert, *Journal of Chromatography A*, 1538 (2018) 45-53.
- [57] Y. Guo, S. Gaiki, *Journal of Chromatography A*, 1074 (2005) 71-80.
- [58] M. Gilar, Y.Q. Yu, J. Ahn, J. Fournier, J.C. Gebler, *Journal of Chromatography A*, 1191 (2008) 162-170.
- [59] X. Santarelli, C. Cabanne, *Current Protein & Peptide Science*, 20 (2019) 14-21.
- [60] Z. Kadlecova, P. Kozlik, E. Tesarova, M. Gilar, K. Kalikova, *Journal of Chromatography A*, 1648 (2021) 9.

- [61] L.J. Wang, W.L. Wei, Z.N. Xia, X. Jie, Z.Z.L. Xia, *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 80 (2016) 495-506.
- [62] M.Y. Mumin, H. Aral, M. Sunkur, T. Aral, *Chemistryselect*, 7 (2022) 16.
- [63] D.Q. Tang, L. Zou, X.X. Yin, C.N. Ong, *Mass Spectrometry Reviews*, 35 (2016) 574-600.
- [64] R.P. Li, Y.L. Guo, Q. Yuan, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 34 (2011) 1112-1132.
- [65] Y.L. Guo, Q. Yuan, R.P. Li, Y.P. Huang, *Chinese Journal of Chromatography*, 30 (2012) 232-238.
- [66] Q. Zhang, F.Q. Yang, L.Y. Ge, Y.J. Hu, Z.N. Xia, *Journal of Separation Science*, 40 (2017) 49-80.
- [67] C. Erkmen, W.H. Gebrehiwot, B. Uslu, *Current Pharmaceutical Analysis*, 17 (2021) 316-345.
- [68] J. Bernal, A.M. Ares, J. Pol, S.K. Wiedmer, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 7438-7452.
- [69] A.L.N. van Nuijs, I. Tarcomnicu, A. Covaci, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 5964-5974.
- [70] G. Marrubini, P. Appelblad, M. Maietta, A. Papetti, *Food Chemistry*, 257 (2018) 53-66.
- [71] M. Thevis, T. Kuuranne, H. Geyer, *Drug Testing and Analysis*, 11 (2019) 8-26.
- [72] B. Tircova, Z. Bosakova, P. Kozlik, *Drug Testing and Analysis*, 11 (2019) 355-360.
- [73] P. Kozlik, B. Tircova, *Steroids*, 115 (2016) 34-39.
- [74] M. Hall, S. Grogan, B. Gough, *Psychology & Health*, 30 (2015) 770-782.
- [75] J. Heaton, N. Gray, D.A. Cowan, R.S. Plumb, C. Legido-Quigley, N.W. Smith, *Journal of Chromatography A*, 1228 (2012) 329-337.
- [76] M. Jovanovic, T. Rakic, D. Ivanovic, B. Jancic-Stojanovic, *Instrumentation Science & Technology*, 43 (2015) 156-169.
- [77] H. Kaur, B. Halliwell, *Chemico-Biological Interactions*, 73 (1990) 235-247.
- [78] R. Kand'ar, P. Zakova, V. Muzakova, *Clinica Chimica Acta*, 365 (2006) 249-256.
- [79] M. Czauderna, J. Kowalczyk, *Journal of Chromatography B*, 704 (1997) 89-98.



- [80] J. Gruber, S.Y. Tang, A.M. Jenner, I. Mudway, A. Blomberg, A. Behndig, K. Kasiman, C.Y.J. Lee, R.C.S. Seet, W.X. Zhang, C. Chen, F.J. Kelly, B. Halliwell, *Antioxidants & Redox Signaling*, 11 (2009) 1767-1776.
- [81] R. Turner, L.K. Stamp, A.J. Kettle, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 891 (2012) 85-89.
- [82] M. Saqib, B.H. Lou, M.I. Halawa, S.A. Kitte, Z.Y. Liu, G.B. Xu, *Analytical Chemistry*, 89 (2017) 1863-1869.
- [83] W.Y. Chung, I.F.F. Benzie, *Clinica Chimica Acta*, 424 (2013) 237-244.
- [84] L. Hasikova, J. Zavada, T. Serranova, L. Kotackova, P. Kozlik, K. Kalikova, J. Trnka, D. Zogala, K. Sonka, E. Ruzicka, P. Dusek, *Parkinsonism & Related Disorders*, 90 (2021) 38-43.
- [85] Y. Bel, M. Porcar, R. Socha, V. Nemeč, J. Ferre, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 34 (1997) 83-98.
- [86] K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L.T. Perelman, I. Itzkan, R. Dasari, M.S. Feld, *Physical Review Letters*, 78 (1997) 1667-1670.
- [87] J. Copikova, M. Uher, O. Lapcik, J. Moravcova, P. Drasar, *Chemicke Listy*, 99 (2005) 802-816.
- [88] V. Nemeč, M. Breuer, A. De Loof, *European Journal of Entomology*, 100 (2003) 19-23.
- [89] B.S. Tullberg, G. Gamberale-Stille, T. Bohlin, S. Merilaita, *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62 (2008) 1389-1396.
- [90] K. Svadova, A. Exnerova, P. Stys, E. Landova, J. Valenta, A. Fucikova, R. Socha, *Animal Behaviour*, 77 (2009) 327-336.
- [91] A.I. Johansen, A. Exnerova, K.H. Svadova, P. Stys, G. Gamberale-Stille, B.S. Tullberg, *Ecological Entomology*, 35 (2010) 602-610.
- [92] J. Brejcha, J.V. Bataller, Z. Bosakova, J. Geryk, M. Havlikova, K. Kleisner, P. Marsik, E. Font, *Royal Society Open Science*, 6 (2019) 34.
- [93] R. Apweiler, H. Hermjakob, N. Sharon, *Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects*, 1473 (1999) 4-8.
- [94] R.D.C. Ajit Varki, Jeffrey D. Esko, Pamela Stanley, Gerald W. Hart, Markus Aebi, Debra Mohnen, Taroh Kinoshita, Nicolle H. Packer, James H. Prestegard, Ronald L. Schnaar, and Peter H. Seeberger, (2022).

- [95] D.T. Tran, K.G. Ten Hagen, *Journal of Biological Chemistry*, 288 (2013) 6921-6929.
- [96] H. Kaltner, J. Abad-Rodriguez, A.P. Corfield, J. Kopitz, H.J. Gabius, *Biochemical Journal*, 476 (2019) 2623-2655.
- [97] M.S. Pereira, I. Alves, M. Vicente, A. Campar, M.C. Silva, N.A. Padrao, V. Pinto, A. Fernandes, A.M. Dias, S.S. Pinho, *Frontiers in Immunology*, 9 (2018) 13.
- [98] C. Reily, T.J. Stewart, M.B. Renfrow, J. Novak, *Nature Reviews Nephrology*, 15 (2019) 346-366.
- [99] J. Ugonotti, S. Chatterjee, M. Thaysen-Andersen, *Molecular Aspects of Medicine*, 79 (2021) 23.
- [100] A. Varki, *Glycobiology*, 27 (2017) 3-49.
- [101] C.K. Goth, S.Y. Vakhrushev, H.J. Joshi, H. Clausen, K.T. Schjoldager, *Trends in Biochemical Sciences*, 43 (2018) 269-284.
- [102] J.G. Rodrigues, M. Balmana, J.A. Macedo, J. Pocas, A. Fernandes, J.C.M. de-Freitas, S.S. Pinho, J. Gomes, A. Magalhaes, C. Gomes, S. Mereiter, C.A. Reis, *Cellular Immunology*, 333 (2018) 46-57.
- [103] S. Chatterjee, L.Y. Lee, R. Kawahara, J.L. Abrahams, B. Adamczyk, M. Anugraham, C. Ashwood, Z. Sumer-Bayraktar, M.T. Briggs, J.H.L. Chik, A. Everest-Dass, S. Forster, H. Hinneburg, K.R.M. Leite, I. Loke, U. Moginger, E.S.X. Moh, M. Nakano, S. Recuero, M.K. Sethi, M. Srougi, K. Stavenhagen, V. Venkatakrishnan, K. Wongtrakul-Kish, S. Diestel, P. Hoffmann, N.G. Karlsson, D. Kolarich, M.P. Molloy, M.H. Muders, M.K. Oehler, N.H. Packer, G. Palmisano, M. Thaysen-Andersen, *Proteomics*, 19 (2019) 13.
- [104] M.M. Xu, M.T. Zhou, S.W. Li, X.C. Zhen, S. Yang, *Journal of Neuroscience Research*, 99 (2021) 1308-1324.
- [105] S. Takata, Y. Takeda, H. Hirata, Y. Shirai, T. Morita, Y. Futami, Y. Naito, K. Masuhiro, T. Shiroyama, K. Miyake, T. Naka, A. Kumanogoh, *Journal of Thoracic Disease*, 14 (2022) 1332-+.
- [106] I. Loke, D. Kolarich, N.H. Packer, M. Thaysen-Andersen, *Molecular Aspects of Medicine*, 51 (2016) 31-55.
- [107] N.J. Hare, L.Y. Lee, I. Loke, W.J. Britton, B.M. Saunders, M. Thaysen-Andersen, *Journal of Proteome Research*, 16 (2017) 247-263.

- [108] R.G. Mealer, S.E. Williams, M.J. Daly, E.M. Scolnick, R.D. Cummings, J.W. Smoller, *Molecular Psychiatry*, 25 (2020) 3129-3139.
- [109] H.J. Li, M. d'Anjou, *Current Opinion in Biotechnology*, 20 (2009) 678-684.
- [110] E. Ucakturk, *Journal of Separation Science*, 35 (2012) 341-350.
- [111] L.R. Ruhaak, G. Xu, Q. Li, E. Goonatilleke, C.B. Lebrilla, *Chemical Reviews*, 118 (2018) 7886-7930.
- [112] S. Wopereis, D.J. Lefeber, E. Morava, R.A. Wevers, *Clinical Chemistry*, 52 (2006) 574-600.
- [113] A. Shajahan, C. Heiss, M. Ishihara, P. Azadi, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409 (2017) 4483-4505.
- [114] S. Suttapitugsakul, F.X. Sun, R.H. Wu, *Analytical Chemistry*, 92 (2020) 267-291.
- [115] C.D. Gutierrez Reyes, P. Jiang, K. Donohoo, M. Atashi, Y.S. Mechref, *Journal of Separation Science*, 44 (2021) 403-425.
- [116] D. Chang, J. Zaia, *Mass Spectrometry Reviews*, (2021).
- [117] A. Chernykh, R. Kawahara, M. Thaysen-Andersen, *Biochemical Society Transactions*, 49 (2021) 161-186.
- [118] S. Tao, Y. Huang, B.E. Boyes, R. Orlando, *Analytical Chemistry*, 86 (2014) 10584-10590.
- [119] M. Sanda, P. Pompach, J. Benicky, R. Goldman, *Electrophoresis*, 34 (2013) 2342-2349.
- [120] K.F. Medzihradzky, K. Kaasik, R.J. Chalkley, *Analytical Chemistry*, 87 (2015) 3064-3071.
- [121] R. Bruderer, O.M. Bernhardt, T. Gandhi, L. Reiter, *Proteomics*, 16 (2016) 2246-2256.
- [122] M.H.J. Selman, M. Hemayatkar, A.M. Deelder, M. Wührer, *Analytical Chemistry*, 83 (2011) 2492-2499.
- [123] H.H. Wan, J.Y. Yan, L. Yu, Q.Y. Sheng, X.L. Zhang, X.Y. Xue, X.L. Li, X.M. Liang, *Analyst*, 136 (2011) 4422-4430.
- [124] Y.W. Zhang, J.H. Zhu, H.D. Yin, J. Marrero, X.X. Zhang, D.M. Lubman, *Journal of Proteome Research*, 14 (2015) 5388-5395.

- [125] M. Mancera-Arteu, E. Gimenez, J. Barbosa, V. Sanz-Nebot, *Analytica Chimica Acta*, 940 (2016) 92-103.
- [126] Y. Takegawa, H. Ito, T. Keira, K. Deguchi, H. Nakagawa, S.I. Nishimura, *Journal of Separation Science*, 31 (2008) 1585-1593.
- [127] J. Wohlgemuth, M. Karas, W. Jiang, R. Hendriks, S. Andrecht, *Journal of Separation Science*, 33 (2010) 880-890.
- [128] G. Zauner, C.A.M. Koeleman, A.M. Deelder, M. Wührer, *Journal of Separation Science*, 33 (2010) 903-910.
- [129] W.R. Alley, M.V. Novotny, *Journal of Proteome Research*, 9 (2010) 3062-3072.
- [130] Y. Huang, Y. Nie, B. Boyes, R. Orlando, *Journal of Biomolecular Techniques*, 27 (2016) 98-104.
- [131] X.E. Liu, L. Desmyter, C.F. Gao, W. Laroy, S. Dewaele, V. Vanhooren, L. Wang, H. Zhuang, N. Callewaert, C. Libert, R. Contreras, C. Chen, *Hepatology*, 46 (2007) 1426-1435.
- [132] J. Benicky, M. Sanda, P. Pompach, J. Wu, R. Goldman, *Analytical Chemistry*, 86 (2014) 10716-10723.
- [133] P. Kozlik, M. Sanda, R. Goldman, *Journal of Chromatography A*, 1519 (2017) 152-155.
- [134] M.S. Choo, C. Wan, P.M. Rudd, T. Nguyen-Khuong, *Analytical Chemistry*, 91 (2019) 7236-7244.
- [135] W.F. Zeng, W.Q. Cao, M.Q. Liu, S.M. He, P.Y. Yang, *Nature Methods*, 18 (2021) 1515-1523.
- [136] Z. Fang, H. Qin, J. Mao, Z. Wang, N. Zhang, Y. Wang, L. Liu, Y. Nie, M. Dong, M. Ye, *Nature Communications*, 13 (2022).
- [137] R. Kawahara, A. Chernykh, K. Alagesan, M. Bern, W. Cao, R.J. Chalkley, K. Cheng, M.S. Choo, N. Edwards, R. Goldman, M. Hoffmann, Y. Hu, Y. Huang, J.Y. Kim, D. Kletter, B. Liquet, M. Liu, Y. Mechref, B. Meng, S. Neelamegham, T. Nguyen-Khuong, J. Nilsson, A. Pap, G.W. Park, B.L. Parker, C.L. Pegg, J.M. Penninger, T.K. Phung, M. Pioch, E. Rapp, E. Sakalli, M. Sanda, B.L. Schulz, N.E. Scott, G. Sofronov, J. Stadlmann, S.Y. Vakhrushev, C.M. Woo, H.Y. Wu, P. Yang, W. Ying, H. Zhang, Y. Zhang, J. Zhao, J. Zaia, S.M. Haslam, G. Palmisano, J.S. Yoo,

G. Larson, K.H. Khoo, K.F. Medzihradszky, D. Kolarich, N.H. Packer, M. Thaysen-Andersen, *Nature Methods*, 18 (2021) 1304-1316.

[138] I.A. Tarasova, C.D. Masselon, A.V. Gorshkov, M.V. Gorshkov, *Analyst*, 141 (2016) 4816-4832.

[139] P. Kozlik, R. Goldman, M. Sanda, *Electrophoresis*, 38 (2017) 2193-2199.

## PŘÍLOHY

- Příloha I **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. *Journal of Chromatography A* 1257 (2012) 58-65.
- Příloha II Kalíková, K., **Kozlík, P.**, Gilar, M., Tesařová, E.: Properties of two amide-based hydrophilic interaction liquid chromatography columns. *Journal of Separation Science* 36 (2013) 2421-2429.
- Příloha III Kalíková, K., Boublík, M., Kučerová, G., **Kozlík, P.**: The effect of buffer concentration and cation type in the mobile phase on retention of amino acids and dipeptides in hydrophilic interaction liquid chromatography. *Chemical Papers* 72 (2018) 139-147.
- Příloha IV **Kozlík, P.\***, Vaclová, J., Kalíková, K.: Mixed-mode hydrophilic interaction/ion-exchange liquid chromatography - Separation potential in peptide analysis. *Microchemical Journal* 165 (2021) 106158.
- Příloha V Tirčová, B., **Kozlík, P.**: HILIC-MS/MS Method for Analysis of Ephedrine in Internet-available Drugs. *Chromatographia* 80 (2017) 523-528.
- Příloha VI **Kozlík, P.\***, Hasíková, L., Stibůrková, B., Závada, J., Kalíková, K.: Rapid and reliable HILIC-MS/MS method for monitoring allantoin as a biomarker of oxidative stress. *Analytical Biochemistry* 589 (2020) 113509.
- Příloha VII **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). *Journal of Chromatography B* 630 (2013) 82-89.

- Příloha VIII Molnárová, K., Cokrtova, K., Tomnikova, A., Křížek, T., **Kozlík, P. \***: Liquid chromatography and capillary electrophoresis in glycomic and glycoproteomic analysis. *Monatshefte fur Chemie* 153 (2022) 659-686.
- Příloha IX **Kozlík, P.**, Goldman, R., Šanda, M.: Study of structure-dependent chromatographic behavior of glycopeptides using reversed phase nanoLC. *Electrophoresis* 38 (2017) 2193-2199.
- Příloha X **Kozlík, P.**, Šanda, M., Goldman, R.: Nano reversed phase versus nano hydrophilic interaction liquid chromatography on a chip in the analysis of hemopexin glycopeptides. *Journal of Chromatography A* 1519 (2017) 152-155.
- Příloha XI **Kozlík, P.**, Goldman, R., Šanda, M.: Hydrophilic interaction liquid chromatography in the separation of glycopeptides and their isomers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 410 (2018) 5001-5008.
- Příloha XII **Kozlík, P.\***, Molnárová, K., Ječmen, T., Křížek, T., Goldman, R.: Glycan-specific precipitation of glycopeptides in high organic content sample solvents used in HILIC. *Journal of Chromatography B* 1150 (2020) 122196.
- Příloha XIII Molnárová, K., **Kozlík, P.\***: Comparison of Different HILIC Stationary Phases in the Separation of Hemopexin and Immunoglobulin G Glycopeptides and Their Isomers. *Molecules* 25 (2020) 4655.
- Příloha XIV Molnárová, K., Ďuriš, A., Ječmen, T., **Kozlík, P.\***: Comparison of human IgG glycopeptides separation using mixed-mode hydrophilic interaction/ion-exchange liquid chromatography and reversed-phase mode. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 413 (2021) 4321-4328.
- Příloha XV **Kozlík, P.\***, Molnárová, K., Ječmen, T., Křížek, T., Bosáková, Z.: Prediction of Intact N-Glycopeptide Retention Time Windows in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *Molecules* 27 (2022) 3723.

\* korespondenční autor