

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie



Diplomová práce

Vývoj UHPLC-MS/MS metody a postupu přípravy vzorků pro stanovení  
steroidních látek v potkaní plasmě

Školitel: RNDr. Hana Kočová Vlčková, Ph. D.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Hradec Králové 13.9.2020

Jiří Hromádko

.....

## Poděkování

Tuto část mé diplomové práce bych rád věnoval RNDr. Haně Kočové Vlčkové, Ph.D. Chtěl bych ji poděkovat za nepřeberné množství užitečných rad, za mnoho času, který mi věnovala, za její trpělivost a nejvíce za její obětavý přístup, bez kterého by tato práce nevznikla. Dále bych rád poděkoval i ostatním pracovníkům Katedry analytické chemie, kteří mi v průběhu práce vytvářeli příjemné pracovní prostředí a předávali mi své zkušenosti a užitečné rady.

## Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

**Kandidát:** Jiří Hromádko

**Školitel:** RNDr. Hana Kočová Vlčková, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Vývoj UHPLC-MS/MS metody a postupu přípravy vzorků pro stanovení steroidních látek v potkaní plasmě

Diplomová práce se zabývá vývojem UHPLC-MS/MS metody pro analýzu 37 steroidních látek v potkaní plazmě a optimalizací úpravy vzorku pomocí PP.

Analyzované látky zahrnují jak strukturně velmi podobné látky lišící se počtem hydroxylových či ketonických funkčních skupin, tak izomerní a vzájemně izobarické sloučeniny. Protože tyto látky velmi snadno odštěpují molekulu vody, v MS spektru mohou být patrné prekurzorové ionty se stejnou  $m/z$  pro různé látky. Z těchto důvodů byla zcela zásadní pečlivá a podrobná charakterizace prekurzorů, následné provedení skenu produktových iontů a výběr vhodných SRM přechodů.

Důležitá byla také separace kritických sloučenin se stejnou  $m/z$  pro prekurzorové ionty. V první fázi optimalizace byl proveden screening 7 kolon. Bylo využito gradientové eluce mobilní fáze ACN/0,1 % FA v rozsahu 5 - 98 % ACN. Na základě výsledků byla provedena podrobná optimalizace gradientu mobilní fáze. Jako optimální byla vybrána kolona Cortecs C18, kde většina analytů eluovala v gradientu 35 – 60 % ACN. Délka analýzy byla 18 min s 2 minutovou ekvilibrací kolony.

Následně byl optimalizován postup proteinová precipitace. Program MODDE byl použit pro návrh a vyhodnocení experimentu. Testovány byly následující faktory: typ a objem precipitačního činidla, čas precipitace a centrifugace. Jako vhodné precipitační činidlo byl vybrán acetonitril v objemu 1000  $\mu$ l na 100  $\mu$ l plazmy. Doba precipitace byla 10 minut a precipitát byl centrifugován 5 minut při 8°C a 14000 RPM. Na závěr bylo provedeno ověření některých validačních parametrů.

**Klíčová slova:** steroidy, UHPLC-MS/MS, proteinová precipitace, plasma, optimalizace

## Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

**Candidate:** Jiří Hromádko

**Supervisor:** RNDr. Hana Kočová Vlčková Ph.D.

**Title of Diploma Thesis:** Development UHPLC-MS/MS method and sample preparation procedure for the determination of steroid compounds in rat plasma

The diploma thesis deals with the development of the UHPLC-MS/MS method for the analysis of 37 steroids in plasma and optimization of sample preparation using PP.

The analytes include structurally very similar substances with different numbers of hydroxyl or ketonic functional groups, isomeric and mutually isobaric compounds. Since these substances cleave water molecules very easily, precursor ions with one  $m/z$  for different substances can be found in the MS spectrum. For these reasons, careful and detailed characterization of the precursors, subsequent scanning of the product ions, and selection of additional SRM transitions were essential.

Separation of critical compounds with the same  $m/z$  for precursor ions was of importance. The optimization started with the screening of 7 columns using gradient elution of the mobile phase ACN/0.1 % FA in the range of 5 - 98% ACN. Based on the results, an optimization of the mobile phase gradient was performed. The Cortecs C18 column was optimal. Most of the analytes eluted in a gradient of 35 – 60 % ACN. The duration of the analysis was 18 minutes with 2 minute column equilibration.

Subsequently, the protein precipitation was optimized. The MODDE software was used to design and evaluate the experiment. The following factors were tested: the type and volume of the precipitating agent, time of precipitation and of centrifugation. Acetonitrile in a volume of 1000  $\mu\text{l}$  per 100  $\mu\text{l}$  of plasma was chosen as a suitable precipitating agent. The precipitation time was 10 minutes and the precipitate was centrifuged for 5 minutes at 8 °C and 14,000 RPM. Finally, verification of certain validation parameters was demonstrated.

**Key words:** steroids, UHPLC-MS / MS, protein precipitation, plasma, optimization

## Obsah

Poděkování.....	3
Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Seznam zkratk .....	9
1. Úvod.....	11
2. Cíl práce.....	12
3. Teoretická část.....	13
3.1. Ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UHPLC).....	13
3.1.1. UHPLC systém.....	13
3.1.2. Stacionární fáze .....	14
3.1.3. Kolony použité v této práci.....	17
3.2. Hmotnostní spektrometrie.....	20
3.2.1. Ionizační techniky .....	20
3.2.2. Hmotnostní analyzátory .....	22
3.2.3. MS záznamy.....	25
3.3. Teorie k analytům.....	26
3.3.1. Steroidní hormony.....	26
3.3.2. Struktura steroidů .....	26
3.3.3. Steroidogeneze.....	27
3.3.4. Jednotlivé skupiny steroidů.....	29
3.3.5. Fyzikálně-chemické vlastnosti analytů .....	31
3.4. Publikované metody analýzy steroidů.....	37
4. Experimentální část.....	39
4.1. Použité přístroje a pomůcky.....	39

4.2. Stacionární fáze.....	39
4.3. Použitá rozpouštědla.....	40
4.4. Standartní látky.....	40
4.5. Vnitřní standartní látky.....	41
4.6. Příprava roztoků.....	41
4.6.1. Zásobní roztoky standardů a vnitřních standardů .....	41
4.6.2. Pracovní roztoky standartních látek.....	41
4.7. Vývoj UHPLC-MS/MS metody.....	42
4.7.1. Výchozí nastavení UHPLC metody.....	42
4.7.2. Optimalizace MS metody .....	43
4.7.3. Optimalizace UHPLC metody.....	43
4.8. Optimalizace postupu přípravy vzorků.....	44
4.8.1. Výběr vhodného rekonstitučního média.....	44
4.8.2. Výběr teplotního programu pro odpaření.....	44
4.8.3. Optimalizace postupu proteinové precipitace .....	45
4.9. Finální PP-UHPLC-MS/MS metoda.....	46
4.9.1. UHPLC metoda.....	46
4.9.2. MS metoda .....	46
4.9.3. Proteinová precipitace .....	48
4.10. Ověření validačních parametrů.....	48
5. Výsledky a diskuse .....	50
5.1. Optimalizace MS metody.....	50
5.1.1. Výběr prekurzorových iontů.....	50
5.1.2. Optimalizace parametrů iontového zdroje .....	53
5.1.3. Výběr produktových iontů.....	55
5.1.4. Optimalizace kolizní energie, výběr finálních přechodů .....	57

5.2 Optimalizace UHPLC.....	58
5.2.1. Screening .....	58
5.2.2. Optimalizace gradientového profilu mobilní fáze na C18 kolonách .....	67
5.2.3. Optimalizace gradientového profilu mobilní fáze na ostatních kolonách	74
5.3. Optimalizace úpravy vzorku.....	77
5.3.1. Optimalizace složení rekonstitučního činidla a teploty odpaření vzorku	77
5.3.2. Optimalizace postupu proteinové precipitace .....	77
5.4. Ověření validačních parametrů.....	83
6. Závěr.....	85
7. Seznam použité literatury.....	86
8. Přílohy .....	92



## Seznam zkratek

ACN	Acetonitril
APCI	Chemická ionizace za atmosferického tlaku
API	Ionizace za atmosferického tlaku
APPI	Fotoionizace za atmosferického tlaku
BEH	Hybridní sorbent s ethylenovými můstky
BPEOS	Polyethoxysilan
BTEE	Bis(triethoxysilyl)ethan
CE	Kolizní energie
CID	Kolizně indukovaná disociace
CSH	Hybridní povrchově nabitá částice
CV	Napětí na vstupním kuželu
EI	Elektronová ionizace
ESI	Ionizace elektrosprejem
F5	Pentafluorofenyl
FA	Kyselina mravenčí
FT-ICR	Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
GC	Plynová chromatografie
HIC	Hydrofóbní interakční chromatografie
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	Vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie
IEC	Iontovýmienná chromatografie
IT	Iontová past
LC	Kapalinová chromatografie
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny
Log P	Rozdělovací koeficient
LOQ	Limit kvantifikace
<i>m/z</i>	Monoisopická hmotnost
MA	Chyba určení

MALDI	Ionizace za účasti matrice
MeOH	Methanol
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
n/a	Nedostupné
NPC	Kapalinová chromatografie v systému normálních fází
PFP	Pentafluorofenyl
pKa	Záporný logaritmus disociační konstanty
PP	Proteinová precipitace
Q	Kvadrupól
QqQ	Trojité kvadrupól
QTOF	Kvadrupól ve spojení s analyzátozem doby letu
RP18	Reverzní fáze s C18 řetězcem
RPC	Kapalinová chromatografie v systému reverzních fází
RPM	Otáčky za minutu
SD	Směrodatná odchylka
SEC	Molekulová vylučovací chromatografie
SIL-ISs	Deuterii značené standardy
SIM	Selektivní záznam jednoho nebo více iontů
SPE	Extrakce na tuhé fázi
SRM	Selektivní záznam reakce
TEOS	Tetraethoxysilan
TOF	Analyzátozem doby letu
UHPLC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV-VIS	Ultrafialovo-viditelná oblast

## 1. Úvod

Steroidní hormony mají funkci chemických posílů. Jsou to látky syntetizované vnitřními žlázami, které jsou následně transportovány pomocí krevního řečiště do místa působení. Prekurzorem steroidních hormonů je cholesterol. Přeměna cholesterolu v další steroidní látky se nazývá steroidogeneze. Základem chemické struktury je gonan, který je různě substituován. Mezi steroidní hormony řadíme pohlavní hormony (androgeny, estrogeny, progestiny) a hormony kůry nadledvinek (mineralokortikoidy a glukokortikoidy) [33 - 36].

Steroidní látky jsou většinou krystalické látky bílé nebo nažloutlé barvy. Z hlediska fyzikálně chemických vlastností se jedná o lipofilní látky charakteru slabých kyselin. Vzhledem ke své lipofilitě jsou rozpustné v organických rozpouštědlech typu methanol, acetonitril. Nicméně, jelikož jsou pro tyto látky charakteristické hydroxylové a ketonické skupiny navázané na základním uhlovodíkovém skeletu, roste i rozpustnost těchto látek ve vodě v závislosti na zvyšujícím se počtu právě těchto substituentů [33, 45, 46].

Při analýze steroidů může docházet ke křížovým interferencím, jelikož se často jedná o látky izobarické, stereoizomerní a lišící se pouze počtem hydroxylových nebo ketonických skupin. Tyto skupiny se však často odštěpují a různé látky mohou poskytovat stejné prekurzorové ionty. Z těchto důvodů je pro jejich analýzu zapotřebí selektivních analytických metod.

Zlatým standardem v analýze steroidů je kapalinová chromatografie nejčastěji s hmotnostní detekcí. V současné době byla publikována celá řada UHPLC-MS/MS metod zabývajících se jejich analýzou. Většina z těchto metod se zabývá pouze vybranými steroidními látkami, nikoli rozsáhlou skupinou steroidů jako v této diplomové práci [47 - 56].

## 2. Cíl práce

Cílem diplomové práce je vývoj metody ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC) ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí (MS/MS) a optimalizace postupu přípravy vzorků pro stanovení 37 steroidních látek patřících do skupiny androgenů, gestagenů, glukokortikoidů, mineralokortikoidů a jejich meziproductů syntézy v potkaní plazmě.

Prvním krokem bylo získání informací o jednotlivých analytech, zejména jejich struktuře a fyzikálně chemických vlastnostech jako například molekulové hmotnosti, pKa a log P.

Další krok zahrnoval optimalizaci MS metody. Nejprve byly vybrány vhodné prekurzorové ionty. Následovala optimalizace parametrů iontového zdroje, která byla provedena pomocí selektivního záznamu iontů (SIM). Poté byl proveden výběr vhodných produktových iontů a optimálních kolizních energií.

Dalším a časově nejnáročnějším krokem byla optimalizace UHPLC metody, která umožní separaci analytů poskytující stejné prekurzorové ionty a eliminuje tak možné křížové interference. Tento krok zahrnoval výběr vhodné kolony, průtoku a gradientového profilu mobilní fáze. Testováno bylo celkem jedenáct chromatografických kolon.

Následovala optimalizace postupu přípravy vzorků pro stanovení steroidních látek v potkaní plazmě. Jako technika přípravy vzorků byla vybrána proteinová precipitace (PP) s následným odpařením a rekonstitucí. Během optimalizace byl vybrán druh a objem precipitačního činidla, čas precipitace a centrifugace. Posledním krokem bylo ověření vybraných validačních parametrů.

### 3. Teoretická část

#### 3.1. Ultra vysokoučinná kapalinová chromatografie (UHPLC)

UHPLC je jedním z trendů v oblasti kapalinové chromatografie. Využívá stejných principů pro separaci látek jako HPLC, tedy opakované ustalování rovnováhy mezi stacionární (nepohyblivou) a mobilní (pohyblivou) fází. Separace jednotlivých látek probíhá na základě odlišné interakce analytů s těmito dvěma fázemi [1, 2].

UHPLC využívá kolony s částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$ , které umožňují vyšší separační účinnost, lepší rozlišení, vyšší citlivost a kratší dobu analýzy vedoucí k vyšší produktivitě přístroje v porovnání s HPLC. Se zkrácením doby analýzy zároveň souvisí nižší spotřeba organických rozpouštědel vedoucí ke snížení provozních nákladů. Důsledkem využití stacionárních fází s částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$  je vznik vyššího zpětného tlaku na koloně, což vyžaduje úpravu HPLC systému a využití odolnějších stacionárních fází [2, 3].

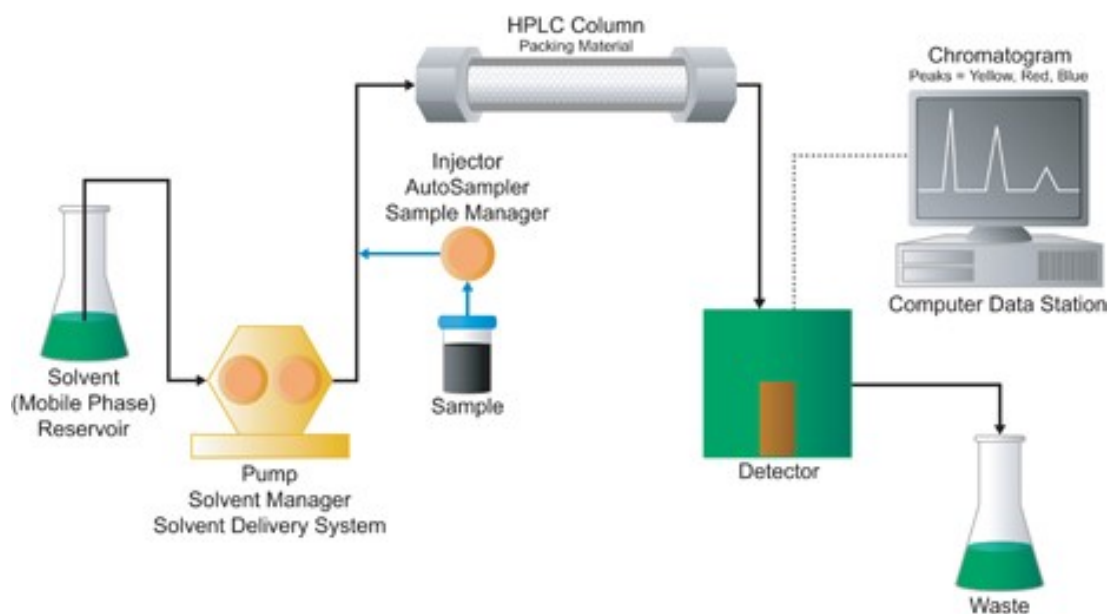
**Tabulka 1:** Porovnání HPLC a UHPLC [2, 4, 5].

Parametr	HPLC	UHPLC
Tlak	< 400 bar	> 400 bar, dnes i 1000-1300 bar
Průtok	ml/min	$\mu\text{l}/\text{min}$
Průměr částic	3, 5, 10 $\mu\text{m}$	< 2 $\mu\text{m}$
Vnitřní průměr kolon	3 - 5 mm	2,1 mm
Rychlost	pomalejší	až 9x rychlejší
Citlivost	méně citlivá	až 3x citlivější
Rozlišení	horší rozlišení	až 2x lepší rozlišení
Organická rozpouštědla	vyšší spotřeba	až 10x nižší spotřeba
Mobilní fáze	nižší nároky na čistotu	vyšší nároky na čistotu

##### 3.1.1. UHPLC systém

Mezi základní části UHPLC chromatografu stejně jako u HPLC patří zásobníky mobilních fází, vysokotlaké čerpadlo, směšovač, odplyňovač mobilní fáze, dávkovač vzorku, kolonový termostat s kolonou, detektor a vyhodnocovací zařízení (počítač s vhodným softwarem). UHPLC systém musí být odolný vůči vysokému zpětnému tlaku (až 100 MPa), což znamená využití zejména tlaku odolných ventilů, kapilár, spojů a zároveň robustního čerpadla a dávkovacího systému. Zcela zásadní je také minimalizace

mimokolonových objemů a přesné dávkování velmi malých objemů vzorku. UHPLC využívá detektory principiálně shodné s HPLC, např. UV-VIS, fluorescenční detektor, refraktometrický detektor, detektory na bázi aerosolu a hmotnostní spektrometr. Nicméně pro UHPLC detektory je zásadní minimalizace objemu detekční cely a vysoká rychlost sběru dat pro získání dostatečného počtu bodů přes pík [2, 3, 6, 7].



**Obrázek 1:** Schématické znázornění kapalinového chromatografu [8].

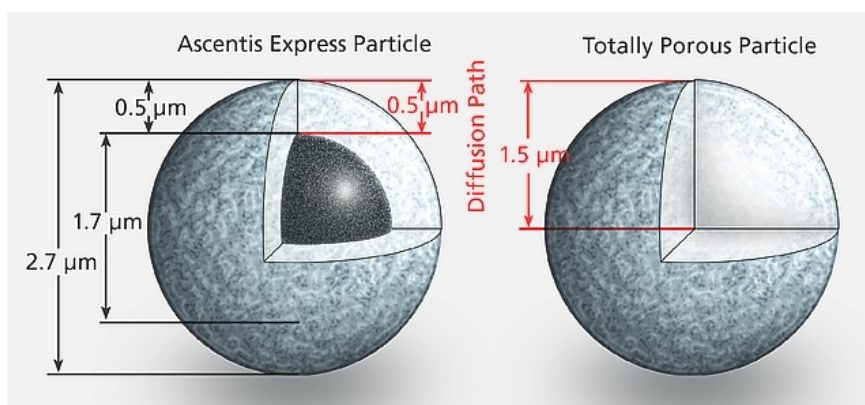
### 3.1.2. Stacionární fáze

Podle charakteru mobilní a stacionární fáze rozlišujeme několik chromatografických módů. Nejčastěji používaná je separace na reverzní fázi (RPC). Mezi další módy patří separace na normální fázi (NPC), iontově výměnná chromatografie (IEC), molekulová vylučovací chromatografie (SEC), vícemodální chromatografie (Mixed-mode chromatography), iontově párová chromatografie, hydrofobní interakční chromatografie (HIC) a chirální chromatografie. Použití většiny z těchto separačních módů s výjimkou RPC je značně komplikované až nevhodné ve spojení s hmotnostní detekcí. Separace na normální fázi je založena na využití polární stacionární fáze a nepolární mobilní fáze a je využívána k separaci polárních analytů. Z důvodu použití nepolárních rozpouštědel tato technika není také vhodná pro spojení s hmotnostní

spektrometrií. V posledních několika letech byla NPC nahrazena hydrofilní interakční chromatografií (HILIC). HILIC se využívá k analýze polárních látek, které jsou rozdělovány mezi polární stacionární fázi (např. silikagel, silikagel s navázanou polární funkční skupinou) a mobilní fázi složenou z vysokého podílu acetonitrilu a malého podílu vody [3, 4, 6, 9, 10].

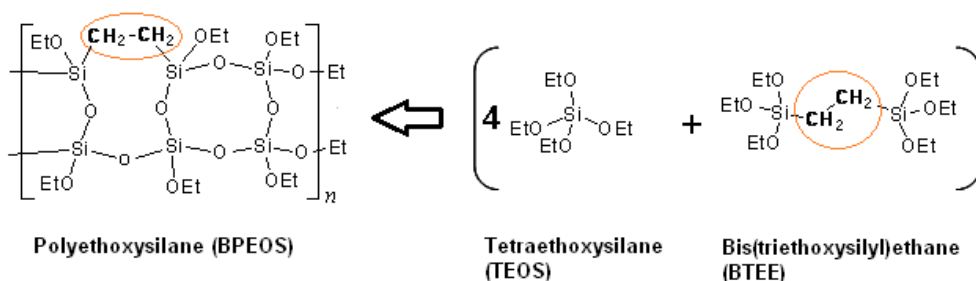
Separace na reverzní fázi je typ uspořádání kapalinové chromatografie, kdy mobilní fáze je polární, zatímco fáze stacionární má charakter nepolární. Stacionární fáze nejčastěji obsahuje dlouhý uhlíkatý řetězec (C18) navázaný na povrch nosiče. Mobilní fáze je směs vodné a polární organické složky tvořené například acetonitrilem a methanolem. Jednotlivé látky jsou eluovány na základě jejich polaritě od vysoce polárních až po vysoce nepolární. Tento separační mód bývá díky své univerzálnosti metodou první volby při vývoji a optimalizaci nové LC metody [3 - 6].

Stacionární fáze lze také rozdělit na základě druhu částic do dvou skupin na plně porézní částice a povrchově porézní částice. Povrchově porézní částice skládají se z pevného jádra a porézního povrchu. Generují nižší zpětný tlak v porovnání s UHPLC částicemi, a tudíž mohou být použity i v HPLC systému. Na druhou stranu separační účinnost povrchově porézních částic je srovnatelná s částicemi  $< 2 \mu\text{m}$  [2, 11].



**Obrázek 2:** Porovnání povrchově porézní částice (2,7 µm, Ascentis Express F5) a plně porézní částice (1,5 µm) [12].

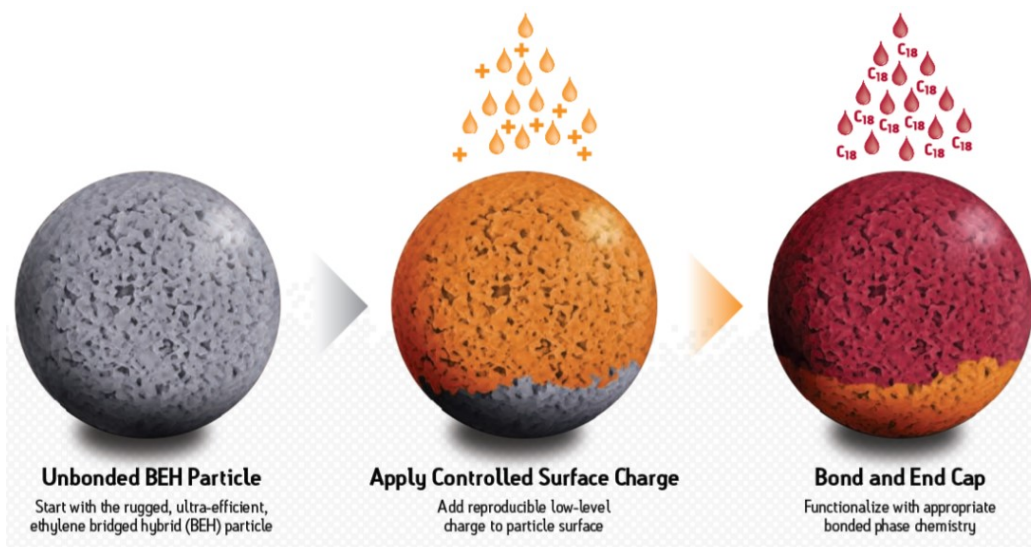
UHPLC stacionární fáze lze rozdělit podle druhu nosiče na silikagelové a hybridní. Silikagelové stacionární fáze poskytují nízkou chemickou stabilitu zejména s ohledem na pH mobilní fáze, ale vysokou mechanickou stabilitu. Naopak hybridní sorbenty poskytují vysokou mechanickou i chemickou stabilitu (široké rozmezí pracovního pH). Jedním z příkladů hybridní stacionární fáze je BEH (Bridged Ethylene Hybride) technologie od společnosti Waters, Obrázek 3. Jedná se o silikagel zesíťovaný pomocí ethylenových můstků, což výrazně zvyšuje chemickou stabilitu (pH 1 - 12) a zároveň i mechanickou odolnost (až 18000 PSI) [2, 3, 13].



**Obrázek 3:** Struktura BEH částic. Zakroužkované jsou ethylenové můstky vložené mezi silanové skupiny. Upraveno dle [13].

Dalším typem hybridních částic je CSH (Charged Surface Hybrid) technologie, která je založena na technologii BEH. Povrch částic je upraven další funkční skupinou s nábojem. Tato technologie se vyznačuje dobrou reprodukovatelností mezi jednotlivými šaržemi kolon, stabilitou v širokém rozsahu pH a velmi rychlou ekvilibrací při změnách pH mobilních fází. CSH kolony poskytují také symetrické a úzké píky, a to i pro bazické sloučeniny [8, 14].

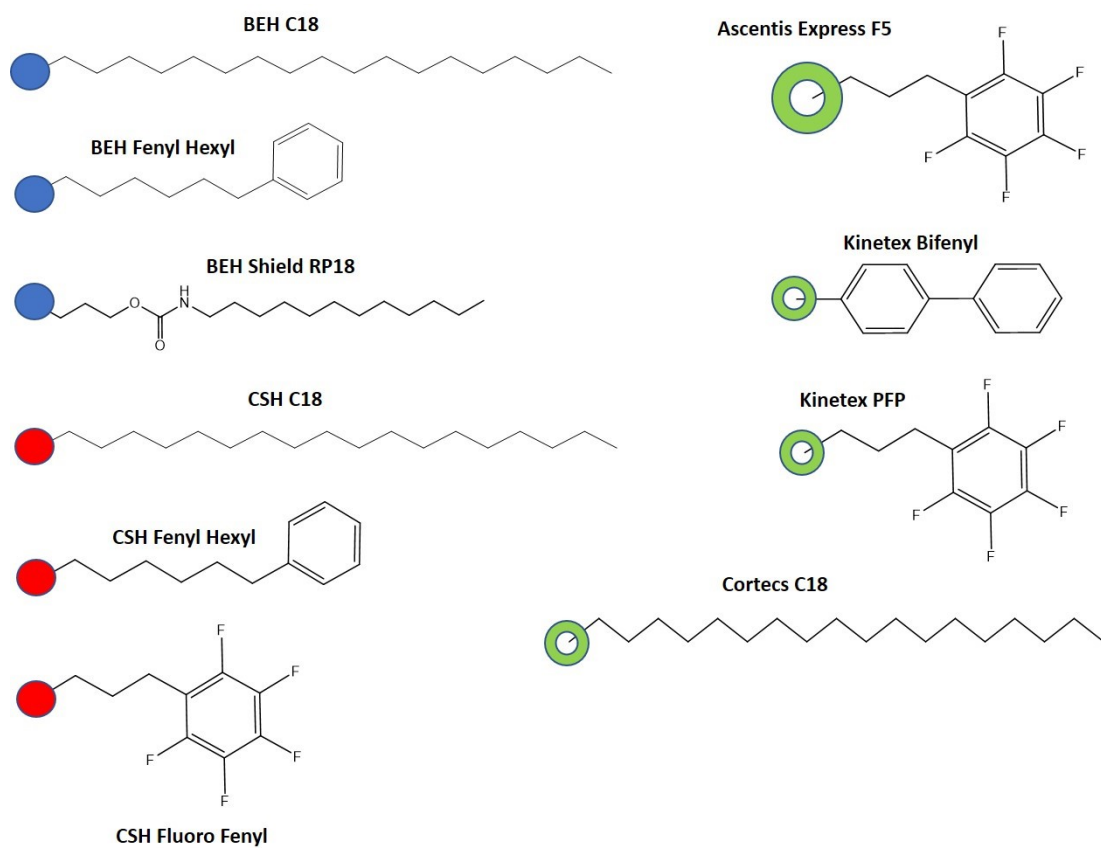




**Obrázek 4:** CSH technologie - částice BEH, jejíž povrch je upraven funkční skupinou s nábojem [15].

### 3.1.3. Kolony použité v této práci

V této práci byly využity kolony s plně porézními i povrchově porézními částicemi. Testované kolony s plně porézními částicemi využívají hybridní stacionární fázi založenou na technologii BEH či CSH. Všechny testované kolony s plně porézními částicemi jsou od firmy Waters, na druhou stranu kolony s povrchově porézními částicemi jsou od různých výrobců. Zahrnuty byly kolony s navázaným C18 řetězcem, bifenylovou, fenylovou, fenylohexylovou, fluoro a fluoro-fenylovou skupinou. Souhrn testovaných kolon společně s jejich vlastnostmi je zobrazen v Tabulce 2 a přehled stacionárních fází je zobrazen na Obrázku 5 [8, 12, 14, 16 - 20].



**Obrázek 5:** Přehled testovaných stacionárních fází. Plné kolečko odpovídá stacionárním fázím s plně porézními částicemi. Modrá kolečka značí BEH technologii, červená CSH technologii. Zelené kruhy značí stacionární fázi s povrchově porézními částicemi [8, 12, 14, 16 - 20].

**Tabulka 2:** Přehled testovaných kolon a jejich vlastnosti. Data získána z [8, 12, 14, 16 - 20].

	BEH C18	BEH Fenyl-Hexyl	BEH Shield RP18	BEH C18	CSH C18	CSH Fenyl-Hexyl
<b>Značka</b>	ACQUITY UPLC	ACQUITY UPLC	ACQUITY UPLC	ACQUITY UPLC	ACQUITY UPLC	ACQUITY UPLC
<b>Pokrytí uhlíkem</b>	18 %	15 %	17 %	18 %	15 %	14 %
<b>Bonding technology</b>	N/A	Fenyl-Hexyl	Shield RP18	N/A	N/A	Fenyl-Hexyl
<b>Ligand</b>	C18	Fenyl	C18	C18	C18	Fenyl
<b>Vnitřní průměr kolony</b>	2,1 mm	2,1 mm	2,1 mm	2,1 mm	2,1 mm	2,1 mm
<b>Délka kolony</b>	100 mm	100 mm	100 mm	150 mm	100 mm	100 mm
<b>Velikost částic</b>	1,7 μm	1,7 μm	1,7 μm	1,7 μm	1,7 μm	1,7 μm
<b>Substrát</b>	Hybridní	Hybridní	Hybridní	Hybridní	Hybridní	Hybridní
<b>Velikost pórů</b>	130 Å	130 Å	130 Å	130 Å	130 Å	130 Å
<b>Plocha povrchu</b>	185 m <sup>2</sup> /g	185 m <sup>2</sup> /g	185 m <sup>2</sup> /g	185 m <sup>2</sup> /g	185 m <sup>2</sup> /g	185 m <sup>2</sup> /g
<b>Rozsah pH</b>	1-12	1-12	2-11	1-12	1-11	1-11
<b>Limitní teplota nízké/vysoké pH</b>	80 °C/60 °C	50 °C/45 °C	80 °C/60 °C	80 °C/60 °C	80 °C/45 °C	80 °C/45 °C
<b>Maximální tlak</b>	18000 psi (1240 bar)	18000 psi (1240 bar)	18000 psi (1240 bar)	18000 psi (1240 bar)	18000 psi (1240 bar)	18000 psi (1240 bar)
<b>Výrobce</b>	Waters	Waters	Waters	Waters	Waters	Waters
	CSH Fluoro-Fenyl	Ascentis Express F5	Kinetex Bifenyl	Kinetex PFP	Cortecs UPLC C18	
<b>Značka</b>	ACQUITY UPLC	Ascentis	Kinetex	Kinetex	Cortecs	
<b>Pokrytí uhlíkem</b>	10 %	5,5 %	11 %	9 %	6,6 %	
<b>Bonding technology</b>	Fluoro-Fenyl	N/A	N/A	N/A	N/A	
<b>Ligand</b>	PFP/Fluoro-Fenyl	Pentafluorofenylpropyl	Bifenyl	PFP	C18	
<b>Vnitřní průměr kolony</b>	2,1 mm	2,1 mm	2,1 mm	2,1 mm	2,1 mm	
<b>Délka kolony</b>	100 mm	100 mm	100 mm	100 mm	150 mm	
<b>Velikost částic</b>	1,7 μm	2,7 μm	1,7 μm	1,7 μm	1,6 μm	
<b>Substrát</b>	Hybridní	Povrchově porézní	Povrchově porézní	Povrchově porézní	Povrchově porézní	
<b>Velikost pórů</b>	130 Å	90 Å	100 Å	100 Å	90 Å	
<b>Plocha povrchu</b>	185 m <sup>2</sup> /g	135 m <sup>2</sup> /g	200 m <sup>2</sup> /g	200 m <sup>2</sup> /g	100 m <sup>2</sup> /g	
<b>Rozsah pH</b>	1-8	2-9	1,5-8,5	1,5-8,5	2-8	
<b>Limitní teplota nízké/vysoké pH</b>	80 °C/45 °C	60 °C/40 °C	N/A	N/A	45 °C/45 °C	
<b>Maximální tlak</b>	18000 psi (1240 bar)	9000 psi (600 bar)	1000 bar	1000 bar	18000 psi (1240 bar)	
<b>Výrobce</b>	Waters	Supelco	Phenomedex	Phenomedex	Waters	

## 3.2. Hmotnostní spektrometrie

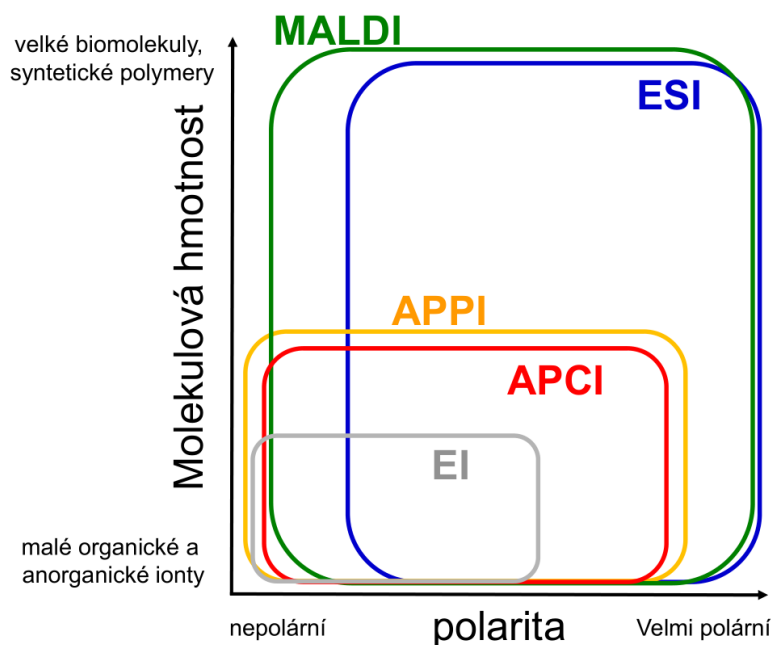
Hmotnostní spektrometrie je citlivá a selektivní analytická metoda, která slouží k určení molekulové hmotnosti a poskytuje strukturní informace o studované látce. Principem této techniky je převedení molekul na ionty plynné fáze pomocí vhodné ionizační techniky. Následně jsou ionty na základě poměru molekulové hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) separovány v analyzátoru za působení magnetického a elektrického pole nebo jejich kombinace. Na závěr jsou jednotlivé ionty v detektoru převedeny na elektrický signál. Kromě iontového zdroje, analyzátoru a detektoru obsahuje hmotnostní spektrometr další nezbytné součásti jako vakuový systém a iontovou optiku. Velmi často se hmotnostní spektrometrie využívá ve spojení se separačními technikami jako je kapalinová chromatografie (LC) a plynová chromatografie (GC). Spojení těchto technik umožňuje kvalitativní a kvantitativní hodnocení složitých směsí, a to s vysokou citlivostí a selektivitou [3, 21 - 24].

### 3.2.1. Ionizační techniky

Ionizační techniky dělíme na tzv. tvrdé a měkké podle množství dodané vnitřní energie. Tvrdé ionizační techniky se vyznačují rozsáhlou fragmentací jednotlivých látek. Charakteristickým zástupcem je elektronová ionizace (EI), která je využívána ve spojení s GC. Měkké ionizační techniky jsou k jednotlivým látkám mírnější, tudíž neposkytují tak výraznou fragmentaci a jsou tvořeny zejména protonované, deprotonované molekuly, případně adukty [3, 25].

Ve spojení s LC se používají měkké ionizační techniky pracující za atmosférického tlaku (API), nejčastěji ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI). Výběr ionizační techniky se provádí na základě charakteru sloučenin, molekulové hmotnosti, polaritě, tepelné stability a těkavosti, Obrázek 6. Zatímco pro nízkomolekulární látky lze využít jak všechny výše zmíněné API techniky, pro analýzu vysokomolekulárních látek, tak jako proteinů a peptidů, se využívá ESI nebo ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI). Na druhou stranu ESI ionizace není vhodná technika pro analýzu nepolárních látek na rozdíl od APCI a APPI. Pro látky s nižší molekulovou hmotností jsou použitelné všechny

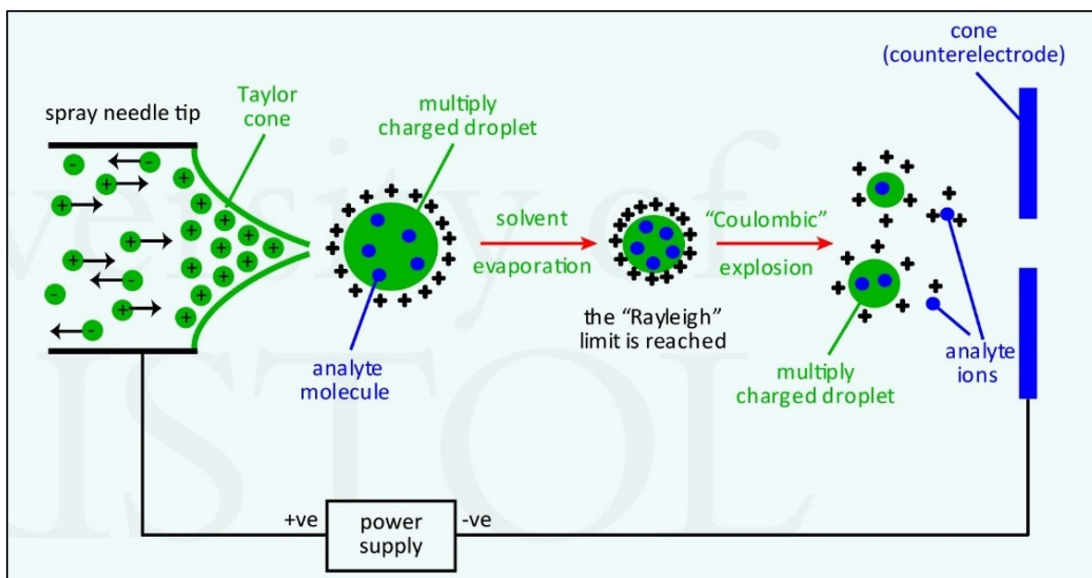
uvedené ionizační techniky, nicméně s rostoucí molekulovou hmotností se možnost užití jednotlivých technik zužuje. Pro biomolekuly a syntetické polymerní látky můžeme využít jen 2 z těchto uvedených technik, a to sice ESI a MALDI [3, 25].



**Obrázek 6:** Výběr ionizační techniky na základě molekulové hmotnosti a polarity látky [25].

### Ionizace elektrosprejem

ESI je nejčastěji užívanou ionizační technikou ve spojení s LC. Kapalný vzorek je přiváděn pomocí kovové kapiláry, na kterou je vloženo napětí dosahující hodnot až 5 kV. Na konec kapiláry je přiváděn zmlžující plyn. Vlivem těchto dvou faktorů dochází ke vzniku nabitých kapiček. Postupným odpařováním rozpouštědla se kapičky zmenšují a dochází k zahušťování povrchového náboje. Když dosáhne hustota náboje kritické hladiny nazývané Rayleighovův limit, dojde k tzv. Coulombické explozi. Tedy k rozpadu jedné kapičky na několik menších kapiček. Zároveň dochází k rozdělení původního náboje mezi vzniklé ionty. V případě, že je tento proces opakován, může dojít až ke vzniku kvazimolekulárních iontů. Takto vzniklé ionty jsou následně usměřovány do analyzátoru [25 - 27].



**Obrázek 7:** Mechanismus ESI [27].

### 3.2.2. Hmotnostní analyzátoary

Analyzátoary jsou další součásti hmotnostního spektrometru, ve které probíhá rozdělení iontů podle poměru  $m/z$  a následuje jejich urychlení do detektoru. Dělení probíhá ve vakuu na základě 5 fyzikálních principů uvedených v Tabulce 3 [3, 28, 29].

**Tabulka 3:** Rozdělení analyzátoary na základě fyzikálního principu separace [3, 28, 29].

Fyzikální princip separace iontů	Analyzátoary
Zakřivení dráhy letu iontů v magnetickém, popřípadě elektrickém poli	Magnetické a elektrostatické analyzátoary
Odlišná stabilita oscilací iontů v kombinaci stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí	Kvadrupóly, iontové pasti
Odlišná doba letu iontů	Analyzátoary doby letu
Odlišná frekvence harmonických oscilací	Orbitrap
Odlišná absorpce energie při cykloidálním pohybu iontů v kombinovaném elektrickém a magnetickém poli	Iontová cyklotronová rezonance

Hmotnostní analyzátory jsou popisovány několika důležitými parametry. Míra schopnosti analyzátoru rozlišit ionty s obdobnou  $m/z$  se nazývá **rozlišení**. S  $m/z$  se pojí další parametr, a to **chyba určení (MA)**, která popisuje míru schopnosti určit správnou hmotnost  $m/z$ . **Hmotnostní rozsah** určuje, jaký rozsah hodnot  $m/z$  může analyzátor zaznamenat. **Lineární dynamický rozsah** popisuje, v jakém rozsahu hodnot koncentrací je odezva lineární. Důležitým parametrem je též **skenovací rychlost**, jakou se zaznamenávají spektra. Je nutné podotknout, že s rostoucí rozlišovací schopností roste též cena [28, 29].

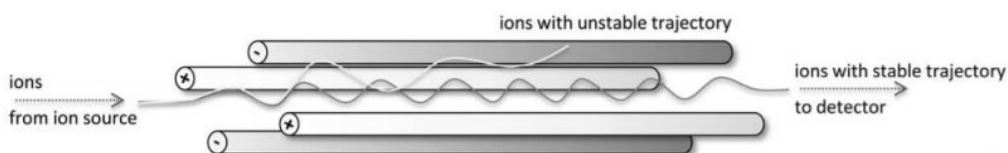
**Tabulka 4:** Parametry jednotlivých analyzátorů. Převzato z [28,29].

analyzátor	$m/z$ rozsah (horní limit)	Rozlišovací schopnost	MA (ppm)	Rychlost	Lineární dynamický rozsah
Q	2000 - 3000	3000 - 5000	Nízká	Střední	$10^5 - 10^6$
IT	4000 - 6000	4000 - (20000)	Nízká	Střední	$10^4 - 10^5$ ( $10^6$ )
TOF	10000 - 1000000	10000 - 100000 (300000)	1 - 5	Vysoká	$10^4 - 10^5$
Q-TOF	10000 - 20000	20000 - 75000	1 - 5	Vysoká	$10^4 - 10^5$
Orbitrální past	4000 - 6000	100000 - 1000000	< 1	Nízká	$10^4$
FT-ICR	4000 - 10000	750000 - 20000000	< 1	Nízká	$10^4$

Podle rozlišení dělíme analyzátory do dvou skupin na analyzátory s vysokým a nízkým rozlišením. Analyzátory s vysokým rozlišením poskytují informaci o přesné hmotě, sumárním vzorci, popřípadě strukturní charakteristice. Používají se zejména ke kvalitativní analýze. Analyzátory s nízkou rozlišovací schopností, kvadrupól a iontová past, jsou využívány v analýze kvantitativní [30].

## Kvadrupól

Kvadrupól je jedním z nejpoužívanějších hmotnostních analyzátorů. Jeho základem jsou čtyři kovové tyče, na které je vloženo kladné nebo záporné stejnosměrné napětí tak, aby na dvou protilehlých tyčích bylo napětí shodné. Mimo to je na všechny tyče přivedeno také vysokofrekvenční střídavé napětí. Princip separace spočívá v odlišné oscilaci iontů s různou  $m/z$  při různých hodnotách stejnosměrného a střídavého napětí. Tak v určitý okamžik, při dané hodnotě napětí, se pouze ionty o určité jedné  $m/z$  pohybují po stabilní trajektorii a projdou dále až k detektoru. Ostatní ionty poskytují nestabilní oscilace a vybijí se na jedné z tyčí kvadrupólu [31].



**Obrázek 8:** Schéma kvadrupólu [31].

Trojité kvadrupól je jedním z nejčastěji používaných tandemových hmotnostních analyzátorů z důvodu vysoké citlivosti, selektivity a robustnosti. Využíván je zejména ke kvantitativní analýze. Skládá se ze tří kvadrupólů spojených za sebou. První a třetí mají funkci hmotnostních analyzátorů. Prostřední má funkci kolizní cely. Je zde zaveden kolizní plyn (dusík, argon). Pomocí tlaku kolizního plynu v kombinaci s urychlením iontů elektrických polem dochází ke srážkám kolizního plynu s ionty z prvního kvadrupólu. Zvýšení vnitřní energie vede ke fragmentaci a vzniku produktových iontů. Ty postupují do třetího kvadrupólu k další analýze [3, 28].

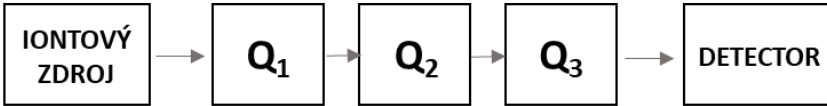


### 3.2.3. MS záznamy

Pomocí hmotnostních analyzátorů můžeme získat několik typů záznamů. V případě, že je měřeno v celém rozsahu hodnot  $m/z$  po celou dobu analýzy, nazýváme tento záznam **celkovým iontovým proudem**. Chceme-li získat výsledky pouze pro jednu hodnotu  $m/z$ , můžeme z předešlého záznamu chromatogram vygenerovat. Tento záznam je pak nazván jako **rekonstruovaný iontový proud** [3, 10].

Můžeme získat 6 typů záznamů. Základním skenem je **MS sken**. Při MS skenu je měřena  $m/z$  v celém rozsahu, který chceme studovat. Získáme, tak základní kvalitativní informace o daném analytu. **Selektivním záznamem iontů (SIM)** se využívá ke kvantitativné analýze. V prvním kvadrupólu dochází k výběru zadané  $m/z$  a tyto ionty dále projdou do detektoru. Nedochozí k fragmentaci iontů. Další čtyři záznamy jsou již v MS/MS módu. **Skenem produktových iontů** získáme kvalitativní informace o produktových iontech vzniklých fragmentací vybraného měřeného prekurzoru. Obdobně u **skenu prekurzorových iontů** získáváme informaci o prekurzorových iontech, které poskytují vybrány produkt. Kvalitativní, popřípadě i kvantitativní informace o všech prekurzorech, které vykazují určitou neutrální ztrátu (určitá hodnota v Da) získáme pomocí **skenu neutrálních ztrát**. Pomocí tohoto skenu je taktéž možná identifikace látek s podobnou strukturou. **Selektivní záznam reakce (SRM)** umožňuje sledovat zadanou přeměnu prekurzoru na produktový iont za optimální kolizní energie [3, 32].

**Tabulka 5:** Typy skenů v hmotnostní spektrometrii [3].



	MS 1	CID	MS 2	
<b>MS sken</b>	skenuje	-	-	kvalitativní analýza
<b>SIM</b>	fixní $m/z$	-	-	kvantitativní analýza
<b>Sken produktových iontů</b>	fixní $m/z$	+	skenuje	kvalitativní analýza
<b>Sken prekurzorových iontů</b>	skenuje	+	fixní $m/z$	kvalitativní analýza
<b>Sken neutrálních ztrát</b>	skenuje	+	skenuje	kvalitativní, kvantitativní analýza
<b>SRM</b>	fixní $m/z$	+	fixní $m/z$	kvantitativní analýza

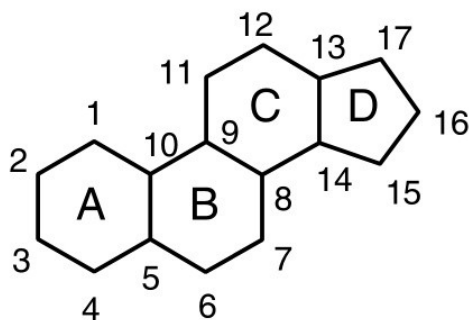
### 3.3. Teorie k analytům

#### 3.3.1. Steroidní hormony

Při vyslovení slova „steroid“ se mnohým vybaví látky zneužívané sportovci. Avšak tyto tělesnou výkonnost zvyšující substance tvoří pouze jednu z jejich kategorií tzv. anabolické steroidy. V lidském těle se vyskytuje celá řada látek se steroidní strukturou, jedná se zejména o tzv. chemické posly, zvané též hormony. Spektrum jejich biologického účinku je široké. Jedná se hlavně o látky typu pohlavních hormonů (androgeny, estrogeny, gestageny) a hormonů nadledvin (mineralokortikoidy a glukokortikoidy). Steroidní hormony jsou syntetizovány žlázami a poté jsou pomocí krevního řečiště roznášeny do místa jejich účinku [33, 34].

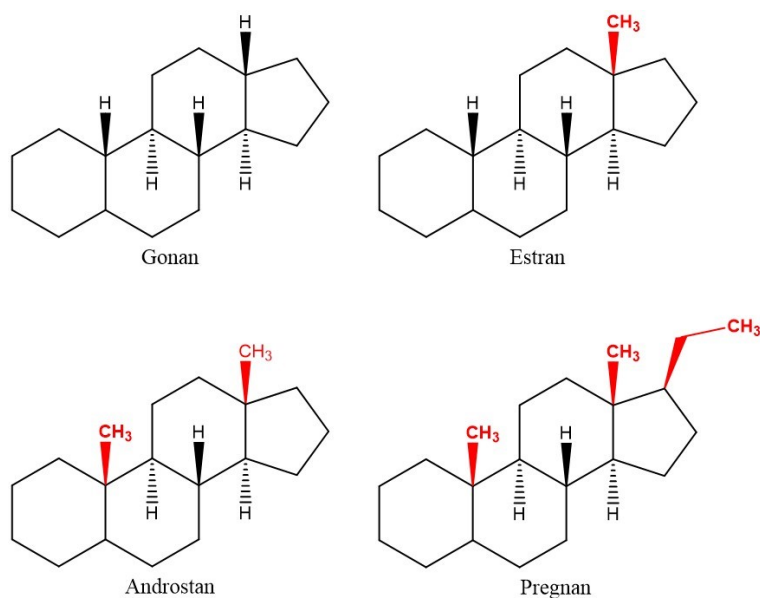
#### 3.3.2. Struktura steroidů

Všechny steroidní látky obsahují v různé míře obměněnou strukturu cyklopentanofenanthrenu, též označovaného jako gonan (C17). Struktura gonanu se skládá ze čtyř uhlovodíkových kruhů, označovaných písmeny A - D, Obrázek 9. Dvojice kruhů B - C a C - D je vždy v uspořádání *trans*, nicméně kruhy A - B mohou být vzájemně v uspořádání *trans* i *cis*. U přírodních steroidů převládá *trans* uspořádání [33, 34].



**Obrázek 9:** Základní steroidní struktura, gonan [33].

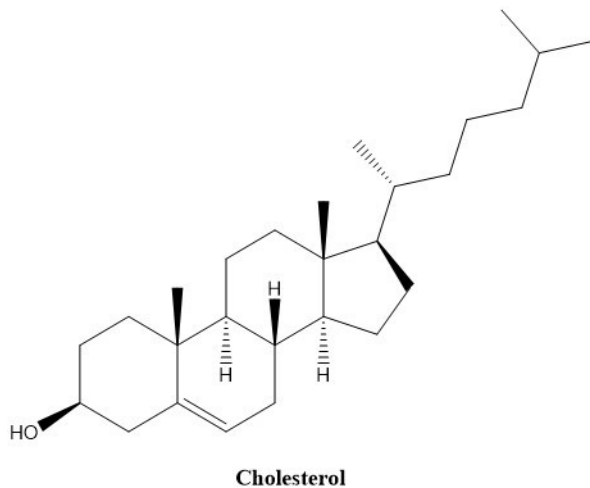
Postupným rozvětčováním struktury **gonanu** získáváme složitější struktury, které slouží jako základ pro další steroidy. Prodloužením základní struktury gonanu o jednu methylovou skupinu v poloze 13 vznikne **estran (C18)**. Estran představuje základ pro ženské pohlavní hormony, estrogeny. Pokud je na estran navázána další methylová skupina v poloze 10 získáme **androstan (C19)**, základ pro mužské pohlavní hormony, androgeny. Dalším navázáním ethylu na androstan do polohy 17 získáme **pregnan (C21)**, základ pro gestageny a glukokortikoidy [35]



**Obrázek 10:** Struktura gonanu, estranu, androstanu a pregnanu.

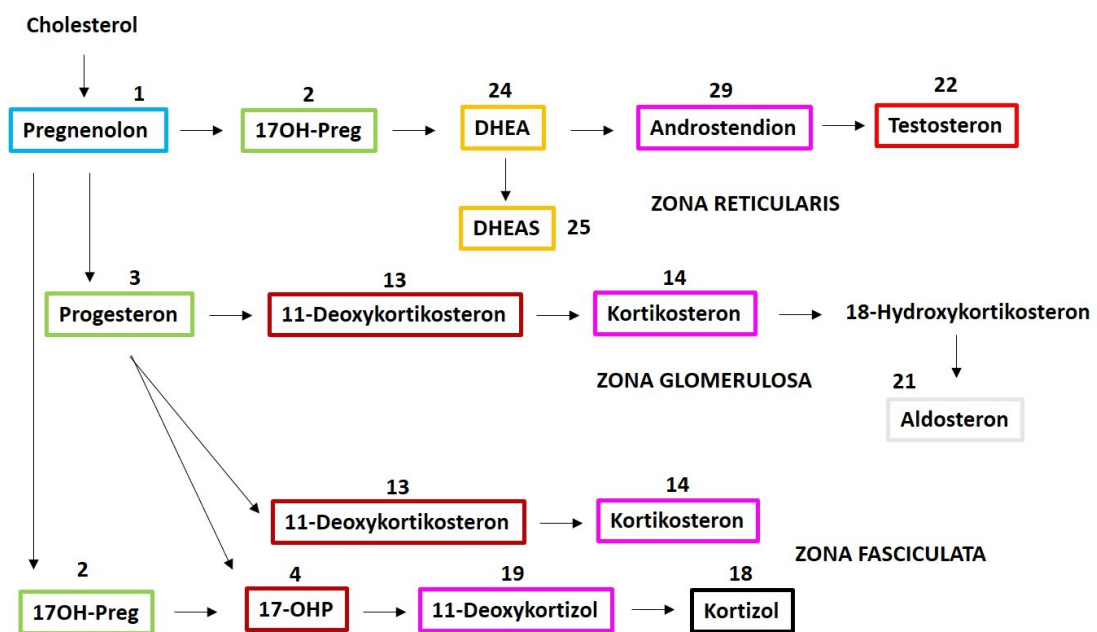
### 3.3.3. Steroidogeneze

Proces přeměny cholesterolu (C27) v další steroidní látky se nazývá **steroidogeneze**. Cholesterol může být získáván jak exogenně potravou, tak je vytvářen endogenně v lidském těle, pomocí biosyntetické cesty z acetyl-koenzymu A, přes mevalonát, zacyklení triterpenu skvalenu a lanostrol [33, 35, 36].

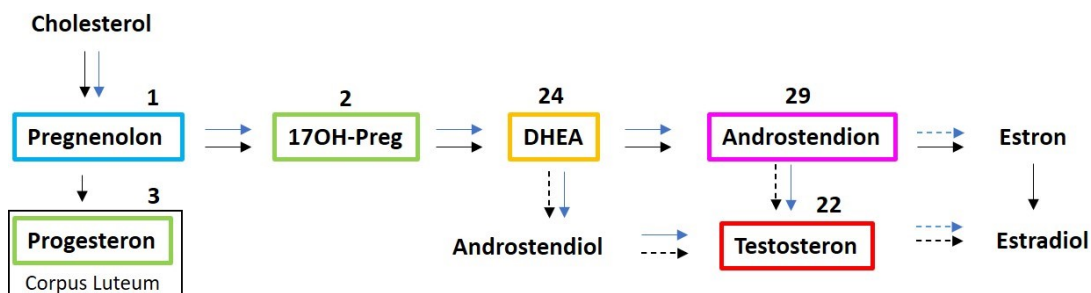


**Obrázek 11:** Struktura cholesterolu - prekursoru steroidů.

Steroidogeneze probíhá v různých typech tkání. Proces probíhající v jednotlivých vrstvách kůry nadledvin je zobrazen na Obrázku 12, zatímco v pohlavních žlázách na Obrázku 13. Mineralokortikoidy vznikají ve vnější vrstvě kůry nadledvin zvané zona glomerulosa. V navazující vrstvě kůry nadledvin, zoně fasciculata, jsou syntetizovány látky ze skupiny glukokortikoidů. Ve vnitřní vrstvě kůry nadledvin, zóně reticularis, jsou syntetizovány androgeny. Syntéza v pohlavních žlázách je obdobná. Odlišností je hlavně různá míra přeměn [36].



**Obrázek 12:** Proces steroidogeneze probíhající v nadledvinách. Upraveno dle [36].



**Obrázek 13:** Proces steroidogeneze probíhající v pohlavních žlázách. Černé šipky jsou použity pro steroidogenezi v théca a granulózních buňkách a modré pro steroidogenezi v Leydigových buňkách. Upraveno dle [36].

### 3.3.4. Jednotlivé skupiny steroidů

#### 3.3.4.1. Androgeny

Androgeny jsou mužské pohlavní hormony, mezi které patří testosteron a dihydrotestosteron. Nelze také opomenout dehydroepiandrosteron (DHEA) a androsten-4-dione, které plní roli meziproductů syntézy testosteronu, jejichž aktivita jakožto androgenů je téměř nulová [37, 38].

Testosteron, hlavní androgen, je v lidském těle syntetizován převážně Leydigovými buňkami, nicméně za zmínku stojí i syntéza v ováriích žen, Obrázek 13. Dalším místem syntézy tohoto hormonu je zona reticularis kůry nadledvin, jak můžeme vidět na Obrázku 12. Testosteron se podílí na vývoji druhotných pohlavních mužských znaků, tedy růstu svalů, kostí a vzniku typického ochlupení. Testosteron je též hormonem se značnou anabolickou aktivitou, podílí se významně na procesu spermatogeneze a též na regulaci osy hypotalamus-hypofýza-varle. Androgen s výraznějším androgenním účinkem je dihydrotestosteron. Vzniká z testosteronu převážně v periferních tkáních pomocí enzymu 5 $\alpha$ -reduktázy [36, 37, 39].

Úprava ve struktuře androgenů vedla k zesílení anabolického účinku a vzniku tzv. anabolických steroidů. Zástupcem této skupiny je nandrolon. Tato léčiva podporují syntézu proteinů. V současné době jsou využívány v terapii aplastické anémie, jelikož podporují erytropoézu. Důležité je také zmínit, že právě tato skupina látek je zneužívána sportovci ke zvýšení výkonnosti [38, 40].

#### 3.3.4.2. Estrogeny

Estrogeny jsou ženské pohlavní hormony. Hlavními zástupci jsou přírodní estradiol a jeho metabolity estron a estriol. Syntetickými členy této skupiny jsou ethinylestradiol, mestranol a stilbestrol. Přírodní estrogeny jsou látky vznikající převážně v ováriích pomocí enzymatické přeměny androgenů androstendionu a testosteronu, Obrázek 13. Estrogeny dále vznikají v placentě, tukových buňkách a kůře nadledvin [36, 38, 40, 41].

Estrogeny jsou důležité pro vývoj sekundárních pohlavních znaků a růst. Dále se podílí na menstruačním a ovariálním cyklu žen. V postmenopauzálním období žen se estrogeny užívají pro mírnění menopauzálních symptomů a zároveň mírní úbytek kostní hmoty. Působí také tlumivě na syntézu gonadotropinu, čehož se u mužů využívá při léčbě rakoviny prostaty. U žen jsou estrogeny užívány v oblasti hormonální kontracepce společně s gestageny. Součástí kombinovaných hormonálních přípravků jsou syntetické estrogeny (ethinylestradiol) [38 - 40, 42].

#### 3.3.4.3. Gestageny (progestiny)

Základním přírodním zástupcem je progesteron, nicméně byla vyvinuta také celá řada jeho derivátů. Syntetickými progestiny jsou odvozeny od 17-hydroxyprogesteronacetátu a 19-nortestosteronu [39, 40].

Progesteron je syntetizován žlutým tělískem, v těhotenství pak placentou, avšak v malém množství vzniká i v kůře nadledvin a varlatech. Progesteron působí na endometrium, které převádí do sekreční fáze z fáze proliferační, čímž umožňuje zahnízdění oplodněného vajíčka. Tyto procesy probíhají v úzké součinnosti s estrogeny, které ovlivňují míru expozice progesteronových receptorů. Hlavní indikace těchto látek je v oblasti hormonální antikoncepce [38 - 40, 42].

#### 3.3.4.4. Glukokortikoidy

Základním zástupcem této skupiny je hydrokortizon, zvaný též kortizol. Kromě jeho glukokortikoidního účinku má též slabý mineralokortikoidní. Tato skupina hormonů je syntetizována v kůře nadledvin, speciálně v zona fasciculata, Obrázek 12. Spektrum účinku glukokortikoidů je široké. Mají vliv na metabolismus glukózy, tuků a bílkovin. Zvyšují lipolýzu a degradaci svaloviny ve prospěch syntézy glukózy a jejího následného ukládání ve formě zásobního glykogenu. Jejich imunopresivních a protizánětlivých účinků je užíváno zejména při léčbě autoimunitních onemocnění. Potlačují nejen hladiny mediátorů zánětu (prostaglandiny, cytokiny, atd.), ale také snižují tvorbu protilátek. Glukokortikoidy mají též vliv na vstřebávání a vylučování iontů [36, 38 - 40].

Užívání kortikoidů způsobuje také celou řadu nežádoucích účinků. Vlivem imunopresivních účinků může docházet k rozvoji infekcí, zásahem do metabolismu k rozvoji hyperglykémie a vlivem antianabolických účinků k rozvoji myopatie [38, 40].

Ve formě inhalačních přípravků jsou používány k tlumení astmatu a chronické obstrukční choroby. Glukokortikoidy jsou dále užívány k systémové léčbě, ale i k lokální léčbě například ve formě mastí. U lokálních přípravků je využíváno zejména účinků protizánětlivých, antiproliferativních a protisvědivých [39].

#### 3.3.4.5. Mineralokortikoidy

Mineralokortikoidy jsou hormony, které mají zásadní vliv na metabolismus iontů a vody. Způsobují zadržování sodíku a vody, naopak zvyšují vylučování draselných a vodíkových kationtů. Jejich vylučování je řízeno renin-angiotensinovým systémem. Přírodním mineralokortikoidem syntetizovaným kůrou nadledvin je aldosteron. Jedním ze syntetických mineralokortikoidů je fludrokortizon [38 - 40].

#### 3.3.5. Fyzikálně-chemické vlastnosti analytů

Steroidní látky jsou většinou bezbarvé, bílé nebo nažloutlé krystalické pevné látky bez zápachu. Jejich fyzikálně-chemické vlastnosti jako molekulová hmotnost, log P a pKa zobrazuje Tabulka 6. Názvosloví jednotlivých testovaných steroidních látek je zobrazeno

v Příloze. Na základě rozdělovacího koeficientu log P (koeficient systému oktanol/voda vyjadřující lipofilitu látky) lze konstatovat, že se jedná o látky spíše lipofilní, dobře rozpustné v organických rozpouštědlech jako acetonitril a methanol. Hodnoty log P se pohybují v rozmezí 1,26 – 4,61 a nejnižší hodnotu má sloučenina 14, CORT (B). Parametr pKa, tedy záporný dekadický logaritmus disociační konstanty, vyjadřuje sílu kyselin. Dělíme je na silné (pKa < 2), středně silné (pKa 2-4), slabé (pKa 5-9) a velmi slabé (pKa > 10). Z údajů uvedených v Tabulce 6 můžeme tedy naše analyty zařadit do kategorie velmi slabých kyselin, jelikož jejich pKa se pohybuje v rozmezí 12-15 [43, 44].

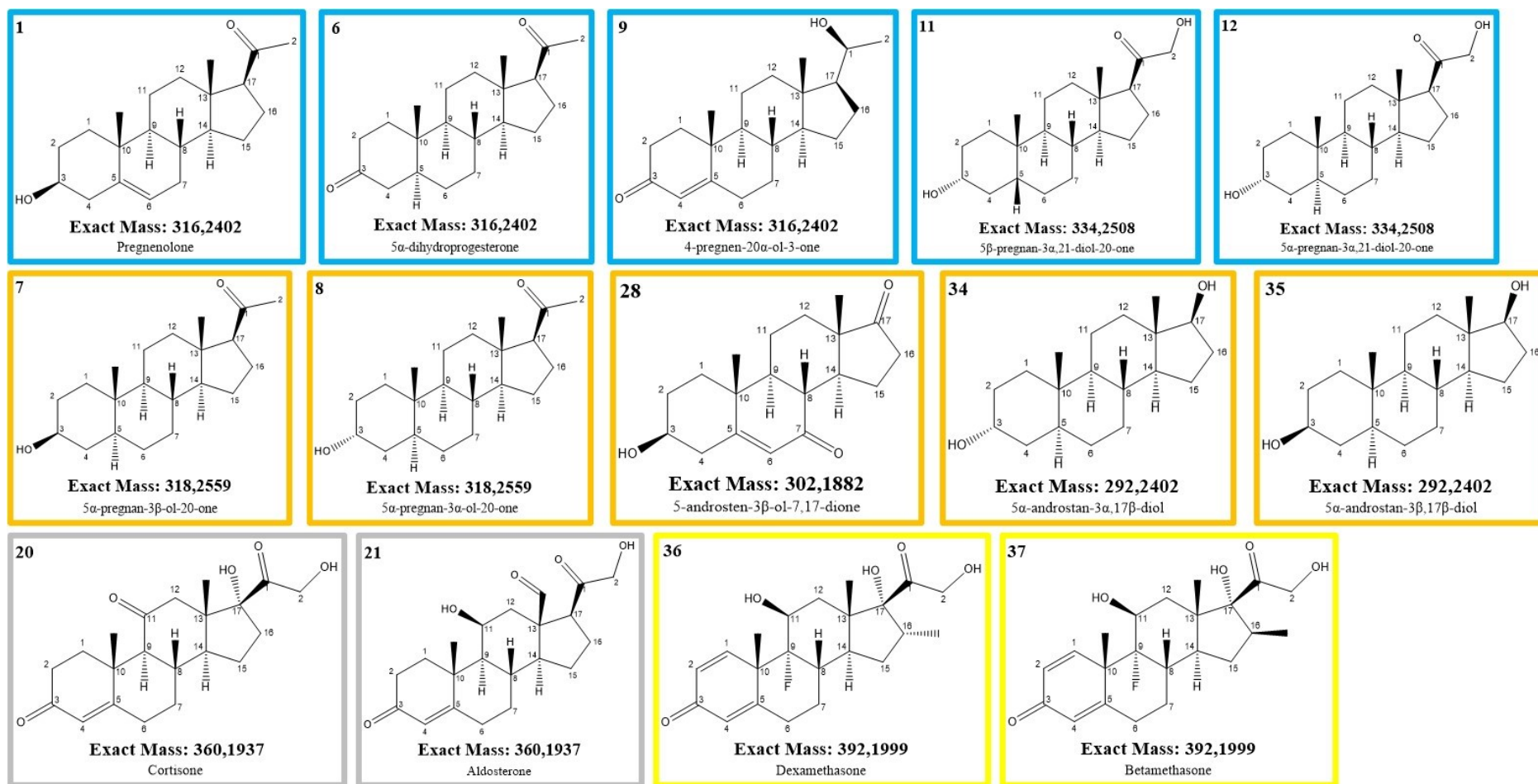
Molekulová hmotnost testovaných analytů se pohybuje v rozmezí 286 - 392. Jedná se často o látky izobarické a stereoizomerní, jejichž molekulová hmotnost je shodná. Příkladem mohou být látky dexametazon a betametazon lišící se pouze polohou metylové skupiny v poloze 16.

Na obrázcích 14-16 jsou zobrazeny struktury jednotlivých látek a jejich rozdělení do skupin (barevné označení). Stejnou barvou jsou označeny látky poskytující prekurzorové ionty se stejnou hodnotou  $m/z$ .

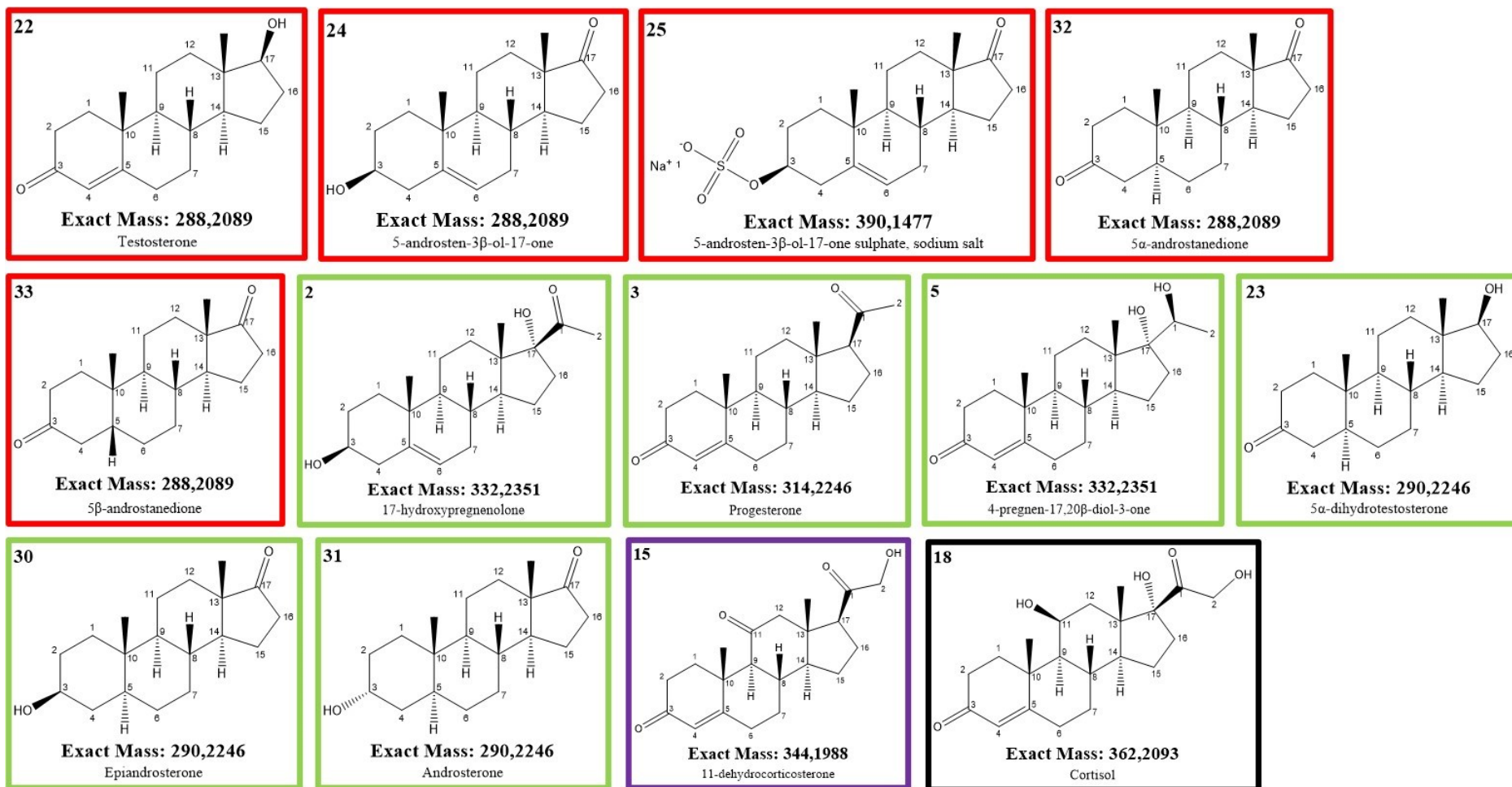


**Tabulka 6:** Fyzikálně chemické vlastnosti analyzovaných steroidů [45, 46].

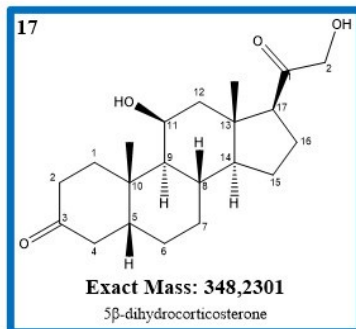
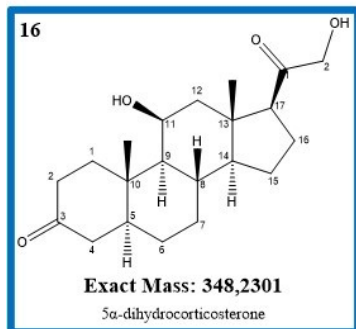
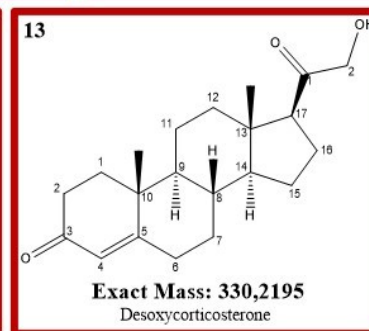
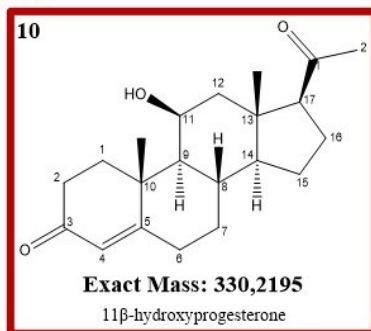
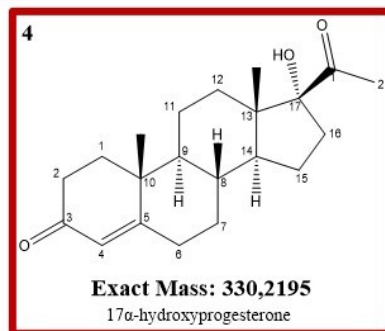
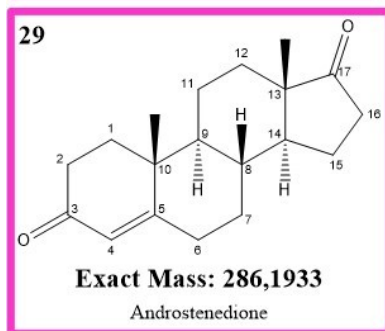
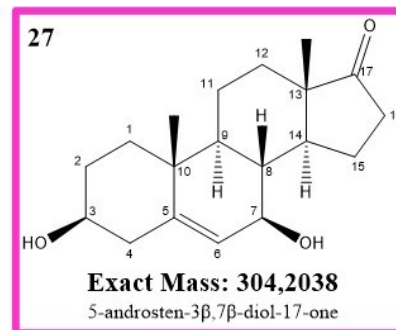
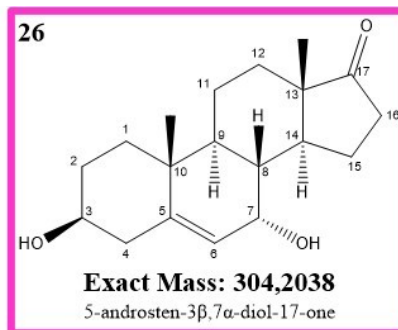
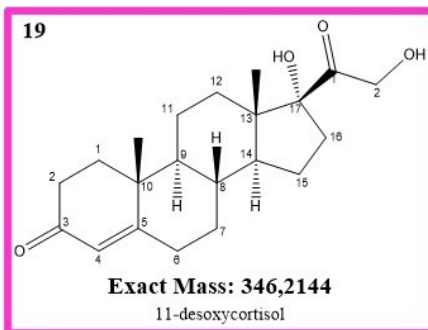
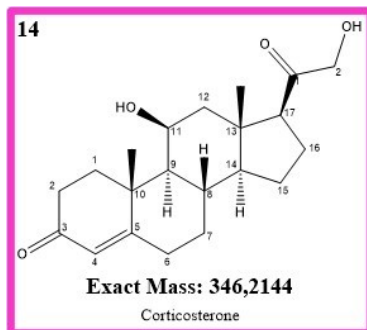
ČÍSLO	ZKRATKA	<i>m/z</i>	<i>pKa</i>		<i>LogP</i>	OH sk.	Keto sk.
1	Preg	316,24	14,61		3,98	1	1
2	17 $\alpha$ -OH-Preg	332,24	14,61	12,80	2,56	2	1
3	P	314,22	n/a		3,78	0	2
4	17 $\alpha$ -OH-P	330,22	12,80		2,36	1	2
5	17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -OH-P	332,24	14,11	17,99	2,70	2	1
6	5 $\alpha$ -DHP	316,24	n/a		4,61	0	2
7	Epiallo-Preg	318,26	14,67		4,46	1	1
8	Allo-Preg	318,26	14,67		4,46	1	1
9	20 $\alpha$ -OH-P	316,24	14,69		3,62	1	1
10	11 $\beta$ -OH-P	330,22	14,26		2,62	1	2
11	THDOC	334,25	14,67	13,09	3,10	2	1
12	Allo-THDOC	334,25	14,67	13,09	3,10	2	1
13	11-DOC	330,22	13,09		2,42	1	2
14	CORT (B)	346,21	14,46	13,09	1,26	2	2
15	11-DHB	344,20	13,00		1,58	1	2
16	5 $\alpha$ -DHB	348,23	14,56	13,09	2,09	2	2
17	5 $\beta$ -DHB	348,23	14,56	13,09	2,09	2	2
18	F	362,41	15,27	12,56	1,88	3	2
19	21-dF (S)	346,21	12,63	14,71	1,66	2	2
20	E	360,19	12,28	14,62	1,48	2	3
21	ALDO	360,19	14,11	12,91	1,76	2	3
22	T	288,21	14,62		3,01	1	1
23	5 $\alpha$ -DHT	290,22	14,65		3,85	1	1
24	DHEA	288,22	14,60		3,71	1	1
25	DHEA-S	390,15	n/a		n/a	1	1
26	7 $\alpha$ -OH-DHEA	304,20	15,05	14,10	2,69	2	1
27	7 $\beta$ -OH-DHEA	304,20	15,05	14,10	2,69	2	1
28	7-oxo-DHEA	302,19	14,29		2,51	1	2
29	A4	286,19	n/a		3,50	0	2
30	EpiAST	290,22	14,67		4,18	1	1
31	AST	290,22	14,67		4,18	1	1
32	5 $\alpha$ -dion	288,21	n/a		4,34	0	2
33	5 $\beta$ -dion	288,21	n/a		4,34	0	2
34	3 $\alpha$ -diol	292,24	14,67	14,65	3,69	2	0
35	3 $\beta$ -diol	292,24	14,67	14,65	3,69	2	0
36	DEXA	392,20	12,41	14,86	1,78	3	2
37	BETA	392,20	14,86	12,41	1,78	3	2



**Obrazek 14:** Struktury analyzovaných steroidů I.



Obrázek 15: Struktury analyzovaných steroidů II.



**Obrázek 16:** Struktury analyzovaných steroidů III.

### 3.4. Publikované metody analýzy steroidů

V současné době je dostupná celá řada LC-MS metod zabývajících se analýzou steroidů. Nicméně většinou se jedná o analýzu určité skupiny steroidů, nikoli o jednu komplexní metodu pro analýzu několika steroidních skupin. V Tabulce 7 je znázorněno deset publikovaných metod zabývajících se analýzou námi testovaných sloučenin. Pouze dvě z těchto metod analyzují více jak deset s naší prací shodných sloučenin.

Steroidy jsou nejčastěji stanovovány v plazmě, séru nebo moči, kdy jako úprava vzorku se používá zejména SPE a LLE. Separace steroidních sloučenin se nejčastěji provádí na C18 stacionární fázi s využitím mobilní fáze 0,1 % FA/ ACN. Na základě těchto informací byla také zvolena mobilní fáze v praktické části diplomové práce [47 - 56].

**Tabulka 7:** Přehled metod analýzy steroidních látek [47 - 56].

Celkový počet anal.	Shodné analyty	Materiál	Úprava vzorků	Kolona	Mobilní fáze	Čas [min]	Technika	Ref.
12	1, 3, 6, 7, 8, 9	Kravní plasma	SPE	Acquity UPLC HSS T3 (1,8 µm, 2,1 × 100 mm)	A: 0.1% FA ve vodě B: 0.1% FA v ACN	15	UHPLC-HRMS	[47]
28	1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 13, 22, 23, 24, 29, 32	Lidský plazmid	LLE	Phenomenex UPLC Kinetex PFP (2,6 µm, 2,1 × 100 mm)	A: 1% FA ve vodě B: MeOH: ACN: isopropanol (49%: 49%: 2%)	n/a	UHPLC-MS/MS	[48]
16	1, 2, 3, 4, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29	Lidské sérum	SPE	Phenomenex Kinetex XB-C18 a Kinetex Biphenyl (1,7 µm, 50 × 2.1 mm)	A: 0,1% FA ve vodě B: 0,1% FA v MeOH	5,5	2D-UHPLC-MS/MS	[49]
5	4, 13, 18, 19	Dried blood spot	LLE	Acquity BEH C18 (1,7 µm, 2,1 × 50 mm)	A: 0.1% FA ve vodě B: 0.1% FA v ACN	1,25	UHPLC-MS/MS	[50]
11	25	Moč	SPE	Acquity BEH C18 (1,7 µm, 2,1 × 150 mm)	A: 0.1% FA ve vodě B: 0.1% FA v ACN	36	UHPLC-HRMS	[51]
26	36, 37	Moč	LLE	Zorbax C18 (1,8 µm, 2,1 × 50 mm)	A: 0.1% kyselina octová ve vodě B: 0.1% kyselina octová v ACN	14	UHPLC-MS/MS	[52]
7	1, 2, 3, 4, 24, 29	Savčí buňky	LLE	Acquity BEH C18 (1,7 µm, 2,1 × 100 mm)	A: 0.1% FA ve vodě B: 1% isopropanol v ACN/MeOH (3:1)	11	UHPLC-MS/MS	[53]
22	18, 20, 36, 37	Moč	LLE	Acquity BEH C18 (1,7 µm, 2,1 × 50 mm)	A: 2 mmol/L octan amonný a 0.1% FA ve vodě B: 2 mmol/L octan amonný a 0.1% FA v MeOH	7,5	UHPLC-HRMS	[54]
5	18, 19, 20, 36	Plasma, sliny, moč	SPE	Acquity BEH C18 (1,7 µm, 2,1 × 50 mm)	A: 2 mmol/L octan amonný a 0.1% FA ve vodě B: 2 mmol/L octan amonný a 0.1% FA v MeOH	3	UHPLC-MS/MS	[55]
4	18, 20, 24, 25	Nehet	SPE	Acquity BEH C18 (1,7 µm, 2,1 × 100 mm)	A: 0.1% FA ve vodě B: ACN	9,5	UHPLC-MS/MS	[56]

## 4. Experimentální část

### 4.1. Použité přístroje a pomůcky

- UHPLC systém Acquity UPLC – binární čerpadlo, automatický dávkovač, kolonový termostat, Waters, Milford, MA
- Xevo TQ-XS Triple Quadrupole Mass Spectrometry, Waters, Milford, MA, USA
- Automatické mikropipety, Eppendorf, Hamburk, Německo
- Analytické váhy, Santorius, Goettingen, Německo
- Ultrazvuková vodní lázeň Sonorex Digitec, Bandelin electronic, Berlín, Německo
- Třepačka IKA Vortex Genius 3, IKA, Německo
- Třepačka IKA MS 3 basic, IKA, Německo
- Centrifuga Hettich MIKRO 220R, Hettich, Německo
- Vakuová odparka Concentrator plus, Eppendorf, Německo
- Software MassLynx, v4.1, Waters, Milford, MA, USA
- Software TargetLynx, Waters, Milford, MA, USA

### 4.2. Stacionární fáze

#### **Analytické kolony firmy Waters, Milford, MA, USA**

- ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm)
- ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 150 mm)
- ACQUITY UPLC CSH C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm)
- CORTECS UPLC C18 (1,6  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 150 mm)
- ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm)
- ACQUITY UPLC BEH Phenyl (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm)
- ACQUITY UPLC CSH Phenyl-Hexyl (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm)
- ACQUITY UPLC CSH Fluoro-Phenyl (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm)

### Analytické kolony jiných výrobců

- Kinetex Biphenyl (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm), Phenomedex, Torrance, CA, USA
- Kinetex PFP (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm), Phenomedex, Torrance, CA, USA
- Ascentis Express F5 (2,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm), Supelco, Bellefonte, PA, USA

### 4.3. Použitá rozpouštědla

- Ultračistá voda, Millipore, destilace v přístroji MILLI Q RG, Burlington, VT, USA
- Acetonitril, LC MS grade, VWR International S.A.S., Fontenay-sous-Bois, Francie
- Methanol LC-MS grade, Avantor Performance Materials, Nizozemsko
- Kyselina mravenčí 98 % - 100 % LC-MS grade, Merck, Praha, Česká republika

### 4.4. Standartní látky

- Pregnenolon (1), 17-hydroxypregnenolon (2), progesteron (3), 17 $\alpha$ -hydroxyprogesteron (4), 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxyprogesteron (5), 5 $\alpha$ -dihydroprogesteron (6), epiallopregnanolon (7), allopregnanolon (8), 20 $\alpha$ -hydroxyprogesteron (9), 11 $\beta$ -hydroxyprogesteron (10), tetrahydrodeoxykortikosteron (11), allotetrahydrodeoxykortikosteron (12), deoxykortikosteron (13), 11-dehydrokortikosteron (15), 5 $\alpha$ -dihydrokortikosteron (16), 5 $\beta$ -dihydrokortikosteron (17), kortizol (18), 11-deoxykortizol (19), kortizon (20), 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron (23), dehydroepiandrosteron (24), dehydroepiandrosteron sulfát (25), 7 $\alpha$ -hydroxyDHEA (26), 7 $\beta$ -hydroxyDHEA (27), 7-oxoDHEA (28), epiandrosteron (30), androsteron (31), 5 $\alpha$ -androstandion (32), 5 $\beta$ -androstandion (33) (Steraloids, Newport, RI, USA)
- Kortikosteron (14), aldosteron (21), androstendion (29), 3 $\alpha$ -dihydroandrosteron (34), 3 $\beta$ -dihydroandrosterone (35) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo)
- Testosteron (22), dexametazon (36) a betametazon (37) (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo)



#### 4.5. Vnitřní standardní látky

- Pregnenolon-d4 (IS1), progesteron-d9 (IS3), kortikosteron-d4 (IS14), kortizon-d8 (IS20), aldosteron-d8 (IS21), testosteron-d3 (IS22), 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron-d3 (IS23), androsteron-d4 (IS31) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Německo)
- 17 $\alpha$ -hydroxyprogesteron-d8 (IS4), isopregnanolon-d5 (IS7), 3 $\alpha$ -allopregnanolon-d5 (IS8), 4-pregnen-20 $\alpha$ -ol-3-on-d4 (IS9), 11-deoxykortikosteron-d8 (IS13), kortizol-d4 (IS18), dexametazon-d5 (IS36) (TRC, Winnipeg, Kanada)
- Dehydroepiandrosteron-d2 (IS24) (Steraloids, Newport, RI, USA)

#### 4.6. Příprava roztoků

##### 4.6.1. Zásobní roztoky standardů a vnitřních standardů

Zásobní roztoky byly připraveny v koncentraci 1 mg/ml. Pro přípravu těchto roztoků bylo naváženo 0,1 – 0,3 mg krystalické látky, která byla rozpuštěna v odpovídajícím množství acetonitrilu. Rozpuštění krystalických látek bylo podpořeno ultrazvukem. Výjimkou byly látky **25** (DHEA-S, *m/z* 390) a **2** (17 $\alpha$ -OH-Preg, *m/z* 332). Látka **25** (DHEA-S, *m/z* 390) byla připravena v koncentraci 0,5 mg/ml za použití 50 % acetonitrilu. Látka **2** (17 $\alpha$ -OH-Preg, *m/z* 332) byla připravena v koncentraci 0,1 mg/ml za použití 80 % acetonitrilu. Jednotlivé zásobní roztoky byly dále ředěny acetonitrilem na koncentraci 0,1 mg/ml a 10  $\mu$ g/ml. Zásobní roztoky vnitřních standardů byly připraveny stejným způsobem jako zásobní roztoky standardních látek.

##### 4.6.2. Pracovní roztoky standardních látek

Pracovní roztoky byly připraveny ze zásobních roztoků postupným ředěním acetonitrilem. Nejčastěji bylo použito ředění desítkovou řadou.

Optimalizace MS metody a UHPLC metody byla provedena za použití 3 směsných roztoků. Zastoupení jednotlivých látek ve směsích bylo stanoveno tak, aby v jednom směsném roztoku nebyly obsaženy látky poskytující prekurzorové ionty se stejnou hodnotou *m/z*. Látka **25** (DHEA-S, *m/z* 390) byla analyzována v samostatném pracovním roztoku. Přehled látek v jednotlivých směsích je uveden v Tabulce 8. Optimalizace

metody byla provedena pomocí směsných roztoků o koncentraci 1 µg/ml nebo 0,1 µg/ml.

**Tabulka 8:** Rozdělení sloučenin do jednotlivých směsí.

Název	Číslo sloučenin
Směs 1	1, 8, 11, 13, 16, 21, 25, 26, 30, 32, 35, 37
Směs 2	3, 5, 10, 12, 14, 15, 17, 20, 27, 29, 31, 34
Směs 3	2, 4, 6, 7, 9, 18, 19, 22, 23, 24, 28, 33, 36

Pracovní roztoky směsí o koncentraci 1 µg/ml, byly připraveny ze zásobních roztoků o koncentraci 100 µg/ml a to tak, že bylo vzato 10 µl od každé látky z dané směsi a směs byla doplněna do 1000 µl acetonitrilem. Obdobným způsobem byly připraveny i směsi o koncentraci 0,1 µg/ml. Pro jejich přípravu byly použity zásobní roztoky o koncentraci 10 µg/ml.

Validace metody byla provedena pomocí směsného roztoku o koncentraci 1 µg/ml obsahujícího všechny analyty. Směsný roztok byl ředěn pomocí 50 % acetonitrilu v rozsahu koncentrací 0,5 ng/ml - 100 ng/ml. Pro validaci metody byly použity také vnitřní standardy, jejichž koncentrace byla stejná na všech validačních hladinách a to 50 ng/ml.

#### 4.7. Vývoj UHPLC-MS/MS metody

##### 4.7.1. Výchozí nastavení UHPLC metody

Analytická kolona: ACQUITY UPLC BEH C18 (1,7 µm; 2,1 x 100 mm)

Mobilní fáze: 0,1% FA (A) a ACN (B), gradientová eluce

Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min

Nastříkovaný objem: 5,0 µl

Teplota na koloně: 40 °C

Silná oplachová tekutina: ACN

Teplota v dávkovači vzorku: 8 °C

Slabá oplachová tekutina: 20 % ACN

**Tabulka 9:** Nastavení gradientu mobilní fáze

Krok	Čas změny (min)	Průtok (ml/min)	A [%]	B [%]	Křivka
1	Začátek analýzy	0,50	95	5	6
2	5,0	0,50	2	98	6
3	5,1	0,50	95	5	6
4	7,0	0,50	95	5	6

#### 4.7.2. Optimalizace MS metody

Výběr vhodných prekurzorových iontů pro každý analyt byl proveden na základě měření MS skenů, které bylo provedeno v ESI<sup>+</sup> a ESI<sup>-</sup>. Byly použity roztoky jednotlivých látek o koncentraci 1 µg/ml.

Optimalizace parametrů iontového zdroje byla provedena měřením směsí 1, 2 a 3 o koncentraci 1 µg/ml. Byly optimalizovány parametry napětí na kapiláře (0,5 - 3,5 kV), napětí na vstupním kuželu (5 - 90 V), průtok desolvačního plynu (600 - 1100 l/hod), desolvační teplota (400 – 600 °C), průtok plynu na vstupním kuželu (150 - 400 l/hod) a tlak zamlžujícího plynu (3,0 - 7,0 Bar). Pro měření byl použit selektivní záznam iontu (SIM).

Ze skenů produktových iontů při kolizní energii 10, 20 a 30 eV byly identifikovány produktové ionty jednotlivých sloučenin. Následně byla provedena optimalizace kolizní energie v rozsahu 5 - 50 eV. Dva nejintenzivnější přechody byly vybrány pro SRM. Byla použita koncentrace 1 µg/ml.

#### 4.7.3. Optimalizace UHPLC metody

V první fázi byl proveden screening celkem 7 chromatografických kolon za použití generického gradientu, Tabulka 9. Testovány byly jak kolony s plně porézními částicemi, tak povrchově porézními částicemi. Všechny chromatografické kolony obsahovaly částice menší než 2 µm, kromě Ascentis Express F5. Na základě výsledků byla provedena optimalizace průtoku mobilní fáze a gradientového profilu. Optimalizace byla provedena na směsných roztocích 1, 2 a 3 o koncentraci 0,1 µg/ml.

#### 4.8. Optimalizace postupu přípravy vzorků

Proteinová precipitace s následným odpařením a rekonstitucí vzorku byla zvolena jako vhodná technika úpravy vzorku. Optimalizace postupu se skládala z několika kroků: testování složení rekonstitučního činidla, teplotního programu pro odpaření, precipitačního činidla, jeho objemu a optimalizace času precipitace a centrifugace.

##### 4.8.1. Výběr vhodného rekonstitučního média

Na základě rozpustnosti jednotlivých analytů a složení mobilní fáze byla vybrána směs acetonitril/voda jako vhodné rozpouštědlo. Testovány byly různé koncentrační poměry: 30, 40, 50, 60, 70 a 80 % ACN.

Směsné roztoky všech analytů o koncentraci 0,1 µg/ml byly připraveny za použití rozpouštědel 30, 40, 50, 60, 70 a 80 % ACN. 100 µl každého z roztoku bylo odpařeno v samostatné vialce při 30 °C po dobu 60 minut. Všechny experimenty byly provedeny v duplikátu. Zbytek každého roztoku bez jakékoli úpravy byl změřen a použit jako referenční měření pro výpočet výtěžnosti. Odparky byly rozpuštěny ve 100 µl rozpouštědla o různém složení (30 – 80 % ACN) a roztoky změřeny. Vhodné činidlo bylo zvoleno na základě nejvyšší výtěžnosti vzhledem k referenčnímu roztoku.

##### 4.8.2. Výběr teplotního programu pro odpaření

Byly testovány tři teplotní programy dle možností vakuové odparky (30, 45 a 60 °C). Byl připraven roztok o koncentraci 0,1 µg/ml v 50 % ACN, který byl rozdělen do vialek po 100 µl. Roztoky byly vždy ve třech opakováních odpařeny při teplotách 30 °C, 45 °C a 60 °C a následně rekonstituovány ve 100 µl 50 % ACN. Všechny roztoky byly změřeny společně se zbytkem roztoku, který neprošel procesy odpaření a rekonstituce (referenční roztok). Vhodná teplota byla vybrána na základě výtěžnosti vzhledem k referenčnímu roztoku.

#### 4.8.3. Optimalizace postupu proteinové precipitace

Testovány byly následující parametry: druh precipitačního činidla (ACN, MeOH), objem precipitačního činidla (200 - 1000 ml), čas precipitace (5 - 30 minut) a čas centrifugace (5 - 30 minut). Centrifugace byla provedena rychlostí 14 000 RPM při teplotě 8 °C. PP byla provedena se 100 µl vzorku a supernatant byl odpařen při teplotě 60 °C a odparek rozpuštěn v 50 % ACN. Optimalizace postupu byla provedena pomocí programu MODDE, který po zadání testovaných parametrů a jejich mezních hodnot navrhl model pro optimalizaci. Zahrnoval celkem 25 experimentů s různými podmínkami PP (Tabulka 10). Na základě výsledků program zhodnotil vliv jednotlivých parametrů a stanovil nejvhodnější postup PP.

**Tabulka 10:** Model vytvořený programem MODDE pro optimalizaci PP.

Označení experimentu	Pořadí analýzy	Precipitační činidlo		Čas [min]	
		Typ	Objem [ml]	Precipitace	centrifugace
N1	3	MeOH	1000	5	5
N2	12	MeOH	200	30	5
N3	8	MeOH	1000	5	30
N4	9	MeOH	200	5	13
N5	15	MeOH	200	5	22
N6	5	MeOH	200	22	30
N7	6	MeOH	1000	30	13
N8	1	MeOH	1000	30	22
N9	7	MeOH	450	30	30
N10	2	MeOH	600	17,5	5
N11	25	ACN	200	5	5
N12	19	ACN	200	30	5
N13	17	ACN	1000	30	5
N14	16	ACN	200	5	30
N15	4	ACN	200	30	30
N16	24	ACN	1000	30	30
N17	13	ACN	1000	5	13
N18	20	ACN	1000	13	5
N19	23	ACN	1000	22	30
N20	22	ACN	750	5	30
N21	10	ACN	200	17,5	17,5
N22	18	ACN	600	30	17,5
N23	21	ACN	600	17,5	17,5
N24	14	ACN	600	17,5	17,5
N25	11	ACN	600	17,5	17,5

## 4.9. Finální PP-UHPLC-MS/MS metoda

### 4.9.1. UHPLC metoda

Analytická kolona: Cortecs UPLC C18 (1,6 µm; 2,1 x 150 mm)

Mobilní fáze: 0,1 % FA (A) a ACN (B), gradientová eluce

Průtok mobilní fáze: 0,3 ml/min

Nastříkovaný objem: 5,0 µl

Teplota na koloně: 40 °C

Silná oplachová tekutina: ACN

Teplota v dávkovači vzorku: 8 °C

Slabá oplachová tekutina: 20 % ACN

**Tabulka 11:** Finální gradient mobilní fáze

Krok	Čas změny (min)	Průtok (ml/min)	A [%]	B [%]
1	Začátek analýzy	0,30	95	5
2	0,5	0,30	95	5
3	1,0	0,30	65	35
4	4,0	0,30	65	35
5	15,0	0,30	55	45
6	16,0	0,30	40	60
7	17,0	0,30	5	95
8	18,0	0,30	5	95
9	18,1	0,30	95	5
10	20,0	0,30	95	5

### 4.9.2. MS metoda

Ionizace: ESI<sup>+</sup>, pouze látka 25 ESI<sup>-</sup>

Nastavení iontového zdroje:

Napětí na kapiláře: 1,5 kV/ 0,5 kV (ESI<sup>+</sup>/ ESI<sup>-</sup>)

Napětí na vstupním kuželu: individuální (Tabulka 12)

Průtok desolvačního plynu: 1100 l/hod

Průtok plynu na vstupním kuželu: 200 l/hod

Desolvační teplota: 500 °C

Tlak zamlžujícího plynu: 5,0 Bar

Měření bylo provedeno pomocí dvou SRM přechodů pro každou látku (Tabulka 12).

**Tabulka 12:** Přehled SRM přechodů a optimálních hodnot CV a CE. Všechny látky byly měřeny v pozitivním módu ionizace, pouze látka **25** (DHEA-S, *m/z* 390) v negativním módu ionizace (označeno modře).

SLOUČ.	$t_R$ [min]	CV [V]	SRM přechod 1 Kvantifikační	CE 1 [eV]	SRM přechod 2 Kvalitativní	CE 2 [eV]
1	16,7	30	281,08 > 171,17	25	281,08 > 211,02	20
2	8,4	25	297,09 > 159,08	20	297,09 > 279,08	15
3	16,8	15	315,14 > 109,08	25	315,14 > 122,89	25
4	9,7	15	331,16 > 109,01	25	331,16 > 313,10	15
5	7,9	15	333,13 > 271,09	15	333,13 > 201,16	20
6	17,9	20	317,18 > 281,22	15	317,18 > 299,15	10
7	17,4	15	300,97 > 283,09	15	300,97 > 189,00	20
8	17,8	20	283,11 > 189,11	20	283,11 > 159,01	20
9	13,0	15	317,18 > 109,01	30	317,18 > 281,07	15
10	8,6	15	331,16 > 313,02	15	331,16 > 294,94	15
11	11,7	30	316,92 > 299,15	10	316,92 > 281,07	15
12	12,3	25	317,05 > 299,04	10	317,05 > 281,07	15
13	8,2	15	331,23 > 96,92	20	331,23 > 108,93	25
14	4,5	20	347,04 > 329,00	15	347,04 > 311,07	15
15	4,0	15	345,01 > 300,95	20	345,01 > 146,91	25
16	6,3	20	349,08 > 313,05	15	349,08 > 159,01	25
17	6,6	20	349,08 > 312,91	15	349,08 > 295,06	15
18	3,1	15	363,06 > 120,98	25	363,06 > 326,85	15
19	4,8	15	347,04 > 109,01	25	347,04 > 311,15	15
20	3,2	15	361,02 > 163,07	25	361,02 > 267,06	20
21	2,7	15	343,04 > 325,03	15	361,09 > 343,02	15
22	7,4	15	289,09 > 109,09	25	289,09 > 122,98	25
23	11,2	15	291,12 > 255,15	15	291,12 > 159,16	20
24	9,1	20	270,90 > 253,12	15	270,90 > 197,06	20
25	5,1	40	367,00 > 96,81	30		
26	3,1	25	269,07 > 251,09	15	269,07 > 211,10	15
27	2,9	15	269,07 > 211,17	15	269,07 > 251,09	10
28	3,5	10	285,08 > 132,96	20	302,94 > 284,97	15
29	9,1	15	287,18 > 109,09	20	287,18 > 97,01	20
30	10,5	20	273,20 > 255,22	10	273,20 > 147,07	20
31	14,1	25	273,20 > 255,15	10	273,20 > 147,07	20
32	13,5	20	271,10 > 161,04	15	289,02 > 271,20	10
33	14,2	20	271,10 > 147,07	20	271,10 > 253,12	15
34	10,8	25	257,18 > 161,19	15	257,18 > 147,00	20
35	7,8	15	256,99 > 161,11	15	256,99 > 147,00	20
36	4,0	25	393,05 > 372,98	10	393,05 > 354,92	10
37	3,9	25	393,05 > 354,99	10	393,05 > 279,10	15

#### 4.9.3. Proteinová precipitace

Pro úpravu vzorku bylo využito proteinové precipitace acetonitrilem. Ke 100 µl plazmy bylo přidáno 1000 µl acetonitrilu. Směs byla promíchána a inkubována po dobu 10 minut. Poté byla směs centrifugována při 8 °C a 14000 RPM po dobu 5 minut. Odebraný supernatant byl odpařen ve vakuové odparce při teplotě 60 °C do úplného odpaření. Následně byl vzorek rekonstituován ve 100 µl 50 % ACN a přenesen do mikrovialek.

#### 4.10. Ověření validačních parametrů

Pro ověření validačních parametrů byla použita finální PP-UHPLC-MS/MS metoda zmíněná v kapitole 4.9. s využitím deuterii značených standardů (SIL-ISs). Z důvodu finanční náročnosti jednotlivých vnitřních standardů a jejich komerční nedostupnosti bylo využito pouze 16 SIL-ISs o koncentraci 50 ng/ml. Jejich seznam je v kapitole 4.5. a jejich přiřazení k jednotlivým látkám shrnuto v Tabulce 13.

**Tabulka 13:** Přiřazení SIL-ISs k jednotlivým analytům.

<b>Analyt</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<b>SIL-ISs</b>	IS1	IS13	IS3	IS4	IS13	IS8	IS7	IS8	IS9	IS13	IS9	IS9	IS13
<b>Analyt</b>	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
<b>SIL-ISs</b>	IS14	IS36	IS22	IS22	IS18	IS14	IS20	IS21	IS22	IS23	IS24	IS14	IS18
<b>Analyt</b>	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37		
<b>SIL-ISs</b>	IS18	IS20	IS24	IS4	IS31	IS31	IS31	IS23	IS22	IS36	IS36		

V první fázi byla změřena standardní a matricová kalibrační křivka v rozsahu koncentrací 0,5 ng/ml - 100 ng/ml. Vzorky matricové kalibrační křivky byly připraveny optimalizovanou metodou úpravy vzorků, dále byly vyhodnoceny korelační koeficienty a stanoveny limity kvantifikace. Ověřeny byly také přesnost, výtěžnost a matricové efekty na 4 koncentračních hladinách. Pro výpočet těchto parametrů bylo nutné změřit na 4 koncentračních hladinách 3 typy roztoků. Roztok standardních látek v 50 % ACN, roztok vzniklý post-extrakčním přidavkem a roztoky vzniklé pre-extrakčním přidavkem. Roztok s post-extrakčním přidavkem byl připraven tak, že „blanková“ plazma byla nejprve upravena PP a následně obohacena roztokem standardů a SIL-ISs o odpovídající



koncentraci. Roztoky pre-extrakčního přídatku byly připraveny tak, že nejprve byla „blanková“ plazma obohacena roztokem standardů a SIL-ISs o odpovídající koncentraci a až následně upravena PP. Změřena byla také „blanková“ plazma bez přídatku standardů pro ověření případného výskytu testovaných látek již před obohacením. Přesnost byla stanovena jako relativní směrodatná odchylka ze tří opakování extrakce. Výtěžnost byla stanovena na základě výpočtu z ploch píků z měření pre-extrakčního a post-extrakčního přídatku. Matricové efekty byly vypočítány z poměrů ploch píků standardů a vnitřních standardů z měření standardních roztoků a post-extrakčního přídatku.

## 5. Výsledky a diskuse

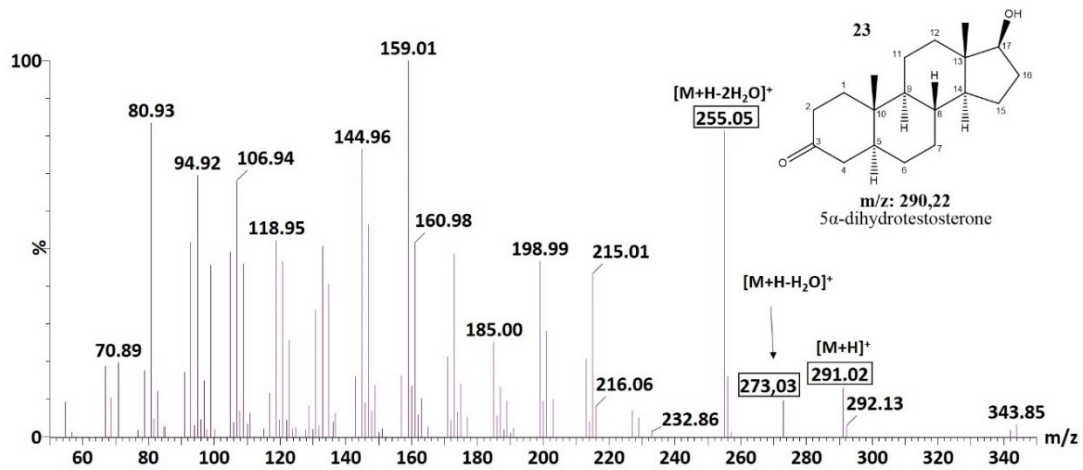
### 5.1. Optimalizace MS metody

#### 5.1.1. Výběr prekurzorových iontů

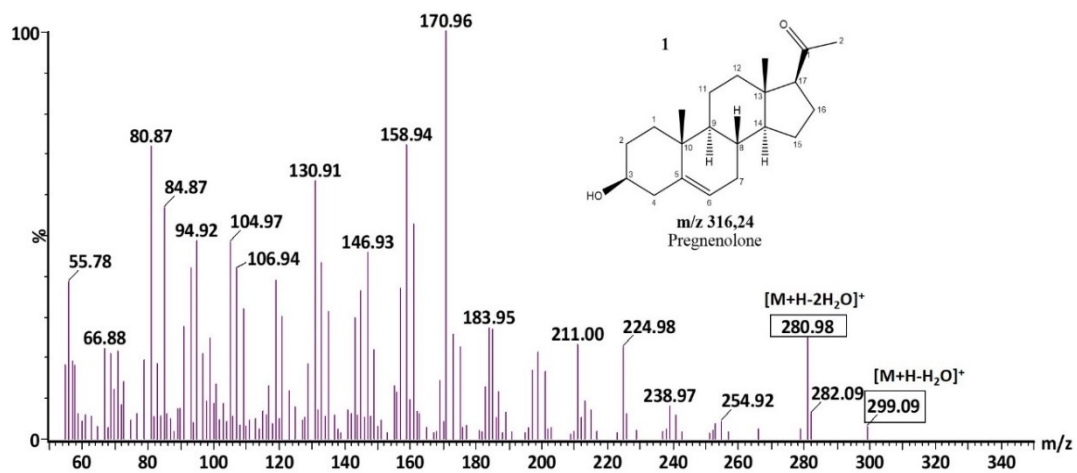
Výběr prekurzorových iontů byl proveden pomocí MS skenu v rozsahu  $m/z$  50 – 800 v pozitivním a negativním módu ionizace. K ionizaci v negativním módu docházelo pouze pro několik málo sloučenin. Nicméně pouze látka **25** (DHEA-S,  $m/z$  390) poskytovala pro deprotonovanou molekulu intenzivní signál. V pozitivním záznamu iontů ionizovaly všechny sloučeniny, kromě látky **25** (DHEA-S,  $m/z$  390). Avšak pouze některé látky poskytovaly protonovanou molekulu. V mnoha případech musel být jako prekurzorový iont vybrán iont po ztrátě jedné  $[M+H-H_2O]^+$ , dvou  $[M+H-2H_2O]^+$ , případně tří molekul vod  $[M+H-3H_2O]^+$ . Tato fragmentace v iontovém zdroji je typická pro steroidní struktury. Zároveň bylo zjištěno, že dochází ke vzniků prekurzorových iontů se stejnou hodnotou  $m/z$  pro různé látky, a to i v případě, že se nejedná o izobary. Důvodem bylo, že některé látky se liší pouze počtem hydroxylových nebo ketonických skupin, které mohou být odštěpovány a tím dochází ke vzniku stejných prekurzorových iontů a možných křížových interferencí. Například u sloučeniny **18** (F,  $m/z$  362) docházelo k odštěpení molekuly vody a vzniku  $[M+H-H_2O]^+$  se stejnou  $m/z$  jako pro  $[M+H]^+$  látky **15** (11-DHB,  $m/z$  344). Tento efekt byl pozorován i pro další látky.

Jak je patrné z MS spekter uvedených na Obrázku 17 a 18, pro některé steroidy jsou typická velmi bohatá MS spektra. Zároveň na Obrázku 18 je patrné, že sloučenina **1** (Preg,  $m/z$  316) neposkytuje protonovanou molekulu, ale jako prekurzorový iont musel být zvolen  $[M+H-H_2O]^+$  nebo  $[M+H-2H_2O]^+$  iont.

Pro všechny sloučeniny, kromě sloučeniny **25** (DHEA-S,  $m/z$  390) byla vybrána ionizace v pozitivním módu. Přehled prekurzorových iontů je uveden v Tabulce 14.



Obrázek 17 : MS spektrum analytu **23** (5 $\alpha$ -DHT,  $m/z$  290).



Obrázek 18 : MS spektrum analytu **1** (Preg,  $m/z$  316).

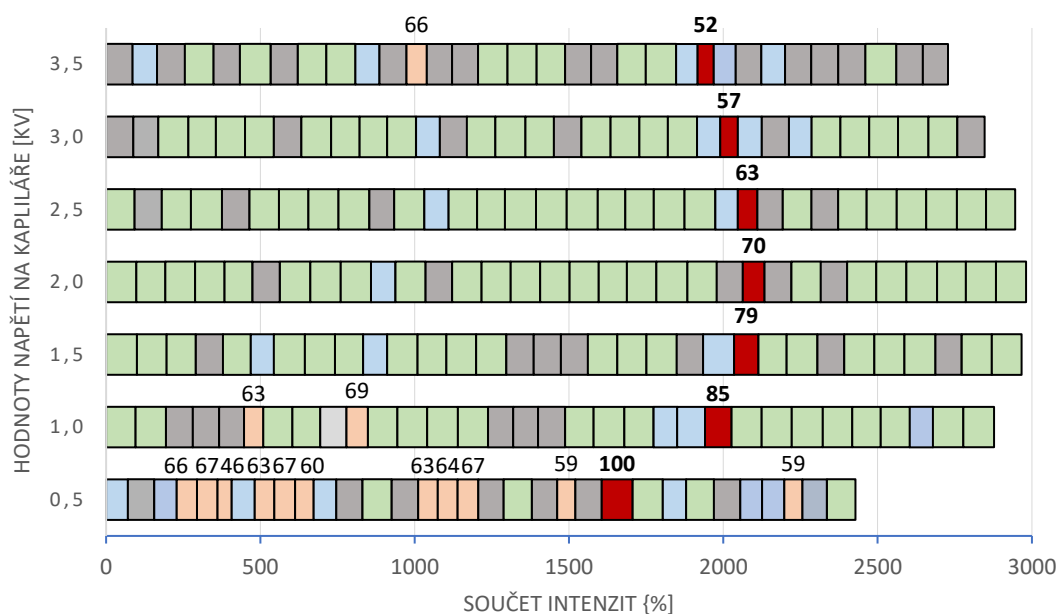
**Tabulka 14:** Tabulka prekurzorových iontů pro testované analyty.

Sloučenina	[M+H] <sup>+</sup>	[M+H-H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	[M+H-2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	[M+H-3H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
1	-	-	280,98	-
2	-	-	296,92	279,01
3	314,91	297,06	279,01	-
4	330,92	313,01	295,02	-
5	332,96	-	296,99	271,06
6	316,94	299,09	281,04	-
7	-	301,06	283,01	-
8	-	-	283,01	-
9	317,01	299,09	281,11	-
10	330,99	313,01	294,96	-
11	-	316,94	299,16	280,91
12	-	316,94	299,16	280,91
13	330,99	312,94	-	-
14	346,87	328,95	310,84	292,92
15	344,97	326,92	-	-
16	349,04	330,92	313,01	-
17	349,04	330,92	313,01	-
18	363,02	-	326,92	309,00
19	347,00	-	-	-
20	360,92	342,92	-	-
21	360,92	342,87	-	-
22	289,05	271,00	253,01	-
23	291,02	-	254,98	-
24	-	271,06	-	-
26	-	-	268,96	-
27	-	-	269,03	-
28	302,96	284,91	267,06	-
29	286,95	-	-	-
30	-	272,97	255,18	-
31	-	272,97	254,98	-
32	289,11	270,93	253,06	-
33	-	271,06	253,01	-
34	-	-	257,02	-
35	-	-	257,02	-
36	392,81	-	-	-
37	393,01	-	355,06	-
	[M-H] <sup>-</sup>			
25	367,02			

### 5.1.2. Optimalizace parametrů iontového zdroje

Cílem optimalizace bylo získání co nejvyšší intenzity jednotlivých prekurzorových iontů. Provedena byla pomocí SIM metody v pozitivním módu ionizace, který byl použit pro všechny analyty s výjimkou látky **25** (DHEA-S,  $m/z$  390). Pro látku **25** (DHEA-S,  $m/z$  390) byly v negativním módu ionizace optimalizovány pouze nejdůležitější parametry, tedy napětí na kapiláře, napětí na vstupním kuželu a kolizní energie.

Napětí na kapiláře bylo optimalizováno v rozmezí hodnot 0,5 až 3,5 kV, Obrázek 19. V pozitivním módu byla pro většinu látek nejlepší odezva pozorována při hodnotě napětí 2,0 kV. Nicméně vzhledem k tomu, že pro látku **6** (5 $\alpha$ -DHP,  $m/z$  316) byla odezva pouze 70 %, nebyla tato hodnota napětí vybrána. Nejlepší intenzita pro látku **6** (5 $\alpha$ -DHP,  $m/z$  316) byla získána při napětí 0,5 kV, nicméně odezva většiny ostatních látek byla podstatně nižší než při vyšších hodnotách napětí. Proto jako kompromis byla zvolena optimální hodnota 1,5 kV.



**Obrázek 19:** Optimalizace napětí na kapiláře. 100 % je nejvyšší hodnota plochy píku pro danou sloučeninu. Zelená políčka značí 90 – 100 %, šedá 80 – 89 %, modrá 70 – 79 % a růžová hodnotu pod 70 %. Vínově jsou vyznačena políčka pro hodnoty napětí u látky **6** (5 $\alpha$ -DHP,  $m/z$  316).

Průtok desolvačního plynu na vstupním kuželu byl optimalizován v rozmezí hodnot 600 – 1100 l/hod. Výběr optimálního průtoku 1100 l/hod byl jednoznačný. Pro většinu látek bylo při tomto průtoku dosaženo maximální intenzity. Látka **18** (F,  $m/z$  362) měla za daných podmínek nejnižší odezvu a to 90 % maximální hodnoty.

Desolvační teplota byla optimalizována v rozmezí 400 – 600 °C. Výběr optimální teploty nebyl zcela jednoznačný. Látky se na základě vlivu teploty rozdělily na pomyslné dvě skupiny. Pro jednu skupinu látek zvyšující teplota vedla ke snížení odezvy pro druhou skupinu naopak docházelo se ke zvýšení odezvy. Z tohoto důvodu byla jako optimální teplota zvolena její střední hodnota 500 °C.

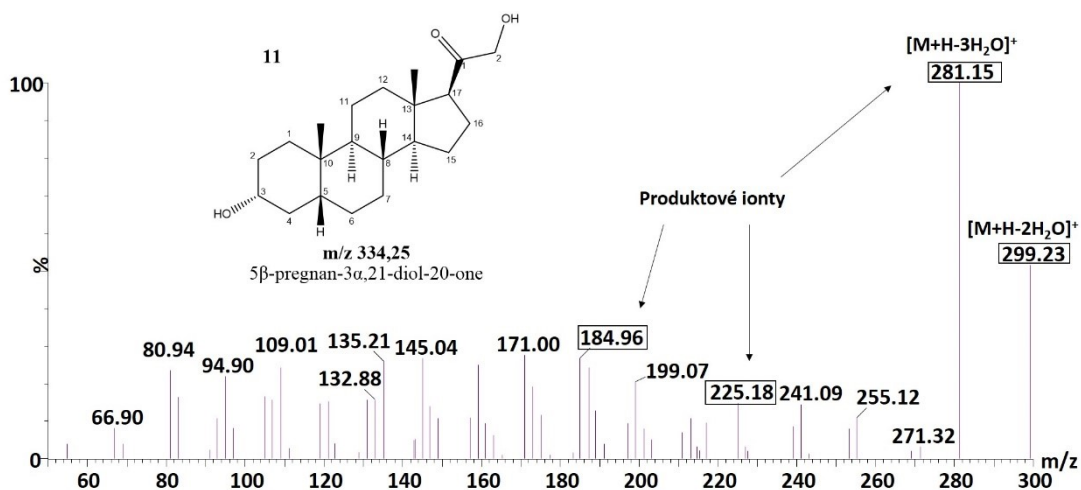
Průtok plynu na vstupním kuželu byl optimalizován v rozmezí hodnot 150 – 400 l/hod. Průtok 350 l/hod byl optimální pro většinu látek, nicméně zároveň pro některé sloučeniny byla poskytnuta odezva menší než 80 %. Z tohoto důvodu byla vybrána hodnota 200 l/hod, u které nebylo u tolika látek dosaženo nejlepší odezvy, nicméně téměř pro všechny sloučeniny přesahovala 90 %.

Tlak zamlžujícího plynu byl optimalizován v rozmezí 3,0 bar a 7,0 bar. Kromě sloučeniny **24** (DHEA,  $m/z$  288), která poskytovala nejvyšší odezvu při 4,0 bar, byl u většiny analytů optimální tlak 5,0 bar nebo 5,5 bar. Hodnota 5,0 bar nicméně vykazovala o něco lepší výsledky.

Napětí na vstupním kuželu bylo optimalizováno individuálně pro každou látku. Optimální hodnoty jednotlivých parametrů jsou uvedeny v kapitole 4.8.

### 5.1.3. Výběr produktových iontů

Výběr produktových iontů byl proveden na základě změřených skenů produktových iontů při kolizních energiích 10, 20 a 30 eV. Byly vybrány tři až čtyři produktové ionty pro každý prekurzor, Tabulka 15. Některé sloučeniny poskytovaly velmi bohatá fragmentační spektra (Obrázek 20), naopak některé poskytovaly pouze jen 2-3 fragmenty.



**Obrázek 20:** Sken produktových iontů pro sloučeninu **11** (THDOC,  $m/z$  334) pro prekurzorový iont  $[M+H-2H_2O]^+ = 299,16$  při CE 20.

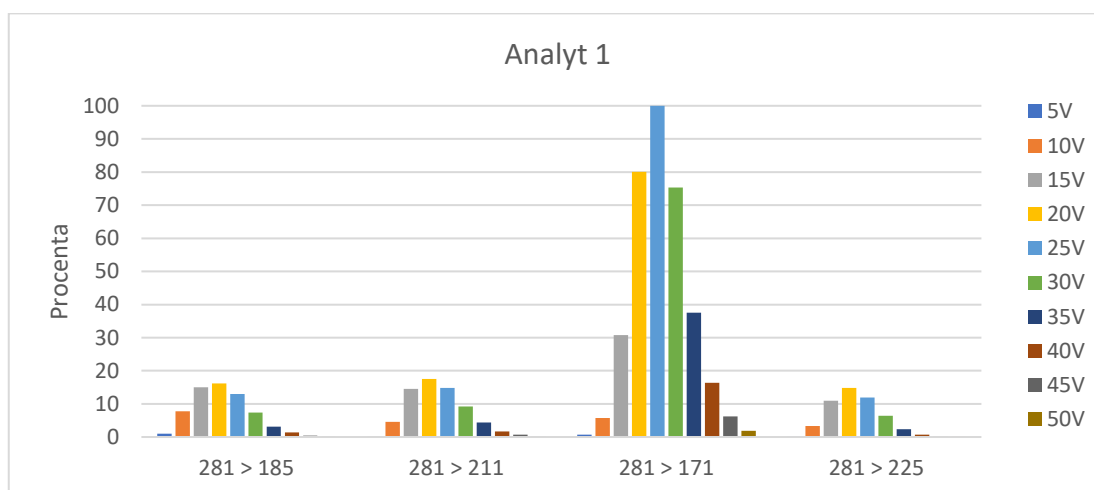
**Tabulka 15:** Produktové ionty příslušných prekurzorů.

Analyt	Prekurzor (m/z)	Produktové ionty(m/z)			Analyt	Prekurzor (m/z)	Produktové ionty(m/z)			
		1	2	3			1	2	3	
1	280,98	171,08	184,96	211,15	16	313,01	271,43	255,08	230,85	
2	279,01	223,30	208,90	183,08	16	330,92	294,91	312,84	283,14	
	296,92	279,13	159,22	186,99		349,04	312,99	159,20	295,29	
3	279,01	208,30	200,94	149,31	17	313,01	276,06	267,31	295,06	
	297,06	281,45	256,17	279,28		330,92	312,99	254,78	294,76	
	314,91	109,01	297,09	123,11		349,04	313,07	295,14	330,92	
4	253,01	197,19	156,82	171,00	18	309,00	268,06	291,01	250,80	
	295,02	278,53	253,92	233,13		326,92	309,09	267,91	285,84	
	313,01	271,23	294,99	254,93		363,02	121,05	327,02	309,03	
	330,92	109,01	313,14	294,99	19	347,00	109,16	311,11	329,12	
5	252,95	238,39	185,64	173,70	20	342,92	302,11	260,78	324,92	
	271,06	175,43	253,09	159,30		360,92	163,06	267,17	343,12	
	296,99	214,90	256,24	278,83	21	342,87	324,99	255,16	315,09	
	332,96	271,13	201,07	175,18		360,92	342,84	315,05	324,99	
6	281,04	239,74	219,25	198,92	22	253,01	235,23	182,41	232,68	
	299,09	188,94	281,15	216,93		271,00	229,91	199,29	243,04	
	316,94	281,04	299,04	189,06		289,05	109,01	123,12	105,11	
7	283,01	201,17	173,10	189,01	23	254,98	159,22	199,22	173,10	
	301,06	283,06	189,06	201,07		291,02	255,34	159,15	215,13	
8	283,01	189,01	173,10	159,07	24	271,06	253,17	197,19	171,00	
9	281,11	219,25	239,51	168,83	25	367,02	96,98	226,76	122,85	
	299,09	281,08	149,24	173,10	26	268,96	251,14	211,00	195,17	
	317,01	109,01	281,04	298,81	27	269,03	211,15	251,22	157,19	
10	294,96	253,77	233,28	265,40	28	267,06	184,73	156,97	249,04	
	313,01	294,84	210,97	254,78		284,91	132,88	267,12	239,21	
	330,99	313,14	294,99	271,06		302,96	285,01	267,08	243,00	
11	280,91	171,00	199,07	210,10	29	286,95	97,08	109,01	122,82	
	299,16	281,30	184,96	225,18	30	255,18	145,11	159,15	199,14	
	316,94	299,04	280,96	198,97		272,97	255,27	161,02	146,99	
12	280,91	210,62	198,92	224,80	31	254,98	145,19	199,14	158,92	
	299,16	281,08	257,44	186,84		272,97	255,19	147,06	199,14	
	316,94	299,04	281,11	199,12	32	253,06	196,89	182,93	235,23	
	329,87	289,14	308,79	247,65		270,93	160,95	213,17	253,17	
13	312,94	294,84	271,73	253,28	33	289,11	271,25	213,25	253,24	
	330,99	96,92	108,93	122,81		253,01	171,23	196,82	183,08	
14	292,92	190,89	210,92	251,74	34	271,06	252,94	147,06	212,95	
	310,84	299,11	269,41	246,75		257,02	161,40	147,14	134,91	
	328,95	288,09	310,89	292,96	35	257,02	160,95	146,84	174,90	
	346,87	328,89	311,04	293,11		36	354,94	237,21	336,89	318,83
	300,86	242,18	218,40	282,69		392,81	372,94	354,95	336,96	
15	326,92	285,61	267,38	309,24	37	355,06	337,10	239,17	279,00	
	344,97	300,99	147,05	269,18		393,01	354,95	279,00	336,96	



#### 5.1.4. Optimalizace kolizní energie, výběr finálních přechodů

Na základě skenu produktových iontů a prekurzorů bylo vytvořeno několik SRM přechodů pro každou látku. Pro tyto přechody byla optimalizována kolizní energie, která společně s napětím na vstupním kuželu může být nastavena individuálně pro každou sloučeninu v MS metodě. Pro každý analyt byly vybrány dva nejintenzivnější SRM přechody a jejich optimální kolizní energie. Na Obrázku 21 je znázorněna optimalizace kolizní energie pro sloučeninu **1** (Preg,  $m/z$  316). Vybrané SMR přechody společně s optimálními kolizními energiemi jsou v Tabulce 12. Vždy nejintenzivnější přechod byl zvolen jako kvantifikační a druhý přechod jako konfirmační. Pro sloučeninu **25** (DHEA-S,  $m/z$  390) bylo možné vybrat pouze jeden SRM přechod, jelikož intenzita ostatních produktových iontů byla velmi nízká.



**Obrázek 21:** Výběr SRM přechodů a optimalizace kolizní energie pro analyt **1** (Preg,  $m/z$  316). Jako 100 % byla zvolena nejvyšší plocha píku.

## 5.2 Optimalizace UHPLC

Separace vybraných analytů byla nezbytná pro jejich přesnou a správnou kvantifikaci. Jedná se zejména o separaci izobarických sloučenin a analytů, které po odštěpení 1 či více molekul vody poskytují ionty se stejnou hodnotu  $m/z$  jako jiná sloučenina. V případě nedostatečné separace by mohlo docházet ke křížovým interferencím a chybné kvantifikaci. Na základě této skutečnosti byly jednotlivé látky pro hodnocení separace rozděleny do 11 skupin. Do jedné skupiny byly vždy zahrnuty interferující látky, které bylo nutné od sebe separovat.

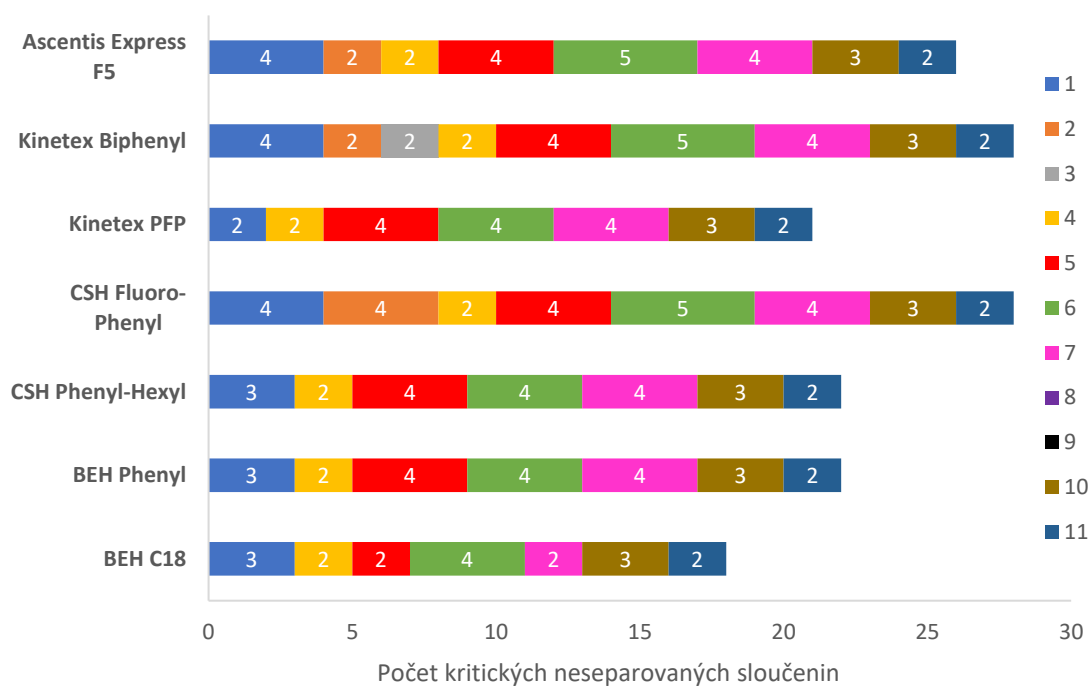
Na základě dříve vyvinutých metod byla jako mobilní fáze zvolena směs acetonitrilu a 0,1 % kyseliny mravenčí. V první fázi byl proveden screening chromatografických kolon a následně optimalizace gradientového profilu.

### 5.2.1. Screening

Cílem screeningu bylo vybrat kolony s co nejvyšší selektivitou, která byla hodnocena na základě počtu separovaných kritických sloučenin. Pro měření byla použita generická UHPLC metoda popsaná v kapitole 4.7.1.

V této fázi bylo testováno celkem 7 chromatografických kolon. Zahrnuty byly jak kolony s plně porézními částicemi, tak povrchově porézními částicemi a dále stacionární fáze lišící se navázaným ligandem: Acquity UPLC BEH C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm), Acquity UPLC BEH Phenyl (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm), Acquity UPLC CSH Phenyl-Hexyl (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm), Acquity UPLC CSH Fluoro-Phenyl (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm), Kinetex PFP (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm), Kinetex Biphenyl (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm), Ascentis Express F5 (2,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm). Separace jednotlivých látek byla hodnocena na základě bodových grafů, kdy jednotlivé kritické skupiny sloučenin byly barevně odlišeny. Na Obrázku 22 jsou zobrazeny počty kritických analytů v jednotlivých skupinách, u kterých nedocházelo k dostatečné separaci. Nejlepších výsledků vzhledem k počtu kritických sloučenin dosahovala kolona Acquity UPLC BEH C18, a to 18 kritických sloučenin. Nejhorších výsledků bylo dosaženo na kolonách Acquity UPLC CSH Fluoro-Phenyl a Kinetex Biphenyl, u obou bylo 28 kritických sloučenin a na Ascentis Express F5, kde bylo těchto sloučenin 26.

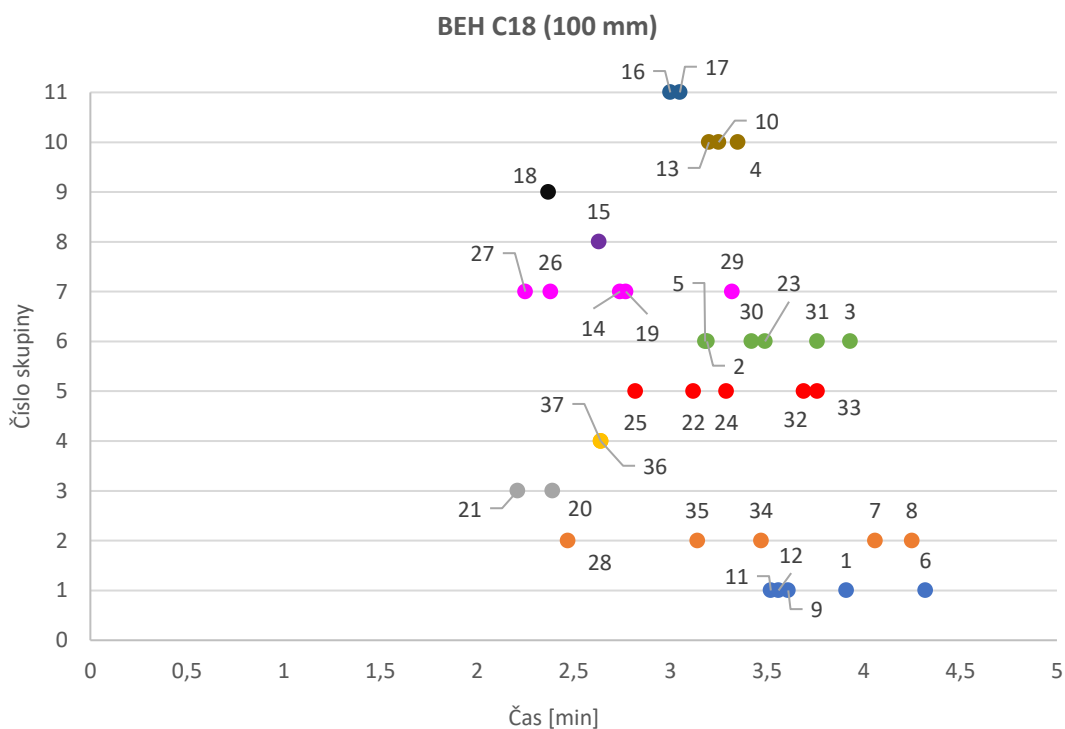
Na všech kolonách byla velice problematická separace ve čtvrté skupině, tedy u sloučenin **36** (DEXA,  $m/z$  392) a **37** (BETA,  $m/z$  392). Dále pak ve skupině deset u sloučenin **4** ( $17\alpha$ -OH-P,  $m/z$  330), **10** ( $11\beta$ -OH-P,  $m/z$  330) a **13** (11-DOC,  $m/z$  330) a jedenáct u sloučenin **16** ( $5\alpha$ -DHB,  $m/z$  348) a **17** ( $5\beta$ -DHB,  $m/z$  348).



**Obrázek 22:** Počty kritických látek v jednotlivě barevně odlišených skupinách.

## Výsledky separace na koloně BEH C18 (100 mm)

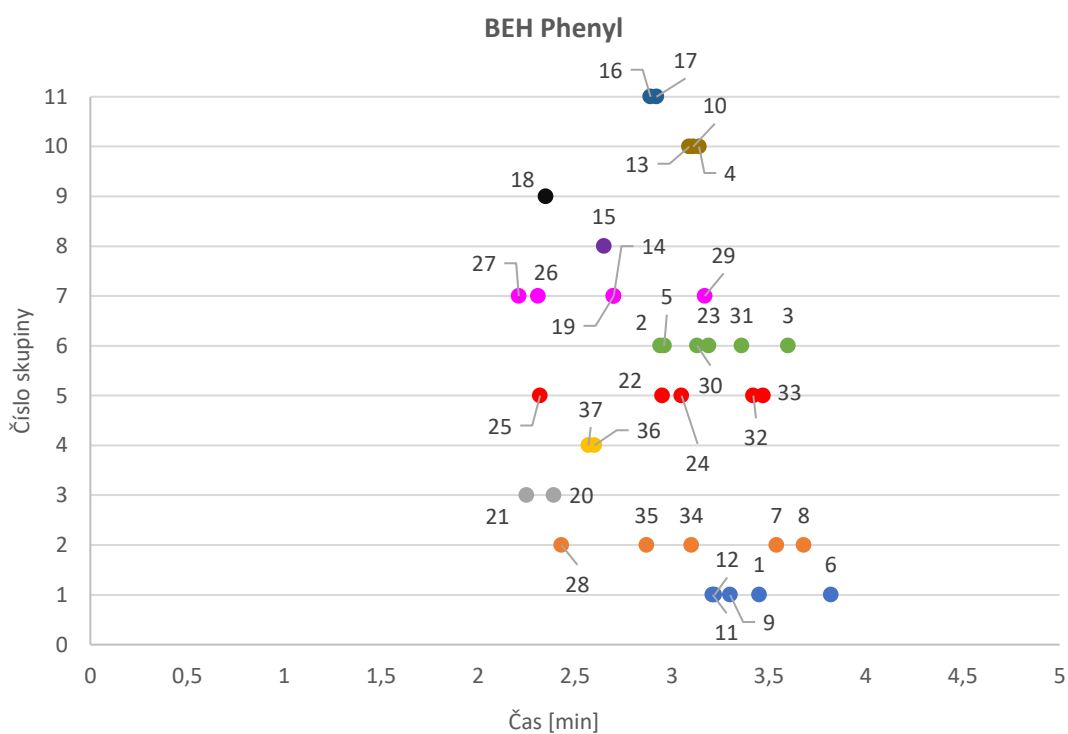
Všechny testované látky byly na této koloně při generickém gradientu eluovány v rozmezí 2 min až 4,5 min. Nebylo dostatečně separováno celkem 18 kritických sloučenin. Tři páry analytů zcela koeluovaly (analyty **36** (DEXA,  $m/z$  392) a **37** (BETA,  $m/z$  392); **14** (CORT (B),  $m/z$  346) a **19** (21-dF (S),  $m/z$  346); **2** ( $17\alpha$ -OH-Preg,  $m/z$  332) a **5** ( $17\alpha,20\beta$ -OH-P,  $m/z$  332)). Naopak pro kritické analyty **23** ( $5\alpha$ -DHT,  $m/z$  290) a **30** (EpiAST,  $m/z$  290); **9** ( $20\alpha$ -OH-P,  $m/z$  316), **11** (THDOC,  $m/z$  334) a **12** (Allo-THDOC,  $m/z$  334); **10** ( $11\beta$ -OH-P,  $m/z$  330) a **13** (11-DOC,  $m/z$  330); **16** ( $5\alpha$ -DHB,  $m/z$  348) a **17** ( $5\beta$ -DHB,  $m/z$  348) byla pozorována vyšší selektivita a látky byly částečně separovány (Obrázek 23).



**Obrázek 23:** UHPLC separace na koloně BEH C18 (100 mm) za pomoci generické gradientové eluce. Barevně jsou odlišeny jednotlivé skupiny analytů.

## Výsledky separace na koloně BEH Phenyl

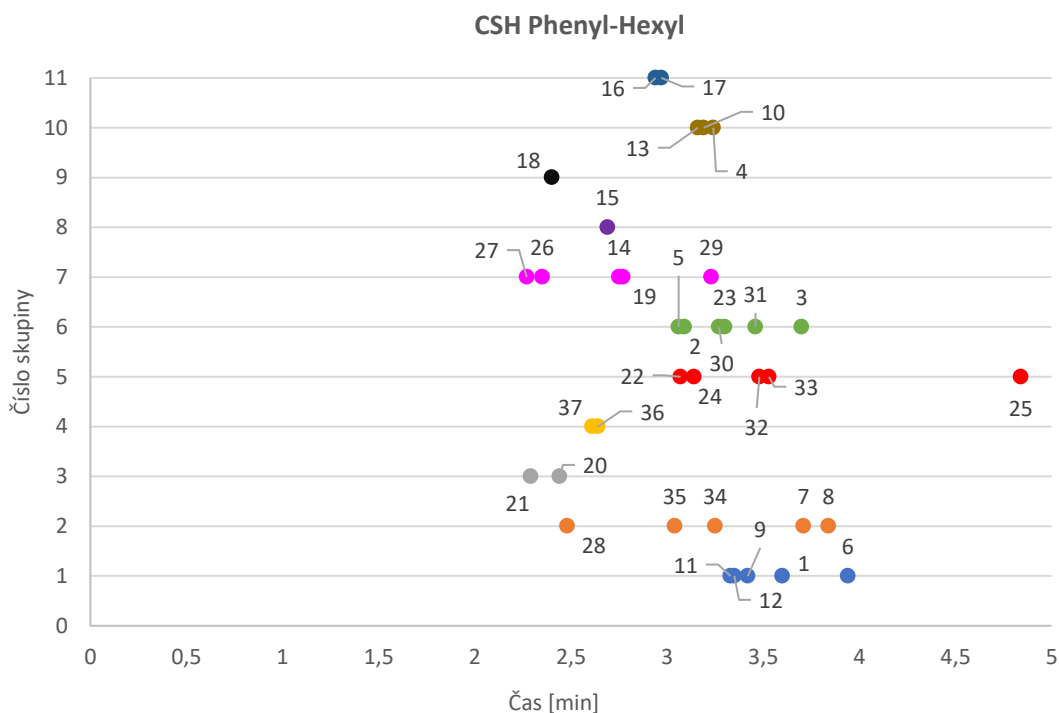
K dostatečné separaci nedocházelo pro 22 kritických látek. Všechny látky byly eluovány během 2 minut. Obecně lze konstatovat, že byla v porovnání s kolonou UPLC BEH C18 (100 mm) pozorována nižší selektivita pro většinu analytů. Došlo k úplné koeluci pro látky **11** (THDOC,  $m/z$  334) a **12** (Allo-THDOC,  $m/z$  334); **2** ( $17\alpha$ -OH-Preg,  $m/z$  332) a **5** ( $17\alpha,20\beta$ -OH-P,  $m/z$  332); **14** (CORT (B),  $m/z$  346) a **19** (21-dF (S),  $m/z$  346) a ke zhoršení separace u **4** ( $17\alpha$ -OH-P,  $m/z$  330), **10** ( $11\beta$ -OH-P,  $m/z$  330) a **13** (11-DOC,  $m/z$  330); **23** ( $5\alpha$ -DHT,  $m/z$  290) a **30** (EpiAST,  $m/z$  290); **32** ( $5\alpha$ -dion,  $m/z$  288) a **33** ( $5\beta$ -dion,  $m/z$  288) (Obrázek 24). Nejproblematictější byla v tomto případě skupina 6.



**Obrázek 24:** UHPLC separace na koloně BEH Phenyl za pomoci generické gradientové eluce. Barevně jsou odlišeny jednotlivé skupiny analytů.

## Výsledky separace na koloně Phenyl-Hexyl

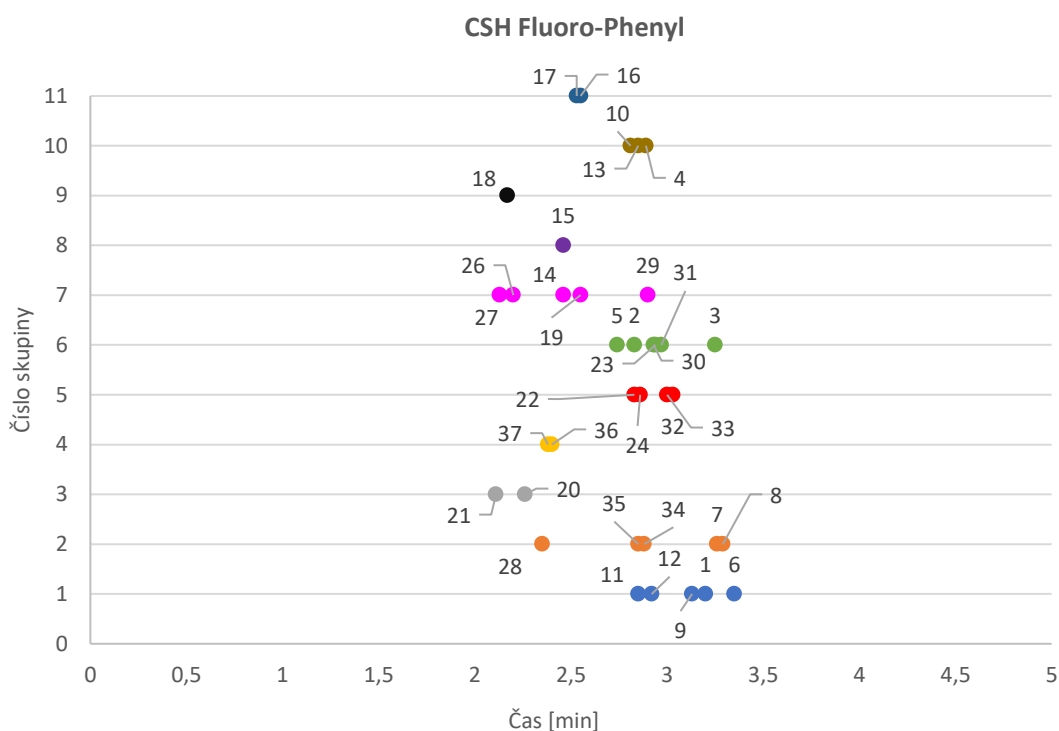
Na této koloně bylo 22 kritických látek. Selektivita byla srovnatelná s BEH Phenyl, kromě sloučeniny **25** (DHEA-S,  $m/z$  390), která se v porovnání s předchozími kolonami chovala zcela odlišně. Na této koloně byla eluována na konci gradientu, tedy při vysokém obsahu acetonitrilu v mobilní fázi. Horší selektivita byla pozorována pro látky **22** (T,  $m/z$  288) a **24** (DHEA,  $m/z$  288) (Obrázek 25).



**Obrázek 25:** UHPLC separace na koloně CSH Phenyl-Hexyl za pomoci generické gradientové eluce. Barevně jsou odlišeny jednotlivé skupiny analytů.

## Výsledky separace na koloně CSH Fluoro-Phenyl

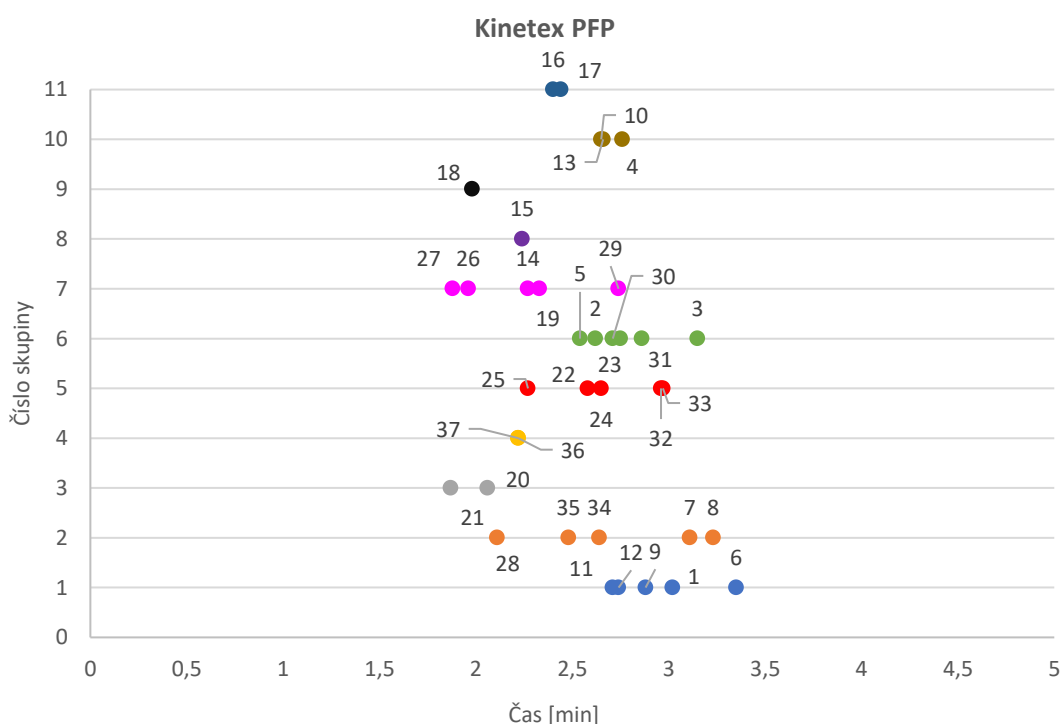
Na této stacionární fázi nedošlo k eluci všech analytů. Látka **25** (DHEA-S,  $m/z$  390) nebyla v průběhu tohoto gradientu eluována. Pokryto bylo však pouze 1,5 min separačního prostoru. Separace na koloně CSH Fluoro-Phenyl ukázala 28 kritických látek, což je nejvyšší počet v porovnání s ostatními testovanými kolonami. Zároveň došlo i k výraznému zhoršení separace sloučenin ve skupinách 2, 5, 6 a 7 (Obrázek 26).



**Obrázek 26:** UHPLC separace na koloně CSH Fluoro-Phenyl za pomoci generické gradientové eluce. Barevně jsou odlišeny jednotlivé skupiny analytů.

## Výsledky separace na koloně Kinetex PFP

Separace na koloně Kinetex PFP poskytla 21 kritických látek. Tímto počtem se kolona dostala na pozici 3. nejlepší kolony. Nicméně obecně poskytovala podstatně nižší selektivitu než kolona BEH C18 (100 mm). Zlepšení selektivity bylo pozorováno u skupiny 1 pro analyty **9** (20 $\alpha$ -OH-P,  $m/z$  316), **11** (THDOC,  $m/z$  334) a **12** (Allo-THDOC,  $m/z$  334) a skupiny 7 pro analyty **14** (CORT (B),  $m/z$  346) a **19** (21-dF (S),  $m/z$  346). Na druhou stranu separace analytů ve skupinách 5 a 6 byla zhoršena (Obrázek 27).

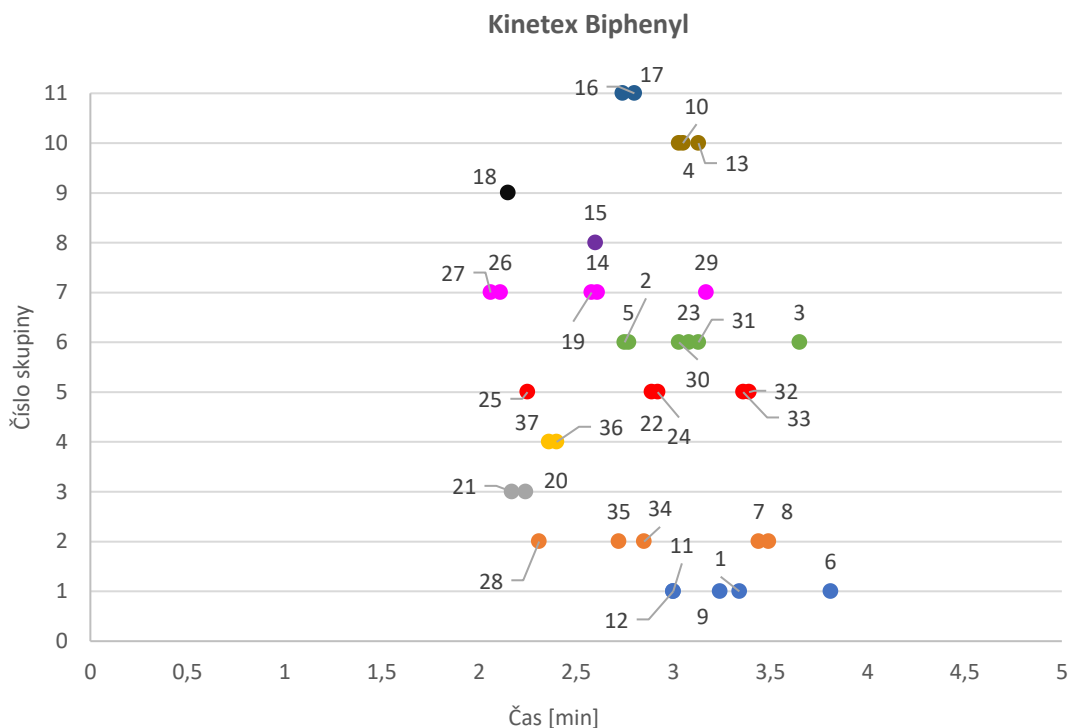


**Obrázek 27:** UHPLC separace na koloně Kinetex PFP za pomoci generické gradientové eluce. Barevně jsou odlišeny jednotlivé skupiny analytů.



## Výsledky separace na koloně Kinetex Biphenyl

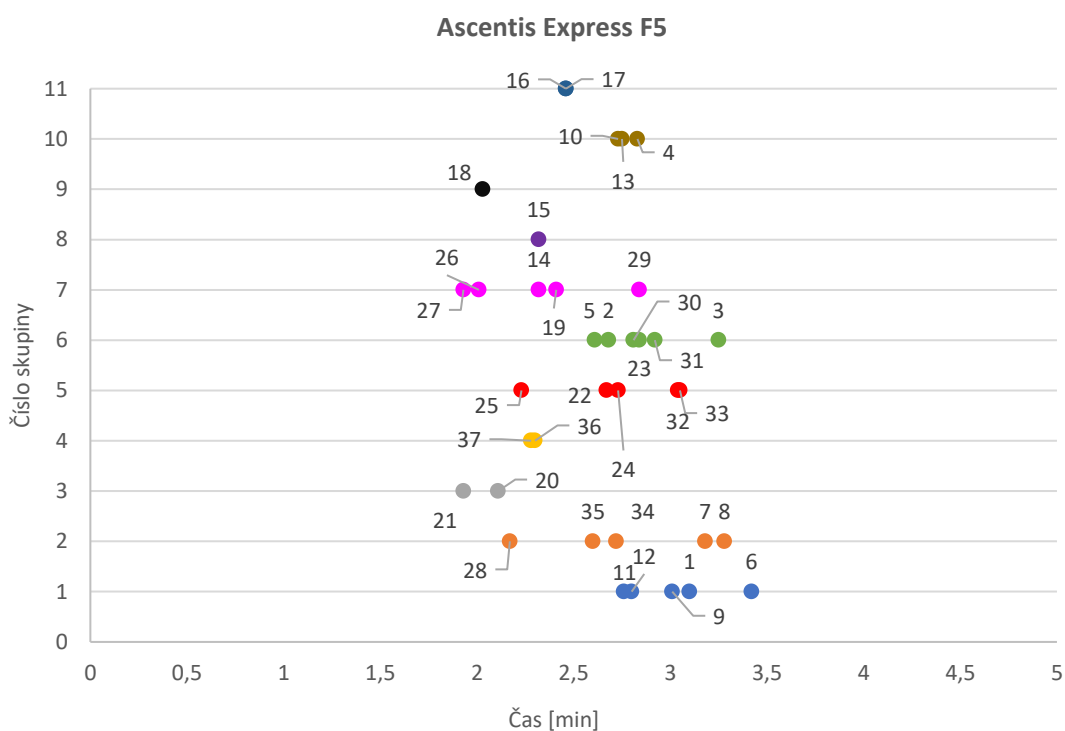
Tato kolona poskytovala nejhorší selektivitu v porovnání s testovanými kolonami. Pro tuto kolonu bylo zaznamenáno celkem 28 kritických látek a eluce všech látek proběhla v dvouminutovém separačním prostoru. Zároveň byla pro téměř všechny skupiny látek pozorována podstatně horší separace než na ostatních kolonách (Obrázek 28).



**Obrázek 28:** UHPLC separace na koloně Kinetex Biphenyl za pomoci generické gradientové eluce. Barevně jsou odlišeny jednotlivé skupiny analytů.

## Výsledky separace na koloně Ascentis Express F5

Separace na koloně Ascentis Express F5 ukázala 26 kritických látek a všechny látky byly eluovány v průběhu dvou minut. Na základě selektivity je možné danou kolonu zařadit mezi méně vhodné. Velmi nízká selektivita byla pozorována zejména pro skupinu 5 a 6. Naopak poskytovala nejlepší separaci sloučenin **14** (CORT (B),  $m/z$  346) a **19** (21-dF (S),  $m/z$  346) a zároveň v porovnání s kolonou BEH C18 (100 mm) byly lépe separovány sloučeniny řazené ve skupině 1 (Obrázek 29).



**Obrázek 29:** UHPLC separace na koloně Ascentis Express F5 za pomoci generické gradientové eluce. Barevně jsou odlišeny jednotlivé skupiny analytů.

### 5.2.2. Optimalizace gradientového profilu mobilní fáze na C18 kolonách

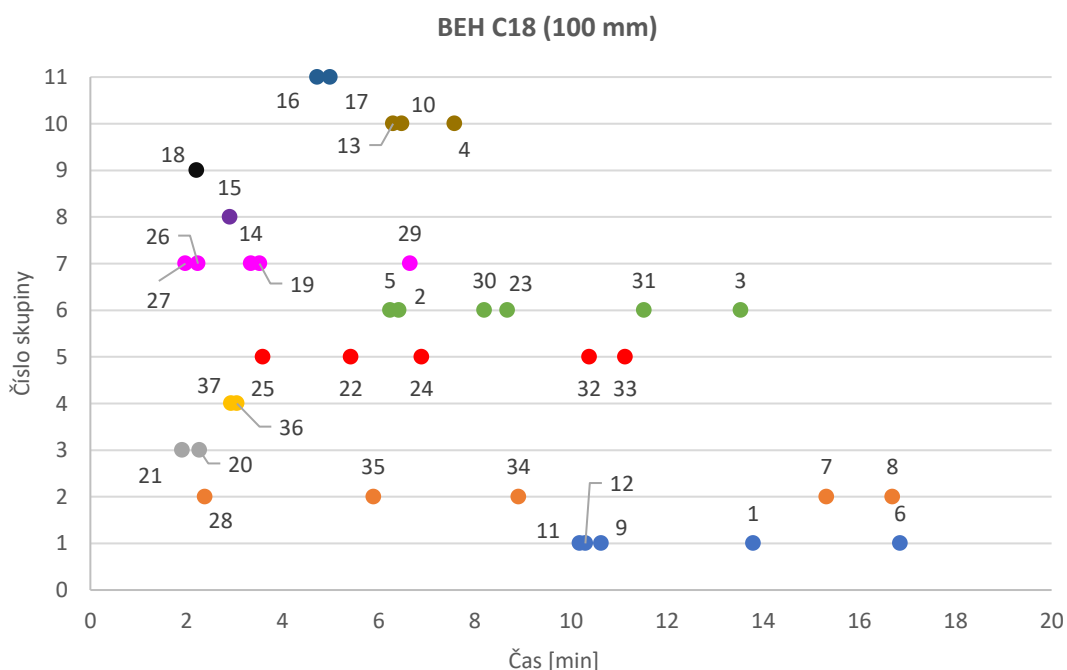
Cílem optimalizace gradientového profilu bylo získat úplnou separaci všech kritických sloučenin. Při optimalizaci se vycházelo z výsledku screeningu uvedeného v předchozí kapitole. Na základě nadějně separace na koloně BEH C18 (100 mm) byly do optimalizace gradientové profilu zařazeny další kolony s C18 řetězcem: (Cortecs UPLC C18 (1,6  $\mu\text{m}$ , 150 x 2,1 mm), Acquity UPLC BEH C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 150 mm), Acquity UPLC CSH C18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm) a Acquity UPLC Shield RP18 (1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 x 100 mm). Protože v rámci screeningu bylo pro většinu kolon dosaženo velmi úzkého separačního prostoru (1,5 - 2,5 min), byla provedena optimalizace gradientového profilu. Počáteční (95/5, A/B) a konečné (5/95, A/B) složení mobilní fáze zůstalo stejné, pouze byl vložen krátký izokratický krok u kolon s nejlepšími separačními výsledky, a to z důvodu eluce kontaminant matrice. Po prvním izokratickém kroku následoval strmý gradient na vyšším procentu složky B, okolo 50 %. Separace většiny analytů probíhala za použití velmi plochého gradientu v rozsahu cca 20 % změny složení mobilní fáze. Poté opět následoval strmý gradient a konečný izokratický krok. Zcela zásadní bylo najít vhodné složení mobilní fáze pro využití plochého gradientu k separaci kritických párů. Zároveň byla analýza prodloužena, v některých případech až na 20 min včetně ekvilibrace kolony.

## Optimalizace gradientového profilu mobilní fáze na koloně BEH C18 (100 mm)

Na této koloně byly provedeny desítky různých pokusů o úplnou separaci. Nejprve byl upravován počátek plochého gradientu. Jako neoptimálnější se nakonec pro tuto kolonu ukázal počátek 30 % ACN. Bylo zjištěno, že můžeme zvýšit míru průtoku a to z 0,5 na 0,6 ml/min. Zkoušen byl různý průběh gradientové křivky a izokratické mezikroky. Doba analýzy byla prodloužena až na dvacet minut včetně ekvilibrace. I přes veškeré snahy se na nejlepší metodě nepodařilo úplně separovat 6 analytů, dvojice **10** (11 $\beta$ -OH-P,  $m/z$  330) a **13** (11-DOC,  $m/z$  330), **11** (THDOC,  $m/z$  334) a **12** (Allo-THDOC,  $m/z$  334), **36** (DEXA,  $m/z$  392) a **37** (BETA,  $m/z$  392), Obrázek 30.

**Tabulka 16:** Gradientový profil nejlepší separace na koloně BEH C18 (100 mm).

Krok	Čas změny (min)	Průtok (ml/min)	% A	% B	Křivka
1	Začátek analýzy	0,60	95	5	Začátek
2	0,5	0,60	95	5	6
3	1,0	0,60	70	30	6
4	16,0	0,60	55	45	7
5	17,0	0,60	5	95	6
6	18,0	0,60	5	95	6
7	18,1	0,60	95	05	6
8	20,0	0,60	95	05	6



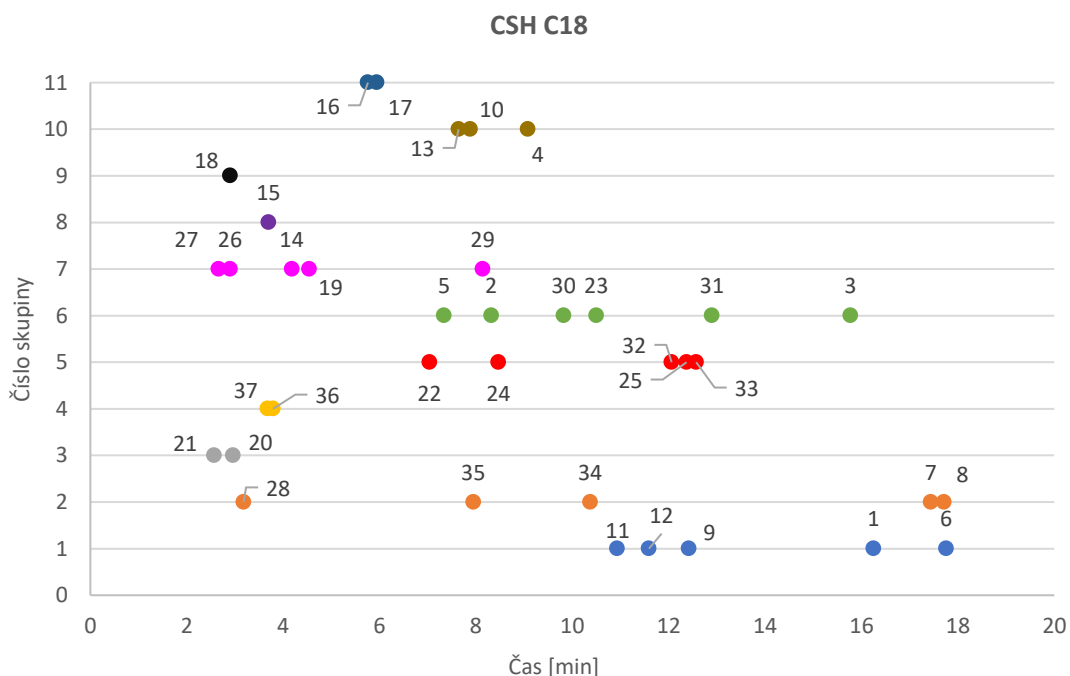
**Obrázek 30:** Nejlepší separace na koloně BEH C18 (100 mm). Barevně jsou odlišeny jednotlivé skupiny analytů.

## Optimalizace gradientového profilu mobilní fáze na koloně CSH C18

Na této koloně byl nastaven začátek plochého gradientu na 30 % ACN. Pro některé analýzy byl posunut na 35 % ACN. Byla zkoušena gradientová křivka 9. Všechny analýzy provedené na této koloně byly dvacetiminutové včetně ekvilibrace. Byly vkládány i izokratické kroky. Pomocí optimální metody se nepodařilo separovat 4 analyty, páry **36** (DEXA,  $m/z$  392) a **37** (BETA,  $m/z$  392), **16** ( $5\alpha$ -DHB,  $m/z$  348) a **17** ( $5\beta$ -DHB,  $m/z$  348), Obrázek 31.

**Tabulka 17:** Gradientový profil nejlepší separace na koloně CSH C18.

Krok	Čas změny (min)	Průtok (ml/min)	% A	% B	Křivka
1	Začátek analýzy	0,30	95	5	Začátek
2	0,5	0,30	95	5	6
3	1,0	0,30	65	35	6
4	4,0	0,30	65	35	6
5	16,0	0,30	55	45	6
6	17,0	0,30	5	95	6
7	18,0	0,30	5	95	6
8	18,0	0,30	95	5	6
9	20,0	0,30	95	5	6



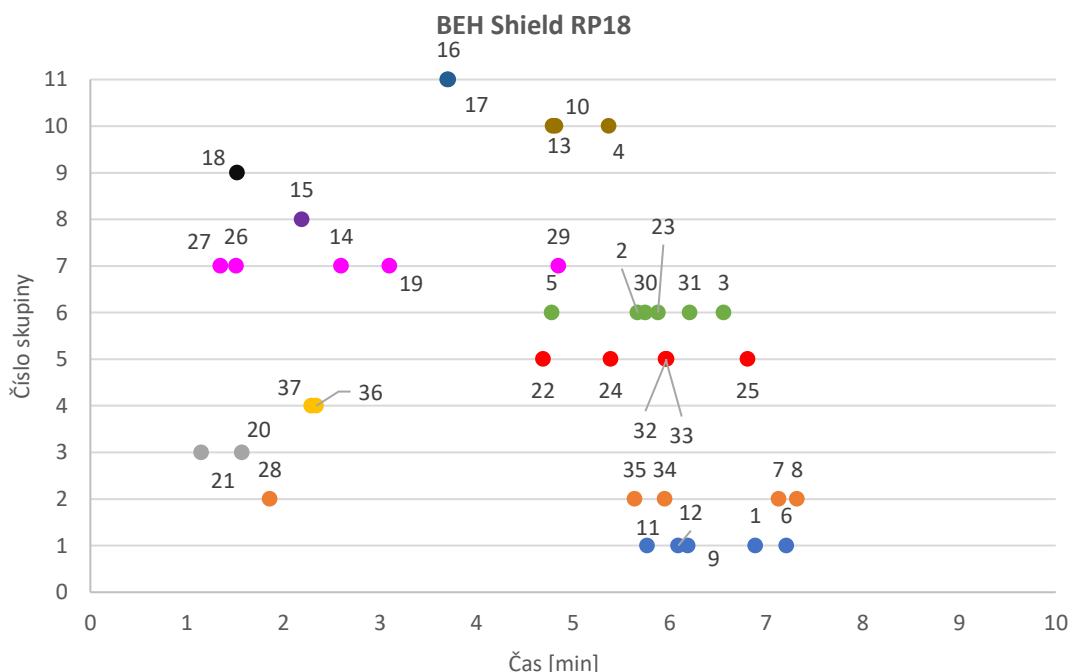
**Obrázek 31:** Nejlepší separace na koloně CSH C18. Barevně jsou odlišeny jednotlivé skupiny analytů.

## Optimalizace gradientového profilu mobilní fáze na koloně BEH Shield RP18

Na této koloně byl posunut začátek gradientu až k 30 % ACN. Všechny zkoušené analýzy byly desetiminutové. Byly testovány různé profily gradientové křivky. Pro dvě analýzy byly vloženy i izokratické kroky. Nicméně i pomocí optimální metody se nepodařilo separovat 10 analytů (**36** (DEXA,  $m/z$  392) a **37** (BETA,  $m/z$  392), **16** (5 $\alpha$ -DHB,  $m/z$  348) a **17** (5 $\beta$ -DHB,  $m/z$  348), **10** (11 $\beta$ -OH-P,  $m/z$  330) a **13** (11-DOC,  $m/z$  330), **32** (5 $\alpha$ -dion,  $m/z$  288) a **33** (5 $\beta$ -dion,  $m/z$  288), **2** (17 $\alpha$ -OH-Preg,  $m/z$  332) a **30** (EpiAST,  $m/z$  290), Obrázek 32. Vzhledem k množství neseparovaných analytů i při desetiminutové analýze nebyla gradient časově prodlužován a kolona byla určena jako nevhodná.

**Tabulka 18:** Gradientový profil nejlepší separace na koloně BEH Shield RP18.

Krok	Čas změny (min)	Průtok (ml/min)	% A	% B	Křivka
1	Začátek analýzy	0,50	70	30	Začátek
2	8,0	0,50	5	95	8
3	8,1	0,50	70	30	6
4	10,0	0,50	70	30	6



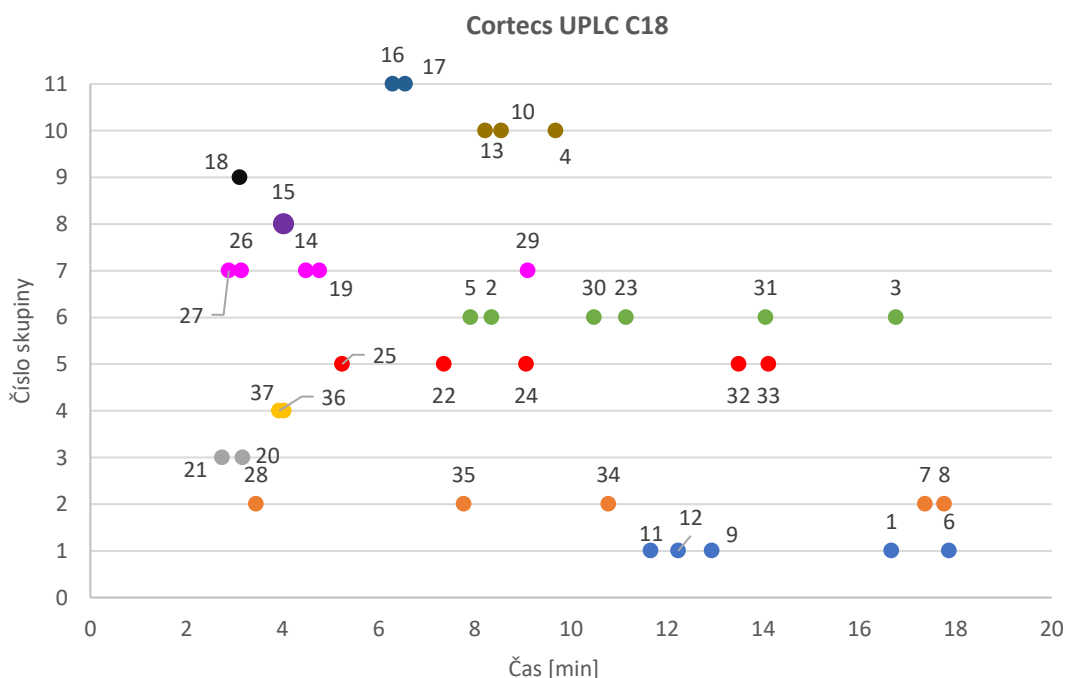
**Obrázek 32:** Nejlepší separace na koloně BEH Shield RP18. Barevně jsou odlišeny jednotlivé skupiny analytů.

## Optimalizace gradientového profilu mobilní fáze na koloně Cortecs UPLC C18

Separace na této koloně dosáhla nejlepších výsledků. Byla zde vybrána také finální metoda. Bylo zjištěno, že optimální počátek plochého gradientu je na 35 % ACN a před ním byl vložen také isokratický krok při těchto podmínkách. Nejproblematictější byla separace dvojice **36** (DEXA,  $m/z$  392) a **37** (BETA,  $m/z$  392). Nicméně se podařilo i tyto látky nakonec téměř úplně separovat. Separace je zobrazena na Obrázcích 33. Výsledný chromatogram změřený za optimálních podmínek je na Obrázku 35.

**Tabulka 19:** Gradientový profil nejlepší dosažené separace na koloně Cortecs UPLC C18.

Krok	Čas změny (min)	Průtok (ml/min)	% A	% B
1	Začátek analýzy	0,30	95	5
2	0,5	0,30	95	5
3	1,0	0,30	65	35
4	4,0	0,30	65	35
5	15,0	0,30	55	45
6	16,0	0,30	40	60
7	17,0	0,30	5	95
8	18,0	0,30	5	95
9	18,1	0,30	95	5
10	20,0	0,30	95	5



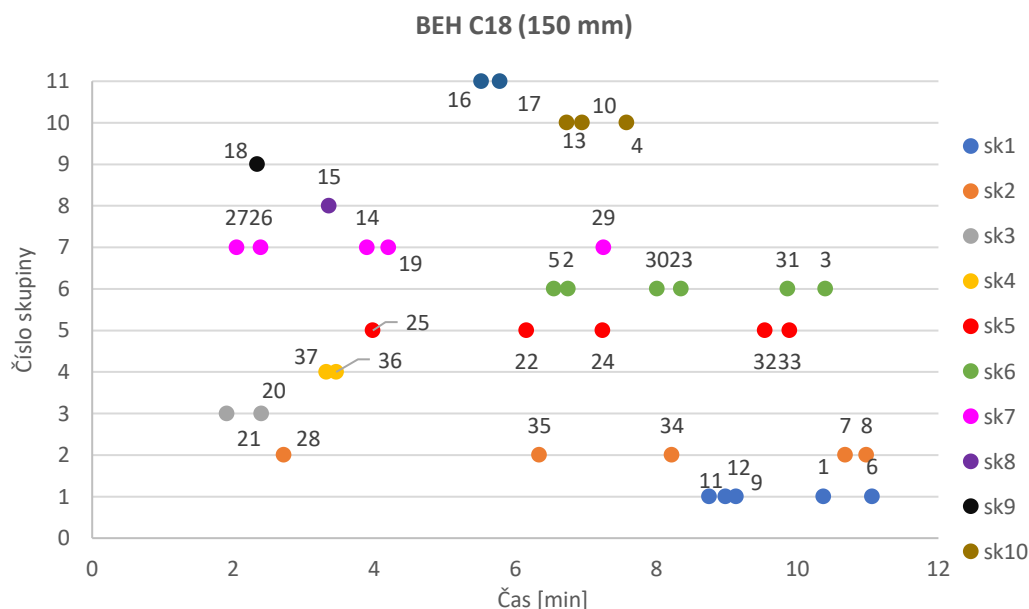
**Obrázek 33:** Nejlepší separace na koloně Cortecs C18. Barevně jsou odlišeny jednotlivé skupiny analytů.

## Optimalizace gradientového profilu mobilní fáze na koloně BEH C18 (150 mm)

Tato kolona byla do optimalizace zahrnuta na základě dobré separace na BEH C18 (100 mm). Byl testován vliv délky kolony. Z důvodu vysokého tlaku, musel být snížen průtok mobilní fáze na 0,3 ml/min. Začátek plochého gradientu byl posunut k hodnotám mezi 30–40 % ACN. Nejlepší na této koloně byla dvanáctiminutová metoda. Problematickými byly sloučeniny **36** (DEXA,  $m/z$  392) a **37** (BETA,  $m/z$  392), které se podařilo téměř separovat, bohužel na úkor separace sloučenin **9** ( $20\alpha$ -OH-P,  $m/z$  316) a **12** (Allo-THDOC,  $m/z$  334). Nepodařilo se tedy separovat 4 analyty, Obrázek 34. Protože nebylo dosaženo lepších výsledků než na Cortecs C18, nebyly vloženy isokratické kroky na počátku a na konci gradientu.

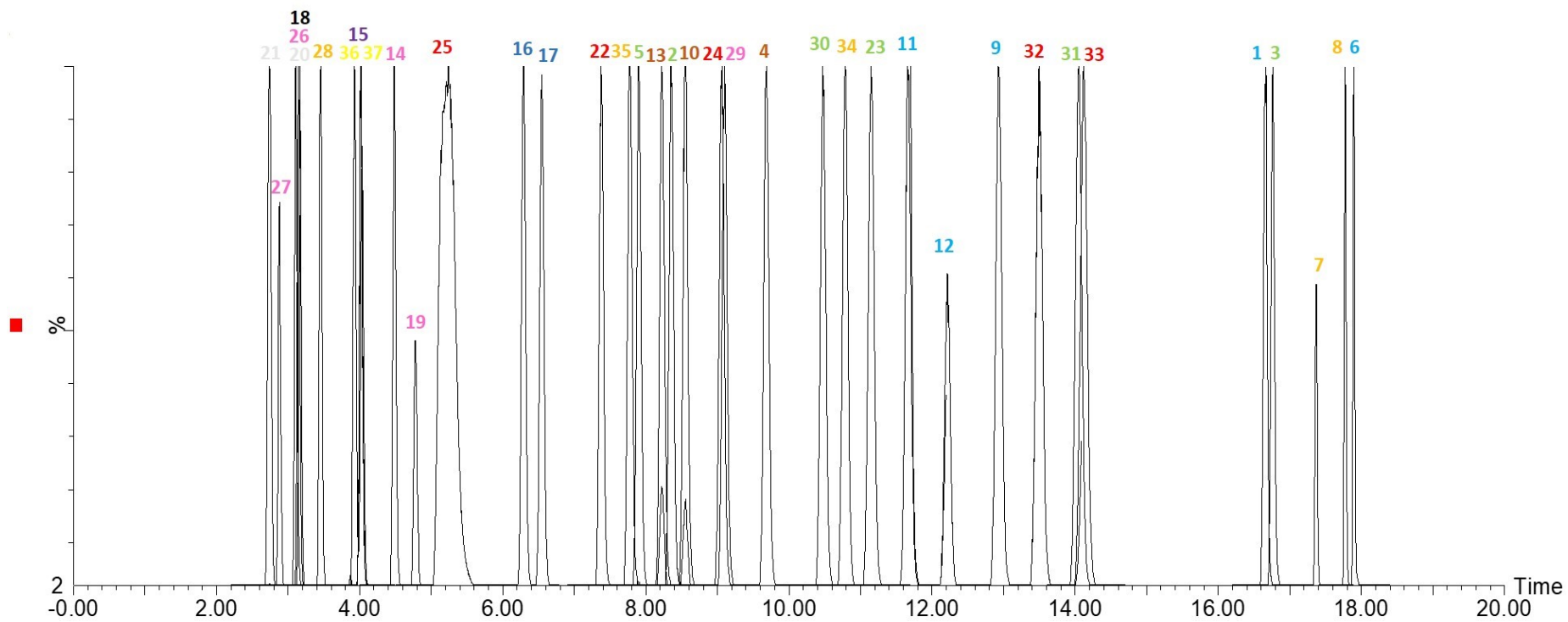
**Tabulka 20:** Gradientový profil nejlepší separace na koloně BEH C18 (150 mm).

Krok	Čas změny (min)	Průtok (ml/min)	% A	% B	Křivka
1	Začátek analýzy	0,30	65	35	Začátek
2	2,5	0,30	65	35	6
3	8,5	0,30	49	51	6
4	10,0	0,30	5	95	6
5	10,1	0,30	70	30	6
6	12,0	0,30	70	30	6



**Obrázek 34:** Nejlepší separace na koloně BEH C18 (150 mm). Barevně jsou odlišeny jednotlivé skupiny analytů.





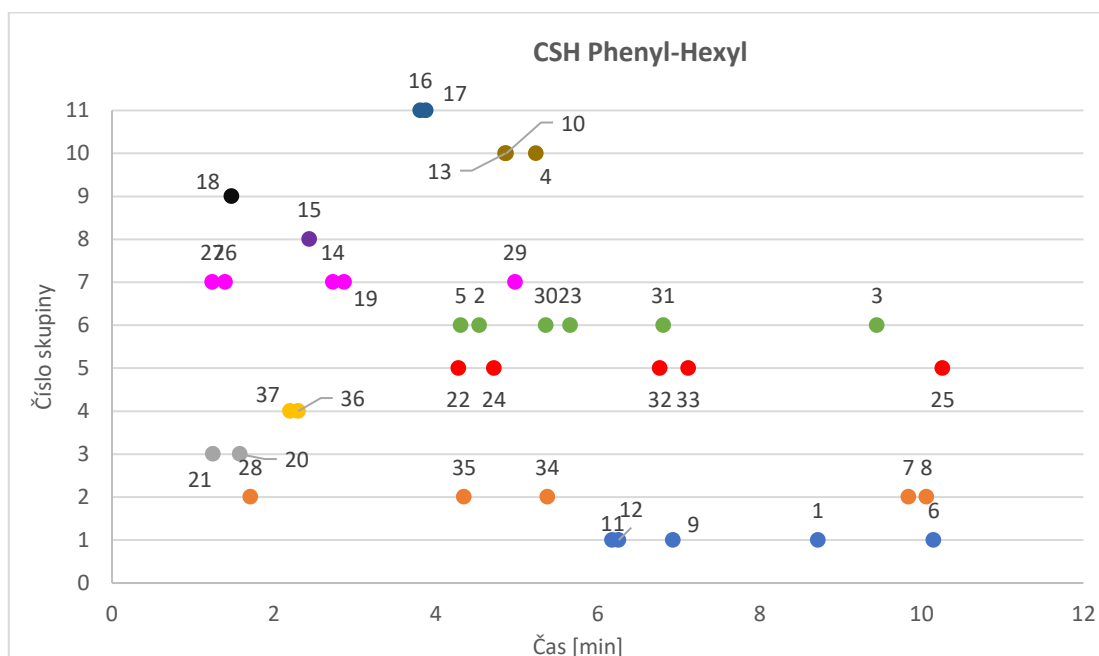
**Obrázek 35:** Chromatogram pomocí finální metody na koloně Cortecs C18. Barevné označení sloučenin odpovídá bodovým grafům.

### 5.2.3. Optimalizace gradientového profilu mobilní fáze na ostatních kolonách

Na základě optimalizace gradientové profilu na C18 kolonách byla vybrána optimální metoda pro separaci analytů na koloně Cortecs C18. Nicméně vzhledem k problematické separaci látek **36** (DEXA,  $m/z$  392) a **37** (BETA,  $m/z$  392), byl gradientový profil optimalizován na dalších kolonách. Při výběru kolon se vycházelo z prvotního screeningu a nejlepší separace výše zmíněné dvojice analytů.

#### Optimalizace gradientového profilu mobilní fáze na koloně CSH Phenyl-Hexyl

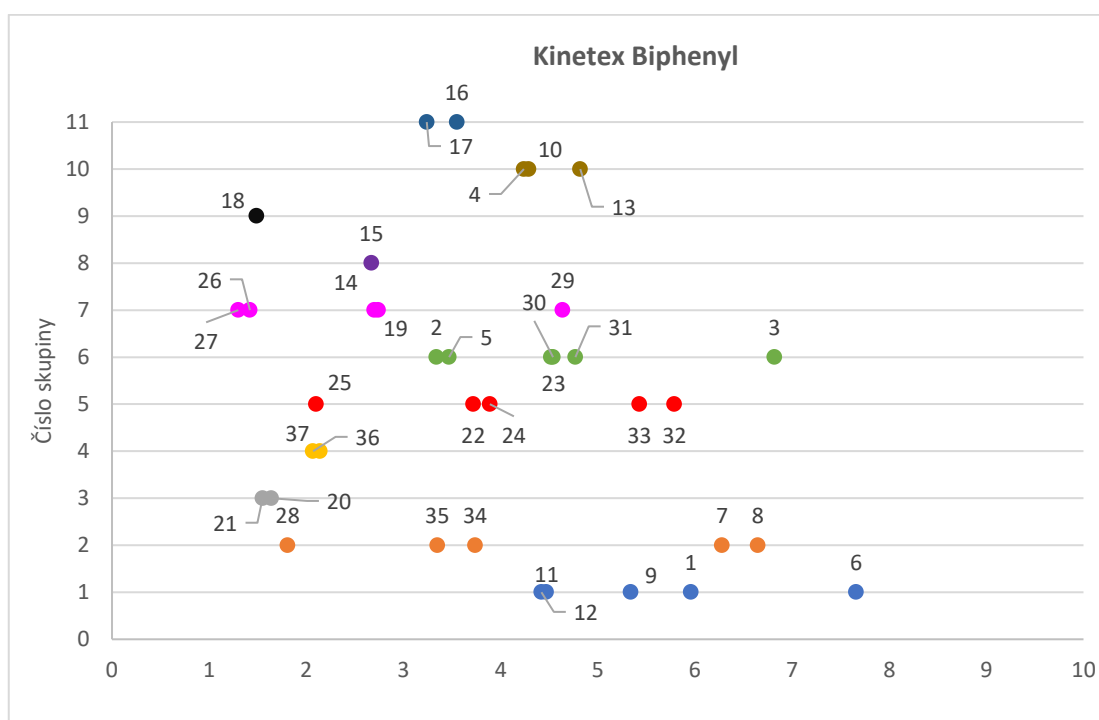
Tato kolona byla určena jako méně vhodná už po primárním screeningu. Nicméně bylo zkoušeno, zda-li se podaří problematickou látku této kolony **25** (DHEA-S,  $m/z$  390) vyeluovat blíže k ostatním analytům a dosáhnout lepší separace pro analyty **36** (DEXA,  $m/z$  392) a **37** (BETA,  $m/z$  392). Počátek gradientu byl posunut na 25 – 30 % ACN. Byly zkoušeny různé profily gradientové křivky. Látku **25** (DHEA-S,  $m/z$  390) se podařilo retenčním časem přiblížit ostatním analytům, bohužel na úkor jejich separace. I přes veškeré snahy při úpravě gradientu se nepodařilo separovat 10 sloučenin.



**Obrázek 36:** Nejlepší separace na koloně CSH Phenyl-Hexyl. Barevně jsou odlišeny jednotlivé skupiny analytů.

## Optimalizace gradientového profilu mobilní fáze na koloně Kinetex Biphenyl

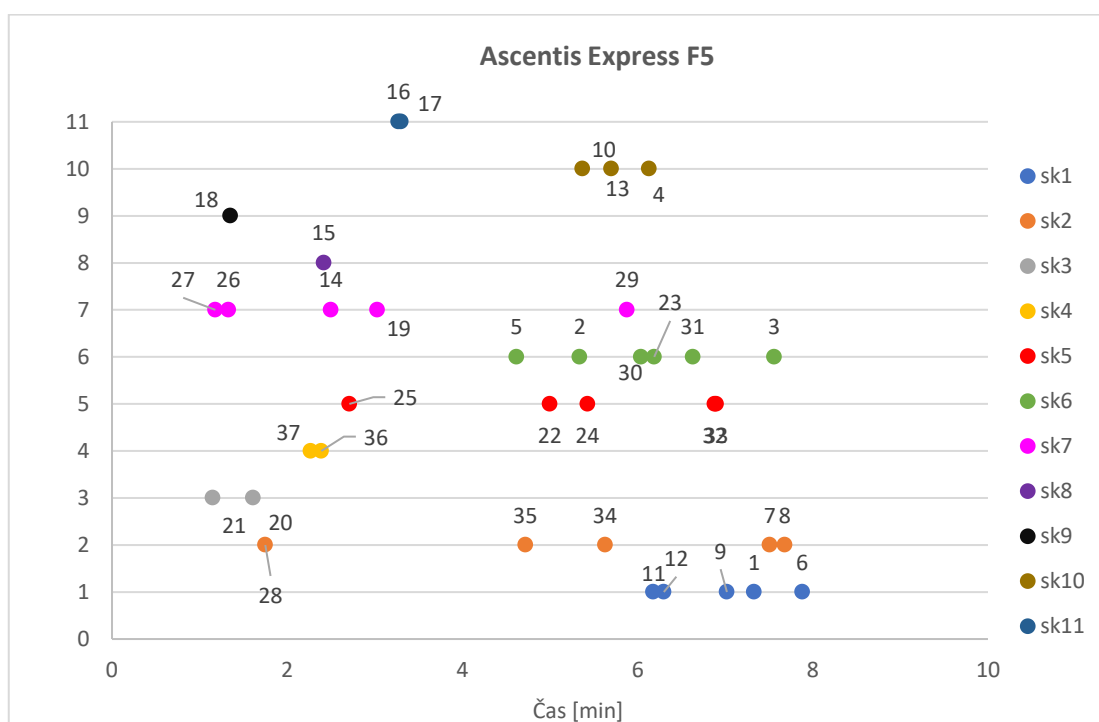
U této kolony byl počátek plochého gradientu posunut na 25% ACN. Separace byla zkoušena navzdory špatným výsledkům již při screeningu. Na této koloně byla zkoušena také změna teploty na koloně z 40 na 50 °C. Tato změna zlepšila separaci látek při užití stejného gradientu. Bohužel ani tento krok nedokázal separaci zlepšit natolik, aby nezůstalo neseparovaných 14 analytů (**36** (DEXA,  $m/z$  392) a **37** (BETA,  $m/z$  392), **14** (CORT (B),  $m/z$  346) a **19** (21-dF (S),  $m/z$  346) a **11** (THDOC,  $m/z$  334) a **12** (Allo-THDOC,  $m/z$  334), **4** (17 $\alpha$ -OH-P,  $m/z$  330) a **10** (11 $\beta$ -OH-P,  $m/z$  330), **26** (7 $\alpha$ -OH-DHEA,  $m/z$  304) a **27** (7 $\beta$ -OH-DHEA,  $m/z$  304), **23** (5 $\alpha$ -DHT,  $m/z$  290) a **30** (EpiAST,  $m/z$  290), **20** (E,  $m/z$  360) a **21** (ALDO,  $m/z$  360)).



**Obrázek 37:** Nejlepší separace na koloně Kinetex Biphenyl. Barevně jsou odlišeny jednotlivé skupiny analytů.

## Optimalizace gradientového profilu mobilní fáze na koloně Ascentis Express F5

Největší problém na této koloně byla separace páru **16** (5 $\alpha$ -DHB,  $m/z$  348) a **17** (5 $\beta$ -DHB,  $m/z$  348). Vzhledem k nedostatečnému pokroku v separaci i po prodloužení analýzy a úpravách gradientu byla tato kolona uzavřena jako nevhodná, jelikož skupina látek **16** (5 $\alpha$ -DHB,  $m/z$  348) a **17** (5 $\beta$ -DHB,  $m/z$  348) zůstala prakticky neseparovaná. Další neseparované analyty na této koloně byly páry **36** (DEXA,  $m/z$  392) a **37** (BETA,  $m/z$  392); **26** (7 $\alpha$ -OH-DHEA,  $m/z$  304) a **27** (7 $\beta$ -OH-DHEA,  $m/z$  304), a **11** (THDOC,  $m/z$  334) a **12** (Allo-THDOC,  $m/z$  334).



**Obrázek 38:** Nejlepší dosažená separace na koloně Ascentis Express F5. Barevně jsou odlišeny látky v různých skupinách.

### 5.3. Optimalizace úpravy vzorku

Jako vhodná úprava vzorku byla vybrána proteinová precipitace společně s odpařením a rekonstitucí ve vhodném rozpouštědle.

#### 5.3.1. Optimalizace složení rekonstitučního činidla a teploty odpaření vzorku

Optimalizací složení rekonstitučního činidla bylo zjištěno, že optimální složení činidla je 50 % ACN. Výtěžnost analytů byla pro všechna testovaná činidla obdobná. Výběr optimálního složení byl tedy ovlivněn zejména tvarem píků jednotlivých analytů, které se zhoršovaly u většiny látek při vyšším podílu ACN v rekonstitučním činidle, zejména při 70 % a 80 % ACN.

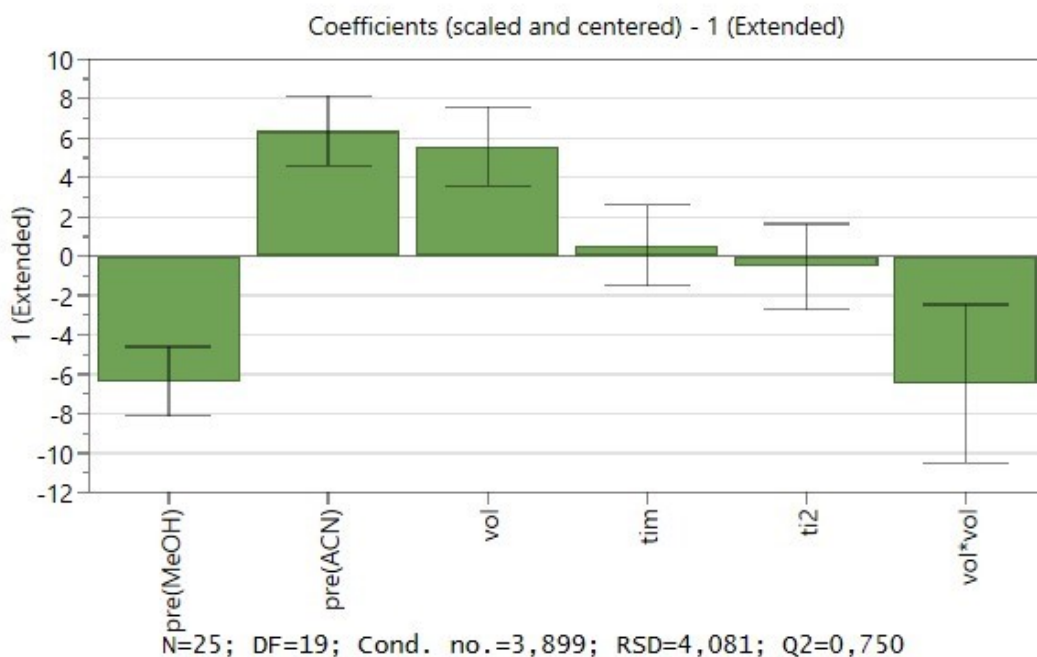
V průběhu optimalizace teploty odpaření ve vakuové odparce byla potvrzena teplotní stabilita jednotlivých látek, tedy se změnou teploty nedocházelo k poklesu výtěžnosti. Z tohoto důvodu rozhodujícím faktorem pro výběr optimální teploty byla časová úspora při zvolené teplotě 60 °C.

#### 5.3.2. Optimalizace postupu proteinové precipitace

Optimalizace postupu proteinové precipitace byla provedena za pomoci programu MODDE, který na základě testovaných parametrů a jejich rozmezí hodnot vygeneroval návrh celého experimentu, Tabulky 10 v kapitole 4.8.3. Naměřená data byla v daném programu také statisticky zpracována. Hodnocen byl vliv jednotlivých faktorů, vhodnost modelu, pravděpodobnost a opakovatelnost. Z daných výsledků byly vybrány 4 nejvhodnější metody, které byly vzájemně znovu porovnány, a vybrán optimální postup PP.

### Vlivů jednotlivých faktorů

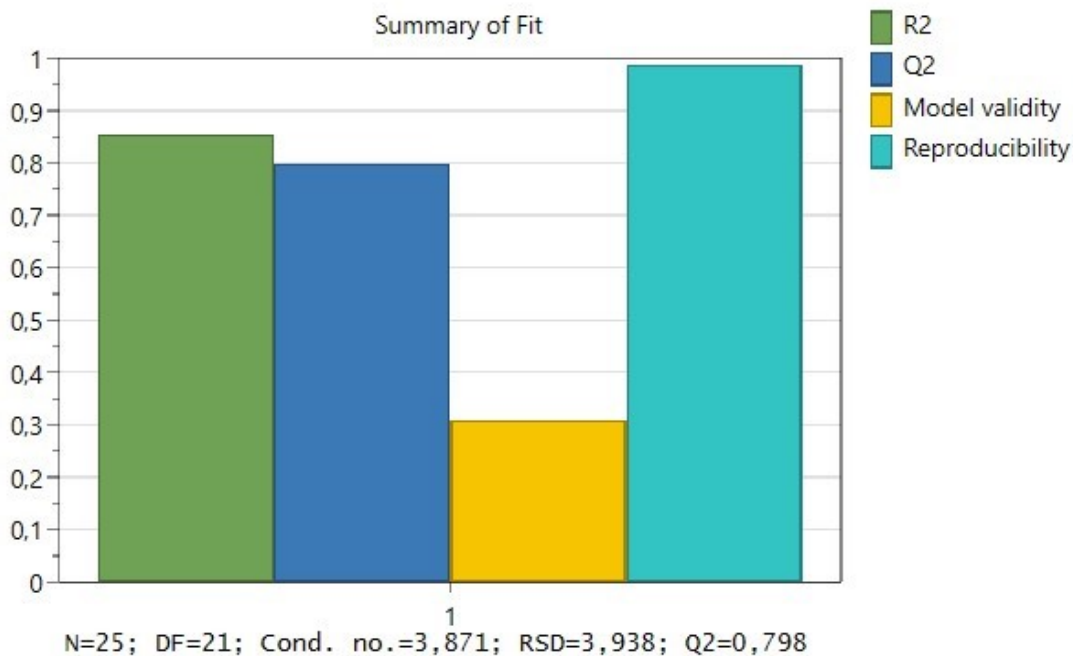
Testovány byly 4 faktory, typ a objem precipitačního činidla, čas precipitace a centrifugace. Na základě krabicového grafu (Obrázek 39) byly vybrány významné a nevýznamné faktory individuálně pro každou látku. Míra významnosti je znázorněna výškou sloupce a mírou nejistoty. Významný je tedy faktor, kdy výška sloupce daného faktoru dosahuje co nejvzdálenějších kladných nebo záporných hodnot od  $y=0$ , a zároveň křivka rozsahu nejistoty neprotíná  $y=0$ . Naopak nesignifikantním parametrem je takový, jehož výška sloupce se blíží hodnotě  $y=0$  a křivka nejistoty protíná  $y=0$ . Z Obrázku 39 je patrné, že významnými faktory jsou druh a objem precipitačního činidla. Na druhou stranu faktory čas precipitace a centrifugace jsou nevýznamné a mohou být vyřazeny [57].



**Obrázek 39:** Krabicový graf pro analyt. První dva sloupečky odpovídají typu precipitačního činidla a 3. sloupeček jeho objemu. 4. sloupeček odpovídá času precipitace a 5. sloupeček času centrifugace.

## Vhodnost modelu

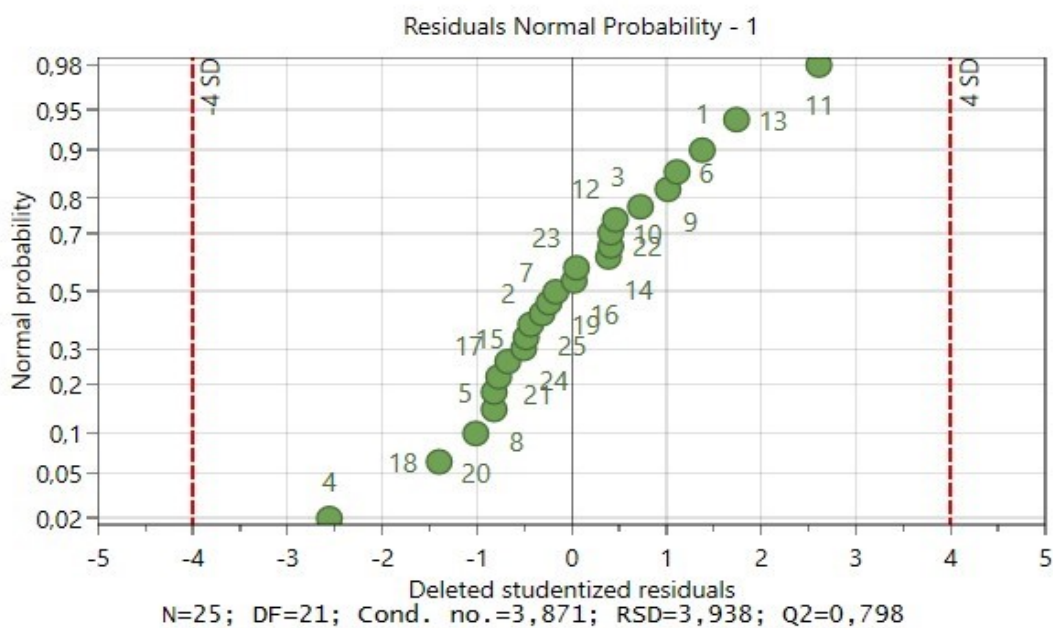
Vhodnost modelu je hodnocena na základě čtyř parametrů, koeficientu determinace (R<sup>2</sup>), odhadu budoucí predikce (parametr Q<sup>2</sup>), hodnotě validity metody a reprodukovatelnosti, Obrázek 40. Všechny parametry mohou nabývat hodnot 0 – 1. Koeficient determinace vypovídá o tom, zda naměřená data korelují s daným modelem. Pro dobrý model by tento parametr měl mít hodnotu vyšší jak 0,5. Odhad budoucí predikce, parametr Q<sup>2</sup>, by měl pro významný model nabývat hodnot vyšších jak 0,1 a pro dobrý model hodnot vyšších jak 0,5. Zároveň by pro dobrý model rozdíl mezi parametry R<sup>2</sup> a Q<sup>2</sup> neměl být vyšší než 0,3. O statistické významnosti modelu vypovídá hodnota validity metody, která musí být vyšší než 0,25. Hodnota pod 0,25 značí statistické problémy s modelem. Posledním hodnotícím parametrem je reprodukovatelnost, která porovnává rozptyl v měření replikátů (experimenty se stejnými parametry měření) a celkovou variabilitu experimentu. Parametr by měl nabývat hodnot 0,5 a více. Na základě Obrázku 40 lze konstatovat, že daný model je vhodný pro zadaný experiment [57].



**Obrázek 40:** Graf vhodnosti modelu pro sloučeninu **1** (Preg, *m/z* 316).

## Graf pravděpodobnosti

Graf znázorňuje jednotlivé experimenty. Při optimálním modelu tyto body leží na přímce, která značí optimální polohu bodů vzhledem k zadanému experimentu. V případě, že by bod ležel za hranicemi  $\pm 4$  násobku SD, lze ho z měření vyloučit, jelikož poloha těchto bodů je statisticky tak nepravděpodobná, že jsou pravděpodobně chybou [57].

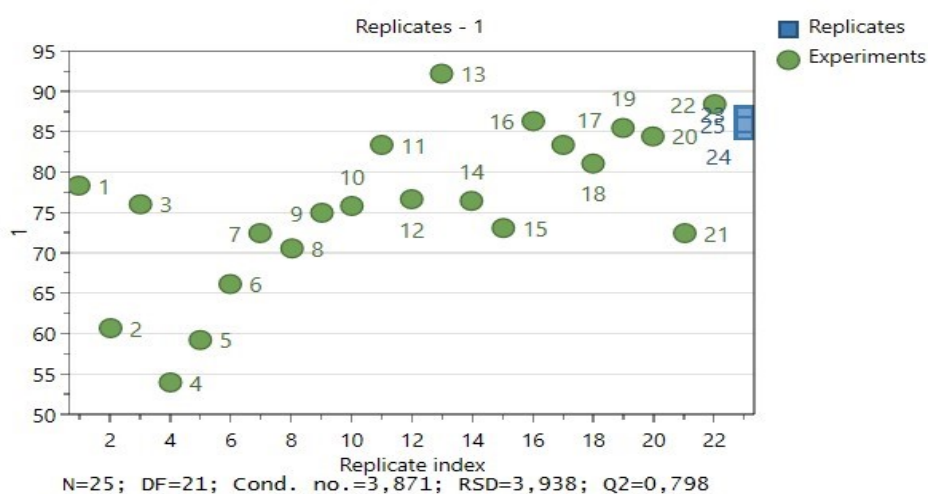


**Obrázek 41:** Graf pravděpodobnosti modelu pro analyt 1 (Preg,  $m/z$  316).



## Opakovatelnost

Na tomto grafu je znázorněna variabilita jednotlivých experimentů. Zelené body znázorňují experimenty měřené za odlišných podmínek. Modrými čtverečky jsou označeny experimenty se stejnými experimentálně měřenými podmínkami. Variabilita těchto tří experimentů by měla být nižší než celková variabilita. Na základě Obrázku 42 lze říci, že daný model poskytuje dobrou opakovatelnost, jelikož se modré čtverečky nachází blízko u sebe [57].



**Obrázek 42:** Graf opakovatelnosti pro analyt **1** (Preg,  $m/z$  316).

## Výběr optimální metody

Na základě naměřených údajů bylo zjištěno, že analýza bude nejvíce ovlivňovat objem činidla a to vlivem 97 %. Naopak čas precipitace a centrifugace se ukázal jako nevýznamný faktor. Pomocí programu MODDE bylo provedeno statistické vyhodnocení a navrhl dva postupy PP, Metoda 1 a 2, Tabulka 21. Protože tyto postupy poskytovaly velmi nízkou výtěžnost u sloučeniny **6** ( $5\alpha$ -DHP,  $m/z$  316) a velmi vysokou výtěžnost pro sloučeninu **14** CORT (B),  $m/z$  346), byly navrženy tři metody zohledňující tento faktor, Metoda 3 – 5, Tabulce 21. Nebylo možné navrhnout postup, který by významně zlepšil výtěžnost těchto analytů.

**Tabulka 21:** PP metody navržené programem MODDE

	Metoda 1	Metoda 2	Metoda 3	Metoda 4	Metoda 5
<b>Druh PP činidla</b>	ACN	ACN	MeOH	MeOH	MeOH
<b>Objem PP činidla [ml]</b>	1000,00	866,00	1000,00	1000,00	1000,00
<b>Čas precipitace [min]</b>	30,00	30,00	5,00	30,00	30,00
<b>Čas centrifugace [min]</b>	5,00	9,00	30,00	13,00	30,00

Dalším a velice významným faktorem posuzování výsledků byl celkový čas metody. Čas centrifugace se ukázal pro analýzu jako zanedbatelný faktor. Čas precipitace měl vliv přibližně 3 % a tak mohl být zkrácen na minimum. U jediné sloučeniny **25** (DHEA-S, *m/z* 390) spadl výtěžek na 60 % svého maxima.

Na základě všech předešlých výsledků byly vybrány 4 metody, které byly podrobeny další analýze. Tyto metody jsou uvedeny v Tabulce 22. Metody 6 a 7 byly zvoleny pro porovnání rozdílu výtěžností při dlouhém a krátkém času precipitace. Metoda 8 byla zvolena pro porovnání s Metodou 6 ohledně výtěžnosti při použití menšího objemu precipitačního činidla. Metoda 9 byla vložena pro porovnání typu precipitačního činidla.

**Tabulka 22:** Vybrané PP metody pro ověření vlivu jednotlivých parametrů.

	Metoda 6	Metoda 7	Metoda 8	Metoda 9
<b>Precipitační činidlo</b>	ACN	ACN	ACN	MeOH
<b>Objem precipitačního činidla [ml]</b>	1000,00	1000,00	850,00	1000,00
<b>Čas precipitace [min]</b>	10,00	30,00	10,00	5,00
<b>Čas centrifugace [min]</b>	5,00	5,00	5,00	10,00

Jako nejlepší metoda byla vyhodnocena Metoda 6. Prodloužení času precipitace nemělo významný vliv na výtěžnost, proto z časové úspornosti byla zvolena metoda s kratší dobou precipitace. Při snížení objemu ACN došlo k poklesu výtěžnosti. Metoda, při které byl jako precipitační činidlo zvolen MeOH dosáhla výsledků značně horších.

#### 5.4. Ověření validačních parametrů

Hodnoceny byly následující validační parametry: přesnost, výtěžnost a matricové efekty. Zároveň byly stanoveny korelační koeficienty a limity kvantifikace jednotlivých látek pro standardní a matricovou kalibrační křivku. Limity kvantifikace pro standardní kalibrační křivku byly v rozmezí 0,05 – 1 ng/ml a pro matricovou kalibrační křivku 0,2 – 2 ng/ml. Korelační koeficienty všech analytů pro standardní kalibrační křivku byly vyšší než 0,9996 a pro matricovou kalibrační křivku vyšší než 0,9992. Pouze pro látku **14** CORT (B), *m/z* 346) měl hodnotu 0,9890. Z měření „blankové“ plazmy bez obohacení bylo zjištěno že některé látky se vyskytují v tomto druhu materiálu, a tudíž nám zkreslují a komplikují vyhodnocení a zároveň kvantifikaci těchto látek. Pro tyto látky muselo být použito odečtu této „blankové“ hodnoty plochy píků. Jedná se o sloučeniny **3** (P, *m/z* 314), **4** (17 $\alpha$ -OH-P, *m/z* 330), **7** (Epiallo-Preg, *m/z* 318), **8** (Allo-Preg, *m/z* 318), **9** (20 $\alpha$ -OH-P, *m/z* 316), **10** (11 $\beta$ -OH-P, *m/z* 330), **11** (THDOC, *m/z* 334), **12** (Allo-THDOC, *m/z* 334), **13** (11-DOC, *m/z* 330), **14** (CORT (B), *m/z* 346), **15** (11-DHB, *m/z* 344), **16** (5 $\alpha$ -DHB, *m/z* 348), **17** (5 $\beta$ -DHB, *m/z* 348), **21** (ALDO, *m/z* 360), **22** (T, *m/z* 288), **29** (A4, *m/z* 286), **31** (AST, *m/z* 290) a **33** (5 $\beta$ -dion, *m/z* 288). Přesnost, matricové efekty a výtěžnost byly hodnoceny na 4 koncentračních hladinách L1 – L4 (0,5 ng/ml; 5 ng/ml; 50 ng/ml; 100 ng/ml). Výsledky ověření validačních parametrů jsou znázorněny v Tabulce 23. Výtěžnost jednotlivých analytů (bez korekce na SIL-ISs) na všech testovaných koncentračních hladinách byla vyšší než 60 % kromě sloučenin **11** (THDOC, *m/z* 334) a **17** (5 $\beta$ -DHB, *m/z* 348) na nejnižší hladině L1 (žluté zbarvení v tabulce). Z hlediska přesnosti všechny analyty splňují limit 15 % na všech koncentračních hladinách kromě sloučenin **11** (THDOC, *m/z* 334), **16** (5 $\alpha$ -DHB, *m/z* 348), **17** (5 $\beta$ -DHB, *m/z* 348) na koncentrační hladině L1 (modré zbarvení v tabulce). Matricových efekty poskytly nejhorší výsledky z testovaných parametrů. Hodnoty větší než 0 značí zesílení ionizace, menší než 0 zeslabení ionizace. Všechny hodnoty vyšší jak 20 % jsou zbarveny v tabulce zeleně a tyto hodnoty byly naměřeny celkem pro 18 analytů, většinou pro nejnižší koncentrační hladinu pro danou látku. Pro některé analyty byly matricové efekty až v řádu stovek. Pro sloučeniny **6** (5 $\alpha$ -DHP, *m/z* 316) a **14** (CORT (B), *m/z* 346) byly hodnoty vyšší než 20 % naměřeny na všech koncentračních hladinách.

**Tabulka 23:** Validační parametry. Uvedená LOQ stanovena z matricové kalibrační křivky. Žluté zbarvení značí výtěžnost nižší než 60%. Modré zbarvení značí přesnost vyšší než 15 %. Matricové efekty vyšší jak +/- 20 % jsou zbarveny zeleně. Červeně zbarvené jsou látky s největší hodnotou plochy v „blankové“ plazmě bez obohacení.

	LOQ [ng/ml]	Výtěžnost [%]				Přesnost [%]				Matricové efekty [%]			
		L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4	L1	L2	L3	L4
1	1	-	61,27	65,05	72,62	-	0,49	1,29	1,02	-	0,41	-2,55	-5,04
2	1	-	77,66	81,93	91,11	-	2,19	0,87	1,32	-	-3,06	-5,96	-5,69
3	0,5	72,24	78,75	80,05	85,53	10,96	1,38	1,09	0,67	-511,46	-53,49	-4,18	-1,83
4	0,2	80,51	81,17	82,86	88,32	3,65	0,66	0,27	0,23	-59,77	-1,82	3,52	4,14
5	0,5	81,60	81,32	84,20	90,35	1,65	1,11	1,96	0,58	-6,28	0,89	-0,93	-1,68
6	1	-	88,12	87,20	91,01	-	3,84	0,30	2,71	-	-57,55	-73,41	-74,77
7	1	-	60,81	62,55	69,82	-	2,88	1,65	1,76	-	-22,33	-10,12	-9,51
8	5	-	74,48	81,35	86,01	-	1,55	0,43	2,27	-	5,41	89,30	90,70
9	2	-	81,83	83,43	88,82	-	3,97	1,08	0,46	-	-264,56	-22,55	-10,87
10	0,2	88,69	83,76	86,27	92,48	3,29	2,53	0,73	1,17	-53,93	-10,93	-6,76	-6,10
11	0,2	59,73	83,02	83,49	89,68	31,55	1,30	1,74	0,58	-641,59	-62,51	-7,41	-8,63
12	1	-	83,52	85,19	89,24	-	2,40	0,34	0,33	-	14,36	-0,57	1,06
13	2	-	75,68	82,81	90,43	-	2,54	0,60	0,71	-	-126,73	-13,73	-8,38
14	2	-	66,48	84,30	89,01	-	10,36	3,85	1,40	-	2693,94	-249,77	-124,01
15	1	-	80,52	83,65	86,73	-	0,78	1,04	0,42	-	-80,29	-7,21	-0,67
16	0,5	84,25	83,57	84,72	88,35	47,47	0,66	0,72	2,08	-839,93	-71,52	2,72	11,84
17	0,5	49,40	85,60	86,45	90,23	63,42	2,13	0,86	1,71	1070,24	-94,63	-2,51	6,78
18	0,5	79,31	84,93	84,59	89,38	4,81	0,92	0,52	0,25	-3,31	-1,03	2,77	-0,17
19	0,5	-	82,62	83,52	88,21	-	2,12	0,92	1,33	-	-0,93	0,58	2,40
20	0,2	93,66	82,23	85,86	90,28	1,67	0,41	1,04	1,16	8,82	2,27	0,06	-1,54
21	2	-	83,14	79,49	85,02	-	2,45	1,68	1,55	-	-57,29	-7,30	-4,38
22	0,2	65,46	79,83	86,89	97,75	11,52	2,22	3,59	1,48	-211,06	-21,17	-3,82	-1,35
23	1	-	83,82	84,41	88,90	-	1,14	1,45	0,28	-	0,26	0,66	0,16
24	2	-	109,80	87,82	94,31	-	1,55	2,66	2,24	-	5,31	2,38	0,85
25	0,2	87,81	84,89	84,77	89,35	3,85	1,65	0,34	1,50	48,40	4,90	0,07	0,62
26	1	-	83,24	82,59	88,47	-	4,22	0,55	2,17	-	-7,24	1,78	0,48
27	1	-	79,84	84,53	90,90	-	2,42	1,20	0,23	-	-2,95	-0,66	-0,21
28	0,5	92,87	84,41	86,08	92,52	2,26	2,51	0,45	0,71	27,03	7,02	5,70	-0,69
29	0,5	80,96	81,07	83,06	88,21	3,47	1,70	0,23	2,29	-7,60	4,43	10,40	13,50
30	0,2	79,62	78,41	79,70	86,20	4,84	1,32	0,52	0,55	2,40	0,74	2,03	3,15
31	0,2	91,09	82,94	82,74	88,38	2,58	0,83	1,16	0,86	-34,98	-4,20	0,18	-1,64
32	0,5	84,06	83,56	83,74	88,93	1,62	0,82	0,75	0,26	7,43	-0,95	-0,55	-1,03
33	0,5	75,08	83,00	84,19	90,49	5,28	0,45	0,61	0,28	-92,39	-13,55	-3,56	-3,19
34	0,2	84,91	84,37	84,36	90,28	3,45	1,30	0,67	0,53	33,77	2,35	-2,51	-1,21
35	1	-	80,26	88,77	100,85	-	2,66	4,52	1,56	-	7,89	-5,20	-3,15
36	0,5	83,26	83,52	85,70	91,03	1,79	0,97	2,05	1,70	15,47	8,68	13,66	3,12
37	0,5	83,56	81,37	84,89	91,08	3,83	0,66	1,18	0,80	-7,96	-2,92	-2,03	0,61

## 6. Závěr

V rámci této diplomové práce byla vyvinuta PP-UHPLC-MS/MS metoda pro stanovení 37 steroidních látek v potkaní plazmě.

V první fázi byly vybrány vhodné prekurzorové ionty a vybrán ionizační mód. Ionizace v pozitivním módu byla vybrána pro všechny analyty, kromě **25** (DHEA-S,  $m/z$  390). Protože u některých sloučenin nebyly patrné protonované molekuly, musely být jako prekurzorové ionty vybrány ionty po odštěpení jedné či více molekul vody. Následně byla provedena optimalizace parametrů iontového zdroje, výběr produktových iontů a optimální kolizní energie pro definici 2 SRM přechodů pro každou látku. Pro látku **25** (DHEA-S,  $m/z$  390) bylo možné definovat pouze jeden SRM přechod.

Z důvodu možných křížových interferencí u látek se stejnou molekulovou hmotností, či látek, které poskytují stejné prekurzory, bylo nutné velkou část vývoje metody věnovat výběru vhodné analytické kolony a optimalizaci gradientového profilu. Screening 7 kolon poskytl nejlepší výsledky pro kolonu BEH C18 (100 mm), a proto další fáze vývoje metody byla zaměřena na tento typ stacionární fáze, kdy byly zahrnuty ještě další kolony s C18 řetězcem. Optimalizace průtoku a gradientu na koloně Cortecs C18 vedla k získání metody, při které došlo k separaci všech kritických sloučenin kromě dvojice sloučenin **36** (DEXA,  $m/z$  392) a **37** (BETA,  $m/z$  392). Nicméně metoda byla akceptovatelná, protože daná dvojice látek by se neměla vyskytovat v reálných vzorcích společně. Celkový čas analýzy včetně ekvilibrace je 20 min.

Optimalizace postupu proteinové precipitace byla provedena pomocí programu MODDE. Testovány byly faktory: druh a objem precipitačního činidla, čas precipitace a čas centrifugace. Zásadní vliv na výtěžnost jednotlivých sloučenin měl typ a objem precipitačního činidla, vliv ostatních faktorů byl zanedbatelný. Po statistickém zhodnocení výsledků testovaného modelu byl vybrán optimální postup (kapitola 4.9.3).

Na závěr bylo provedeno ověření validačních parametrů, nicméně na základě výsledků lze konstatovat, že pro některé analyty vyšly velmi vysoké matricové efekty, a proto by stálo za zvážení změnit druh použité úpravy vzorku.

## 7. Seznam použité literatury

- [1] J. Klimeš, Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2015 str. 29-40.
- [2] J. Olšovská, M. Jurková, Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin, Část 1, Teoretický úvod, Kvasny Prum., 58, iss. 2 (2012), 30-35, doi: 10.18832/kp2012005.
- [3] L. Nováková, M. Douša, Moderní HPLC separace v teorii a praxi I., Lucie Nováková, Praha, 2013.
- [4] Yuri V. Kazakevich, Rosario LoBrutto, HPLC for Pharmaceutical Scientists, John Wiley & Sons, Hoboken, 2007.
- [5] Douglas A. Skoog, Donal M. West, F. James Holler, Stanley R. Crouch, Fundamentals of Analytical Chemistry, 9. vydání, mezinárodní vydání, 2014, str. 912-934.
- [6] Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, John W. Dolan, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Třetí vydání, John Wiley & Sons, Hoboken, 2010.
- [7] P. Klouda, Moderní analytické metody, třetí, upravené vydání, Pavko, Ostrava, 2016, str. 12-43.
- [8] Waters, (n.d.) (<https://www.waters.com/nextgen/us/en.html> (accessed August 19, 2020)).
- [9] Hemström, P. and Irgum, K. (2006), Hydrophilic interaction chromatography. J. Sep. Science, 29, 1784-1821, doi:10.1002/jssc.200600199.
- [10] Holčápek, Spojení separačních technik a hmotnostní spektrometrie , (2019), [https://holcapek.upce.cz/teaching/09\\_Spojzeni\\_MS\\_separace.pdf](https://holcapek.upce.cz/teaching/09_Spojzeni_MS_separace.pdf), (accessed August 31, 2020).

- [11] Szabolcs Fekete, Julie Schappler, Jean-Luc Veuthey, Davy Guillarme, Current and future trends in UHPLC, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 63 (2014), 2-13, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.08.007>.
- [12] Sigma Aldrich, (n.d.) <https://www.sigmaaldrich.com/czech-republic.html> (accessed August 19, 2020).
- [13] HPLC, (n.d.) [www.hplc.cz](http://www.hplc.cz) (accessed August 19, 2020).
- [14] Waters Quality Parts, Chromatography Columns, and Supplies Catalog, (2017), <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005718en.pdf> (accessed August 19, 2020).
- [15] Charged Surface Hybrid C18 for High Resolution LC and LC/MS Peptide Separations, (2013), [https://www.waters.com/webassets/cms/promotion/docs/us\\_promos/CSH130\\_C18\\_Webinar\\_030713.pdf](https://www.waters.com/webassets/cms/promotion/docs/us_promos/CSH130_C18_Webinar_030713.pdf) (accessed August 19, 2020).
- [16] Phenomedex, (n.d.) <https://www.phenomenex.com> (accessed August 19, 2020).
- [17] Labicom, (n.d.) <https://www.labicom.cz> (accessed August 19, 2020).
- [18] Chromservis, (n.d.), <https://www.chromservis.eu/cz/> (accessed August 19, 2020).
- [19] 1.7 $\mu$ m Core-Shell Columns: The FIRST and ONLY sub-2 $\mu$ m core-shell columns on the market, (2011), <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/ef8950ec-aa2c-4c78-919b-18e3c432b638.pdf>, (accessed August 19, 2020).
- [20] The Chromatographer's Guide To Improving UHPLC Column Selectivity, (2018), <https://phenomenex.blog/wp-content/uploads/2018/02/UHPLC-Selectivity-Guide.pdf> (accessed August 19, 2020).
- [21] Marek Smoluch, Giuseppe Grasso, Piotr Suder Jerzy Silberring, *Mass Spectrometry, An Applied Approach*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2019.
- [22] Wilfried M.A. Niessen-Liquid chromatography-mass spektrometry, CRC\_Taylor & Francis, London, 2006.

- [23] Robert E. Ardrey, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons, Chichester, 2003.
- [24] Basics of LC/MS, (2001), <https://www.agilent.com/cs/library/support/documents/a05296.pdf> (accessed August 19, 2020).
- [25] Holčápek, *Ionizační techniky*, (2019), [https://holcapek.upce.cz/teaching/02-03\\_Ionizacni\\_techiky.pdf](https://holcapek.upce.cz/teaching/02-03_Ionizacni_techiky.pdf), (accessed August 19, 2020).
- [26] Dominic M. Desiderio, Nico M. Nibbering, Rolf Ekman, Jerzy Silberring, Ann M. Brinkmalm, *Mass spectrometry: instrumentation, interpretation, and applications*, John Wiley & Sons, Hoboken, 2009
- [27] H. Kočová Vlčková, *MS Ionizační techniky API*, (2019), <https://intranet.faf.cuni.cz/Studijni-materialy/KACH/>, (accessed August 31, 2020).
- [28] Holčápek, *Analyzátory 1. část*, (2019), [https://holcapek.upce.cz/teaching/04\\_MS\\_analyzatory\\_cast1.pdf](https://holcapek.upce.cz/teaching/04_MS_analyzatory_cast1.pdf), (accessed August 19, 2020).
- [29] Holčápek, *Analyzátory 2. část*, (2019), [https://holcapek.upce.cz/teaching/05\\_MS\\_analyzatory\\_cast2.pdf](https://holcapek.upce.cz/teaching/05_MS_analyzatory_cast2.pdf), (accessed August 19, 2020).
- [30] D. Friedecký, K. Lemr, *Hmotnostní spektrometrie – zdroj analytických informací, Klinická biochemie a metabolismus*, 4 (2012) str. 210–215
- [31] D. Friedecký, K. Lemr, *Úvod do hmotnostní spektrometrie, Klinická biochemie a metabolismus*, 3 (2012) str. 152–157.
- [32] Chhabil Dass, *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, 1. vydání, John Wiley & Sons, Hoboken, 2007.
- [33] L. Nahar, S. Satyajit, *Chemistry for Pharmacy students: general, organic and natural product chemistry*, 2. vydání, John Wiley & Sons Ltd, Liverpool, 2019, str. 466-476.



- [34] F. Hampl, S. Rádl, J. Paleček, *Farmakochemie*, 3. upravené a rozšířené vydání, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, 2015, str. 600-611.
- [35] John M. Beale, John Block, Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, 12. vydání, Lippincott Williams & Wilkins, 2010, str. 819-865.
- [36] Alfredo Ulloa-Aguirre, P. Michael Conn, *Cellular Endocrinology in Health and Disease*, Academic Press, 2014, str. 207-227.
- [37] Chung Bon-chu, Hu Meng-Chun, *Androgens and Androgen Receptor: Mechanisms, Functions, and Clinical Applications*, Springer US, 2002, str. 1-15.
- [38] James Ritter, Rod Flower, Graeme Henderson, Yoon Kong Loke, David MacEwan, Humphrey Rang, *Rang & Dale's Pharmacology*, 9. vydání, Elsevier, London, 2020, str. 432-447.
- [39] J. Martínková et al., *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*, 2., zcela přepracované a doplněné vydání, Grada Publishing, Praha, 2018, str. 364-384.
- [40] F. Perlík, *Základy farmakologie*, druhé, přepracované a doplněné vydání, Galén, Praha, 2011, str. 126-132.
- [41] Jia You, Ying Shi, Jiaqi Li, Xiaoqin Yang, Zeyu Liu, Wenli Zhu, Zhigang Wu, Jingyuan Xiong, Rapid quantification of human urinary estrogens and estrogen metabolites by HPLC mass spectrometry, *Microchemical Journal*, 147 (2019), 157-162, <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.008>.
- [42] Christine Ammer, *The Encyclopedia of Women's Health*, 6. vydání, Infobase Publishing, 2009, str. 312-315.
- [43] Meloun UPCE, (n. d.) <https://meloun.upce.cz/> (accessed August 6, 2020).
- [44] Jiajian Yin, LogP Prediction for Blocked Tripeptides with Amino Acids Descriptors (HMLP) by Multiple Linear Regression and Support Vector Regression, *Procedia Environmental Sciences*, 8 (2011), 173-178, <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2011.10.028>.
- [45] PubChem, (n. d.) <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed August 4, 2020).

- [46] American Chemical Society, SciFinder, (2020). <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf> (accessed August 2, 2020).
- [47] A.K. Hankele, K. Rehm, J. Berard, G. Schuler, L. Bigler, S.E. Ulbrich, Progesterone profiling in plasma during the estrous cycle in cattle using an LC-MS based approach, *Theriogenology*, 142, (2020), 376-383, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.10.005>.
- [48] Desmaré van Rooyen, Therina du Toit, Renate Louw-du Toit, Donita Africander, Pieter Swart, Amanda C. Swart, The metabolic fate and receptor interaction of 16 $\alpha$ -hydroxyprogesterone and its 5 $\alpha$ -reduced metabolite, 16 $\alpha$ -hydroxy-dihydroprogesterone, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 441 (2017), 86-98, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.09.025>.
- [49] Gellért Karvaly, Krisztián Kovács, Katalin Mészáros, Ibolya Kocsis, Attila Patócs, Barna Vásárhelyi, The comprehensive characterization of adrenocortical steroidogenesis using two-dimensional ultra-performance liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 153 (2018), 274-283, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.01.054>.
- [50] Nils Janzen, Stefanie Sander, Michael Terhardt, Ulrike Steuerwald, Michael Peter, Anibh M. Das, Johannes Sander, Rapid steroid hormone quantification for congenital adrenal hyperplasia (CAH) in dried blood spots using UPLC liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Steroids*, 76 (2011), 1437-1442, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.07.013>.
- [51] F. Badoud, E. Grata, J. Boccard, D. Guillarme, J.-L. Veuthey, S. Rudaz, M. Saugy, Quantification of glucuronidated and sulfated steroids in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400 (2011), 503-516, <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4779-8>.

- [52] M. Mazzarino, F Botre, A fast liquid chromatographic/mass spectrometric screening method for the simultaneous detection of synthetic glucocorticoids, some stimulants, anti-oestrogen drugs and synthetic anabolic steroids, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20 (2006), 3465-3476, <https://doi-org.ezproxy.is.cuni.cz/10.1002/rcm.2729>.
- [53] Karl-Heinz Storbeck, Norbert W. Kolar, Marietjie Stander, Amanda C. Swart, Désirée Prevo, Pieter Swart, The development of an ultra performance liquid chromatography-coupled atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry assay for seven adrenal steroids, *Analytical Biochemistry*, 372 (2008), 11-20, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.09.036>.
- [54] M.E. Touber, M.C. van Engelen, C. Georgakopoulos, J.A. van Rhijn, M.W.F. Nielen, Multi-detection of corticosteroids in sports doping and veterinary control using high-resolution liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 586 (2007), 137-146, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.09.058>.
- [55] Brett C. McWhinney, Scott E. Briscoe, Jacobus P.J. Ungerer, Carel J. Pretorius, Measurement of cortisol, cortisone, prednisolone, dexamethasone and 11-deoxycortisol with ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Application for plasma, plasma ultrafiltrate, urine and saliva in a routine laboratory, *Journal of Chromatography B*, 878 (2010), 2863-2869, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.08.044>.
- [56] Ben Khelil, M., Tegethoff, M., Meinschmidt, G. et al., Simultaneous measurement of endogenous cortisol, cortisone, dehydroepiandrosterone, and dehydroepiandrosterone sulfate in nails by use of UPLC–MS–MS, *Anal Bioanal Chem*, 401 (2011), 1153–1162, <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5172-3>.
- [57] User Guide to MODDE, <https://blog.umetrics.com/hubfs/Download%20Files/MODDE%2012.0.1%20User%20Guide.pdf>, (accessed August 31, 2020).

## 8. Přílohy

**Tabulka 24:** Přehled analyzovaných steroidů 1 - 20 s uvedenou monoisotopickou hmotností.

Číslo	Zkratka	Triviální název	Systematický název	Sumární vzorec	m/z
1	<b>PREG</b>	PREGNENOLONE	5-pregnen-3 $\beta$ -ol-20-on	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	316,24
2	<b>17<math>\alpha</math>-OH-PREG</b>	17 $\alpha$ -HYDROXPREGNENOLONE	5-pregnen-3 $\beta$ , 17-diol-20-on	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	332,24
3	<b>P</b>	PROGESTERONE	4-pregnen-3, 20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	314,22
4	<b>17<math>\alpha</math> -OH-P</b>	17 $\alpha$ -HYDROXYPROGESTERONE	4-pregnen-17-ol-3, 20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	330,22
5	<b>17<math>\alpha</math>,20<math>\beta</math>-OH-P</b>	17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -DIHYDROXYPROGESTERONE	4-pregnen-17, 20 $\beta$ -diol-3-on	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	332,24
6	<b>5<math>\alpha</math> -DHP</b>	5 $\alpha$ -DIHYDROPROGESTERONE ALLODIHYDROPROGESTERONE	5 $\alpha$ -pregnan-3, 20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	316,24
7	<b>EPIALLO-PREG</b>	5 $\alpha$ -DIHYDROPREGNANOLONE EPIALLOPREGNANOLONE	5 $\alpha$ -pregnan-3 $\beta$ -ol-20-on	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	318,26
8	<b>ALLO-PREG</b>	ALLOPREGNANOLONE	5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-on	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	318,26
9	<b>20<math>\alpha</math>-OH-P</b>	20 $\alpha$ -HYDROXYPROGESTERONE	4-pregnen-20 $\alpha$ -ol-3-on	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	316,24
10	<b>11<math>\beta</math>-OH-P</b>	11 $\beta$ -HYDROXYPROGESTERONE	4-pregnen-11 $\beta$ -ol-3, 20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	330,22
11	<b>THDOC</b>	21-HYDROXPREGNANOLONE TETRAHYDRODEOXYCORTICOSTERONE	5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ , 21-diol-20-on	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	334,25
12	<b>ALLO-THDOC</b>	ALLOTETRAHYDRO DOC	5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ , 21-diol-20-on	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	334,25
13	<b>11-DOC</b>	DESOXYCORTICOSTERONE 11-DEOXYCORTICOSTERONE	4-pregnen-21-ol-3, 20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	330,22
14	<b>CORT (B)</b>	CORTICOSTERONE	4-pregnen-11 $\beta$ , 21-diol-3, 20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	346,21
15	<b>11-DHB</b>	11-DEHYDROCORTICOSTERONE	4-pregnen-21-ol-3, 11, 20-trion	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	344,20
16	<b>5<math>\alpha</math>-DHB</b>	5 $\alpha$ -DIHYDROCORTICOSTERONE	5 $\alpha$ -pregnan-11 $\beta$ , 21-diol-3, 20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	348,23
17	<b>5<math>\beta</math>-DHB</b>	5 $\beta$ -DIHYDROCORTICOSTERONE	5 $\beta$ -pregnan-11 $\beta$ , 21-diol-3, 20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	348,23
18	<b>F</b>	CORTISOL	4-pregnen-11 $\beta$ , 17, 21-triol-3, 20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	362,41
19	<b>21-dF (S)</b>	11-DESOXYCORTISOL	4-pregnen -17, 21-diol-3, 20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	346,21
20	<b>E</b>	CORTISONE	4-pregnen -17, 21-diol-3, 11, 20-trion	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	360,19

**Tabulka 25:** Přehled analyzovaných steroidů 21 - 37 s uvedenou monoisotopickou hmotností.

Číslo	Zkratka	Triviální název	Systematický název	Sumární vzorec	m/z
21	ALDO	ALDOSTERONE	4-pregnen -11 $\beta$ , 21-diol-3, 18, 20-trion	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	360,19
22	T	TESTOSTERONE	4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-on	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	288,21
23	5 $\alpha$ -DHT	5 $\alpha$ -DIHYDROTESTOSTERONE	5 $\alpha$ -androstan--17 $\beta$ -ol-3-on	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	290,22
24	DHEA	DHEA	5-androsten--3 $\beta$ -ol-17-on	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	288,22
25	DHEA-S	DHEA SULPHATE, SODIUM SALT	5-androsten--3 $\beta$ -ol-17-on sulfát, sodná sůl	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> NaO <sub>5</sub> S	390,15
26	7 $\alpha$ -OH-DHEA	7 $\alpha$ -HYDROXDHEA	5-androsten--3 $\beta$ , 7 $\alpha$ -diol-17-on	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	304,20
27	7 $\beta$ -OH-DHEA	7 $\beta$ -HYDROXDHEA	5-androsten--3 $\beta$ , 7 $\beta$ -diol-17-on	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	304,20
28	7-OXO-DHEA	7-OXODHEA	5-androsten--3 $\beta$ , ol-7, 17-dion	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	302,19
29	A4	ANDROSTENEDIONE	4-androsten--3,17-dion	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	286,19
30	EpiAST	EPIANDROSTERONE	5 $\alpha$ -androstan -3 $\beta$ -ol-17-on	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	290,22
31	AST	ANDROSTERONE	5 $\alpha$ -androstan -3 $\alpha$ -ol-17-on	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	290,22
32	5 $\alpha$ -DION	ANDROSTANEDIONE	5 $\alpha$ -androstan -3, 17-dion	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	288,21
33	5 $\beta$ -DION	ANDROSTANEDIONE(5 $\beta$ )	5 $\beta$ -androstan -3, 17-dion	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	288,21
34	3 $\alpha$ -DIOL	17 $\beta$ -DIHYDROANDROSTERONE	5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ , 17 $\beta$ -diol	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	292,24
35	3 $\beta$ -DIOL	DIHYDROANDROSTERONE	5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	292,24
36	DEXA	DEXAMETHASONE	11 $\beta$ ,16 $\alpha$ -9-Fluoro-11,17,21-trihydroxy-16 $\alpha$ -methylpregna-1,4-diene-3,20-dione	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> FO <sub>5</sub>	392,20
37	BETA	BETAMETHASONE	9 $\alpha$ -Fluoro-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-trihydroxy-16 $\beta$ -methylpregna-1,4-diene-3,20-dione	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> FO <sub>5</sub>	392,20