

## 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