

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ



Katedra analytické chemie

Diplomová práce

Vývoj a validace SLE metody pro úpravu plasmy před  
UHPLC-MS/MS analýzou pro stanovení steroidů

Školitel: PharmDr. Kateřina Plachká, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Taťána Gazárková

Hradec Králové 2024

Dominika Dubecová

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

V Hradci Králové dne .....

.....

Dominika Dubecová

Moje poďakovanie patrí najmä školiteľke PharmDr. Kateřině Plachké, Ph.D. a konzultantke Mgr. Taťáně Gazárkové za ich čas, ochotu a obetavosť počas celého spracovávania diplomovej práce a taktiež za cenné a odborné rady a vedenie, ktoré vznik tejto diplomovej práce umožnili. Ďalej ďakujem ostatným pracovníkom Katedry analytickej chémie za vytváranie príjemného pracovného prostredia. Ďakujem tiež svojej rodine a priateľom za podporu počas celého štúdia.

# Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

**Katedra:** Katedra analytické chemie

**Kandidát:** Dominika Dubecová

**Školitel:** PharmDr. Kateřina Plachká, Ph.D.

**Konzultant:** Mgr. Taťána Gazárková

**Název diplomové práce:** Vývoj a validace SLE metody pro úpravu plasmy před UHPLC-MS/MS analýzou pro stanovení steroidů.

Presné a spoľahlivé stanovenie koncentrácií endogénnych steroidov je nevyhnutnou súčasťou výskumu mnohých biologických otázok. Cieľom tejto práce bolo preto vyvinúť metódu prípravy vzorky, ktorá bude následne použitá pre analýzu vzoriek myšej plazmy s cieľom sledovať vplyv akútneho a chronického stresu na plazmatické koncentrácie vybraných steroidných hormónov. Set analyzovaných steroidov bol preto zostavený na základe požiadaviek Fyziologického Ústavu Akadémie vied Českej republiky, ktorý vykonával biologické experimenty.

Táto práca sa venovala vývoju a optimalizácii metódy prípravy vzorky pre analýzu 38 steroidných hormónov, ktoré boli následne profilované/kvantifikované za použitia ultra-vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (UHPLC-MS/MS). V rámci diplomovej práce boli porovnávané dve metódy prípravy vzorky: proteínová precipitácia (PP) a extrakcia z kvapaliny do kvapaliny s využitím inertného nosiča (SLE). V rámci optimalizácie PP metódy bola testovaná metóda samotná, metóda v spojení s enzymatickou hydrolýzou a s využitím fosfátového tlmivého roztoku. Bolo tiež optimalizované zloženie precipitačného činidla, pričom najvyššie hodnoty výtťažnosti boli dosiahnuté pri použití acetonitrilu. Najvyššie hodnoty výtťažnosti spomedzi spomínaných metód boli dosiahnuté pri samotnej PP a to >50% s RSD <15% u väčšiny analytov. Táto metóda však bola zaťažená významnými maticovými efektmi, preto bola metóda PP ďalej porovnávaná so SLE metódou.

V rámci vývoja SLE metódy bolo optimalizovaných niekoľko parametrov vrátane objemu nanášanej vzorky, zloženia a objemu extrakčného činidla a počtu krokov extrakcie. Optimalizované zloženie nanášanej vzorky pozostávalo zo 40  $\mu$ l plazmy nariadenej 40  $\mu$ l 50% isopropanolu a 320  $\mu$ l vody. Ako extrakčné činidlo bola vybraná kombinácia metyl-terc-butyléteru a etylacetátu v pomere 80:20. Takto optimalizovaná metóda umožnila dosiahnuť výtťažnosť väčšiny stanovovaných analytov >60% s RSD <15%. SLE vykazovala oproti PP niekoľko výhod, medzi ktoré patrili vyššia výtťažnosť a opakovateľnosť. Výsledná metóda bola validovaná podľa medzinárodných smerníc ICH M10/EMA. Metóda sa tak osvedčila ako vhodná pre rýchlu a presnú kvantifikáciu plazmatických steroidov a môže byť využitá pre analýzu ich stresovo závislých zmien.

**Kľúčové slová:** proteínová precipitácia, extrakcia z kvapaliny do kvapaliny s využitím inertného nosiča, hmotnostná spektrometria, ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, optimalizácia, validácia

# Abstract

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

**Department:** Department of Analytical Chemistry

**Candidate:** Dominika Dubecová

**Supervisor:** PharmDr. Kateřina Plachká, Ph.D.

**Consultant:** Mgr. Taťána Gazárková

**Title of the diploma thesis:** Development and validation of SLE method for plasma retreatment prior UHPLC-MS/MS analysis for the determination of steroids

Accurate and reliable determination of endogenous steroid concentrations is an essential part of research into many biological questions. The aim of this work was to develop a sample preparation method that will be subsequently used for the analysis of mouse plasma samples to monitor the effect of acute and chronic stress on the plasma concentration of selected steroid hormones. The set of analysed steroids was compiled based on the requirements of the Institute of Physiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic; which carried out the biological experiments.

This diploma thesis focused on the development and optimization of a sample preparation method for the analysis of 38 steroid hormones; which were subsequently analysed using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Two sample preparation methods were compared within this thesis: protein precipitation (PP) and supported liquid extraction (SLE). The PP method was tested alone; in conjunction with enzymatic hydrolysis and using phosphate buffer solution to optimise the PP method. The composition of the precipitation reagent was also optimized; with the highest recovery achieved using acetonitrile. The highest recovery among the mentioned methods was obtained with PP achieving values of  $>50\%$  s  $RSD <15\%$  for most analytes. However; this method was burdened by significant matrix effects; therefore the PP method was further compared with the SLE method.

Several parameters were optimized during the development of SLE method including sample load volume; extraction solvent composition and its volume; and the number of extraction steps. The optimized composition of the loaded sample included 40  $\mu\text{L}$  of mouse plasma diluted by 40  $\mu\text{L}$  of 50% 2-propanol and 320  $\mu\text{L}$  of water. A combination of methyl-tert-butyl ether and ethyl acetate in a ratio of 80:20 (v/v) was selected as extraction solvent. The optimized SLE method enabled to obtain the recovery of  $> 60\%$  with  $RSD <15\%$  for majority of the targeted steroids. SLE showed several advantages over PP; including higher recovery and repeatability. The final method was validated according to the ICH M10/EMA guideline. The method was proven to be suitable for fast and precise quantification of plasmatic steroids and can be used for analysis of its stress-dependent changes.

**Key words:** protein precipitation, supported liquid extraction, mass spectrometry, ultra-high-performance liquid chromatography, optimization, validation

# Obsah

Abstrakt .....	4
Abstract .....	5
Zoznam skratiek .....	8
1. Úvod .....	10
2. Cieľ práce .....	11
3. Teoretická časť .....	12
3.1 Steroidy .....	12
3.1.1 Štruktúra a klasifikácia steroidov .....	12
3.1.2 Syntéza steroidných hormónov .....	13
3.1.3 Metabolizmus steroidných hormónov .....	14
3.1.4 Steroidy analyzované v tejto práci .....	15
3.2 Metódy prípravy vzorky .....	24
3.2.1 Proteínová precipitácia .....	24
3.2.2 Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny .....	24
3.2.3 Extrakcia na tuhú fázu .....	25
3.2.4 Moderné trendy v príprave vzorky .....	26
3.2.5 Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny s využitím inertného nosiča .....	26
3.3 Chromatografické metódy využívané v analýze steroidov .....	27
3.3.1 Plynová chromatografia .....	27
3.3.2 Superkritická fluidná chromatografia .....	27
3.3.3 Ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia .....	28
3.3.4 Inštrumentácia v UHPLC .....	29
3.3.5 Detektory v UHPLC .....	30
3.4 Hmotnostná spektrometria .....	30
3.4.1 Ionizačný zdroj .....	31
3.4.2 Hmotnostné analyzátory .....	32
3.4.3 Kvadrupól .....	32
3.4.4 Trojitý kvadrupól .....	32
3.4.5 Detektory .....	33
3.4.6 Spojenie LC-MS .....	33
3.5 Publikované práce zaoberajúce sa analýzou steroidov .....	34
4. Experimentálna časť .....	40
4.1 Použité prístroje a pomôcky .....	40
4.2 Použité chemikálie a rozpúšťadlá .....	40

4.3 Štandardné látky .....	41
4.4 Vnútorne štandardné látky .....	41
4.5 Biologické vzorky .....	41
4.6 Príprava zásobných roztokov štandardov a vnútorných štandardov .....	42
4.7 Príprava pracovných roztokov .....	42
4.7.1 Príprava pracovných roztokov štandardov .....	42
4.7.2 Príprava okyslenej vody .....	42
4.7.3 Príprava fosfátového tlmivého roztoku .....	42
4.8 Príprava vzoriek k validácii .....	42
4.9 Podmienky použitej UHPLC-MS/MS metódy.....	43
4.10 Vývoj metódy prípravy vzorky .....	46
4.10.1 Optimalizácia proteínovej precipitácie.....	46
4.10.2 Optimalizácia SLE metódy.....	46
4.10.3 Optimalizácia extrakčného činidla pre SLE metódu .....	47
4.10.4 Optimalizácia zloženia vzorky nanášanej na SLE doštičku .....	48
4.10.5 Porovnanie optimalizovaných metód prípravy vzorky.....	48
4.10.6 Finálne podmienky SLE metódy .....	49
4.11 Overenie validačných parametrov.....	49
5.Výsledky a diskusia .....	51
5.1 Analyzovanie vplyvu enzymatickej hydrolýzy na výťažnosť proteínovej precipitácie .....	51
5.2 Porovnanie metód PP, EH-PP a TR-PP .....	54
5.3 Optimalizácia SLE metódy .....	56
5.3.1 Výber extrakčného činidla.....	56
5.3.2 Optimalizácia zloženia nanášanej vzorky .....	60
5.4 Porovnanie optimalizovaných metód.....	64
5.5 Validácia optimalizovanej SLE metódy.....	66
5.5.1 Kalibračné rozmedzie .....	66
5.5.2 Výťažnosť a matricové efekty .....	68
5.5.3 Presnosť a precíznosť .....	72
5.5.4 Porovnanie analógového manifoldu a poloautomatizovaného manifoldu .....	76
6.Záver .....	77
7.Referencie .....	78

## Zoznam skratiek

ACN – acetonitril  
APCI – chemická ionizácia za atmosférického tlaku  
APPI – fotoionizácia za atmosférického tlaku  
DCM – dichlórmetán  
DLLME – disperzná mikroextrakcia z kvapaliny do kvapaliny  
EH – enzymatická hydrolýza  
EI – elektrónová ionizácia  
ELSD – odparovací detektor rozptylu svetla  
EMA – Európska lieková agentúra  
EME – elektromembránová mikroextrakcia  
ESI – ionizácia elektrosprejom  
EtAc – etylacetát  
EtOH – etanol  
FA – kyselina mravčia  
GC – plynová chromatografia  
HEX – hexan  
HIC – hydrofóbna interakčná chromatografia  
HILIC – hydrofilná interakčná chromatografia  
HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia  
HSD – hydroxysteroid dehydrogenáza  
CHLFR – chloroform  
ICH – Medzinárodná rada pre zosúladienie technických požiadaviek na lieky na humánne použitie  
IPA – propan-2-ol  
LC – kvapalinová chromatografia  
LIT – lineárna iónová pasca  
LLE – extrakcia z kvapaliny do kvapaliny  
LPME – mikroextrakcia z kvapalnej fázy  
MeOH – metanol  
MS – hmotnostná spektrometria  
MS/MS – tandemová hmotnostná spektrometria  
MTBE – metyl-terc-butyléter  
NP – normálne fázy  
PP – proteínová precipitácia  
PT- $\mu$ SPE – mikroextrakcia na tuhú fázu v pipetovej špičke  
Q – kvadrupól  
QIT – kvadrupólová iónová pasca  
QqQ – trojitý kvadrupól  
RP – reverzné fázy  
RSD – relatívna smerodajná odchýlka  
SBSE – sorpčná extrakcia na miešacej tyčinke



SFC – superkritická fluidná chromatografia  
SLE – extrakcia z kvapaliny do kvapaliny s využitím inertného nosiča  
SPE – extrakcia na tuhú fázu  
SPME – mikroextrakcia na tuhú fázu  
SRM – selektívny záznam vybranej reakcie  
TCA – kyselina trichlóroctová  
TOF – analyzátor doby letu  
TR – fosfátový tlmivý roztok  
UHPLC – ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia  
UHPLC-MS/MS – ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia v spojení  
s tandemovou hmotnostnou spektrometriou

# 1. Úvod

Steroidy sú molekuly nachádzajúce sa v živých organizmoch nevyhnutné pre bunčné štruktúry a systémové či lokálne signálne dráhy. Hrajú dôležitú úlohu v mnohých fyziologických procesoch a zmeny v ich štruktúre alebo hladinách tak môžu vyústiť v širokú škálu rôznych porúch [1, 2].

Steroidné hormóny sa syntetizujú z cholesterolu a ako základ štruktúry obsahujú cyklopentanoperhydrofenantrénový kruh [5]. Na základe obmien tohto skeletu sa následne delia na estrogény, androgény, gestagény, glukokortikoidy a mineralokortikoidy [6-8].

Steroidné hormóny sú látky povahy veľmi slabých kyselín a často sa jedná o polohové izoméry alebo stereoizoméry, čo značne komplikuje ich analýzu. Pri analýze steroidných hormónov sa uplatňujú rôzne chromatografické metódy a typy detekcie, najčastejšie však kvapalinová chromatografia s hmotnostnou detekciou (LC-MS). Analýzou steroidných hormónov sa zaoberalo množstvo publikovaných prác, žiadna však v rozsahu tejto diplomovej práce [28, 48-60].

Metóda prípravy vzorky má zásadný vplyv na čas analýzy a najmä na kvalitu nameraných dát. Je to proces manuálne a časovo náročný a náchylný na vznik chyby. Detailná optimalizácia metódy prípravy vzorky je preto dôležitým krokom každej bioanalytickej metódy. Zvolená metóda prípravy vzorky musí spĺňať niekoľko podmienok vrátane dostatočnej výťažnosti, opakovateľnosti, vysokej priepustnosti a zároveň by mala zaručiť čo najlepšie prečistenie od matrice. Najčastejšie používanými metódami v analýze steroidných hormónov sú klasické metódy – proteínová precipitácia (PP), extrakcia na tuhú fázu (SPE) a extrakcia z kvapaliny do kvapaliny (LLE), ich miniaturizované modifikácie či moderné metódy ako napr. SLE [15,16].

SLE je moderný trend vychádzajúci z klasickej metódy LLE vhodný pre prípravu vzoriek biologických tekutín zabezpečujúci rýchle, jednoduché a efektívne odstránenie vo vzorke obsiahnutých proteínov a iných interferujúcich látok matrice [26-30]. Preto bola SLE metóda s možnosťou automatizácie porovnaná v rámci tejto práce s klasickou metódou PP.

## 2. Cieľ práce

Cieľom diplomovej práce bol vývoj a optimalizácia metódy prípravy vzorky pre následnú analýzu 38 steroidných hormónov obsiahnutých v plazme pomocou ultra-vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (UHPLC-MS/MS).

Boli porovnané dve metódy prípravy vzoriek a to klasická PP a poloautomatizovaná SLE. Obe metódy bolo nutné dôkladne optimalizovať za účelom dosiahnutia čo najvyššej výťažnosti a najnižšieho vplyvu matricových efektov.

V rámci optimalizácie PP boli porovnávané štyri precipitačné činidlá. Testované bolo taktiež pridanie fosfátového tlmivého roztoku s cieľom zabrániť zmenám ionizačných stavov analytov a podrobenie vzoriek enzymatickej hydrolýze s cieľom narušiť ich väzbu na glukuronid.

V rámci vývoja SLE metódy bolo nutné optimalizovať extrakčné činidlo z hľadiska jeho zloženia a použitého objemu, množstvo vzorky nanášanej na SLE doštičku a počet extrakčných krokov.

Na záver bolo nutné finálnu SLE metódu validovať podľa medzinárodných smerníc ICH10/EMA. Validácia prebehla rovnakým spôsobom na dvoch manifoldoch – analógovom a poloautomatizovanom, aby bolo možné oba manifoldy porovnať a vyzdvihnúť tak ich výhody a nevýhody.

## 3. Teoretická časť

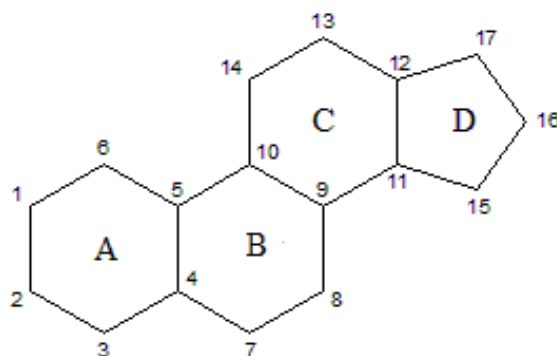
### 3.1 Steroidy

Steroidy sú molekuly nachádzajúce sa v živých organizmoch. Sú nevyhnutné pre formovanie bunecných štruktúr a taktiež ako systémové a lokálne signálne molekuly. Steroidné hormóny hrajú úlohu v mnohých fyziologických procesoch ako sú regulácia vody, rovnováha elektrolytov, metabolizmus, stresová odpoveď organizmu, zápalové reakcie či reprodukcia. Preto aj ich malé štruktúrne zmeny môžu vyústiť v dramatické funkčné zmeny a endokrinné poruchy ako sú kongenitálna adrenálna hyperplázia, Cushingov syndróm, syndróm polycystických vaječníkov, primárny aldosteronizmus a hormonálne závislé nádory prostaty a prsníka. Presná kvantifikácia steroidných hormónov je tak esenciálna pre výskumné aj diagnostické účely [1, 2].

Významné sú taktiež syntetické steroidy zo skupiny glukokortikoidov – betametazón a dexametazón. Jedná sa o epiméry a jediný rozdiel v ich štruktúre je rozdielna orientácia metylovej skupiny na uhlíku C16. Samotné a ich estery sú kvôli svojim protizápalovým a imunosupresívnym účinkom súčasťou krémov, očných a ušných kvapiek a tabliet. Využívajú sa taktiež na liečbu obštrukcií dýchacích ciest [3, 4].

#### 3.1.1 Štruktúra a klasifikácia steroidov

Prirodzene sa vyskytujúce steroidné hormóny sú syntetizované z cholesterolu. Vo svojej štruktúre tak obsahujú cyklopentanoperhydrofenantrénový kruh – štruktúru pozostávajúcu zo štyroch uhlíkovodíkových kruhov, označených a číslovaných podľa Obrázku č. 1 [5].

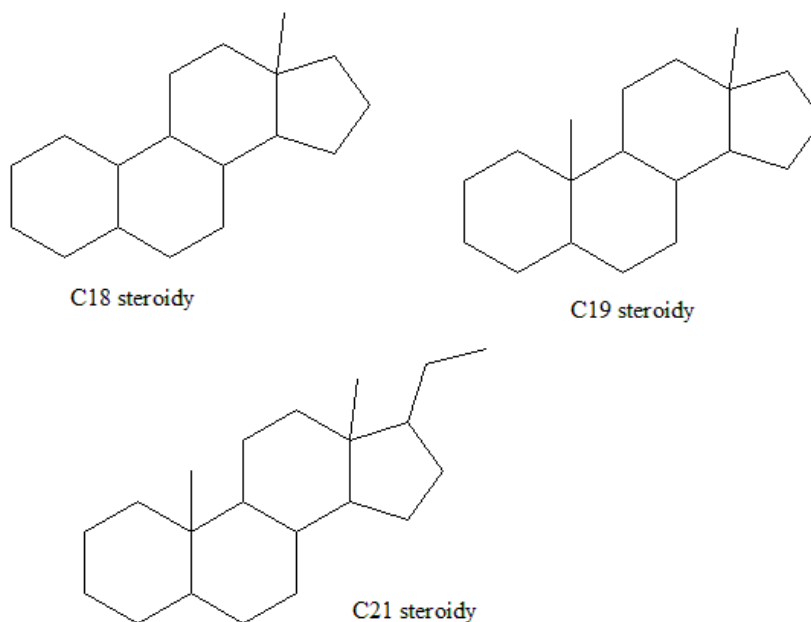


Obrázok č. 1: Štruktúra cyklopentanoperhydrofenantrénového kruhu. Zdroj: ChemDraw

Fyziologické funkcie jednotlivých hormónov sú determinované modifikáciou tejto základnej steroidnej štruktúry – môže ísť o pozíciu a počet hydroxylových či keto skupín alebo polohu dvojitej väzby. Prirodzene sa vyskytujúce, klinicky významné steroidné hormóny môžu byť kategorizované na základe počtu uhlíkových atómov v steroidnom skelete (Obrázok č. 2):

- C18 steroidy (estrany): označované tiež ako ženské pohlavné hormóny. Syntetizujú sa primárne vo vaječníkoch a nadobličkách.

- C19 steroidy (androstany): označované tiež ako mužské pohlavné hormóny. Syntetizujú sa primárne v semenníkoch (Leydigových bunkách) a v menšom množstve v nadobličkách.
- C21 steroidy (pregnany): sú syntetizované primárne v nadobličkách. Do tejto skupiny steroidných hormónov patria dve podskupiny – glukokortikoidy (kortizol) a mineralokortikoidy (aldosterón) [6, 7]. Patrí sem taktiež progesterón, ženský pohlavný hormón, syntetizovaný primárne v žltom teliesku a v placente [8].



Obrázok č. 2: Zobrazenie základného steroidného skeletu C21, C19 a C18 steroidov.  
Zdroj: ChemDraw

### 3.1.2 Syntéza steroidných hormónov

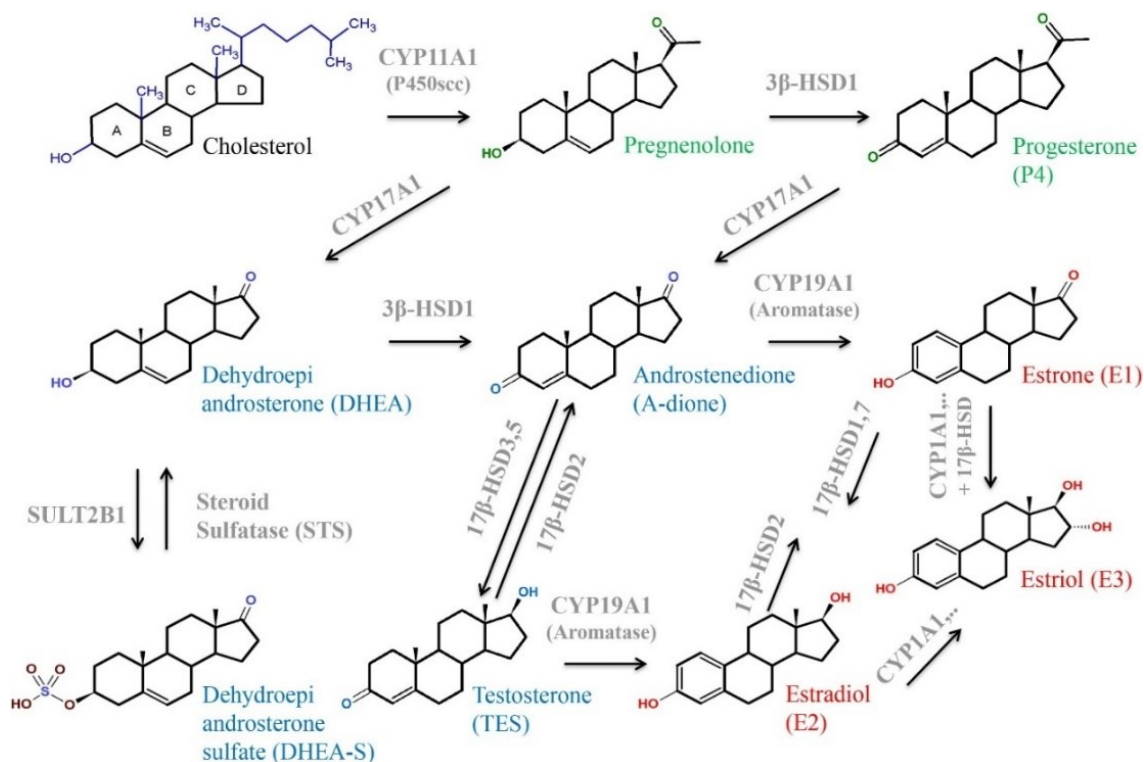
Steroidné hormóny sú produkované v procese zvanom steroidogéza. Tento proces prebieha najmä v nadobličkách (zona glomerulosa, zona fasciculata, zona reticularis), v gonádach (v Leydigových bunkách semenníkov a granulóznych bunkách a v théca bunkách vaječníkov) a v placente (v syncytiotrofoblastoch). Niektoré steroidné hormóny, nazývané neurosteroidy, sa tvoria v mozgu (v gliových bunkách a neurónoch) [6, 9].

Tkanivá, v ktorých prebieha steroidogéza využívajú cholesterol ako východiskovú molekulu v syntéze pregnenolonu – prekurzorového steroidu v biosyntéze steroidných hormónov. Cholesterol môže pochádzať z viacerých zdrojov. Patria medzi ne:

- Syntéza de novo v endoplazmatickom retikule
- Plazmatické lipoproteíny
- Hydrolýza cholesterylesterov uložených v lipidových kvapkách
- Cholesterol z plazmatických membrán

Dve hlavné triedy enzýmov podieľajúcich sa na tvorbe steroidných hormónov sú: cytochróm P450 (konkrétne CYP11A1, CYP17A1, CYP19A1 CYP11B2, CYP21A1 a CYP21A2) a hydroxysteroid dehydrogenázy (HSD). HSD sa ďalej delia na dehydrogenázy s krátkym reťazcom a aldo-keto reduktázy. Príkladom je

17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenáza, ktorá konvertuje inaktívne 17-keto-steroidy na aktívne 17 $\beta$ -hydroxy formy alebo opačne [6, 10, 11]. Schéma syntézy steroidov je uvedená na Obrázku č. 3.



Obrázok č. 3: Biosyntéza steroidných hormónov z cholesterolu. Prevzaté z referencie [12].

### 3.1.3 Metabolizmus steroidných hormónov

Metabolizmus steroidných hormónov pozostáva z dvoch fáz. Prvá fáza zahŕňa redukciu, oxidáciu a hydroxyláciu daného steroidu. Androgény, glukokortikoidy, mineralokortikoidy a progestíny podliehajú redukcii po ktorej nasleduje hydroxylácia. Tento proces zahŕňa enzýmy: 5 $\alpha$  alebo 5 $\beta$ -reduktázu a HSD. Tieto reductázy zabezpečujú redukciu dvojitej väzby v polohe C4 a C5 hormónu. HSD zabezpečuje hydroxyláciu v polohe C3 steroidu. Estrogény majú odlišný metabolizmus kvôli aromatickému kruhu A a dochádza u nich primárne k hydroxylácii na estron. Cieľom druhej fázy metabolizmu je zníženie hydrofobicity molekúl, aby sa mohli následne renálne eliminovať. Dochádza preto ku konjugácii steroidného hormónu so sulfátom alebo glukuronidom v polohe C3. Väčšina metabolitov podlieha konjugácii práve s glukuronidom a iba niektoré, ako napríklad DHEA, so sulfátom [6].

K inaktivácii – konverzii biologicky aktívnej látky na neaktívnu látku – steroidných hormónov dochádza najmä v pečeni, v menšej miere v obličkách a v črevách. V pečeni je redukcia v prvej fáze metabolizmu inaktivačný proces, neplatí to však je všetky tkanivá, napr. 5 $\alpha$ -dihydrotestosterón sa tvorí v prostate a je ešte účinnejší než testosterón [5].

### 3.1.4 Steroidy analyzované v tejto práci

Cieľom práce bolo vyvinúť metódu prípravy vzorky, ktorá bude následne použitá pre analýzu vzoriek myšej plazmy s cieľom sledovať vplyv akútneho a chronického stresu na plazmatickú koncentráciu steroidných hormónov. Set analyzovaných steroidov bol preto zostavený na základe požiadaviek Fyziologického Ústavu Akadémie vied Českej republiky, ktorý vykonával biologické experimenty.

Názvoslovie a vybrané fyzikálne chemické vlastnosti analyzovaných steroidných látok zobrazuje Tabuľka č. 1. Podľa logP (rozdeľovací koeficient systému oktanol-voda) ide väčšinou o lipofilné látky nepresahujúce hodnoty logP 4,61, dobre rozpustné v acetonitrile a metanole. Výnimkou je polárnejší ALDO (21) s hodnotou logP 0,06.

Parameter pKa (záporný dekadický logaritmus disociačnej konštanty pre kyseliny) sa pohybuje v rozmedzí 10,46 – 18,92, jedná sa teda o veľmi slabé kyseliny.

Molekulová hmotnosť testovaných analytov sa pohybuje v rozmedzí 286,19 – 393,21. Štruktúrne sa často jedná o polohové izoméry alebo stereoizoméry vykazujúce rovnaký sumárny vzorec a molekulovú hmotnosť. Tabuľky č. 1-5 uvádzajú steroidy analyzované v tejto práci a ich vybrané parametre.




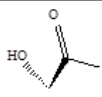
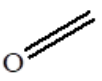

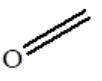
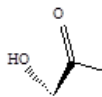
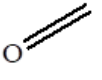
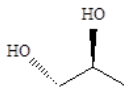
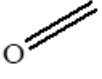

Tabuľka č. 1: Zoznam steroidov analyzovaných v tejto práci a ich fyzikálne chemické vlastnosti. Nižšie uvedené fyzikálne chemické vlastnosti boli získané z databáz SciFinder, PubChem a ChemDraw. Dvojice látok majúce rovnakú hmotu sú vyznačené rovnakou farbou. Č. – číslo analytu, m/z – pomer hmotnosti a náboja, logP – rozdeľovací koeficient systému oktanol-voda, pKa – záporný dekadický logaritmus disociačnej konštanty pre kyseliny, N/A - nenájdené

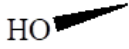

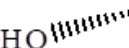




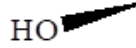

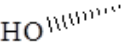
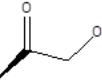
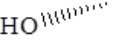
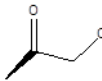

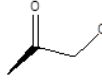
Č.	Triviálny názov	Skratka	Systematický názov	Sumárny vzorec	m/z	logP	pKa
1	pregnenolon	P5	5-pregnen-3 $\beta$ -ol-20-on	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	316,24	3,98	15,00
2	17-hydroxypregnenolon	17 $\alpha$ OHP5	5-pregnen-3 $\beta$ ,17-diol-20-on	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	332,24	2,56	13,02
3	progesterón	P4	4-pregnen-3,20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	314,22	3,78	18,92
4	17 $\alpha$ -hydroxyprogesterón	17 $\alpha$ OHP4	4-pregnen-17-ol-3,20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	330,22	2,36	13,03
5	17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxyprogesterón	17 $\alpha$ ,20 $\beta$ OHP4	4-pregnen-17,20 $\beta$ -diol-3-on	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	332,24	2,70	14,79
6	5 $\alpha$ -dihydroprogesterón	5 $\alpha$ DHP4	5 $\alpha$ -pregnan-3,20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	316,24	4,61	N/A
7	epiallopregnanolon	EPIALLO-P-ONE	5 $\alpha$ -pregnan-3 $\beta$ -ol-20-on	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	318,26	4,46	15,12
8	allopregnanolon	ALLO-P-ONE	5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ -ol-20-on	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	318,26	4,46	15,12
9	20 $\alpha$ -hydroxyprogesterón	20 $\alpha$ OHP4	4-pregnen-20 $\alpha$ -ol-3-on	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	316,24	3,62	14,69
10	11 $\beta$ -hydroxyprogesterón	11 $\beta$ OHP4	4-pregnen-11 $\beta$ -ol-3,20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	330,22	2,62	14,52
11	tetrahydrodesoxykortikosterón	THDOC	5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,21-diol-20-on	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	334,25	3,10	12,98
12	allotetrahydrodesoxykortikosterón	ALLO-THDOC	5 $\alpha$ -pregnan-3 $\alpha$ ,21-diol-20-on	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	334,25	3,10	12,98
13	11-deoxykortikosterón	11DOC	4-pregnen-21-ol-3,20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	330,22	2,42	12,98
14	kortikosterón	B	4-pregnen-11 $\beta$ , 21-diol-3,20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	346,21	1,26	12,98
15	11-dehydrokortikosterón	11DHC	4-pregnen-21-ol-3,11,20-trion	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	344,20	1,58	12,95
16	5 $\alpha$ -dihydrokortikosterón	5 $\alpha$ DHC	5 $\alpha$ -pregnan-11 $\beta$ , 21-diol-3,20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	348,23	2,09	12,98
17	5 $\beta$ -dihydrokortikosterón	5 $\beta$ DHC	5 $\beta$ -pregnan-11 $\beta$ , 21-diol-3,20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	348,23	2,09	12,98
18	kortizol	F	4-pregnen-11 $\beta$ ,17,21-triol-3,20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	362,21	0,50	12,47
19	11-deoxykortizol	11DOCSOL	4-pregnen-17,21-diol-3,20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	346,21	1,66	12,64
20	kortizón	E	4-pregnen-17,21-diol-3,11,20-trion	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	360,19	0,82	12,37
21	aldosterón	ALDO	4-pregnen-11 $\beta$ ,21-diol-3,18,20-trion	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	360,19	0,06	12,98
22	testosterón	T	4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-on	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	288,21	3,31	15,06

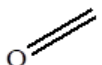

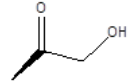
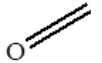

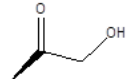
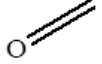

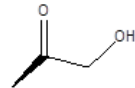
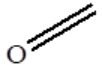

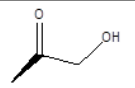
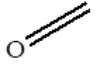
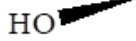
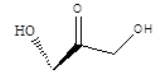
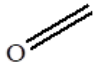
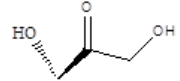
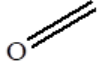

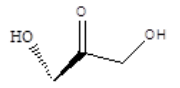


23	5 $\alpha$ -dihydrotestosterón	5 $\alpha$ DHT	5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -ol-3-on	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	290,44	3,85	15,08
24	dehydroepiandrosterón	DHEA	5-androsten-3 $\beta$ -ol-17-on	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	288,21	3,71	15,02
25	DHEA sulfát, sodná soľ	DHEA-S	5-androsten-3 $\beta$ -ol-17-on sulfát, sodná soľ	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> NaO <sub>5</sub> S	390,15	2,80	N/A
26	7a-hydroxyDHEA	7 $\alpha$ OHDHEA	5-androsten-3 $\beta$ ,7 $\alpha$ -diol-17-on	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	304,42	2,69	14,06
27	7b-hydroxyDHEA	7 $\beta$ OHDHEA	5-androsten-3 $\beta$ ,7 $\beta$ -diol-17-on	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	304,42	2,69	14,06
28	7-oxoDHEA	7OXODHEA	5-androsten-3 $\beta$ ,ol-7,17-dion	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	302,19	2,55	14,67
29	androsténdión	A4	4-androsten-3,17-dion	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	286,19	3,50	N/A
30	epiandrosterón	EPI-AN	5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ -ol-17-on	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	290,22	3,93	15,14
31	androsterón	AN	5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ -ol-17-on	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	290,22	4,18	15,14
32	androstandión	5 $\alpha$ DHA4	5 $\alpha$ -androstan-3,17-dion	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	288,21	3,60	N/A
33	androstandión (5 $\beta$ )	5 $\beta$ DHA4	5 $\beta$ -androstan-3,17-dion	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	288,21	3,60	N/A
34	17 $\beta$ -dihydroandrosterón	3 $\alpha$ Adiol	5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	290,22	4,39	15,07
35	17 $\beta$ -dihydroandrosterón (3 $\beta$ )	3 $\beta$ Adiol	5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	290,22	4,39	15,07
36	dexametazón	DEXA	9 $\alpha$ -fluoro-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-trihydroxy-16 $\alpha$ - methylpregnan-1,4-dien-3,20-dion	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> FO <sub>5</sub>	393,21	2,03	12,13
37	betametazón	BETA	9 $\alpha$ -fluoro-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-trihydroxy-16 $\beta$ - methylpregna-1,4-dien-3,20-dion	C <sub>22</sub> H <sub>29</sub> FO <sub>5</sub>	393,21	2,03	12,13
38	$\beta$ -estradiol	$\beta$ -ESTRADIOL	17 $\beta$ -estradiol	C <sub>18</sub> H <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	253,03	3,91	10,46

Tabuľka č. 2: Prehľad C21 steroidných hormónov analyzovaných v tejto práci uvádzajúci substituenty. Číslovanie jednotlivých uhlíkov (C<sup>x</sup>) zodpovedá číslovaníu uvedenom na Obrázku č.1. Č. – číslo analytu priradené podľa Tabuľky č. 1

Č.	Skratka	C <sup>3</sup>	C <sup>4</sup>	C <sup>5</sup>	C <sup>6</sup>	C <sup>7</sup>	C <sup>11</sup>	C <sup>17</sup>	C <sup>18</sup>
1	P5	HO 	-	= C <sup>6</sup>	= C <sup>5</sup>	-	-		-
2	17 $\alpha$ OHP5	HO 	-	= C <sup>6</sup>	= C <sup>5</sup>	-	-		-
3	P4		= C <sup>5</sup>	= C <sup>4</sup>	-	-	-		-
4	17 $\alpha$ OHP4		= C <sup>5</sup>	= C <sup>4</sup>	-	-	-		-
5	17 $\alpha$ ,20 $\beta$ OHP4		= C <sup>5</sup>	= C <sup>4</sup>	-	-	-		-
6	DHP4		-	-	-	-	-		-











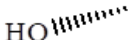





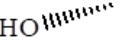



7	EPIALLO-P-ONE		-	-	-	-	-		-
8	ALLO-P-ONE		-	-	-	-	-		-
9	20 $\alpha$ OHP4		= C <sup>5</sup>	= C <sup>4</sup>	-	-	-		-
10	11 $\beta$ OHP4		= C <sup>5</sup>	= C <sup>4</sup>	-	-			-
11	THDOC		-	= C <sup>4</sup>	-	-	-		-
12	ALLO-THDOC		-	-	-	-	-		-
13	11DOC		= C <sup>5</sup>	= C <sup>4</sup>	-	-	-		-

14	B		= C <sup>5</sup>	= C <sup>4</sup>	-	-	HO 		-
15	11DHC		= C <sup>5</sup>	= C <sup>4</sup>	-	-			-
16	5 $\alpha$ DHC		-	-	-	-	HO 		-
17	5 $\beta$ DHC		-	-	-	-	HO 		-
18	F		= C <sup>5</sup>	= C <sup>4</sup>	-	-	HO 		-
19	11DOCSOL		= C <sup>5</sup>	= C <sup>4</sup>	-	-	-		-
20	E		= C <sup>5</sup>	= C <sup>4</sup>	-	-			-



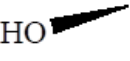

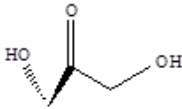


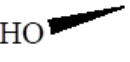

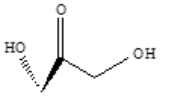
21	ALDO		= C <sup>5</sup>	= C <sup>4</sup>	-	-	HO		
----	------	--	------------------	------------------	---	---	----	--	--

Tabuľka č. 3: Prehľad C19 steroidných hormónov analyzovaných v tejto práci uvádzajúci substituenty. Číslovanie jednotlivých uhlíkov (C<sup>x</sup>) zodpovedá číslovaniu uvedenom na Obrázku č.1. Č. – číslo analytu priradené podľa Tabuľky č. 1

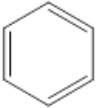


Č.	Skratka	C <sup>3</sup>	C <sup>4</sup>	C <sup>5</sup>	C <sup>6</sup>	C <sup>7</sup>	C <sup>11</sup>	C <sup>17</sup>
22	T		= C <sup>5</sup>	= C <sup>4</sup>	-	-	-	HO
23	5 $\alpha$ DHT		-	-	-	-	-	HO
24	DHEA	HO	-	= C <sup>6</sup>	= C <sup>5</sup>	-	-	
25	DHEA-S		-	= C <sup>6</sup>	= C <sup>5</sup>	-	-	
26	7 $\alpha$ OHDHEA	HO	-	= C <sup>6</sup>	= C <sup>5</sup>	HO	-	

27	7 $\beta$ OHDHEA	HO 	-	= C <sup>6</sup>	= C <sup>5</sup>	HO 	-	
28	7OXODHEA	HO 	-	= C <sup>6</sup>	= C <sup>5</sup>		-	
29	A4		= C <sup>5</sup>	= C <sup>4</sup>	-	-	-	
30	EPI-AN	HO 	-	-	-	-	-	
31	AN	HO 	-	-	-	-	-	
32	5 $\alpha$ DHA4		-	-	-	-	-	
33	5 $\beta$ DHA4		-	-	-	-	-	
34	3 $\alpha$ Adiol	HO 	-	-	-	-	-	HO 
35	3 $\beta$ Adiol	HO 	-	-	-	-	-	HO 

Tabuľka č. 4: Prehľad syntetických steroidných hormónov analyzovaných v tejto práci uvádzajúci substituenty. Číslovanie jednotlivých uhlíkov ( $C^x$ ) zodpovedá číslovaniu uvedenom na Obrázku č.1. Č. – číslo analytu priradené podľa Tabuľky č. 1

Č.	Skratka	$C^1$	$C^3$	$C^4$	$C^9$	$C^{11}$	$C^{16}$	$C^{17}$
36	DEXA	= $C^2$		= $C^5$	F 	HO 		
37	BETA	= $C^2$		= $C^5$	F 	HO 		

Tabuľka č. 5: Prehľad  $C_{18}$  steroidných hormónov analyzovaných v tejto práci uvádzajúci ich substituenty. Číslovanie jednotlivých uhlíkov ( $C^x$ ) zodpovedá číslovaniu uvedenom na Obrázku č.1. Č. – číslo analytu priradené podľa Tabuľky č. 1

Č.	Skratka	Kruh A	$C^3$	$C^{17}$
38	$\beta$ -ESTRADIOL		HO 	HO 

### 3.2 Metódy prípravy vzorky

Vzorka zozbieraná k analýze je zmesou analytu, interferencií a matrice. Kvôli svojmu zloženiu väčšina vzoriek nie je vhodná k priamej analýze a musí byť najprv upravená. Takáto úprava sa označuje ako príprava vzorky a vykonáva sa s cieľom modifikovania vzorky na formu, ktorá je vhodná pre zamýšľanú analýzu. Príprava vzorky je manuálne aj časovo náročná a je to proces náchylný na vznik chyby. Má zásadný vplyv na celkový čas analýzy a najmä na kvalitu nameraných dát, preto je výber a optimalizácia vhodnej metódy kľúčovým faktorom zodpovedajúcim za úspech analýzy a spoľahlivosť a presnosť výsledkov [13, 14].

Najčastejšie používané metódy v analýze steroidných hormónov sú klasické metódy PP, SPE, LLE a moderná metóda SLE [15, 16].

Nasledujúca kapitola obsahuje súhrn klasických metód a moderných trendov prípravy vzorky. Tato práca bola zameraná na optimalizáciu metódy PP a SLE, preto budú v tejto kapitole detailnejšie popísané predovšetkým tieto metódy.

#### 3.2.1 Proteínová precipitácia

PP je široko rozšírená metóda prípravy vzorky pred chromatografickou analýzou spojená predovšetkým s detekciou pomocou hmotnostnej spektrometrie (MS) [17]. Je vhodná pre matrice s vyšším obsahom proteínov ako sú sérum, plazma či plná krv. Jej výhodami sú jednoduchosť, minimálne straty vzorky, lacné reaktanty, relatívne nízka pracovná záťaž, široká aplikovateľnosť a jednoduchosť automatizácie [19]. Nevýhodou však je, že vo vzorke aj naďalej zostávajú interferencie, ktoré môžu komplikovať analýzu, napr. kvôli koelúcii či ovplyvneniu detekcie pri použití MS. Môže sa tak znižovať citlivosť, reprodukovateľnosť a selektivita metódy [7, 18].

Pri PP sa používajú rôzne precipitačné činidlá:

- kyseliny: kyselina trichlóroctová (TCA), kyselina chlorovodíková (HCl)
- organické rozpúšťadlá: acetonitril (ACN), metanol (MeOH), etanol (EtOH)
- soli viacmocných kovov: síran zinočnatý

V prípade kyselín a organických rozpúšťadiel dochádza v dôsledku zmeny pH alebo hydrofobicity k zmenám interakcií medzi proteínmi a vodným prostredím. V prípade solí kovov dochádza k tvorbe väzieb s funkčnými skupinami proteínov. Dochádza k rozrušeniu intramolekulárnych interakcií a proteíny denaturujú, agregujú a vypadávajú z roztoku [18]. Princíp PP je nasledovný: vzorky sú najprv zmiešané s 3-5 násobným množstvom precipitačného činidla ako je vlastný objem vzorky. Dôjde k precipitácii a následne sa využije centrifugácia alebo filtrácia na oddelenie supernatantu a precipitátu. Supernatant môže byť priamo nastrekovaný do kvapalinového chromatografického systému (LC) alebo vysušený a rekonštituovaný v LC mobilnej fáze na zaistenie požadovanej koncentrácie vzorky a kompatibility s mobilnou fázou [17, 18].

#### 3.2.2 Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny

Jedná sa o jednu z najstarších a najviac používaných metód prípravy vzorky, ktorá je využiteľná pre široké spektrum biologických materiálov ako sú krv, moč alebo žlč. Jej výhodami sú vyššia selektivita oproti PP, krátky vývoj metódy a finančná nenáročnosť. Nevýhodami sú však použitie veľkého množstva organických rozpúšťadiel, tvorba



emulzií a často nutná niekoľkonásobná extrakcia, čím sa predlžuje trvanie metódy [13, 19].

LLE je založená na princípe rozdeľovania analytov (ktoré by mali vykazovať dostatočne vysoký rozdeľovací koeficient) medzi dve vzájomne nemiesiteľné kvapaliny – polárnu a nopolárnu. Dochádza k prestupu analyzovaných látok do nopolárneho extrakčného činidla a tak k ich separácii od vodnej zložky vzorky. Bežnými extrakčnými činidlami sú: dichlórmetán (DCM), chloroform (CHLFR), n-butylchlorid, toluén a hexan (HEX). Na podporu extrakcie je vhodné systém trepať, no príliš intenzívne trepanie môže spôsobovať tvorbu emulzií [19].

Extrakciu je taktiež možné podporiť procesom vysol'ovania za použitia chloridu sodného, rozpustného vo vodnej fáze. Analyty prechádzajú do organickej fázy v neionizovanej forme, preto je dôležitá vhodná úprava pH vodnej fázy [19]. Na zníženie rizika interferencií je často vyžadovaná spätná extrakcia potenciálne interferujúcich látok matrice do malého množstva polárneho rozpúšťadla, napr. MeOH [20].

Postup LLE je nasledovný: vodná fáza (vzorka), obsahujúca analyty, je zmiešaná s organickou fázou tvorenou extrakčným činidlom. Pri trepaní systému dochádza k rozdeľovaniu analytu medzi polárnu a nopolárnu zložku systému. Extrakcia môže podľa potreby prebehnúť viackrát, pričom organická fáza je po každej extrakcii odvádzaná a jednotlivé frakcie sú následne spojené. Organická fáza je vysušená, rozpúšťadlo je následne odparené a vzorka je rekonštituovaná v LC mobilnej fáze [21].

### 3.2.3 Extrakcia na tuhú fázu

V snahe eliminovať vyššie spomínané nevýhody LLE, najmä vysokú spotrebu organických rozpúšťadiel, bola vyvinutá metóda SPE [13, 22]. Jedná sa o jednoduchú metódu s vysokou selektivitou pre ktorú je dostupný široký výber sorbentov – nopolárne sorbenty C18, C8 alebo polárne sorbenty (silikagél, oxid hlinitý, florisil či rôzne polyméry). Množstvo rozpúšťadla, ktoré sa pri SPE využíva je redukované. Metóda má však aj svoje nevýhody medzi ktoré patrí jej komplexnosť, vysoká cena a neexistencia univerzálneho sorbentu [13, 18, 23].

SPE je metóda založená na princípe rozdeľovania látok medzi kvapalinu a pevnú fázu (sorbent). Analyty sú na sorbente zadržované nasledovnými mechanizmami: mechanizmom adsorpcie (SPE na reverzných fázach) alebo mechanizmom iónovej výmeny (viacmodálne SPE) [18, 24].

Prevedenie metódy je nasledovné: v prvom kroku je nutné zmáčanie sorbentu, presnejšie jeho funkčných skupín, za účelom jeho aktivácie. Na to sa najčastejšie využíva MeOH alebo ACN. Nasleduje kondicionovanie sorbentu rozpúšťadlom čo najpodobnejším rozpúšťadlu aplikovanej vzorky. Po nanosení vzorky na sorbent dôjde k interakciám medzi analytom a stacionárnou fázou. Sorbent sa niekoľkokrát premyje premývacím činidlom, aby bolo zaistené odstránenie matrice a interferujúcich látok. Sorbent je potom vysušený vzduchom alebo dusíkom za účelom odstránenia zvyškovej vody a premývacieho činidla. Na sorbent je nanosené elučné činidlo, čím sú analyty vymyté zo stacionárnej fázy a zozbierané pre analýzu. Väčšina protokolov vyžaduje odparenie nopolárneho organického rozpúšťadla a následnú rekonštitúciu analytov v rozpúšťadle kompatibilnom s LC-MS systémom [18, 23].

### 3.2.4 Moderné trendy v príprave vzorky

Medzi moderné trendy v príprave vzoriek patria miniaturizácia a automatizácia. Cieľom miniaturizácie je zníženie množstva použitých rozpúšťadiel, vzoriek a chemických reagentov a skrátenie času prípravy vzorky. Nevýhodami neautomatizovanej metódy je totiž dlhý čas potrebný k analýze, komplexnosť prevedenia a vyššia možnosť analytickej chyby. Významom automatizácie je teda zvýšenie priepustnosti vzorky, jednoduchosti prevedenia a environmentálnej prijateľnosti metódy [13, 25, 26].

Metóda SPE sa od svojho zavedenia na trh výrazne vyvinula. Dnes využíva mikrogramové množstvá sorbentov a je schopná dosiahnuť vysokej výťažnosti za súčasného zníženia množstva použitých organických rozpúšťadiel. Materiály pre výrobu sorbentov sú rozmanité. Pre svoju jednoduchú miniaturizáciu sa používajú nanočastice, napr. uhlíkové a magnetické. Mikroextrakcia na tuhú fázu v pipetovej špičke (PT- $\mu$ SPE) je príkladom miniaturizovanej SPE metódy, kedy sa hrot pipety uplatňuje ako SPE kolónka. SPE bola tiež automatizovaná a bola vyvinutá komerčne dostupná mikroextrakcia na tuhú fázu (SPME) alebo sorpčná extrakcia na miešacej tyčinke (SBSE) [13, 25, 26].

LLE sa taktiež podarilo automatizovať a miniaturizovať. Disperzná mikroextrakcia z kvapaliny do kvapaliny (DLLME) je príkladom rýchlejšej, lacnej a jednoduchej miniaturizovanej metódy využiteľnej pre vzorky na vodnej báze. Má dobrú efektivitu a vyžaduje množstvo vzorky pohybujúce sa rádovo v mikrolitroch. DLLME sa taktiež podarilo automatizovať. Ďalším príkladom moderných miniaturizovaných mikroextračných metód sú mikroextrakcia z kvapalnej fázy (LPME) a elektromembránová mikroextrakcia (EME). Medzi moderné techniky odvodené od LLE patrí taktiež SLE [13, 25, 26].

### 3.2.5 Extrakcia z kvapaliny do kvapaliny s využitím inertného nosiča

SLE je moderný trend vychádzajúci z LLE používajúci sa na prípravu vzoriek biologických tekutín. Zabezpečuje rýchle, jednoduché a efektívne odstránenie vo vzorke obsiahnutých proteínov a iných interferujúcich látok matrice. Jej výhodami sú oproti klasickým metódam vyššia rýchlosť extrakcie, vyššia výťažnosť a nižší vplyv matricových efektov. Na rozdiel od LLE nedochádza k tvorbe emulzií a metódu je taktiež pomerne jednoduché automatizovať [26-30]. Nevýhodami sú však cena a, rovnako ako pri LLE, využitie relatívne veľkého množstva organických rozpúšťadiel [23, 31].

Metóda využíva chemicky inertný nosič v podobe doštičky, ktorá obsahuje kremelinu. Tá má obsah kremíka dosahujúci hodnoty až 90 %, ktorý zabezpečuje jej polárny charakter. Na doštičke tak dochádza k polárnym interakciám s vodnou vzorkou, ktorá sa adsorbuje na jej povrch. Nepochárne látky sú následne extrahované nepolárnym rozpúšťadlom (extrakčným činidlom) a zozbierané pre následnú analýzu. Ako extrakčné činidlá sa používajú napr. HEX, metyl-terc-butyléter (MTBE), DCM, CHLFR alebo etylacetát (EtAc) [27, 29, 32, 61].

SLE metóda využíva manifold pre aplikáciu pozitívneho tlaku. Jedná sa o modernú alternatívu vákuového manifoldu a jeho cieľom je zabezpečiť rovnomerný a kontrolovateľný tlak na celej doštičke. Existujú dva typy manifoldov: analógový

manifold (napr. Waters Positive Pressure-96 Processor) alebo poloautomatizovaný manifold (napr. OttoSPEcialist Positive Pressure Manifold). Ten má oproti analógovému manifoldu niekoľko výhod: eliminuje sa ľudská chyba, chyby pracovaného postupu a jednotlivé kroky sú dokumentované [33, 62].

Prevedenie metódy je nasledovné: v prvom kroku sa nanesie vzorka na kremelinovú doštičku. Analyty obsiahnuté vo vzorke musia byť v neionizovanej podobe, preto môže byť potrebné pred samotným nanosením vzorky upraviť jej pH. Po nanosení dochádza k adsorpcii polárnej fázy na povrch doštičky a k interakciám s polárnymi skupinami kremeliny. V ďalšom kroku sa na doštičku nanesie extrakčné činidlo a prebehne samotná extrakcia nepolárnych analytov. Extrakcia prebieha najprv pomocou gravitácie, neskôr aplikovaním tlaku pomocou manifoldu. Rovnako ako u klasickej LLE je eluát/organická fáza podrobená analýze priamo alebo dochádza k jeho odpareniu a rekonštitúcii v mobilnej fáze, ktorá je kompatibilná s LC-MS systémom [27, 29, 61].

### **3.3 Chromatografické metódy využívané v analýze steroidov**

#### **3.3.1 Plynová chromatografia**

Plynová chromatografia (GC) je považovaná za „zlatý štandard“ v analýze steroidných hormónov. Je to separačná technika založená na rozdieloch teploty varu jednotlivých zložiek analyzovanej zmesi. GC ako mobilnú fázu využíva inertný plyn (vodík, hélium, dusík). Vzorka je odparená za vysokej teploty (100-300 °C) a spolu s nosným plynom privedená na termostatovanú kolónu. Teplota môže byť stála alebo sa môže meniť v závislosti na chromatografickom móde. Kolóny sa používajú náplňové aj kapilárne, preferované sú však náplňové. Stacionárna fáza musí byť vysoko chemicky a teplotne stabilná, selektívna a musí mať nízku viskozitu pri teplote analýzy [40, 41].

GC je využiteľná pre prchavé analyty – nevyhnutným krokom je preto často derivatizácia vzorky na dosiahnutie vyššej prchavosti a tepelnej stability analytov, čo vedie k zvýšenej citlivosti detekcie a zvýšenému chromatografickému rozlíšeniu. Najpoužívanejšou derivatizačnou metódou pre analýzu steroidných hormónov obsahujúcich hydroxylovú skupinu je silylácia. Príkladmi silylačných derivatizačných činidiel sú: trimetylsilimidazol alebo trimetylchlorosilan. Pri derivatizácii je nutná prísna kontrola všetkých parametrov reakcie, aby sa zamedzilo vzniku vedľajších produktov [39]. V prípade konjugovaných steroidov (s glukuronidom či sulfátom) musí samotnej derivatizácii predchádzať dekonjugučný krok, čím sa ešte viac zvyšuje riziko nechcených modifikácií a tvorby polohových izomérov [38]. Ďalšou nevýhodou GC je pracovná a časová náročnosť celého procesu [39].

#### **3.3.2 Superkritická fluidná chromatografia**

Superkritická fluidná chromatografia (SFC) je alternatívna chromatografická metóda vhodná pre separáciu štruktúrne a hmotnostne podobných zlúčenín ako sú steroidy. Oproti LC a GC dosahuje vyššiu priepustnosť, má zlepšenú chromatografickú účinnosť a selektivitu a na rozdiel od GC nevyžaduje derivatizáciu, čím sa znižuje čas potrebný pre prípravu vzorky a analytický proces. Je to taktiež metóda potenciálne využiteľná pre analýzu konjugovaných steroidov, čím sa ďalej zvyšuje potenciál skrátenia času analýzy a zníženia ekologickej záťaže [38, 65].

SFC využíva mobilnú fázu v podobe superkritického stavu oxidu uhličitého. Ten nastáva, keď CO<sub>2</sub> prekročí svoju kritickú teplotu a kritický tlak. Mobilná fáza má tak hustotu a rozpúšťaciu schopnosť kvapaliny, ale nízku viskozitu a plynu podobnú difuzivitu. Na zvýšenie polarizácie a zlepšenie rozpustnosti analytu v mobilnej fáze a modifikáciu elučnej sily sa využívajú kosolventy v podobe organických rozpúšťadiel alebo organických rozpúšťadiel s pridanými aditívami. Oproti LC sa v SFC-MS využíva taktiež prídavná kvapalina, ktorá bráni precipitácii analytu na stenách kapilár po dekompresii CO<sub>2</sub> pred vstupom do iónového zdroja. Ďalšou výhodou prídavnej kvapaliny je možnosť zvýšenia ionizácie analyzovaných látok bez vplyvu na selektivitu vyvinutej separačnej SFC metódy. Požiadavkou na stacionárnu fázu je stabilita v CO<sub>2</sub> a zmesi CO<sub>2</sub>/kosolvent a odolnosť voči tlaku až 600 bar. Metóda môže využívať kolóny náplňové aj kapilárne, ale moderné SFC metódy využívajú prakticky iba náplňové kolóny. Väčšina kolón používaná v SFC bola pôvodne vyvinutá pre LC [36-38]. Používané stacionárne fázy sú väčšinou založené na silikagély modifikovanom polárnou (diol, amín, 2-etylpyridín) alebo nepolárnou (C18, 1-aminoantracén) funkčnou skupinou [37].

### 3.3.3 Ultra-vysokoučinná kvapalinová chromatografia

UHPLC je chromatografická metóda založená na princípe rozdeľovania rozpustených látok medzi nepohyblivú stacionárnu fázu a pohyblivú mobilnú fázu. Dochádza k interakciám analytu a stacionárnej fáze, kedy sa uplatňuje mechanizmus adsorpcie – rôzne látky sú na stacionárnej fáze zadržované rozdielne dlhú dobu, čo vedie k ich separácii. Stacionárna fáza je tvorená pevným poréznym materiálom uloženým v kolóne, zatiaľ čo mobilná fáza nesúca analyt je kvapalina pretekajúca kolónou [47].

UHPLC využíva kolóny so stacionárnymi fázami tvorenými poréznymi časticami menšími ako 2 µm. Požiadavkami na stacionárnu fázu sú vysoká chemická a mechanická odolnosť. Najčastejšie používanými materiálmi sú silikagél a hybridné stacionárne fázy, menej často sa používa oxid zirkoničitý či organické polyméry. Sú dostupné stacionárne fázy pre rôzne chromatografické módy: reverzné fázy (RP), normálne fázy (NP), iónovo výmenné fázy (ionexy), fázy pre hydrofóbnú interakčnú chromatografiu (HIC) a hydrofilnú interakčnú chromatografiu (HILIC), gély a molekulové sitá či fázy pre viacmódalnu chromatografiu [34].

Zmenšenie častíc stacionárnej fázy pod 2 µm prináša niekoľko výhod – dochádza k zlepšeniu separačnej účinnosti, vyššiemu rozlíšeniu pík a ku skráteniu doby analýzy. Dôsledkom použitia častíc o tak malom rozmere je však generovanie vysokého spätného tlaku (až 150 MPa) (Tabuľka č. 6), čomu musí byť chromatografický systém adekvátne prispôsobený. Stabilný prietok a zloženie mobilnej fázy je zabezpečené použitím ultra-vysokotlakového čerpadla [34].

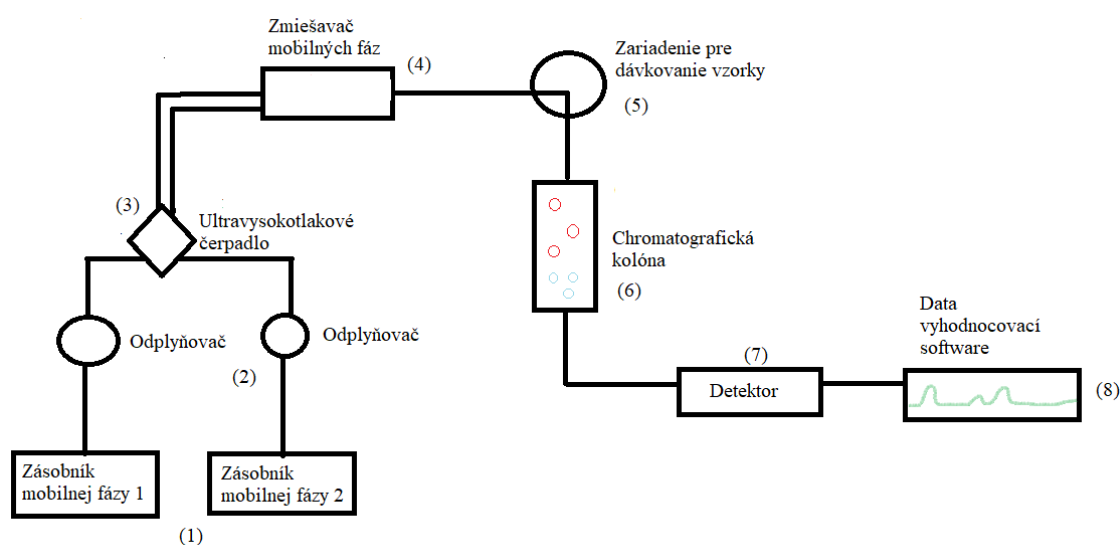
UHPLC je metóda so širokým bioanalytickým využitím, uplatňuje sa napr. v identifikácii metabolitov, bioekvivalenčných štúdiách, proteomike či toxikológii. Medzi jej nevýhody patrí vyššia cena, no najmä nutnosť špecializovanej inštrumentácie zaisťujúcej dostatočne malé mimokolónové objemy a dostatočnú odolnosť voči vysokému tlaku. Vznikajú tak problémy kompatibility s už existujúcimi metódami a prenosom medzi laboratóriami [34].

Tabuľka č. 6: Porovnanie vybraných parametrov HPLC a UHPLC. Prevzaté z referencie [34]. HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, UHPLC – ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

Parameter	HPLC	UHPLC
<b>Tlak</b>	do 400 bar	nad 400 bar (150 MPa)
<b>Spotreba organických rozpúšťadiel</b>	vyššia	nižšia
<b>Prietok mobilnej fázy</b>	ml/min	μl/min
<b>Priemer častíc kolóny</b>	3-10 μm	1,5-2 μm
<b>Vnútrotný priemer kolóny</b>	3-5 mm	2,1 mm
<b>Rozlíšenie</b>	nižšie	vyššie
<b>Rýchlosť analýzy</b>	nižšia	vyššia

### 3.3.4 Inštrumentácia v UHPLC

UHPLC inštrumentácia je schematicky zobrazená na Obrázku č. 4. Systém sa skladá z jedného (v prípade izokraticej elúcie) alebo viacerých (v prípade gradientovej elúcie) zásobníkov mobilných fáz (1). Mobilné fázy sú zbavené plynov v odplyňovači (2) a zmiešané v zmiešavači mobilných fáz (4). Stabilný tok a zloženie mobilnej fázy je zabezpečené ultra-vysokotlakovým čerpadlom (3). Zariadenie pre dávkovanie vzorky (5) nastrekuje vzorku do toku mobilnej fázy. Mobilná fáza je následne vedená na chromatografickú kolónu (6), kde prebehne samotná separácia analytov. Kolóna je spojená priamo s detektorom (7), odkiaľ je signál vedený do dátovej stanice a vyhodnotený pomocou chromatografického softwaru (8) [34, 35].



Obrázok č. 4: Schematický popis inštrumentácie v UHPLC (vlastný obrázok). Prevzaté z referencie [34, 35].

### 3.3.5 Detektory v UHPLC

Detektory zaznamenávajú rozdiel v signáli pri prechode čistej mobilnej fázy a mobilnej fázy obsahujúcej analyt. Medzi najčastejšie používané detektory v kvapalinovej chromatografii patria:

1. **Spektrofotometrické detektory:** založené na princípe absorpcie žiarenia v UV-VIS oblasti (190 až 800 nm). UV detektor je široko používaný a dostačujúci pre väčšinu aplikácií. Jedná sa však o neselektívny detektor, čo môže byť nevýhodou pri analýze vzoriek s komplexnou maticou [34].
2. **Fluorescenčné detektory:** založené na princípe luminiscencie a meraní emisného žiarenia, ktoré látka vyžiari po absorpcii excitačného elektromagnetického žiarenia [34].
3. **Chemiluminiscenčné detektory:** využívajú fluorescenciu, ktorá je dôsledkom chemickej reakcie [34].
4. **Refraktometrické detektory:** fungujúce na princípe odozvy, ktorá je úmerná rozdielu indexu lomu eluátu v mernej cele a indexu lomu mobilnej fázy v referenčnej cele detektoru [34].
5. **Elektrochemické detektory:** využiteľné pre látky, ktoré sú schopné podliehať oxidácii či redukcii [34].
6. **Vodivostné detektory:** založené na princípe merania elektrickej vodivosti eluátu v prietokovej cele medzi dvoma elektródami na ktoré je vkladané striedavé napätie. Patria do skupiny tzv. univerzálnych detektorov [34].
7. **Detektory na báze aerosolu:** ich fungovanie možno rozdeliť do troch fáz: zmlžovanie, odparenie mobilnej fázy a detekcia. Jednotlivé detektory patriace do tejto skupiny sa líšia princípom detekcie vzniknutých častíc. Patria sem:
  - Odparovací detektor rozptylu svetla: detekcia prebieha meraním rozptylu svetla.
  - Detektor nabitého aerosolu: detekcia prebieha meraním vzniknutého prúdu elektrometrom [34].
8. **Hmotnostne spektrometrický detektor (MS):** funguje na princípe ionizácie vzorky a následnom rozdelení iónov podľa pomeru hmotnosti a náboja  $m/z$ . Jedná sa o špecifický druh detektoru s vysokou citlivosťou, ktorý možno využiť k identifikácii a kvantifikácii analytov [34].

### 3.4 Hmotnostná spektrometria

MS je analytická metóda založená na generovaní iónov z organických alebo anorganických zlúčenín a ich následnom rozdelení na základe pomeru hmotnosť/náboj ( $m/z$ ). MS sa používa na zistenie molekulovej hmotnosti a elementárneho zloženia zlúčením, rovnako ako na objasnenie ich štruktúry a kvantifikáciu. Zabezpečuje teda analýzu kvalitatívnu aj kvantitatívnu [42, 43].

Detekcia látok pomocou MS sa odohráva v troch krokoch: najprv dochádza k ionizácii vzorky, kedy sú neutrálne molekuly pomocou iónového zdroja prevedené na ióny. Nasleduje rozdelenie vzniknutých iónov podľa pomeru  $m/z$  v hmotnostnom analyzátoze. Vo finálnom kroku dôjde k detekcii iónov a zosilneniu signálu v detektore [34].

### 3.4.1 Ionizačný zdroj

V ionizačnom zdroji dochádza k prevedeniu neutrálnych molekúl na ióny. V závislosti na ionizačnej technike môže ionizácia prebiehať za atmosférického tlaku alebo v prítomnosti vákua. Ionizačné techniky sa delia na mäkké a tvrdé, pričom voľba ionizačnej techniky je ovplyvnená prchavosťou, tepelnou stabilitou, molekulovou hmotnosťou a polaritou látky. Pri tvrdých ionizačných technikách dochádza vplyvom použitia vyššej energie k rozsiahlej fragmentácii molekuly. Príkladom tvrdej ionizačnej techniky je elektrónová ionizácia (EI), ktorej podmienkou je prchavosť látky kvôli čomu je táto technika používaná najmä v spojení s GC [34].

V spojení s UHPLC sa najčastejšie využívajú mäkké techniky ionizácie prebiehajúce za atmosférického tlaku ako je ionizácia elektrosprejom (ESI), fotoionizácia za atmosférického tlaku (APPI) a chemická ionizácia za atmosférického tlaku (APCI). Pri ionizácii mäkkými ionizačnými technikami dochádza k minimálnej fragmentácii, pričom vznikajú protonizované molekuly  $[M+H]^+$  pri zázname kladných iónov a deprotonizované molekuly  $[M-H]^-$  pri zázname záporných iónov [42, 44].

Medzi najpoužívanejšie mäkké ionizačné techniky prebiehajúce za atmosférického tlaku používané pri spojení LC-MS patria:

1. **Ionizácia elektrosprejom (ESI):** vodné vzorky sú odparované na kovovej hrote kapiláry na ktorú je privádzaný vysoký elektrický potenciál, čím vznikajú rozprášené nabité kvapôčky. Kvapôčky sú odparené za použitia tepla a prúdu plynu (najčastejšie dusíka) a reziduálny elektrický náboj je z kvapôčok prenesený na analyty. Takto ionizované analyty sú následne transportované do vysokého vákua hmotnostného spektrometra. Vznikajú niekoľkonásobne nabité ióny, pričom množstvo nábojov stúpa s rastúcou veľkosťou molekuly a množstvom funkčných skupín. Ionizácia pomocou ESI je univerzálna – je ňou tak možné analyzovať látky so širokým rozsahom molekulových hmotností a lipofilit. ESI sa využíva na meranie molekulových hmotností peptidov, proteínov, biologických vzoriek, polymérov, nukleotidov, sacharidov a organokovov [42, 44].
2. **Chemická ionizácia za atmosférického tlaku (APCI):** analyt s mobilnou fázou prúdi vstupnou kapilárou do APCI zdroja, kde sa pomocou tepla odparuje. Ionizácia prebieha pomocou korónového výboja. Vzniknuté ióny rozpúšťadla následne reagujú s analytom, ktorý získava náboj pomocou medzimolekulárnych interakcií. Táto ionizačná technika je používaná pre málo polárne a nepolárne analyty s priemernou molekulovou hmotnosťou do 1500 Da [42].
3. **Fotoionizácia za atmosférického tlaku (APPI):** metóda využíva odparenie mobilnej fázy a následná excitácia a ionizácia molekúl prebieha za pomoci vysoko energetických fotónov generovaných iónovým zdrojom. Táto technika je použiteľná pre nepolárne analyty, ťažko ionizovateľné pomocou ESI a APCI [42].

### 3.4.2 Hmotnostné analyzátory

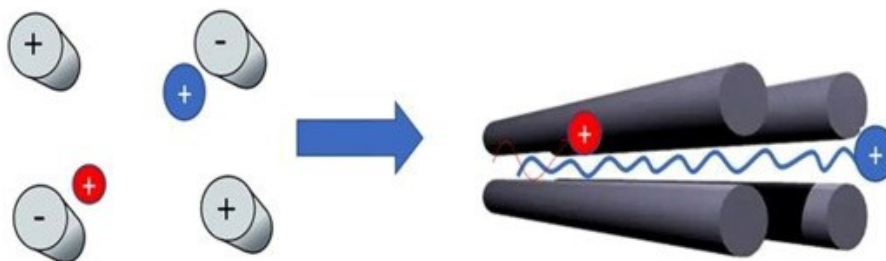
Po ionizácii sú vzniknuté ióny transportované do analyzátora, ktorý je umiestnený medzi ionizačným zdrojom a detektorom. Jeho úlohou je separácia iónov podľa  $m/z$ . Toto rozdelenie prebieha vo vákuu. Rozdelené ióny sú následne urýchlené a fokusované. Analyzátor je charakterizovaný nasledujúcimi parametrami: hmotnostný rozsah, rozlíšenie, účinnosť, odchýlka  $m/z$ , lineárny dynamický rozsah, rýchlosť a citlivosť. Analyzátory využívané v MS sú založené na nasledujúcich princípoch:

- zakrivenie dráhy letu v magnetickom poli alebo v elektrickom poli (prípadne v ich kombinácii): magnetický analyzátor
- stabilita oscilácií iónov v kombinácii jednosmerného a vysokofrekvenčného striedavého napätia: kvadrupól (Q), trojitý kvadrupól (QqQ), lineárna iónová pasca (LIT) či kvadrupólová iónová pasca (QIT)
- doba letu v oblasti bez poľa: analyzátor doby letu (TOF)
- absorpcia energie pri cykloidálnom pohybe iónov v kombinovanom magnetickom a elektrickom poli: iónová cyklotrónová rezonancia s Fourierovou transformáciou
- frekvencia harmonických oscilácií (napr. orbitálna pasca) [34].

V tejto práci bol využití hmotnostný spektrometer s kvadrupolovým analyzátorom, ktorý bude popísaný detailnejšie.

### 3.4.3 Kvadrupól

Jedná sa o najpoužívanejší typ analyzátora. Pozostáva zo štyroch paralelných tyčí v radiálnom usporiadaní umiestnených medzi iónovým zdrojom a detektorom. Na tyče je privádzané jednosmerné a vysokofrekvenčné striedavé napätie, čím dochádza k oscilácii iónov. V dvojrozmernej alebo trojrozmernej kombinácii týchto dvoch typov napätí je stabilná trajektória iba iónu s určitým pomerom  $m/z$  a tento ión je privádzaný na detektor. Postupne sú takto privedené na detektor všetky ióny [42]. Schematické znázornenie kvadrupólu je zobrazené na Obrázku č. 5.



Obrázok č. 5: Schematické zobrazenie kvadrupólu. Prevzaté z referencie [45].

### 3.4.4 Trojitý kvadrupól

Trojitý kvadrupól (QqQ) je využívaný v MS/MS a využíva zapojenie viacerých analyzátorov do série, v tomto prípade troch kvadrupólov. MS/MS sa využíva, pretože mäkké ionizačné techniky neposkytujú dostatočné štruktúrne informácie a uplatňuje sa tak najmä pri identifikácii a kvantifikácii látok v komplexných zmesiach a pri objasnení



fragmentačných procesov [34, 46]. Trojitý kvadrupól umožňuje meranie viacerých typov záznamov:

- sken produktových iónov, ktorý obsahuje ióny vzniknuté fragmentáciou prekurzorových iónov.
- sken neutrálnych strát, kedy sú monitorované prekurzory podliehajúce vybranej neutrálnej strate.
- sken prekurzorových iónov, ktorý poskytuje spektrum prekurzorových iónov z ktorých mohol vzniknúť určitý fragment.
- selektívny záznam vybraných reakcií (SRM), pri ktorom je sledovaná špecifická fragmentačná reakcia [34, 46].

V tejto práci bol použitý SRM typ záznamu, ktorý umožňuje dosiahnuť vyššiu selektivitu a citlivosť a je preto vhodný pre kvantifikáciu. Proces SRM je nasledovný: prvý analyzátor vyberie prekurzorový ión, ktorý podlieha fragmentácii v kolíznej cele (druhý analyzátor) za použitia inertného plynu. Následne posledný analyzátor umožní prechod k detektoru len vybranému  $m/z$  [34, 46].

### 3.4.5 Detektory

Prúd iónov privádzaný na detektor je zaznamenávaný vo forme elektrického prúdu. Príkladmi detektorov fungujúcich na tomto princípe sú: elektrónový násobič, fotonásobič a mikrokanálová doštička [42].

### 3.4.6 Spojenie LC-MS

Spojenie LC-MS sa používa pre vzorky vysoko komplexné, tvorené veľkým počtom komponentov. Najväčšími výhodami tohto spojenia sú:

- menšia spotreba vzoriek než pri off-line usporiadaní
- minimalizácia potlačenia signálu a zlepšenie kvality spektrálnych dát, keďže separácia zaisťuje odstránenie interferencií
- odhalenie koelúcie píkovo vďaka MS detekcii
- lepšia identifikácia látok a spoľahlivosť kvantitatívnej analýzy vďaka možnosti využitia izotopicky značených vnútorných štandardov
- možnosť separácie izomérov a látok s rovnakou hmotou, čo následne umožní ich spoľahlivú detekciu v MS [34, 44].

Rozpúšťadlami používanými pri spojení LC-MS sú prchavé rozpúšťadlá ako napr. MeOH či ACN, pričom kvalita rozpúšťadla je požadovaná vyššia než pri samotnom LC. Využitie bezvodného rozpúšťadla ako mobilnej fázy často nie je kompatibilné s ionizačnými technikami, najmä ESI. Prietok mobilnej fázy systémom sa líši podľa použitej ionizačnej techniky a výrobcu: pri ESI sa pohybuje od 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  po 1  $\text{ml}/\text{min}$  a pri APCI od 1  $\text{ml}/\text{min}$  až do 2  $\text{ml}/\text{min}$ . Vhodné aditíva sú taktiež prchavé látky, napr. kyselina mravčia (FA), kyselina octová a tlmivé roztoky octanu a mravčanu amónneho. Nevhodné sú tlmivé roztoky acetátu sodného alebo fosforečnanový tlmivý roztok. Využitie kyseliny triflóroctovej a fluórovaných karboxylových kyselín môže spôsobiť potlačenie signálu a ich koncentrácia v mobilnej fáze by mala byť čo najnižšia. Koncentrácia aditív by sa mala pohybovať pod 1 % alebo pod 10  $\text{mmol}/\text{l}$ , pri vyššej koncentrácii aditív totiž dochádza ku kompetícii o náboj pri ionizácii, čo vedie k poklesu signálu [34, 44].

Na dosiahnutie spoľahlivých a presných kvantitatívnych výsledkov sa pri LC-MS používajú vnútorné štandardy – izotopicky značené analyty s takmer totožnými chemickými vlastnosťami s analyzovanými látkami. Využívajú sa ako kompenzácia potlačenia signálu a chýb pri príprave vzorky, rovnako ako na kontrolu senzitivity MS a integrity LC systému [44].

### 3.5 Publikované práce zaoberajúce sa analýzou steroidov

Tabuľky č. 7-11 zobrazujú 14 prác publikovaných v rokoch 2015 až 2024, ktoré sa zaoberali analýzou steroidov.

Jedná sa o multianalytové práce okrem štúdie č. 5, ktorá analyzovala estradiol a č. 9, kedy sa jednalo o necielenú analýzu. Počet analyzovaných steroidov sa pohyboval v rozmedzí od 1 do 37, žiadna štúdia teda neanalyzovala všetky steroidy analyzované v tejto práci.

Štúdie č. 1-12 (Tabuľka č. 7-9) využívali ako chromatografickú techniku HPLC/UHPLC. Tabuľka č. 10 zobrazuje štúdiu využívajúcu GC a Tabuľka č. 11 štúdiu využívajúcu SFC.

Mobilné fázy v chromatografickom systéme HPLC/UHPLC pozostávali z H<sub>2</sub>O, ACN a MeOH, ďalej z FA, mravčanu a octanu amónneho a NH<sub>4</sub>F. Vo všetkých prípadoch bola použitá gradientová elúcia. V GC sa ako nosný plyn používalo hélium, v systéme SFC CO<sub>2</sub> a kosolvent MeOH.

Vo všetkých prípadoch bol na detekciu využitý MS. Ionizačnou technikou vo všetkých uvedených štúdiách, okrem štúdie č. 13, bola ESI a najčastejšie využitým analyzátorom bol QqQ, menej často Q-orbitálna pasca a QTOF.

Najčastejšie používaným biologickým materiálom bolo sérum a plazma. Štúdie č. 8, 9, 10, 11 a 12 používali menej typické materiály – moč, semennú tekutinu, tkanivo z endometria, plodovú vodu, mlieko a sliny.

Množstvo použitého objemu vzorky bolo v rozmedzí 50 µl do 2 ml. Ako metódy prípravy vzorky boli využité klasické metódy: SPE a LLE, v prípade štúdií č. 2, 4 a 8 im predchádzala PP.

Alternatívna SLE metóda bola používaná menej. Štúdia č. 5 zobrazuje jej využitie v spojení s LC-MS, štúdia č. 13 zase s GC-MS. V oboch štúdiách sa SLE osvedčila ako vhodná alternatíva ku klasickým metódam a štúdie poukazovali na jej výhody oproti týmto metódam. V štúdií č. 9 boli porovnávané metódy SLE a SPE. Štúdia demonštruje obmedzenia SLE metódy – množstvo vzorky nanášané na SLE sorbent je oproti SPE obmedzené. SLE metóda tak má nižšiu citlivosť pre vysoko viskózne biologické materiály, ktoré je treba zriediť. Táto nevýhoda však odpadá, pokiaľ je eluent pred SLE extrakciou odparený a rozpustený iba v požadovanom objeme rozpúšťadla.

Pri použití PP metódy precipitačné činidlá pozostávali z MeOH, ACN a ZnSO<sub>4</sub>, pri metóde SPE extrakčné činidlá tvorili MeOH, ACN, CHLFR a NH<sub>4</sub>F, pri metóde LLE extrakčné činidlá pozostávali z MTBE, ACN, EtAc, toluénu, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a NaCl a pri metóde SLE z DCM, EtAc a HEX.

Na základe prehľadu zobrazených prác možno dôvody vykonania diplomovej práce zhrnúť nasledovne: žiadna z publikovaných prác neanalyzovala všetky steroidy obsiahnuté v sete, ktorý bol analyzovaný v rámci tejto diplomovej práce. Bolo potrebné

vyvinúť metódu prípravy vzorky využívajúcu iba 40  $\mu$ l vzorky, keďže zamýšľaným použitím bola analýza myšej plazmy. Väčšina uvedených metód nebola dôkladne validovaná podľa medzinárodných smerníc, bolo teda nutné vyvinúť metódu, ktorá by podmienky daných smerníc spĺňala.

V rámci tejto diplomovej práce bola pre analýzu steroidov použitá metóda UHPLC-MS/MS vyvinutá v rámci diplomovej práce Mgr. Hromádka [63].

Tabuľka č. 7: Zobrazenie vybraných parametrov pre 12 štúdií využívajúcich LC publikovaných v rokoch 2015-2024 [48-59]. Ref. – číslo referencie, LC – kvapalinová chromatografia

Štúdia č.	Počet steroidov	Skupina steroidov	Typ matrice	Množstvo vzorky [ $\mu$ l]	Ref.
1	12	progesteróny	kravská plazma	500	[48]
2	15	mineralokortikoidy, glukokortikoidy	sérum	250	[49]
3	8	androgény, progesteróny, glukokortikoidy	sérum	100	[50]
4	24	androgény, progesteróny, glukokortikoidy, estrogény, mineralokortikoidy	sérum	100	[51]
5	1	estradiol	sérum	200	[53]
6	16	estrogény, progesteróny, androgény, glukokortikoidy, mineralokortikoidy	sérum	175	[54]
7	27	glukokortikoidy, mineralokortikoidy, progesteróny, androgény	sérum	200	[55]
8	15	glukokortikoidy, mineralokortikoidy, progesteróny, androgény	moč	2000 / 200	[52]
9	x	necielená analýza	semenná tekutina	200	[56]
10	14	estrogény, androgény, progesteróny, glukokortikoidy, mineralokortikoidy	sérum, plazma, tkanivo z endometria	150	[57]
11	28/15/12	kortikosteroidy, progesteróny, androgény, estrogény	plodová voda, sliny, materské mlieko	50 / 500 / 1000	[58]
12	26	glukokortikoidy, progesteróny	hovädzia plazma, odstredené mlieko, sliny	500	[59]

Tabuľka č. 8: Zobrazenie vybraných parametrov pre 12 štúdií využívajúcich LC publikovaných v rokoch 2015-2024 [48-59]. ACN – acetonitril, MeOH – metanol, MTBE – metyl-terc-butyléter, EtAc – etylacetát, HEX – hexan, CHLFR – chloroform, DCM – dichlórmetán, LC – kvapalinová chromatografia, SPE – extrakcia na tuhú fázu, LLE – extrakcia z kvapaliny do kvapaliny, SLE – extrakcia z kvapaliny do kvapaliny s využitím inertného nosiča, Ref. – číslo reference.

Štúdia č.	Metóda prípravy vzorky	Sorbent	Použitie precipitačné/extrakčné činidlo	Ref.
1	SPE	Strata-X 33 µm, polymér, RF	ACN/MeOH (85:15)	[48]
2	PP + SPE	OASIS HLB 30 mg	(PP): ZnSO <sub>4</sub> , MeOH, (SPE): ACN	[49]
3	LLE	x	MTBE	[50]
4	PP + LLE	x	(PP): ACN (LLE): MTBE	[51]
5	SLE	ISOLUTE ® SLE + 40 µl SLE doštička	EtAc/HEX (75:25)	[53]
6	SPE	Spark-Holland (10 mm dĺžka, 2 mm priemer)	MeOH, NH <sub>4</sub> F	[54]
7	SPE	OASIS HLB (3 ml, 60 mg)	MeOH, NH <sub>4</sub> F	[55]
8	PP + SPE	SepPak C18 (200 mg)	(PP): ACN/ZnSO <sub>4</sub> (SPE): CHLFR, MeOH	[52]
9	SLE / SPE	ISOLUTE ® SLE + 40 µl SLE doštička	(SLE): DCM (SPE): H <sub>2</sub> O/ACN	[56]
10	LLE	x	toluén	[57]
11	LLE	x	NaCl, K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , EtAc	[58]
12	LLE	x	MTBE	[59]

Tabuľka č. 9: Zobrazenie vybraných parametrov pre 12 štúdií využívajúcich LC publikovaných v rokoch 2015-2024 [48-59]. MeOH – metanol, FA – kyselina mravčia, ACN – acetonitril, MS – hmotnostná spektrometria, MS/MS – tandemová hmotnostná spektrometria, ESI<sup>+/-</sup> - ionizácia elektrosprejom v pozitívnom/negatívnom móde, HPLC – vysokoučinná kvapalinová chromatografia, UHPLC – ultra-vysokoučinná kvapalinová chromatografia, Q – kvadrupól, QqQ – trojitý kvadrupól, TOF – analyzátor doby letu, Ref. – referencia

Č.	HPLC/UHPLC kolóna	Mobilná fáza	Detektor	Ionizácia	Analyzátor	Ref.
1	Acquity UPLC HSS T3 (1,8 µm, 2,1 × 100 mm)	(A): 0,1% FA (B): ACN + 0,1% FA	MS	ESI +	Q-orbitálna pasca	[48]
2	BEH C18 kolóna (1,7 µm, 2,1 × 100 mm)	(A): 5 mmol/l mravčan amónny (B): MeOH	MS/MS	ESI +	QqQ	[49]
3	Kinetex™ 2,6µm Biphenyl (2,6 µm, 2,1 × 50 mm)	(A): MeOH/H <sub>2</sub> O (5:95) + 0,1% FA + 2 mmol/l octan amónny (B): MeOH + 0,1% FA + 2 mmol/l octan amónny	MS/MS	ESI +	Q-orbitálna pasca	[50]
4	Kinetex™ 2.6 µm PFP (2,6 µm, 3,0 × 100 mm)	(A): H <sub>2</sub> O (B): MeOH	MS/MS	ESI +	Q-orbitálna pasca	[51]
5	Capcell Core C18 (2,7 µm, 2,1 × 150 mm)	(A): 0,2 mmol/l NH <sub>4</sub> F (B): MeOH	MS/MS	ESI +/-	QqQ	[53]
6	Kinetex C18 (2,6 µm, 3,0 × 100 mm)	(A): 0,2 mmol/l NH <sub>4</sub> F (B): 40% MeOH	MS/MS	ESI +/-	QTOF / QqQ	[54]
7	Hypersil Gold C18 (1,9 µm, 2,1 × 50 mm)	(A): 0,1% FA + 5% ACN (B): 0,1% FA + 95% ACN	MS/MS	ESI +/-	QqQ	[55]
8	Acclaim™ C30 (3 µm, 2,1 × 100 mm)	(A): 10 mmol/l octan amónny (B): MeOH/ACN (3:7)	MS/MS	ESI -	QqQ	[52]
9	Kinetex C18 (1,7 µm, 2,1 mm × 100 mm)	(A): 0,1% FA (B): ACN + 0,1% FA	MS	ESI +	Orbitálna pasca	[56]
10	Kinetex Biphenyl (1,7 µm, 2,1 mm × 100 mm)	(A): 0,2 mmol/l NH <sub>4</sub> F (B): 0,2 mmol/l NH <sub>4</sub> F v MeOH/H <sub>2</sub> O (95:5)	MS/MS	ESI +/-	QqQ	[57]
11	Waters Acquity BEH C18 (1,7 µm, 2,1 mm × 100 mm)	(A): 1 mmol/l mravčan amónny + 0,01% FA (B): MeOH + 1mM mravčan amónny + 0,01% FA	MS/MS	ESI +	QqQ	[58]
12	ACQUITY UPLC HSS T3 (1,8 µm, 2,1 mm × 100 mm)	(A): 0,1% FA (B): ACN + 0,1% FA	MS	ESI +/-	Q-orbitálna pasca	[59]

Tabuľka č. 10: Zobrazenie vybraných parametrov 1 štúdie využívajúcej GC [28]. SLE – extrakcia z kvapaliny do kvapaliny s využitím inertného nosiča, DCM – dichlórmetán, EI – elektrónová ionizácia, QqQ – trojitý kvadrupól, MS/MS – tandemová hmotnostná spektrometria, GC – plynová chromatografia

<b>Poradové číslo</b>	<b>13</b>
Počet analyzovaných steroidov	37
Typ analyzovaných steroidov	androgény, estrogény, progesteróny, kortikosteroidy, steroly
Typ analyzovaného materiálu	sérum
Množstvo vzorky	100 µl
Metóda prípravy vzorky	SLE
Sorbent	ISOLUTE® SLE + 400 µl SLE doštička
Použitý precipitačné/extrakčné činidlo	DCM
GC kolóna	MTX - 1 (30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 mm)
Mobilná fáza	hélium
Detektor	MS/MS
Ionizácia	EI
Analyzátor	QqQ

Tabuľka č. 11: Zobrazenie vybraných parametrov 1 štúdie využívajúcej SFC [60]. LLE – extrakcia z kvapaliny do kvapaliny, MTBE – metyl-terc-butyléter, MeOH – metanol, ESI – ionizácia elektrosprejom, QqQ – trojitý kvadrupól, SFC – superkritická fluidná chromatografia

<b>Poradové číslo</b>	<b>14</b>
Počet analyzovaných steroidov	5
Typ analyzovaných steroidov	androgény
Typ analyzovaného materiálu	štandardy
Množstvo vzorky	2,5 µl
Metóda prípravy vzorky	LLE
Použitý precipitačné/extrakčné činidlo	MTBE
SFC kolóna	AgilentPoroshell Chiral-V 100 x 4,6 mm, 2,7 µm AgilentPoroshell Chiral-CD 100 x 4,6 mm, 2,7 µm Agilent PoroshellChiral-CF 100 x 4,6 mm, 2,7 µm
Mobilná fáza	CO <sub>2</sub> + MeOH
Detektor	MS/MS
Ionizácia	ESI
Analyzátor	QqQ

## 4. Experimentálna časť

### 4.1 Použité prístroje a pomôcky

- Chromatografický systém ACQUITY UPLC, binárne čerpadlo, automatický dávkovač, kolónový termostat, Waters Corp., USA
- Analytická kolóna CORTECS C18 (2,1 x 150 mm, 1,6  $\mu$ m) a in-line Acquity kolónový predfilter, Waters Corp., USA
- Xevo TQ-XS hmotnostný spektrometer, Waters Corp., USA
- Software MassLynx, v4.1, Waters Corp., USA
- Software TargetLynx, Waters Corp., USA
- Poloautomatizovaný manifold pre SLE: Otto SPEcialist Positive Pressure Manifold, Waters Corp., USA
- Analógový manifold pre SLE: Positive Pressure-96 Processor, Waters Corp., USA
- 96-jamková doštička pre SLE: ISOLUTE SLE+ 400  $\mu$ l Fixed Well, Biotage, Švédsko
- Automatické mikropipety so špičkami, Eppendorf, Nemecko
- Analytické váhy, Sartorius, Nemecko
- Ultrazvuková čistička Sonorex Digitec, Bandelin electronic, Nemecko
- Trepáčka Ika Vortex, Sigma-Aldrich, Česká republika
- Centrifúga Mikro 220R, Hettich, Nemecko
- Vákuová odparka Concentrator Plus, Eppendorf, Česká republika
- pH meter, Mettler-Toledo s.r.o., Česká republika
- Sklenené skrutkovacie vialky s uzávermi, Vitrum, Česká republika
- Total Recovery vialky s uzávermi, Thermo Scientific, USA

### 4.2 Použité chemikálie a rozpúšťadlá

- Acetonitril, Metanol: LC-MS Grade, Fisher Chemical, UK
- Etanol: LC-MS grade, VWR International S.A.S, UK
- Ultračistá voda: LC-MS grade, Fisher Chemical, UK
- Trichlóroctová kyselina:  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, Nemecko
- Kyselina chlorovodíková: 35%, Lach:ner, Česká republika
- Kyselina mravčia:  $\geq 99\%$ , VWR International S.A.S., UK
- Metyl-terc-butyléter:  $\geq 99,8\%$ , Sigma-Aldrich, Francúzsko
- Etylacetát:  $\geq 99,91\%$ , Sigma-Aldrich, USA
- Dichlórmetán:  $\geq 99,8\%$ , Sigma-Aldrich, Nemecko
- Hexan:  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich, Nemecko
- Propan-2-ol :  $\geq 99,9\%$ , Honeywell, Nemecko
- Hydrogénfosforečnan draselný: Penta, Česká republika
- Dihydrogénfosforečnan draselný: Chemapol, Česká republika
- $\beta$ -glukuronidáza z kmeňa E.Coli K12, roztok, Roche Diagnostics, Nemecko



- Chloroform:  $\geq 99,9\%$ , Sigma-Aldrich, Nemecko

### 4.3 Štandardné látky

- Pregnenolon, 17-hydroxypregnenolon, progesterón, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterón, 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxyprogesterón, 5 $\alpha$ -dihydroprogesterón, epiallopregnanolon, allopregnanolon, 20 $\alpha$ -hydroxyprogesterón, 11 $\beta$ -hydroxyprogesterón, tetrahydrodeoxykortikosterón, allotetrahydrodeoxykortikosterón, deoxykortikosterón, 11-dehydrokortikosterón, 5 $\alpha$ -dihydrokortikosterón, 5 $\beta$ -dihydrokortikosterón, kortizol, 11-deoxykortizol, kortizón, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterón, dehydroepiandrosterón, DHEA sulfát sodná soľ, 7 $\alpha$ -hydroxyDHEA, 7 $\beta$ -hydroxyDHEA, 7-oxoDHEA, epiandrosterón, androsterón, 5 $\alpha$ -androstandión a 5 $\beta$ -androstandión boli zakúpené zo Steraloids, USA
- Kortikosterón, aldosterón, androstendión, 3 $\alpha$ -dihydroandrosterón, 3 $\beta$ -dihydroandrosterón a  $\beta$ -estradiol boli zakúpené zo Sigma-Aldrich, Nemecko
- Testosterón, dexametazón a betametazón boli zakúpené zo Serva Electrophoresis GmbH, Nemecko

### 4.4 Vnútorne štandardné látky

- Pregnenolon-d4 (IS1), progesterón-d9 (IS3), kortikosterón-d4 (IS14), kortizon-d8 (IS20), aldosterón-d8 (IS21), testosterón-d3 (IS22), 5 $\alpha$ -dihydrotestosterón-d3 (IS23) a androsterón-d4 (IS31) boli zakúpené zo Sigma-Aldrich, Nemecko
- 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterón-d8 (IS4), isopregnanolon-d5 (IS7), 3 $\alpha$ -allopregnanolon-d5 (IS8), 4-pregnen-20 $\alpha$ -ol-3-on-d4 (IS9), 11-deoxykortikosterón-d8 (IS13), kortizol-d4 (IS18) a dexametazón-d5 (IS36) boli zakúpené z TRC, Kanada
- Dehydroepiandrosterón-d2 (IS24) bol zakúpený zo Steraloids, USA

### 4.5 Biologické vzorky

Na vývoj a optimalizáciu metódy bola použitá ľudská plazma. Ľudská plazma bola odobraná dobrovoľníkom z Katedry analytickej chémie Farmaceutickej fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy. Plazmu poskytli traja muži a tri ženy vo veku 20 – 40 rokov. Všetci dobrovoľníci poskytli písomný informovaný súhlas s použitím ich plazmy pre vedecké účely. Plazma bola pripravená z krvi odobranej od dobrovoľníkov pomocou odstredivky MIKRO 220R, Hettich (Nemecko), (4 025  $\times$  g, 20 min) k oddeleniu krvinky a plazmy. Plazma bola následne skladovaná pri -80 °C. Naše experimenty boli vykonané s použitím zmesnej vzorky plazmy pripravenej zo vzoriek 6 zdravých dobrovoľníkov, aby sme pokryli individuálnu variabilitu.

Konečná metóda bola aplikovaná pre analýzu myšej plazmy. Samičia a samčia plazma bezmikróbových myší BALB/c bez špecifických patogénov bola dodaná v spolupráci s Fyziologickým Ústavom Akadémie Vied ČR (Praha, Česká republika).

#### **4.6 Príprava zásobných roztokov štandardov a vnútorných štandardov**

Jednotlivé roztoky štandardov boli pripravené v koncentrácii 1 mg/ml. Pre prípravu týchto roztokov bolo navážených približne presne 0,1-0,3 mg kryštalickej látky, ktorá bola rozpustená v zodpovedajúcom množstve ACN. Bola pripravená zásobná zmes roztokov štandardov o koncentrácii 10 µg/ml. Zásobné roztoky vnútorných štandardov boli pripravené rovnakým spôsobom.

#### **4.7 Príprava pracovných roztokov**

##### **4.7.1 Príprava pracovných roztokov štandardov**

Pracovné roztoky štandardov boli pripravené zriedením 50% ACN z predchádzajúcich zásobných roztokov na finálnu koncentráciu 50 ng/ml. V prípade prípravy kalibračnej krivky bol zásobný roztok štandardov riedený desiatkovou radou.

##### **4.7.2 Príprava okyslenej vody**

Okyslená voda používaná v experimente uvedenom v kapitole 4.10.4 bola pripravená v objeme 30 ml za použitia počiatočných 10 µl HCl. Ďalším prídavkom HCl bolo následne upravené pH na hodnotu 3,09.

##### **4.7.3 Príprava fosfátového tlmivého roztoku**

Zásobný fosfátový tlmivý roztok (TR) bol pripravený navážením 3 480 mg  $\text{HPO}_3$  a 2 720 mg  $\text{H}_2\text{PO}_3$  a ich následným rozpusteným v odmernej banke o objeme 100 ml; pH roztoku sa pohybovalo v rozmedzí 6-6,5. Zásobný roztok bol následne 100x riedený vodou na pracovnú koncentráciu 0,62 mg/ml.

#### **4.8 Príprava vzoriek k validácii**

Bola používaná zmes štandardných látok o koncentrácii 10 µg/ml a zmes vnútorných štandardov (IS) o koncentrácii 1 µg/ml – okrem vnútorných štandardov IS 6, IS 8, IS 25, IS 38, IS 39 a IS 40, ktoré boli o koncentrácii 10 µg/ml. Priradenie analytov k vnútorným štandardom (Tabuľka č. 12) prebehlo na základe ich štruktúrnej podobnosti. V prípade, že pre daný analyt nebol dostupný vlastný vnútorný štandard, bol zvolený vnútorný štandard podľa najbližšej štruktúrnej podobnosti a blízkosti retenčného času analytu a vnútorného štandardu.

Tabuľka č. 12: Priradenie analytov k vnútorným štandardom. IS – vnútorný štandard

Analyt	IS	Analyt	IS	Analyt	IS	Analyt	IS
1	IS 1	11	IS 9	21	IS 21	31	IS 31
2	IS 13	12	IS 9	22	IS 22	32	IS 31
3	IS 3	13	IS 13	23	IS 23	33	IS 23
4	IS 4	14	IS 14	24	IS 24	34	IS 22
5	IS 13	15	IS 36	25	IS 25	35	IS 36
6	IS 6	16	IS 36	26	IS 18	36	IS 36
7	IS 7	17	IS 36	27	IS 13	37	IS 36
8	IS 8	18	IS 18	28	IS 20	38	IS 38
9	IS 9	19	IS 14	29	IS 24		
10	IS 13	20	IS 20	30	IS 4		

Štandardná aj matricová kalibračná krivka boli pripravené na 13 koncentračných hladinách v rozmedzí 0,05-100 ng/ml. Pre prípravu matricovej kalibračnej krivky bolo 40 µl plazmy obohatených pred extrakciou 2 µl zmesného roztoku štandardov o danej koncentrácii a 2 µl roztoku vnútorných štandardov o koncentrácii 50 ng/ml.

Výtťažnosť a matricové efekty boli hodnotené na koncentračných hladinách 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml, 7 ng/ml, 25 ng/ml a 75 ng/ml. Pre prípravu týchto vzoriek bolo 40 µl plazmy obohatených 2 µl zmesného roztoku štandardov o danej koncentrácii (60 ng/ml, 140 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml, 1500 ng/ml a 2000 ng/ml) a 2 µl roztoku vnútorných štandardov o koncentrácii 50 ng/ml. Pre hodnotenie výtťažnosti boli vzorky plazmy obohatené pred extrakciou. Hodnotenie prítomnosti matricových efektov prebiehalo z analýzy vzoriek obohatených po extrakcii.

Pripravené boli ďalej vzorky obohatené iba roztokom vnútorných štandardov (nulové vzorky) a vzorky bez obohatenia (slepé vzorky).

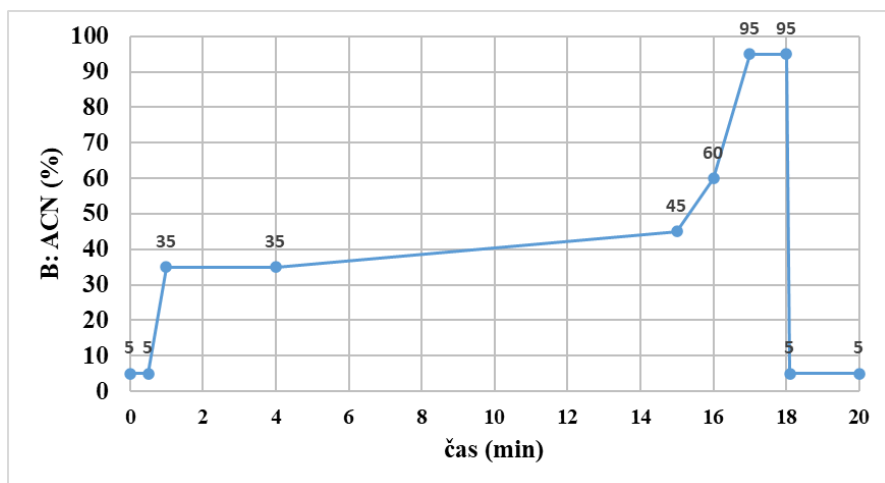
#### 4.9 Podmienky použitej UHPLC-MS/MS metódy

**Analytická kolóna:** CORTECS UPLC C18 (2,1 x 150 mm, 1,6 µm + in-line kolonový predfilter)

**Mobilná fáza:** 0,1% FA vo vode (A), ACN (B)

**Prietok mobilnej fázy:** 0,3 ml/min

**Elúcia:** gradientová (Obrázok č. 6)



Obrázok č. 6: Zobrazenie gradientu mobilnej fázy B v UHPLC-MS/MS metóde použitej pre analýzu steroidov v tejto práci. ACN - acetonitril

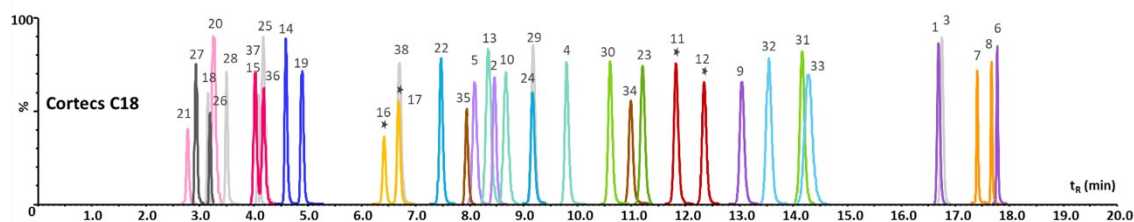
**Teplota na kolóne:** 40 °C

**Teplota v automatickom injektore:** 8 °C

**Silná oplachovacia kvapalina:** 100% ACN

**Slabá oplachovacia kvapalina:** 20% ACN

**Oplachovacia kvapalina pre piest čerpadla:** 10% ACN



Obrázok č. 7: Finálna separácia steroidov dosiahnutá na kolóne Cortecs C18 za vyššie uvedeníých podmienok. Číslovanie steroidov zodpovedá Tabuľke č. 1. Farby píkov označujú jednotlivé páry izomérov. Obrázok prevzatý z [66].

### Ionizačný zdroj:

Typ a mód ionizácie: ESI<sup>+</sup> / ESI<sup>-</sup>

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

Napätie na vstupnom kuželi: individuálne nastavenie podľa Tabuľky č. 13

Prietok desolvačného plynu: 1100 l/hod

Prietok plynu na vstupnom kuželi: 200 l/hod

Desolvačná teplota: 500 °C

Tlak zmlžujúceho plynu: 5,0 bar (dusík)

Kolízna energia: individuálne nastavenie podľa Tabuľky č. 13

Použitie SRM prechody sú zhrnuté v Tabuľke č. 13.

Tabuľka č. 13: Nastavenie MS/MS metódy. STD – analyt,  $t_R$  – retenčný čas, CV – napätie na vstupnom kuželi, SRM quantifier – monitorovanie vybranej reakcie pre kvantifikáciu, SRM qualifier - monitorovanie vybranej reakcie pre potvrdenie identity, CE – kolízna energia, MS/MS – tandemová hmotnostná spektrometria. Táto metóda bola optimalizovaná v rámci diplomovej práce Mgr. Hromádka [63]

STD	$t_R$ [min]	CV [V]	SRM 1 quantifier	CE [eV]	SMR 2 quantifier	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	315,15 > 122,89	25
4	9,7	15	331,15 > 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	300,98 > 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	317,25 > 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	4,7	15	347,04 > 109,01	25	347,04 > 311,15	15
20	3,2	15	356,02 > 163,07	25	361,02 > 367,06	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 > 159,15	20
24	9,1	20	270,90 > 253,12	15	270,90 > 197,06	20
25	5,1	40	367,00 > 96,81	30	x	x
26	3,0	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	285,08 > 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

#### 4.10 Vývoj metódy prípravy vzorky

Boli optimalizované dve metódy prípravy vzorky: PP a SLE. Testovanými parametrami boli najmä výťažnosť a matricové efekty – vzorky na sledovanie parametru výťažnosti boli obohatené pred extrakciou, vzorky na sledovanie matricových efektov po extrakcii. Ako výsledná metóda bola vybraná SLE metóda a jej finálne podmienky sú uvedené v kapitole 4.10.6.

##### 4.10.1 Optimalizácia proteínovej precipitácie

V rámci optimalizácie metódy bola porovnávaná PP, PP v spojení s enzymatickou hydrolyzou (EH-PP) a PP s prídavkom TR (TR-PP). Bolo pripravených 1500  $\mu$ l zásobného roztoku plazmy obohateného o analyty v koncentrácii 50 ng/ml a vnútorné štandardy o koncentrácii 0,1  $\mu$ g/ml. Tento zásobný roztok bol použitý pre všetky optimalizačné experimenty. Vzorky pre všetky experimenty boli vždy pripravené v troch replikátoch. Za rovnakých podmienok zhrnutých v Tabuľke č. 14 boli testované štyri precipitačné činidlá: MeOH, EtOH, ACN a TCA. Vzorky boli následne odparované do sucha za využitia vákuovej odparky a následne zrekonštituované v 50  $\mu$ l 50% ACN.

V experimente EH-PP boli navyše použité 2  $\mu$ l enzýmu  $\beta$ -glukuronidázy (*E. coli*) pridané k 50  $\mu$ l plazmy a 10  $\mu$ l TR pripraveného spôsobom uvedeným v kapitole 4.7.3. Vzorky sa po pridaní  $\beta$ -glukuronidázy a TR 60 min inkubovali pri teplote 50 °C a 250 RPM. V experimente TR-PP bolo použitých 10  $\mu$ l TR, ktorý bol pridaný k 50  $\mu$ l plazmy.

Tabuľka č. 14: Podmienky metódy proteínovej precipitácie

Parameter	Jednotka	Hodnota
Objem precipitovanej vzorky	$\mu$ l	50
Objem precipitačného činidla	$\mu$ l	500
Čas inkubácie	min	10
Teplota inkubácie	°C	25
Čas centrifugovania	min	5
Počet otáčok	RPM	14 000
Teplota centrifugovania	°C	8
Odparovacia teplota	°C	60
Čas odparovania	min	30
Rekonštitučné činidlo	50% ACN	
Objem rekonštitučného činidla	$\mu$ l	50
Čas inkubácie	min	10
Počet otáčok	RPM	1 400
Teplota rekonštitúcie	°C	25

##### 4.10.2 Optimalizácia SLE metódy

Pre všetky experimenty v rámci optimalizácie SLE metódy bola použitá ľudská plazma obohatená o analyty aj vnútorné štandardy. Podmienky SLE metódy boli zachované vždy rovnaké. Po nanosení vzorky na SLE doštičku prebehla adsorpcia

aplikáciou pozitívneho tlaku 5 psi po dobu 120 s a následne aplikovaním pozitívneho tlaku 1 psi po dobu 240 s. Extrakcia prebehla pomocou tlaku 1 psi po dobu 240 s a následne pomocou tlaku 5 psi po dobu 120 s.

#### 4.10.3 Optimalizácia extrakčného činidla pre SLE metódu

Boli testované extrakčné činidlá a ich pomery: MTBE, DCM, zmes DCM/EtAc v pomere (80:20, v/v), zmes MTBE/EtAc v pomere (80:20, v/v), zmes MTBE/EtAc v pomere (70:30, v/v), zmes MTBE/EtAc v pomere (50:50, v/v) a EtAc.

Slepé vzorky plazmy boli pripravené za použitia 720  $\mu$ l plazmy a 40  $\mu$ l roztoku zmesi vnútorných štandardov o koncentrácii 1  $\mu$ g/ml a doplnené boli 40  $\mu$ l ACN. Finálna koncentrácia vnútorných štandardov bola teda 1  $\mu$ g/ml. Vzorky obohatenej plazmy boli pripravené za použitia 720  $\mu$ l plazmy, 40  $\mu$ l roztoku zmesi vnútorných štandardov o koncentrácii 1  $\mu$ g/ml a 40  $\mu$ l roztoku zmesi štandardných látok o koncentrácii 70 ng/ml. Vzorka plazmy teda vždy obsahovala štandardy o koncentrácii 70 ng/ml a vnútorné štandardy o koncentrácii 1  $\mu$ g/ml. Z pripravených vzoriek bolo následne odobraných 40  $\mu$ l a doplnených 360  $\mu$ l vody. Táto nariadená vzorka bola potom nanosená na SLE doštičku. Pre každé extrakčné činidlo boli pripravené tri replikáty. Extrakcia prebehla 3krát 1 ml príslušného činidla, vzorky boli následne odparené do sucha a zrekonštituované v 40  $\mu$ l 50% ACN.

Následne boli optimalizované a porovnávané extrakčné profily: extrakcia 3krát 1 ml zmesi MTBE/EtAc v pomere (80:20, v/v), extrakcia 1krát 1 ml MTBE a 2krát 1 ml EtAc a extrakcia 2krát 2 ml MTBE a 1ml EtAc (Tabuľka č. 15). Boli pripravené dva replikáty vzoriek z každého testovaného profilu. Na prípravu vzoriek bolo použitých 40  $\mu$ l obohatenej plazmy a 360  $\mu$ l vody. Obohatená plazma bola pripravená za použitia 950  $\mu$ l plazmy a 50  $\mu$ l roztoku zmesi štandardných látok o koncentrácii 1  $\mu$ g/ml. Vzorky boli do sucha odparené a zrekonštituované vo 40  $\mu$ l 50% ACN.

Tabuľka č. 15: Schematické znázornenie extrakčných profilov. MTBE – metyl-terc-butyléter, EtAc – etylacetát.

	Extrakčný profil (A)	Extrakčný profil (B)	Extrakčný profil (C)
<b>1. krok</b>	MTBE/EtAc (80:20, v/v)	MTBE	MTBE
<b>2. krok</b>	MTBE/EtAc (80:20, v/v)	EtAc	MTBE
<b>3. krok</b>	MTBE/EtAc (80:20, v/v)	EtAc	EtAc

V ďalšom experimente bolo testované optimálne množstvo extrakčného činidla. Bol pripravený zásobný roztok plazmy obohatenej roztokom štandardných látok za použitia 950  $\mu$ l plazmy a 50  $\mu$ l zmesi štandardných látok o koncentrácii 1  $\mu$ g/ml. Vzorky boli pripravené zo 40  $\mu$ l obohatenej plazmy a 360  $\mu$ l vody. Takto pripravené vzorky boli nanosené na SLE doštičku v piatich replikátoch. Extrakcia prebehla 3krát za použitia 1 ml zmesi MTBE/EtAc v pomere (80:20, v/v) v každom extrakčnom kroku. Každý extrakčný krok bol zbieraný do vlastnej Eppendorf skúmavky, odparený do sucha a následne zrekonštituovaný v 40  $\mu$ l 50% ACN. Ako referencia, ku ktorej boli porovnávané výsledky jednotlivých extrakčných krokov, slúžili vzorky extrahované tým

istým spôsobom, pričom všetky extrakčné kroky boli zbierané do jednej Eppendorf skúmavky. Vzorky boli rovnako odparené a zrekonštituované obdobným spôsobom.

#### 4.10.4 Optimalizácia zloženia vzorky nanášanej na SLE doštičku

Bol optimalizovaný faktor riedenia nanášanej vzorky. Boli testované štyri riedenia na finálny nanášaný objem 150  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$ , 300  $\mu\text{l}$  a 400  $\mu\text{l}$ . V každom prípade bolo použitých 40  $\mu\text{l}$  obohatenej plazmy odobranej zo zásobného roztoku pripraveného z 950  $\mu\text{l}$  plazmy a 50  $\mu\text{l}$  roztoku zmesi štandardných látok o koncentrácii 1,4  $\mu\text{g/ml}$ . Boli pripravené tri replikáty z každého testovaného objemu. Ako extrakčné činidlo bola použitá zmes MTBE/EtAc v pomere (80:20, v/v) a extrakcia prebehla 3krát 1 ml tohto činidla. Vzorky boli následne odparené do sucha a zrekonštituované v 40  $\mu\text{l}$  50% ACN.

Ďalej bol testovaný vplyv koncentrácie isopropanolu (IPA) na narušenie väzby analyzovaných látok na transportné proteíny. Boli analyzované tri skupiny vzoriek, každá z nich pozostávala z troch replikátov. Prvá skupina vzoriek bola pripravená za použitia 40  $\mu\text{l}$  plazmy obohatenej o roztok štandardov a 360  $\mu\text{l}$  zmesi  $\text{H}_2\text{O}/\text{IPA}$  v pomere (50:50, v/v). Druhá skupina vzoriek bola pripravená za použitia 40  $\mu\text{l}$  obohatenej plazmy, 160  $\mu\text{l}$  vody a 200  $\mu\text{l}$  IPA. Tretia skupina vzoriek bola pripravená za použitia 40  $\mu\text{l}$  obohatenej plazmy, 40  $\mu\text{l}$  zmesi  $\text{H}_2\text{O}/\text{IPA}$  v pomere (50:50, v/v) a 320  $\mu\text{l}$  vody. Vzorky boli odparené do sucha a zrekonštituované v 40  $\mu\text{l}$  50% ACN.

V snahe analyzovať analyt DHEA-S (25) boli vykonané dva experimenty s prídavkom vody okyslenej pomocou HCl, pripravenej spôsobom uvedeným v kapitole 4.7.2. Boli porovnávané dva parametre: výťažnosť a matricové efekty. Pre testovanie parametru výťažnosti boli vzorky pred extrakciou obohatené roztokom zmesi štandardných látok o koncentrácii 1  $\mu\text{g/ml}$  a roztokom zmesi vnútorných štandardov o rovnakej koncentrácii. Pre testovanie parametru matricových efektov boli vzorky obohatené naopak po extrakcii.

V oboch experimentoch bolo použitých 40  $\mu\text{l}$  plazmy. V rámci prvého experimentu bolo ku vzorkám pridaných 40  $\mu\text{l}$  zmesi  $\text{H}_2\text{O}/\text{IPA}$  v pomere (50:50, v/v), druhý experiment bol vykonaný bez tohto prídavku. V oboch experimentoch boli vzorky následne doplnené do celkového objemu 400  $\mu\text{l}$  vodou okyslenou HCl.

#### 4.10.5 Porovnanie optimalizovaných metód prípravy vzorky

Boli porovnávané nasledujúce metódy a ich spojenia: PP, PP v spojení so SLE (PP-SLE), EH-PP, PP v spojení s EH a SLE (EH-PP-SLE), EH v spojení so SLE (EH-SLE) a (SLE). Ako precipitačné činidlá boli testované: MeOH, EtOH a ACN. Bol testovaný parameter výťažnosti a parameter matricových efektov. Vzorky na testovanie výťažnosti boli obohatené prídavkom roztoku štandardných látok o koncentrácii 70  $\text{ng/ml}$  a roztokom vnútorných štandardov o koncentrácii 0,1  $\mu\text{g/ml}$ . Vzorky na testovanie matricových efektov boli obohatené po extrakcii. Vzorky boli pri všetkých metódach odparené do sucha a zrekonštituované podľa protokolu uvedenom v kapitole 4.10.1.

- **PP:** Pri metóde PP bolo použitých 40  $\mu\text{l}$  vzorky a 400  $\mu\text{l}$  optimalizovaného precipitačného činidla. Rekonštitúcia prebehla v 40  $\mu\text{l}$  50% ACN. Bol použitý protokol uvedený v kapitole 4.10.1
- **PP-SLE:** Pri metóde PP-SLE bolo použitých 40  $\mu\text{l}$  vzorky, 400  $\mu\text{l}$  optimalizovaného precipitačného činidla a rekonštitúcia prebehla v 40  $\mu\text{l}$  50%



ACN. Pre PP bol použitý protokol uvedený v kapitole 4.10.1. Supernatant bol následne prenesený na SLE doštičku. SLE metóda prebehla podľa podmienok zhrnutých v kapitole 4.10.6.

- **EH-PP:** Pri metóde EH-PP bolo použitých 40  $\mu$ l plazmy, 8  $\mu$ l TR a 1,6  $\mu$ l enzýmu  $\beta$ -glukuronidázy. Inkubácia prebehla po dobu 60 min pri teplote 50 °C a 250 RPM. Bolo použitých 400  $\mu$ l optimalizovaného precipitačného činidla a rekonštitúcia prebehla v 40  $\mu$ l 50% ACN. Pre PP bol použitý protokol uvedený v kapitole 4.10.1
- **EH-PP-SLE:** V prípade metódy EH-PP-SLE bolo použitých 40  $\mu$ l plazmy, 8  $\mu$ l TR a 1,6  $\mu$ l enzýmu  $\beta$ -glukuronidázy. Vzorky boli inkubované po dobu 60 minút pri teplote 50 °C a trepané pri 250 RPM. Následne bolo pridaných 400  $\mu$ l optimalizovaného precipitačného činidla. Rekonštitúcia prebehla v 40  $\mu$ l 50% ACN. Pre PP bol použitý protokol uvedený v kapitole 4.10.1. Supernatant bol následne prenesený na SLE doštičku. SLE metóda prebehla podľa podmienok zhrnutých v kapitole 4.10.6.
- **SLE:** Podmienky SLE metódy sú zhrnuté v kapitole 4.10.6.
- **EH-SLE:** Pri metóde EH-SLE bolo použitých 40  $\mu$ l plazmy, 8  $\mu$ l TR a 1,6  $\mu$ l enzýmu  $\beta$ -glukuronidázy. Vzorky boli inkubované po dobu 60 minút pri teplote 50 °C a 250 RPM. SLE prebehla podľa podmienok zhrnutých v kapitole 4.10.6.

#### 4.10.6 Finálne podmienky SLE metódy

Finálne podmienky SLE metódy boli nasledovné: 40  $\mu$ l plazmy bolo nariadených 40  $\mu$ l zmesi H<sub>2</sub>O/IPA v pomere (50:50, v/v) a celkový objem 400  $\mu$ l bol doplnený 320  $\mu$ l vody. Takto nariadená vzorka bola nanosená na SLE doštičku. Adsorpcia na doštičku bola uskutočnená aplikáciou tlaku 5 psi do dobu 120 s a následne aplikovaním tlaku 1 psi po dobu 120 s v dvoch cykloch.

Extrakcia prebiehala v dvoch krokoch. V každom extrakčnom kroku bolo nanosené činidlo MTBE/EtAc v pomere (80:20, v/v) v objeme 1 ml. Bol aplikovaný tlak 1 psi po dobu 240 s a následne tlak 5 psi po dobu 120 s. Odparenie prebehlo do sucha na vákuovej odparke Concentrator Plus pri teplote 60 °C a 2000 RPM. Odparená vzorka bola zrekonštituovaná v 40  $\mu$ l zmesi H<sub>2</sub>O/ACN (50:50, v/v), trepaná po dobu 10 min a 1400 PRM a následne prenesená do vialiek a analyzovaná UHPLC-MS/MS metódou.

#### 4.11 Overenie validačných parametrov

Pre overenie validačných parametrov bola použitá finálna metóda SLE-UHPLC-MS/MS zhrnutá v kapitolách 4.9 a 4.10.6. Overenie validačných parametrov prebehlo rovnakým spôsobom na dvoch manifoldoch – poloautomatizovanom manifolde Otto SPeCialist a analógovom manifolde Positive Pressure-96 Processor. Overovanými parametrami boli výťažnosť, matricové efekty, presnosť a precíznosť, ktorých overenie prebehlo na základe podmienok validačnej smernice ICH M10/EMA [64].

Pre každý analyt bol stanovaný dolný a horný limit kvantifikácie. Tieto limity boli určené na základe hranice relatívnej smerodajnej odchýlky ( $\pm 15$  % pre najnižšiu

koncentračnú hladinu a  $\pm 20\%$  pre vyššie koncentračné hladiny) stanovenej v ICH10/EMA [64] pre parametre precíznosť a presnosť.

Validačné parametre boli overované na 6 koncentračných hladinách: 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml, 7 ng/ml, 25 ng/ml a 75 ng/ml. Príprava vzoriek k validácii je uvedená v kapitole 4.8.

Výtťažnosť bola stanovená výpočtom z plôch píkov vzoriek obohatených pred a po extrakcii – od pre-extrakčného prídavku bola odčítaná hodnota slepej vzorky plazmy, čiže plazmy bez obohatenia (Rovnica č. 1).

$$\text{výťažnosť [\%]} = \frac{\text{vzorka obohatená pred extrakciou} - \text{slepá vzorka plazmy}}{\text{vzorka obohatená po extrakcii}} \times 100$$

*Rovnica č. 1: Výpočet výťažnosti.*

Matricové efekty boli stanovené výpočtom z plôch píkov z merania vzoriek obohatených po extrakcii a štandardných roztokov – od hodnôt vzoriek obohatených po extrakcii boli odčítané hodnoty slepej vzorky plazmy (Rovnica č. 2). Záporné hodnoty značia zoslabenie ionizácie, pozitívne hodnoty značia zosilnenie ionizácie.

$$\text{matricové efekty [\%]} = \frac{\text{vzorka obohatená po extrakcii} - \text{slepá vzorka plazmy}}{\text{štandardný roztok}} \times 100$$

*Rovnica č. 2: Výpočet matricových efektov.*

Presnosť bola stanovená výpočtom z priemeru šiestich opakovaní extrakcie na danej koncentračnej hladine (Rovnica č. 3).

$$\text{presnosť [\%]} = \frac{\text{priemer opakovaní extrakcie}}{\text{koncentračná hladina}} \times 100$$

*Rovnica č. 3: Výpočet presnosti.*

Precíznosť bola stanovená ako relatívna smerodajná odchýlka zo šiestich opakovaní extrakcie (Rovnice č. 4).

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}$$

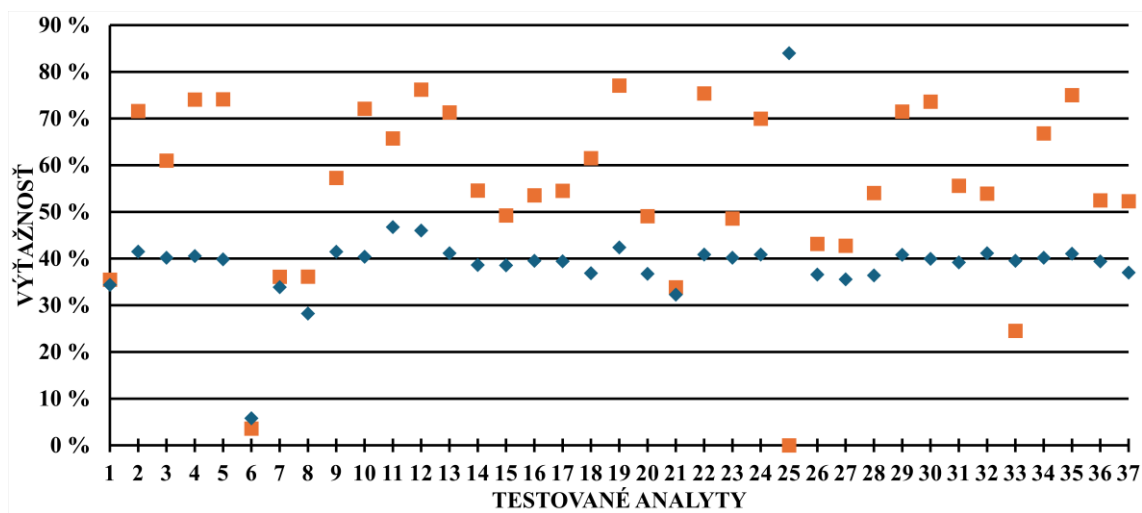
*Rovnica č. 4: Výpočet precíznosti, kde  $N=6$ .*

## 5. Výsledky a diskusia

### 5.1 Analyzovanie vplyvu enzymatickej hydrolýzy na výťažnosť proteínovej precipitácie

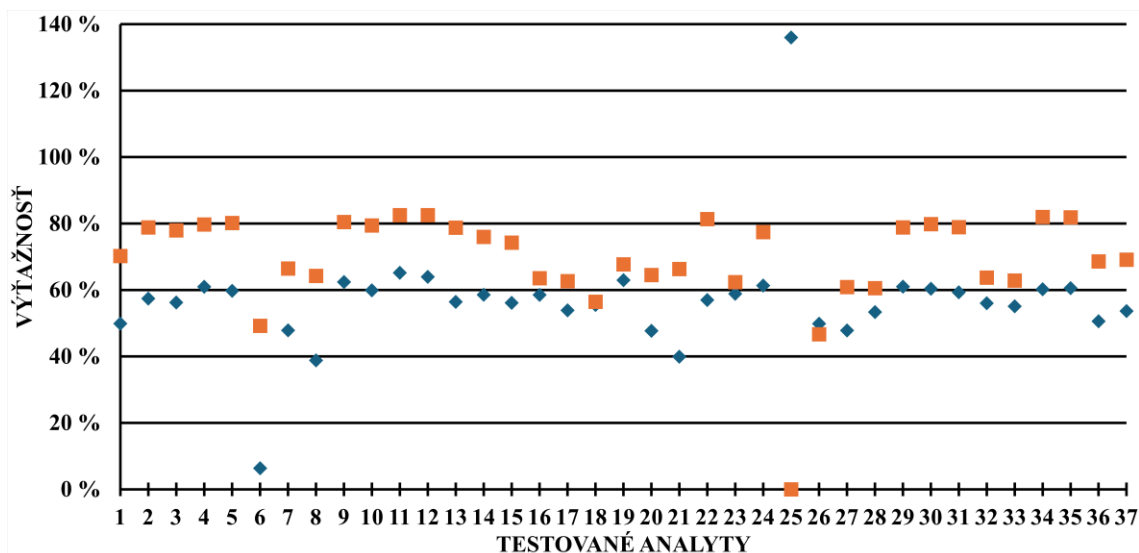
Na začiatku optimalizácie bola porovnávaná PP a EH-PP. Boli porovnávané štyri precipitačné činidlá: MeOH, EtOH, ACN a TCA.

Pri použití činidiel MeOH a EtOH boli pozorované vyššie hodnoty výťažnosti pri metóde EH-PP oproti samotnej PP. V prípade činidla MeOH sa hodnoty výťažnosti pri metóde EH-PP pohybovali v rozmedzí 0-80 %, pri metóde PP 4-84 % (Obrázok č. 8).



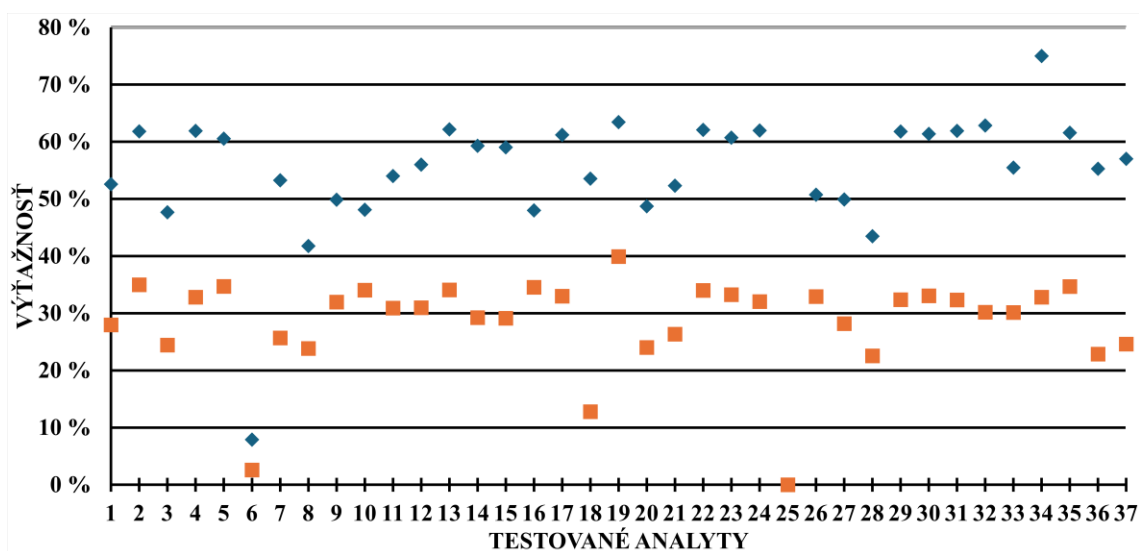
Obrázok č. 8: Výťažnosť testovaných steroidov pri použití činidla MeOH ako precipitačného činidla v metóde PP (modré body) a EH-PP (oranžové body). Čísla analytov sú priradené podľa Tabuľky č. 1. MeOH – metanol, PP – proteínová precipitácia, EH-PP – proteínová precipitácia v spojení s enzymatickou hydrolýzou

Pri použití činidla EtOH sa hodnoty výťažnosti pri metóde EH-PP pohybovali v rozmedzí 0-85 %, pri metóde PP v rozmedzí 5-135 % (Obrázok č. 9). Pri metóde EH-PP bolo však možné pozorovať nízku presnosť výsledkov, kedy hodnoty nevyhovovali limitu stanovenom vo validačnej smernici [64], čo bolo pravdepodobne spôsobené chybou pri príprave vzorky. Nízke hodnoty výťažnosti (5 %) vykazoval analyt 5 $\alpha$ DHP4 (6). Dôvodom mohla byť jeho štruktúra – konkrétne prítomnosť hydroxylovej skupiny v polohe C3 a alkylového reťazca v polohe C20 kvôli čomu bol tento steroid menej rozpustný v organických rozpúšťadlách ako sú MeOH a EtOH. Analyt DHEA-S (25) vykazoval nulovú výťažnosť pri metóde EH-PP pri použití oboch činidiel. Dôvodom mohlo byť nevhodné pH, čo viedlo k prevahe ionizovanej formy steroidu, ktorá nebola extrahovateľná do testovaných precipitačných činidiel.



Obrázok č. 9: Výťažnosť testovaných steroidov pri použití činidla EtOH ako precipitačného činidla v metóde PP (modré body) a EH-PP (oranžové body). Čísla analytov sú priradené podľa Tabuľky č. 1. EtOH – etanol, PP – proteínová precipitácia, EH-PP – proteínová precipitácia v spojení s enzymatickou hydrolyzou

V prípade použitia činidla ACN boli vyššie hodnoty výťažnosti pozorované pri metóde PP a to v rozmedzí 0-75 %. Pri metóde EH-PP sa hodnoty výťažnosti pohybovali v rozmedzí 0-40 %. Na Obrázku č. 10 je opäť možné pozorovať nízke hodnoty výťažnosti analytu 5 $\alpha$ DHP4 (6), dosahujúce maximálne 6 %, a nulovú výťažnosť analytu DHEA-S (25). V prípade analytu 5 $\alpha$ DHP4 (6) mohla byť opäť dôvodom prítomnosť hydroxylovej skupiny v polohe C3, ktorá mohla potenciálne reagovať s ACN a vytvárať komplexy, čo následne viedlo k nízkej výťažnosti analytu počas analytického procesu.



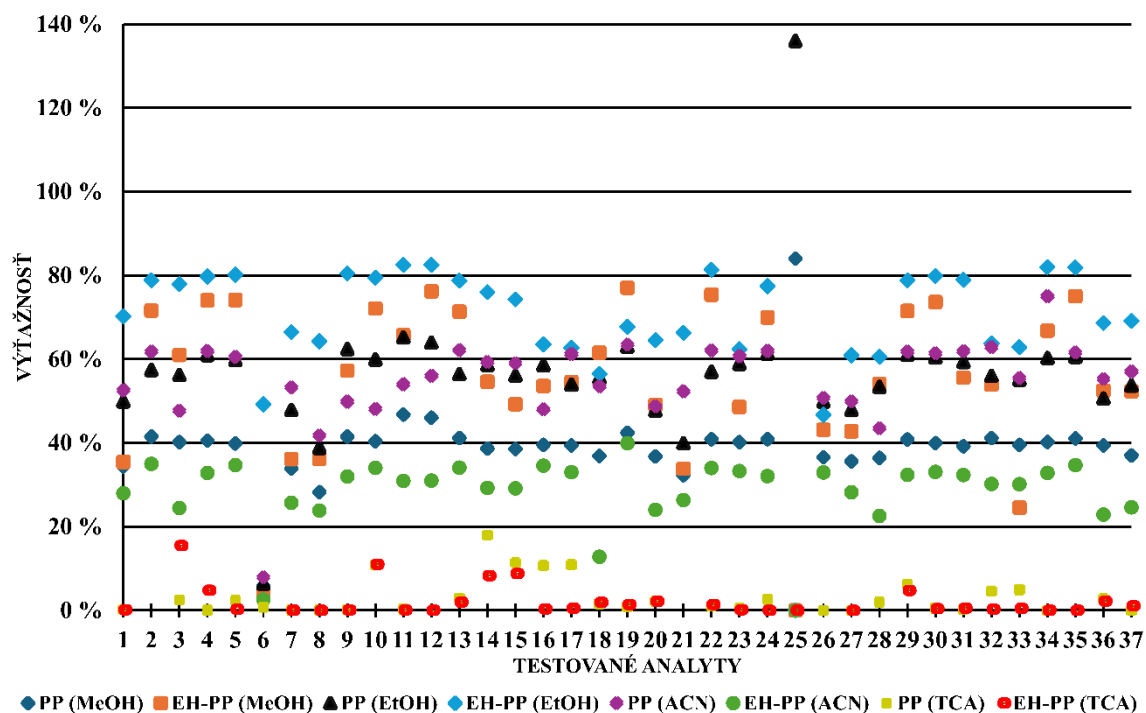
Obrázok č. 10: Výťažnosť testovaných steroidov pri použití činidla ACN ako precipitačného činidla v metóde PP (modré body) a EH-PP (oranžové body). Čísla analytov sú priradené podľa Tabuľky č. 1. ACN - acetonitril, PP – proteínová precipitácia, EH-PP – proteínová precipitácia v spojení s enzymatickou hydrolyzou

Najnižšie hodnoty výťažnosti boli pozorované pri použití činidla TCA. Toto činidlo bolo testované z dôvodu plánovaného testovania SLE metódy, ktorá je založená na princípe extrakcie analytov do nemiesiteľného rozpúšťadla. Keďže TCA je vodné rozpúšťadlo, jej prítomnosť by tak umožnila možnosť testovania rôznych organických rozpúšťadiel počas optimalizácie SLE.

Hodnoty výťažnosti pre metódu PP sa pohybovali v rozmedzí 0-18 % a pre metódu EH-PP v rozmedzí 0-15 %. Väčšina analytov však ani pri jednej metóde nepresahovala hodnotu výťažnosti 10 %. Dôvodom mohol byť fakt, že TCA je silná kyselina, čo mohlo viesť k degradácii analytov. S týmto činidlom sa preto v ďalších experimentoch nepokračovalo.

Obrázok č. 11 zobrazuje súhrn hodnôt výťažnosti pri použití jednotlivých činidiel a metód. Hoci najvyššie hodnoty výťažnosti boli pozorované pri použití činidla EtOH pri metóde EH-PP, z dôvodu nízkej presnosti výsledkov nebola táto metóda vybraná ako finálna metóda.

Z dôvodu vysokej výťažnosti a jednotného profilu merania sa ako optimálne činidlo javil ACN a metóda PP.



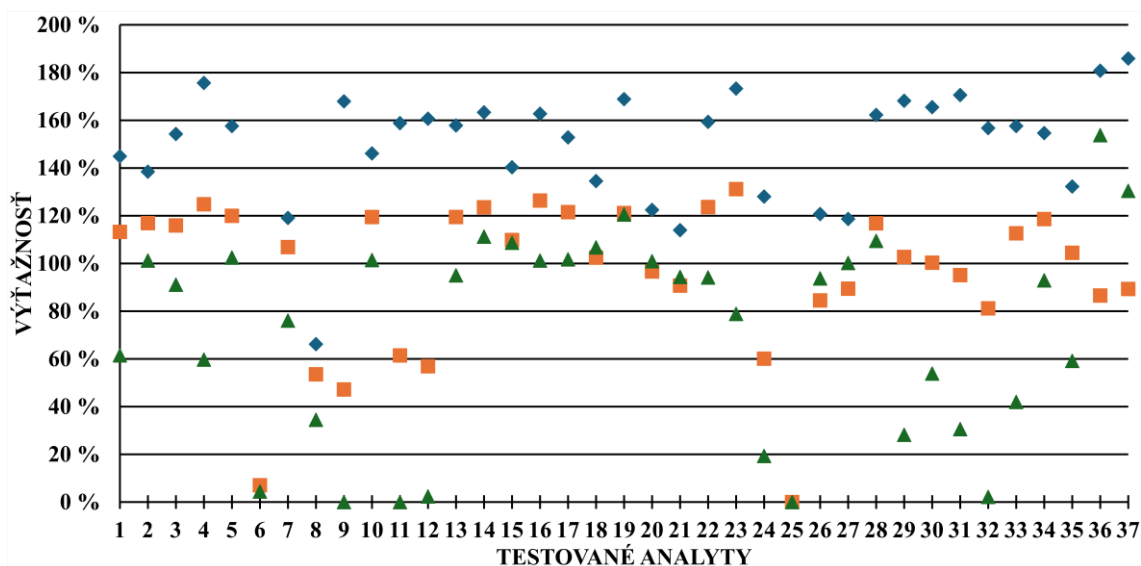
Obrázok č. 11: Výťažnosť testovaných steroidov pri použití činidiel MeOH, EtOH, ACN a TCA ako precipitačných činidiel v metóde PP a EH-PP. Čísla analytov sú priradené podľa Tabuľky č. 1. MeOH – metanol, EtOH – etanol, ACN – acetonitril, TCA – kyselina trichlóroctová, PP – proteínová precipitácia, EH-PP – proteínová precipitácia v spojení s enzymatickou hydrolýzou

## 5.2 Porovnanie metód PP, EH-PP a TR-PP

V nasledujúcom experimente boli testované dve predchádzajúce metódy (PP a EH-PP) a metóda s využitím fosfátového tlmivého roztoku (TR-PP), ktorého príprava je uvedená v kapitole 4.7.3. Tlmivý roztok bol pridaný, aby bolo zachované pH behom extrakcie a nedochádzalo tak k zmenám ionizačných stavov analytov, predovšetkým analytu DHEA-S (25). Tento analyt sa v plazme bežne vyskytuje v ionizovanej forme, pre jeho úspešnú kvantifikáciu je však nutná neionizovaná forma – pH roztoku je tak pre analýzu tohto analytu kritickým faktorom.

Obrázok č. 12 zobrazuje hodnoty výťažnosti pri použití jednotlivých metód pri použití činidla ACN. Najvyššia výťažnosť bola pozorovaná pri použití metódy PP, hodnoty výťažnosti sa pohybovali v rozmedzí 0-185 %. Hodnoty klesali pod 50 % iba v prípade analytov 5 $\alpha$ DHP4 (6) a DHEA-S (25), kedy boli nulové pri všetkých troch metódach. V prípade analytu 5 $\alpha$ DHP4 (6) mohla byť príčinou prítomnosť hydroxylovej skupiny v polohe C3, ktorá mohla potenciálne reagovať s ACN a vytvárať komplexy, čo následne viedlo k jeho nízkej výťažnosti počas analytického procesu.

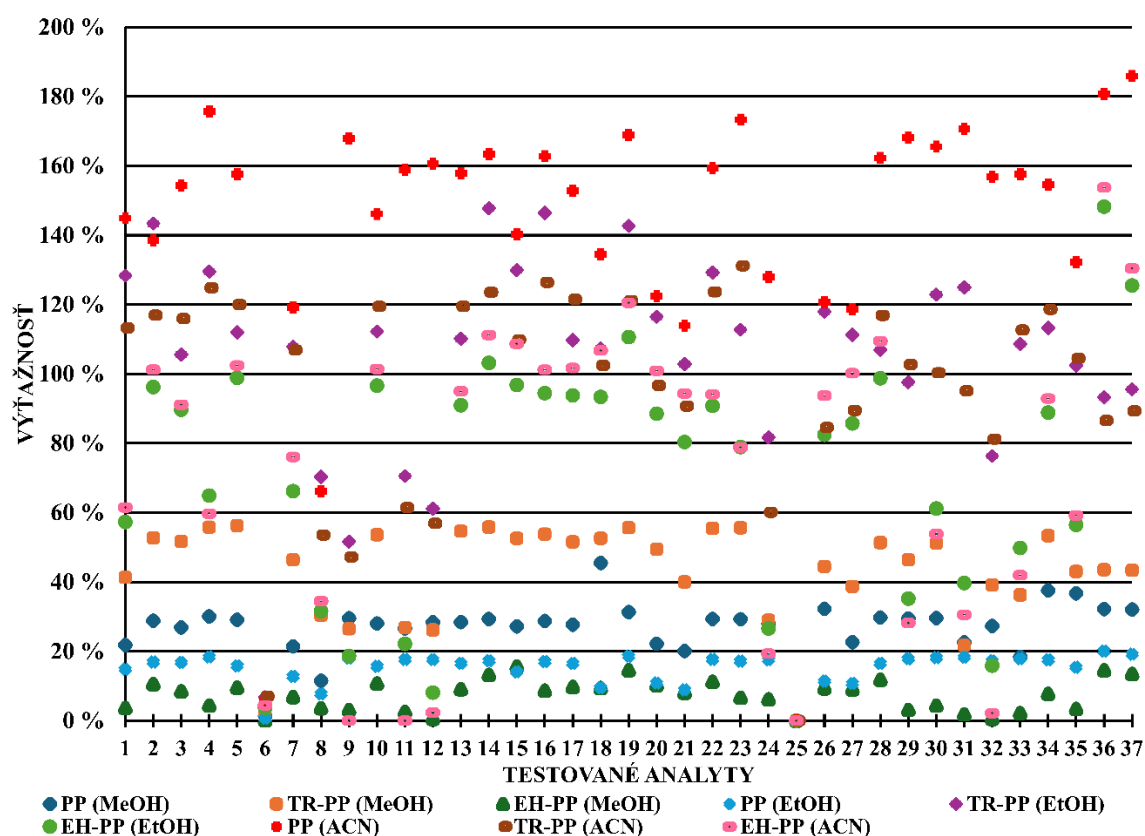
Dôvod nízkej výťažnosti (53 %) pri metóde PP v prípade analytu ALLO-P-ONE (8) mohol byť rovnaký ako v prípade analytu 5 $\alpha$ -DHP4 (6). Nutné je ale podotknúť, že analyt EPIALLO-P-ONE (7) – epimer analytu ALLO-P-ONE (8) – tento problém nevykazuje (Obrázok č. 12). Dôvodom nízkej výťažnosti mohol byť teda aj faktor matricových efektov na ktorý nebol v tejto chvíli braný ohľad a ktorý mohol výsledky potenciálne skresľovať.



Obrázok č. 12: Výťažnosť testovaných steroidov pri použití činidla ACN ako precipitačného činidla v metóde PP (modré body), TR-PP (oranžové body) a EH-PP (zelené body). Čísla analytov sú priradené podľa Tabuľky č. 1. ACN – acetonitril, PP – proteínová precipitácia, EH-PP – proteínová precipitácia v spojení s enzymatickou hydrolýzou, TR-PP – proteínová precipitácia s využitím fosfátového tlmivého roztoku

Obrázok č.13 súhrnne znázorňuje využitie činidiel MeOH, EtOH a ACN pri všetkých troch metódach. Z grafu vyplýva, že najnižšie hodnoty výtťažnosti boli dosahované pri metódach EH-PP pri použití činidla MeOH a PP pri použití činidla EtOH, kedy výtťažnosť nepresahovala 20 %. Výtťažnosť do 60 % bola pozorovaná pri metódach PP a TR-PP pri použití činidla MeOH. Metódy EH-PP a TR-PP pri použití činidla ACN a EH-PP a TR-PP pri použití činidla EtOH vykazovali hodnoty výtťažnosti dosahujúce 155 %, ale pomerne nejednotné profily meraní, čo bolo pravdepodobne spôsobené matricovými efektami.

Najvyššie hodnoty výtťažnosti boli pozorované pri použití činidla ACN pri metóde PP. Toto činidlo a metóda boli preto vybrané ako finálne. Keďže však nebolo možné extrahovať analyty 5 $\alpha$ -DHP4 (6) a DHEA-S (25) bola v ďalšom kroku optimalizovaná metóda SLE.



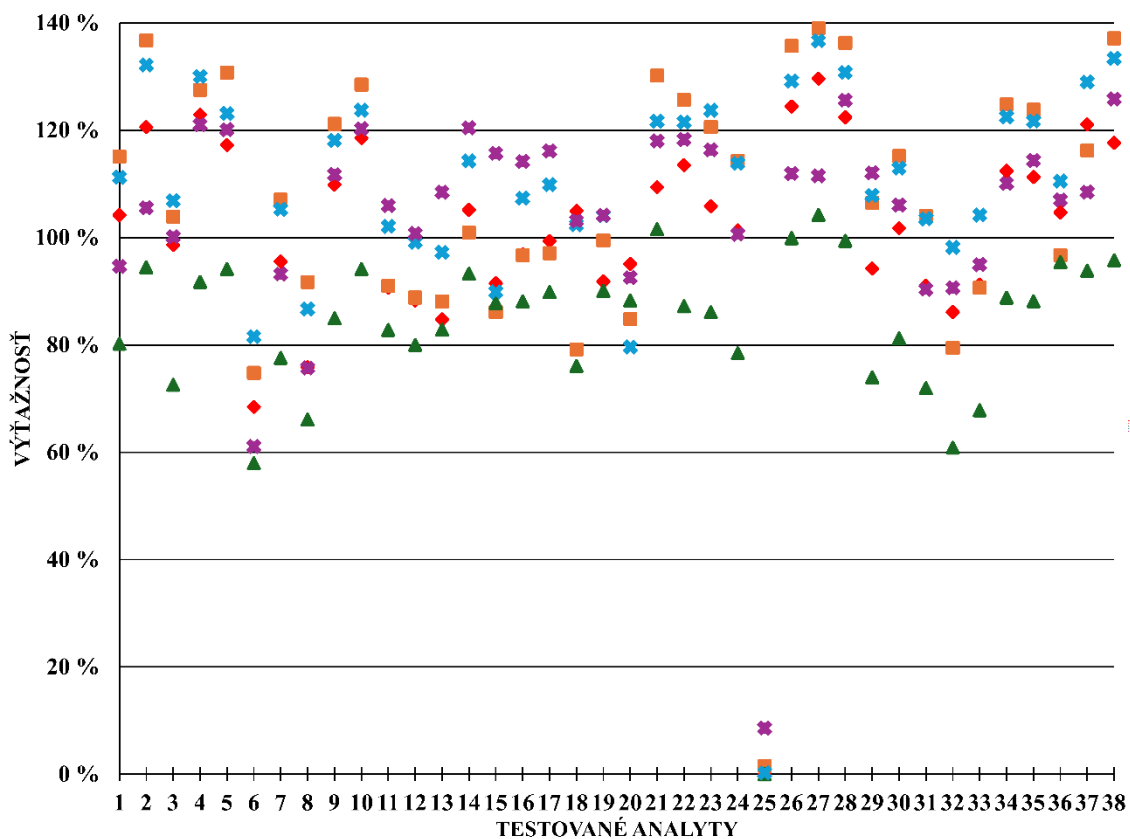
Obrázok č. 13: Výtťažnosť testovaných steroidov pri použití činidiel ACN, MeOH a EtOH ako precipitačných činidiel v metóde PP, TR-PP a EH-PP. Číslo analytov sú priradené podľa Tabuľky č. 1. MeOH – metanol, EtOH – etanol, ACN – acetonitril, PP – proteínová precipitácia, EH-PP – proteínová precipitácia v spojení s enzymatickou hydrolýzou, TR-PP – proteínová precipitácia s využitím fosfátového tlmivého roztoku

## 5.3 Optimalizácia SLE metódy

### 5.3.1 Výber extrakčného činidla

Pri optimalizácii metódy SLE boli postupne testované extrakčné činidlá uvedené v kapitole 4.10.3. Výťažnosti pri použití jednotlivých činidiel sú zobrazené na Obrázku č. 14. Najnižšie hodnoty výťažnosti boli pozorované pri použití činidla DCM/EtAc (80:20, v/v) a to v rozmedzí 60-105 %. Pri použití ostatných činidiel boli pozorované porovnateľné výsledky, pohybujúce sa v rozmedzí 65-140 %. Výťažnosti analytu DHEA-S (25) sa pohybovali v rozmedzí 0-9 % pri použití všetkých testovaných činidiel. Spomedzi testovaných rozpúšťadiel boli najväčšie výkyvy výťažnosti naprieč analytmi pozorované pri použití činidla DCM, pričom dôvodom mohol byť polárny charakter činidla. Z tohto dôvodu, a taktiež pretože sa jednalo o najtoxickejšie spomedzi testovaných činidiel, bolo DCM z nasledujúcich experimentov vyradené.

Najviac konzistentný profil merania bol pozorovaný pri použití činidla MTBE/EtAc (80:20, v/v) a táto kombinácia bola preto ďalej optimalizovaná.



Obrázok č. 14: Porovnanie výťažnosti pri metóde SLE pre činidlá MTBE (červené body), DCM (oranžové body), DCM/EtAc (80:20, v/v) (zelené body), MTBE/EtAc (80:20, v/v) (modré body) a EtAc (fialové body). Číslo analytu sú priradené podľa Tabuľky č. 1. SLE – extrakcia z kvapaliny do kvapaliny s využitím inertného nosiča, MTBE – metyl-terc-butyléter, DCM – dichlórmetán, EtAc – etylacetát

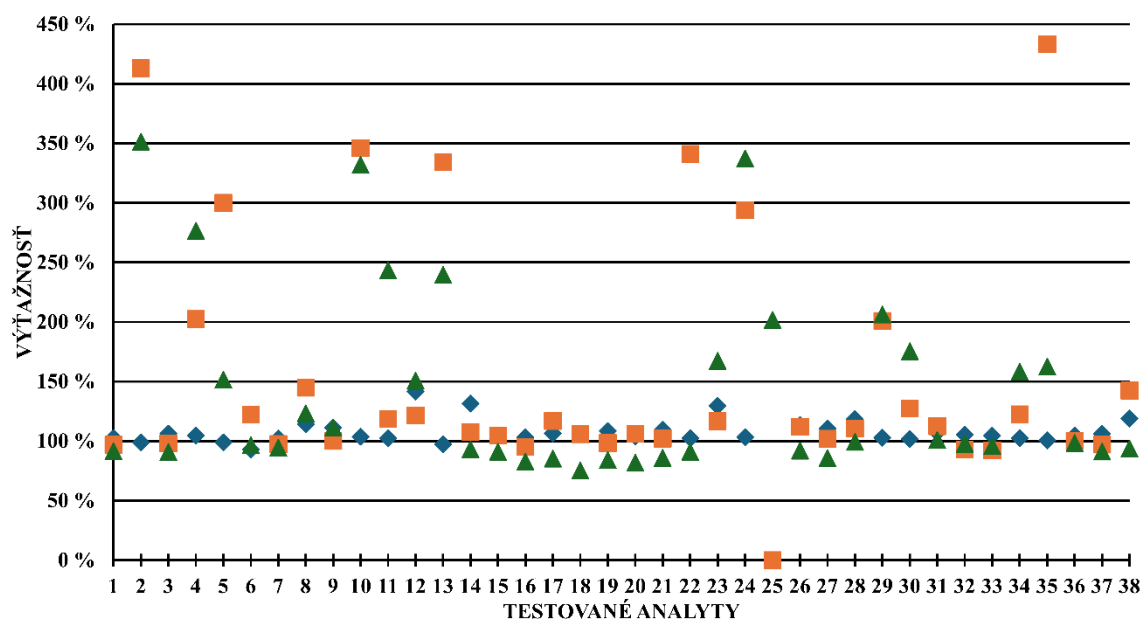


V rámci optimalizácie zmesi činidiel MTBE/EtAc boli porovnávané percentuálne zastúpenia jednotlivých zložiek (v/v): (80:20), (70:30) a (50:50). Boli analyzované parametre výťažnosti (Obrázok č. 15) a matricových efektov (Tabuľka č. 16).

Najnižšie hodnoty výťažnosti a najvyšší vplyv matricových efektov boli pozorované pri pomere (50:50, v/v). Matricové efekty sa u väčšiny analytov pohybovali v záporných hodnotách, dochádzalo teda k potlačeniu ionizácie. Naopak, najviac jednotný profil merania, najvyššie hodnoty výťažnosti pohybujúce sa v rozmedzí 90-140 % a najmenší vplyv matricových efektov – nespĺňajúci limit validačnej smernice [64] iba v prípade analytov 5 $\alpha$ -DHP4 (6), ALLO-P-ONE (8), Allo-THDOC (12) a DHEA-S (25) – bol pozorovaný pri použití pomeru (80:20, v/v).

Na základe výsledkov je tak možné konštatovať, že zvyšujúca sa etylacetátová zložka mala negatívny vplyv na extrakciu analytov, respektíve na matricové efekty. Vplyvom polarizácie etylacetátu dochádzalo okrem extrakcie analytov taktiež k čiastočnej elúcii polárnych zložiek matrice a následne k ovplyvneniu ionizácie.

Ako výsledný pomer bol preto vybraný pomer MTBE/EtAc (80:20, v/v).



Obrázok č. 15: Výťažnosť pri použití rôznych percentuálnych zastúpení zmesi MTBE/EtAc: – 80:20, v/v (modré body), 70:30, v/v (oranžové body), 50:50, v/v (zelené body). Čísla analytov sú priradené podľa Tabuľky č. 1. MTBE – metyl-terc-butyléter, EtAc - etylacetát

Tabuľka č. 16: Matricové efekty pri použití rôznych percentuálnych zastúpení zmesi MTBE/EtAc (v/v). Červenou farbou sú vyznačené hodnoty presahujúce limity stanovené validačnou smernicou ICH10/EMA [64]. Č. - čísla analytov priradené podľa Tabuľky č. 1. MTBE – metyl-terc-butyléter, EtAc – etylacetát

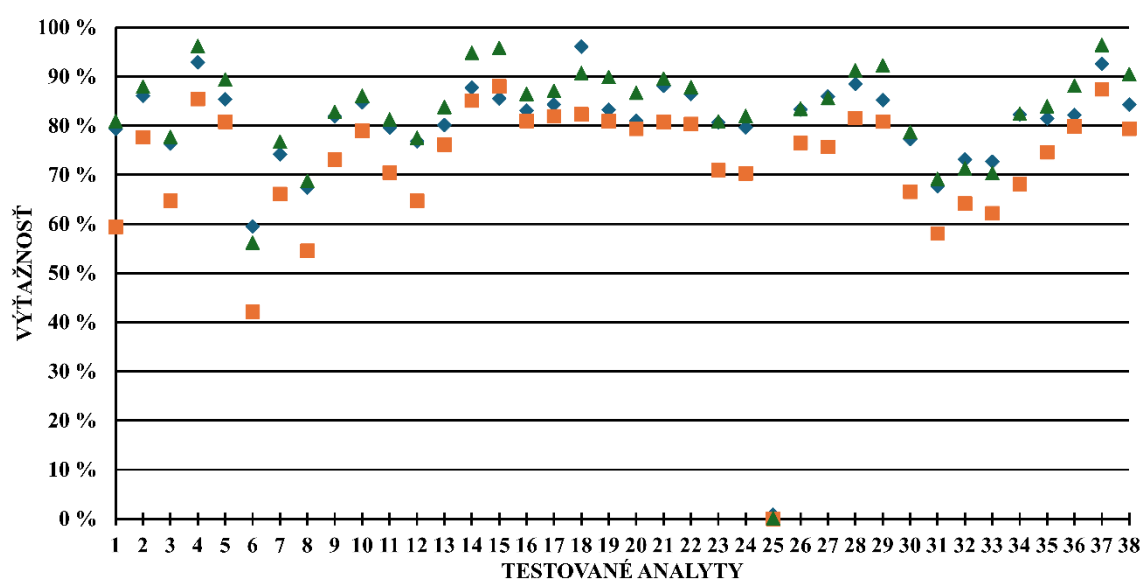
Č.	80:20 (v/v)	70:30 (v/v)	50:50 (v/v)
1	-3%	-4%	-15%
2	7%	-73%	-72%
3	-9%	-10%	-13%
4	13%	-47%	-63%
5	14%	-60%	-32%
6	-43%	-44%	-55%
7	-11%	-8%	-24%
8	-55%	-53%	-59%
9	-6%	-11%	-20%
10	8%	-68%	-68%
11	5%	-20%	-65%
12	-27%	-22%	-48%
13	10%	-67%	-59%
14	-12%	-2%	7%
15	11%	-1%	13%
16	12%	17%	18%
17	5%	-3%	17%
18	2%	-5%	30%
19	5%	11%	23%
20	4%	-3%	20%
21	3%	3%	8%
22	7%	-67%	6%
23	-17%	-16%	-48%
24	3%	-65%	-74%
25	-38%	-52%	-100%
26	-3%	-11%	0%
27	2%	3%	2%
28	-1%	-9%	-7%
29	14%	-51%	-52%
30	0%	-30%	-49%
31	-8%	-16%	-25%
32	1%	-7%	-14%
33	-5%	-3%	-11%
34	4%	-23%	-45%
35	9%	-74%	-41%
36	6%	19%	2%
37	12%	19%	14%
38	-1%	-27%	-8%

V nasledujúcom experimente boli testované tri extrakčné profily. Ich schematické znázornenie je zobrazené v Experimentálnej časti v Tabuľke č. 15. Hodnoty výťažnosti sú zobrazené na Obrázku č. 16.

Extrakcia v každom extrakčnom profile prebehla 3x, vždy 1 ml činidla. Najnižšie hodnoty výťažnosti boli pozorované pri extrakčnom profile B. Profily A a C vykazovali porovnateľné hodnoty výťažnosti pohybujúce sa v rozmedzí 55-100 %. Analyt DHEA-S (25) vykazoval nulové hodnoty pri všetkých troch profiloch.

Spoločným znakom profilov A a C bolo použitie minimálne 2krát 1 ml činidla MTBE – objem tohto činidla bol teda vyhodnotený ako relevantnejší v porovnaní s množstvom použitého EtAc.

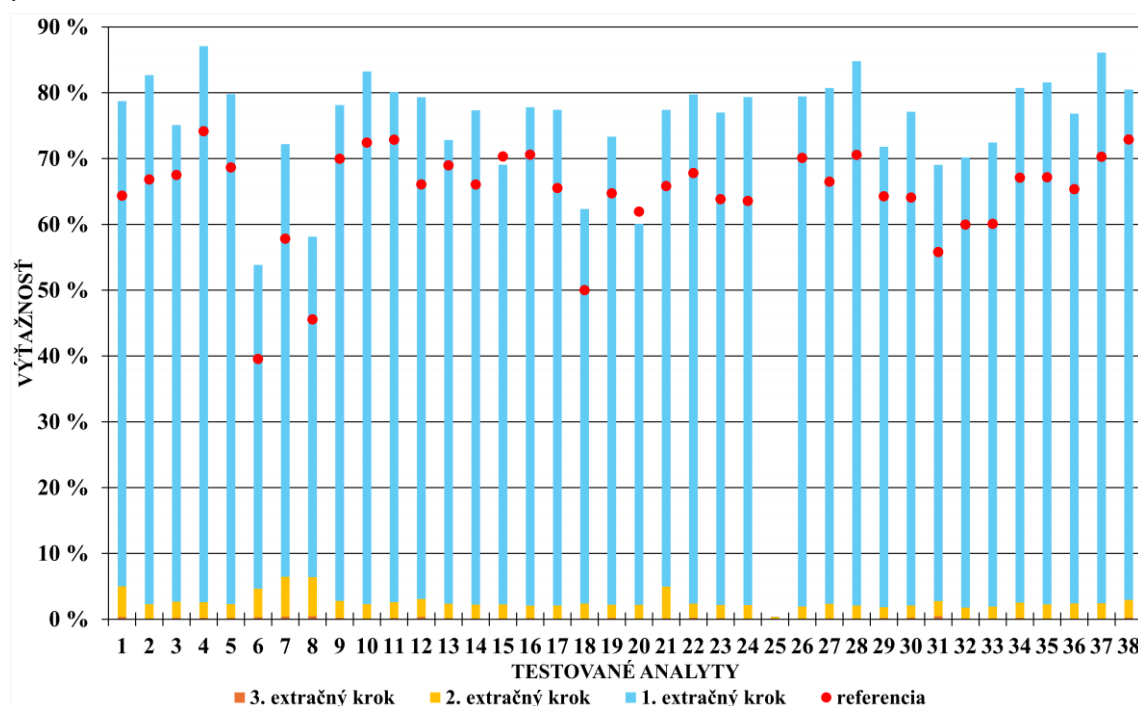
Ako finálne činidlo bola preto vybraná kombinácia MTBE/EtAc v pomere (80:20, v/v), extrakcia 3krát 1 ml činidla.



Obrázok č. 16: Porovnanie výťažnosti extrakčných profilov uvedených v Tabuľke č. 15 pri použití SLE metódy: extrakčný profil A (modré body), B (oranžové body), C (zelené body). Čísla analytov sú priradené podľa Tabuľky č. 1. SLE – extrakcia z kvapaliny do kvapaliny s využitím inertného nosiča

Následne bol optimalizovaný počet extrakčných krokov. Výťažnosti jednotlivých extrakčných krokov zobrazuje Obrázok č. 17. Najvyššie výťažnosti boli pozorované v 1. extrakčnom kroku, kedy sa hodnoty pohybovali v rozmedzí 50-85 %. V 2. extrakčnom kroku hodnoty výťažnosti prudko klesli a dosahovali maximálne 6 % a v 3. extrakčnom kroku boli nulové u všetkých analytov. Analyt DHEA-S (25) vykazoval nulové hodnoty výťažnosti vo všetkých extrakčných krokoch.

Z nameraných údajov vyplýva, že použitie 2x 1 ml činidla bolo dostatočné pre extrakciu analytov. Extrakčné činidlo vybrané pre SLE metódu bolo na základe výsledkov experimentov nasledovné: zmes MTBE/EtAc v pomere zložiek (80:20, v/v). Extrakcia týmto činidlom prebehla 2x, zakaždým 1 ml činidla.



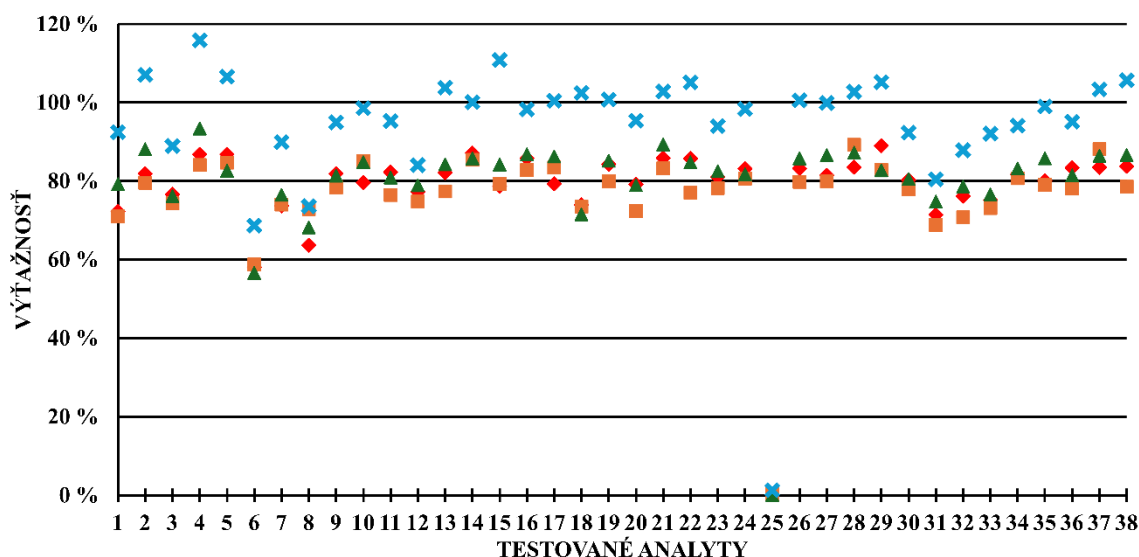
Obrázok č. 17: Porovnanie profilov výťažnosti pri použití činidla MTBE/EtAc (80:20, v/v) v troch extrakčných krokoch. Číslo analytov sú priradené podľa Tabuľky č. 1. MTBE – metyl-terc-butyléter, EtAc – etylacetát

### 5.3.2 Optimalizácia zloženia nanášanvej vzorky

Optimalizácia zloženia nanášanvej vzorky za použitia finálneho činidla zahŕňala nasledujúce kroky: testovanie faktoru riedenia nanášanvej vzorky, vplyv koncentrácie IPA na narušenie väzby analyzovaných látok na transportné proteíny a optimalizáciu zmeny pH pomocou vody okyslenej HCl.

Pri optimalizácii faktoru riedenia nanášanvej vzorky sa porovnávali štyri objemy: 150 µl, 200 µl, 300 µl a 400 µl. Tieto objemy boli zvolené na základe odporúčenia výrobcu SLE doštičiek, kedy by sa mal nanášať objem vzorky pohybovať medzi 150 a 400 µl.

Na Obrázku č. 18 je možné pozorovať, že najvyššie hodnoty výťažnosti boli dosiahnuté pri zriedení plazmy na 400  $\mu$ l, kedy sa hodnoty pohybovali v rozmedzí 70-110 %. Pri nižších zriedeniach boli hodnoty výťažnosti porovnateľné a pohybovali sa v rozmedzí 65-95 %. Analyt DHEA-S (25) dosahoval nulové hodnoty pri všetkých štyroch zriedeniach. Možným vysvetlením poklesu hodnôt výťažnosti pri nižších zriedeniach bola vysoká viskozita, ktorá neumožňovala dobré pokrytie povrchu kremeliny, čím sa znižovala extrahovateľnosť analytov.

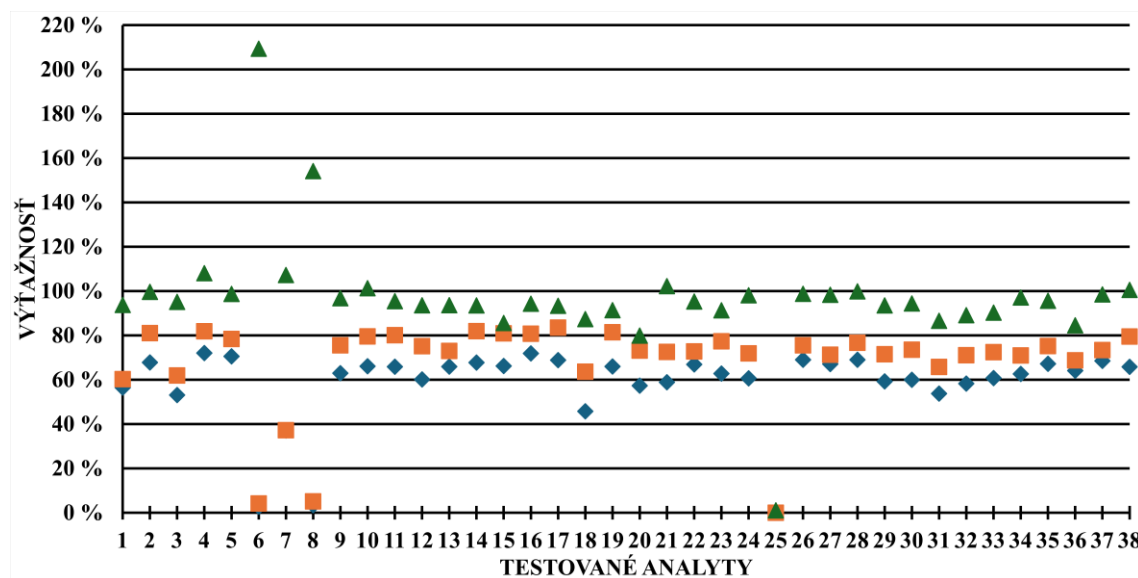


Obrázok č. 18: Výťažnosť testovaných steroidov pri optimalizácii faktoru riedenia nanášanej vzorky – 150  $\mu$ l (červené body), 200  $\mu$ l (oranžové body), 300  $\mu$ l (zelené body), 400  $\mu$ l (modré body). Čísla analytov sú priradené podľa Tabuľky č. 1.

V ďalšom kroku bol testovaný vplyv koncentrácie IPA na narušenie väzby analyzovaných látok na transportné proteíny, napr. transkortin. Použitie IPA bolo odporúčané výrobcom, kedy bol odporúčaný maximálny prídavok 5 % organickej zložky k nanášanej vzorke, pričom táto koncentrácia mala zabrániť strhávaniu matrice do výsledného extraktu. IPA sa ku vzorke pridával v takom množstve, aby nedochádzalo k precipitácii proteínov pred nanosením na SLE doštičku.

Boli testované nasledujúce množstvá a pomery prídavku IPA: 360  $\mu$ l H<sub>2</sub>O/IPA (50:50, v/v), 200  $\mu$ l IPA, 40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O/IPA (50:50, v/v), pričom najvyššie hodnoty výťažnosti boli pozorované pri použití zmesi 40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O/IPA (50:50, v/v) a to v rozmedzí hodnôt 80-210 % (Obrázok č. 19). Najvýraznejšie zvýšenie hodnôt výťažnosti bolo pozorované pri analytoch 5 $\alpha$ -DHP4 (6) a ALLO-P-ONE (8), čo poukazuje na výrazné narušenie väzby na transportné proteíny. Dôvodom mohla byť ďalej aj chemická štruktúra analytov, ktorá mohla viesť k ich zvýšenej rozpustnosti – ich spoločným znakom je prítomnosť hydroxylovej skupiny v polohe C3 a ALLO-P-ONE (8) má navyše aj aminoskupinu v polohe C20. IPA tvorí s hydroxylovými skupinami vodíkové väzby a s aminoskupinou iónové väzby. Mohlo tak dôjsť k zvýšenej rozpustnosti a extrahovateľnosti analytov.

Najnižšie hodnoty výťažnosti boli naopak pozorované pri zmesi 360  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}/\text{IPA}$  (50:50, v/v). V tomto prípade vykazovali analyty 5 $\alpha$ -DHP4 (6) a ALLO-P-ONE (8) nulové výťažnosti, čo mohol byť dôsledok vplyvu zvýšenej koncentrácie IPA, kedy mohlo dochádzať naopak k zníženiu rozpustnosti týchto analytov a zníženiu narušenia väzby na transportné proteíny. Analyt DHEA-S sulfát (25) vykazoval nulovú výťažnosť vo všetkých troch prípadoch.



Obrázok č. 19: Výťažnosť analyzovaných steroidov pri optimalizácii vplyvu IPA na narušenie väzby na transportné proteíny: 360  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}/\text{IPA}$  (50:50, v/v) (modré body), 200  $\mu\text{l}$  IPA (oranžové body), 40  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}/\text{IPA}$  (50:50, v/v) (zelené body). Čísla analytov sú priradené podľa Tabuľky č. 1. IPA - isopropanol

V snahe analyzovať analyt DHEA-S (25) boli vykonané dva experimenty (s prípravkom IPA a bez prídavku IPA) s prídavkom vody okyslenej HCl, pripravenej spôsobom uvedeným v kapitole 4.7.2.

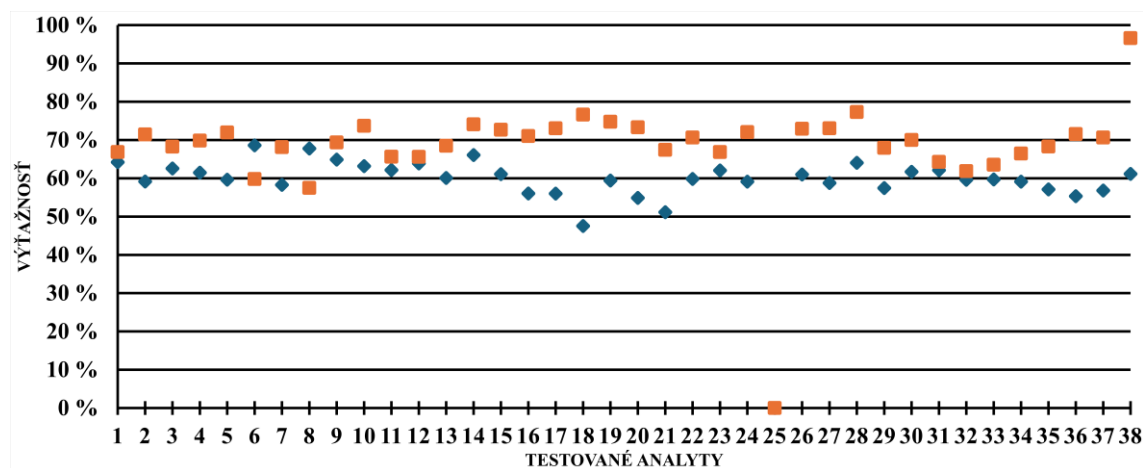
Tento analyt sa za normálnych okolností vyskytuje v plazme v ionizovanej forme, pre jeho úspešnú extrakciu pomocou SLE metódy však musí byť v neionizovanej forme. Sledoval sa teda vplyv zníženia pH roztoku na hodnoty výťažnosti tohto analytu. Boli porovnávané dva parametre: výťažnosť (Obrázok č. 20) a matricové efekty (Obrázok č. 21).

Vyššie hodnoty výťažnosti boli pozorované v prípade experimentu bez prídavku IPA a pohybovali sa v rozmedzí 55-100 %. V prípade experimentu s prídavkom IPA sa pohybovali v rozmedzí 45-70 %. Tento pokles výťažnosti mohol byť spôsobený faktom, že IPA mohla v prítomnosti HCl viesť k chemickým modifikáciám steroidov a tým ovplyvniť ich kvantifikáciu.

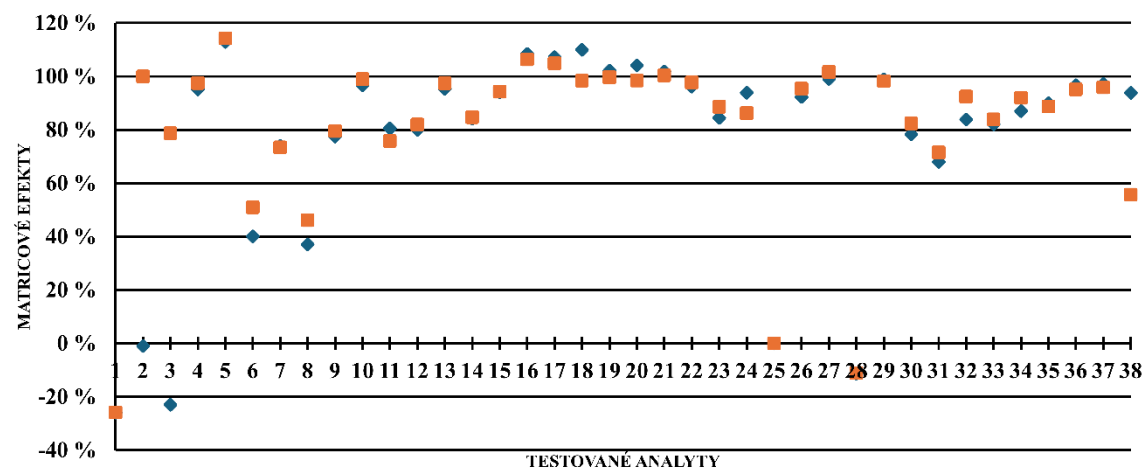
Analyt DHEA-S (25) vykazoval nulovú výťažnosť v oboch prípadoch, z čoho vyplýva, že zníženie pH analyzovaného roztoku nemalo na extrakciu tohto analytu vplyv. Dôvodom mohlo byť nedostatočné zníženie pH. Väčšie zníženie pH by potenciálne mohlo viesť k vyššej výťažnosti analytu DHEA-S (25), zároveň by však mohlo viesť aj

k degradácii ostatných analytov, čo bolo v tomto prípade nežiaduce. Parameter matricových efektov sa výrazne nelíši bez ohľadu na prídavok IPA.

Pre finálnu metódu bol na základe výsledkov vybraný prídavok 40 µl zmesi H<sub>2</sub>O/IPA (50:50, v/v).



Obrázok č. 20: Výťažnosť analyzovaných steroidov pri optimalizácii zmeny pH pomocou vody okyslenej HCl s prídavkom IPA (modré body) a bez prídavku IPA (oranžové body). Čísla analytov sú priradené podľa Tabuľky č. 1. IPA – isopropanol



Obrázok č. 21 : Matricové efekty analyzovaných steroidov pri optimalizácii zmeny pH pomocou vody okyslenej HCl s prídavkom IPA (modré body) a bez prídavku IPA (oranžové body). Čísla analytov sú priradené podľa Tabuľky č. 1. IPA - isopropanol

## 5.4 Porovnanie optimalizovaných metód

V rámci diplomovej práce boli testované nasledujúce metódy: PP, PP-SLE, EH-PP, EH-PP-SLE, EH-SLE a SLE.

Metóda EH-SLE nie je v porovnaní zahrnutá, keďže sa zmenil zámer biologickej štúdie pre ktorú bola metóda používaná. Analyt  $\beta$ -estradiol (38) nie je v porovnaní zahrnutý, keďže v priebehu optimalizácie PP metódy ešte nebol súčasťou biologickej štúdie – zámer jeho neskoršieho testovania bolo jeho potenciálne budúce použitie. Metódy PP-SLE a EH-PP-SLE nie sú v porovnaní zahrnuté, keďže pri nich dochádzalo k elúcii matrice do vzorky vyplývajúce z faktu, že sa na SLE doštičku nenanášal vodný roztok, ale organický supernatant – vo svojej podstate sa teda už nejednalo o SLE metódu. Porovnanie metód PP a PP-EH prebehlo v rámci experimentu, ktorý je diskutovaný v kapitole 5.1. Pri využití metódy PP nebolo možné v dôvodu nulovej výťažnosti analyzovať analyty 17 $\alpha$ -OHP4 (4) a E (9) (z dôvodu pravdepodobnej chyby merania) a preto nie sú v porovnaní zahrnuté.

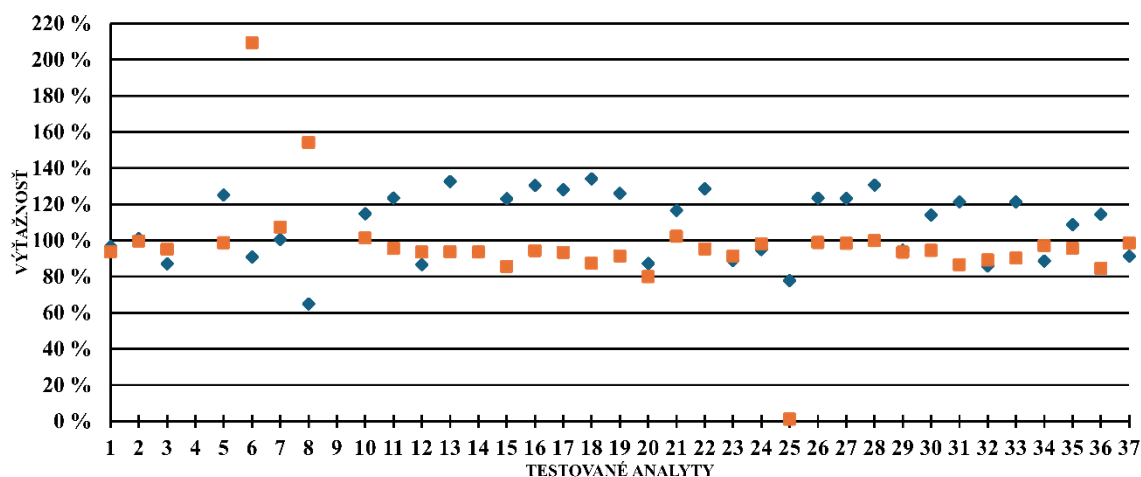
Za základe experimentov boli ako finálne metódy vybrané: PP a SLE metóda. Ako finálne precipitačné činidlo bol pre PP na základe predchádzajúcich experimentov vybraný ACN. Finálne podmienky SLE metódy sú zhrnuté v kapitole 4.10.6. Táto kapitola sa teda sústreďí na porovnanie hodnôt výťažnosti a matricových efektov PP a SLE.

Obrázok č. 22 znázorňuje porovnanie hodnôt výťažnosti metód PP a SLE. Hoci bolo možné pri metóde PP pozorovať vyššie hodnoty výťažnosti v rozmedzí 0–140 %, výkyvy medzi jednotlivými analytmi boli výraznejšie a profil merania menej konzistentný než v prípade metódy SLE, kedy výrazný výkyv vykazovali iba analyty 5 $\alpha$ -DPH4 (6), ALLO-P-ONE (8) a DHEA-S sulfát (25). Metódou PP bolo možné analyzovať kritický analyt DHEA-S (25) bolo však možné pozorovať nízku presnosť výsledkov, kedy hodnoty nevyhovovali limitu stanovenom vo validačnej smernici [64] a neboli tak spoľahlivé.

Vplyv matricových efektov bol porovnateľný pri oboch metódach, vyšší vplyv matrice pri niektorých analytoch však vykazovala SLE metóda (Tabuľka č. 17). Tento fakt bol vyhodnotený ako menej relevantný v porovnaní s parametrom výťažnosti.

Keďže bolo SLE metódou možné analyzovať všetky analyty v stanovovanom sete, okrem analytu DHEA-S (25), bola táto metóda vybraná ako finálna metóda prípravy vzorky.





Obrázok č. 22: Porovnanie výťažnosti analyzovaných steroidov pri použití optimalizovaných metód PP (modré body) a SLE (oranžové body). Čísla analytov sú priradené podľa Tabuľky č. 1. PP – proteínová precipitácia, SLE – extrakcia z kvapaliny do kvapaliny s využitím inertného nosiča

Tabuľka č. 17: Matricové efekty analyzovaných steroidov pri použití optimalizovaných metód PP a SLE. Červenou farbou sú vyznačené hodnoty presahujúce limity stanovené validačnou smernicou [64]. Č. – číslo analytu priradené podľa Tabuľky č. 1, PP – proteínová precipitácia, SLE – extrakcia z kvapaliny do kvapaliny s využitím inertného nosiča

Č.	PP	SLE	Č.	PP	SLE
1	-25%	-26%	21	-30%	2%
2	-6%	-1%	22	-1%	-4%
3	-3%	-23%	23	-1%	-16%
5	-1%	13%	24	-18%	-6%
6	-91%	-60%	25	-415%	-100%
7	-32%	-26%	26	-20%	-8%
8	-52%	-63%	27	-23%	-1%
10	-4%	-3%	28	-17%	-111%
11	-7%	-19%	29	0%	-1%
12	-3%	-20%	30	0%	-22%
13	-6%	-5%	31	0%	-32%
14	-2%	-16%	32	-2%	-16%
15	-8%	-6%	33	-1%	-18%
16	-10%	8%	34	1%	-13%
17	-7%	7%	35	-9%	-10%
18	-24%	10%	36	-25%	-3%
19	-7%	2%	37	-16%	-3%
20	-18%	4%			

## 5.5 Validácia optimalizovanej SLE metódy

### 5.5.1 Kalibračné rozmedzie

Linearita kalibračného rozmedzia bola hodnotená na základe matricovej kalibračnej krivky. Tá bola pripravená v rozmedzí 0,05-100 ng/ml obohatením ľudskej plazmy roztokom vytvoreným zmiešaním štandardov a vnútorných značených štandardov. Vzhľadom k endogénnej povahe analytov bolo súčasťou vyhodnotenia matricovej kalibračnej krivky odčítanie pozadia – teda plôch píkov príslušných analytov v nulovej vzorke. Po tomto odpočte boli plochy v obohatenej vzorke vzťahované na plochu vnútorného štandardu a logaritmicky transformované a podrobené regresnej analýze.

Kalibračný model s logaritmickou transformáciou dát preukázal linearitu kalibračného rozmedzia v oblasti 0,5-75 ng/ml s hodnotami determinačného koeficientu  $R^2 > 0.991$  pre väčšinu analytov s výnimkou CL (18), AN (31) a  $\beta$ -estradiol (38). Kalibračné rozmedzie a determinačné koeficienty boli porovnateľné medzi analógovým aj poloautomatizovaným manifoldom (Tabuľka č. 18). Nižšie hodnoty  $R^2$  boli pri analytoch CL (18), AN (31) a  $\beta$ -estradiol (38) spôsobené ich vysokou endogénnou koncentráciou v nulovej vzorke. Kalibračné rozmedzie nebolo možné určiť pri analyte DHEA-S (25) v dôsledku jeho neextrahovateľnosti.

*Tabuľka č. 18: Porovnanie kalibračných rozmedzí a determinačných koeficientov ( $R^2$ ) naprieč manifoldmi. Č. – číslo analytu priradené podľa Tabuľky č. 1.*

Č.	Analógový manifold			Poloautomatizovaný manifold		
	$R^2$	kalibračné rozmedzie (ng/ml)	priemerná výťažnosť	$R^2$	kalibračné rozmedzie (ng/ml)	priemerná výťažnosť
1	0,9972	0,5-75,0	57%	0,9936	0,5-25,0	58%
2	0,9960	0,5-75,0	45%	0,9902	0,5-75,0	62%
3	0,9914	0,5-75,0	45%	0,9941	0,5-75,0	50%
4	0,9987	0,5-75,0	51%	0,9916	0,5-75,0	56%
5	0,9973	0,5-75,0	59%	0,9911	0,5-75,0	67%
6	0,9944	1,0-75,0	62%	0,9907	0,5-25,0	54%
7	0,9963	0,5-75,0	55%	0,9944	0,5-75,0	63%
8	0,9958	7,0-75,0	76%	0,9904	7,0-75,0	46%
9	0,9962	0,5-75,0	38%	0,9913	7,0-75,0	64%
10	0,9936	0,5-75,0	54%	0,9966	0,5-75,0	56%
11	0,9959	0,5-75,0	43%	0,9957	7,0-75,0	72%
12	0,9923	7,0-75,0	26%	0,9948	3,0-75,0	61%
13	0,9942	0,5-75,0	59%	0,9959	7,0-75,0	70%
14	0,9987	0,5-75,0	59%	0,9920	0,5-75,0	68%
15	0,9986	0,5-75,0	54%	0,9909	0,5-75,0	58%
16	0,9953	1,0-75,0	60%	0,9960	0,5-25,0	76%
17	0,9978	0,5-75,0	61%	0,9939	0,5-75,0	68%
18	0,9515	0,5-75,0	17%	0,9808	0,5-75,0	10%
19	0,9979	0,5-75,0	56%	0,9918	0,5-75,0	64%
20	0,9978	0,5-75,0	25%	0,9944	0,5-75,0	22%

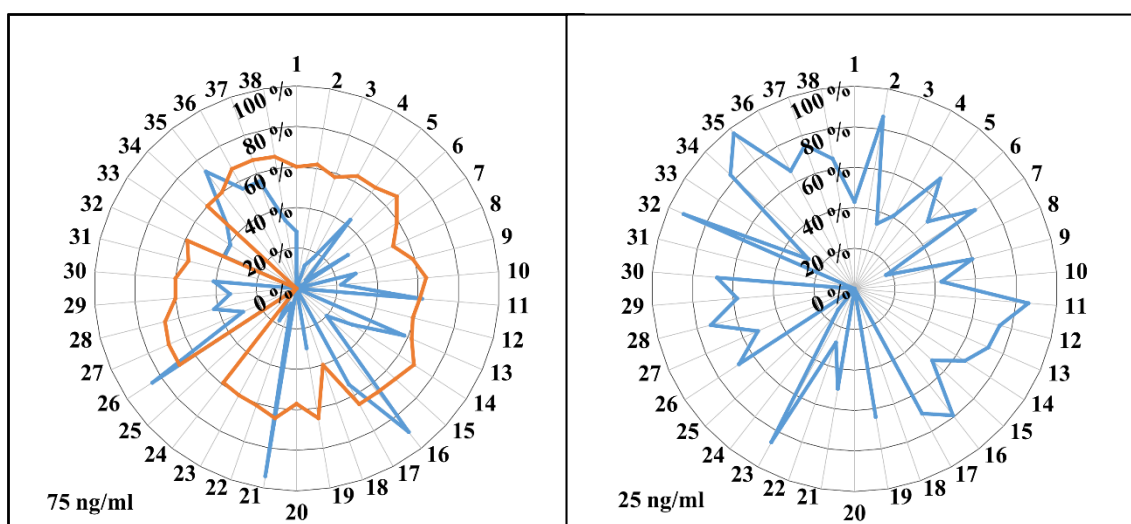
<b>21</b>	0,9957	1,0-75,0	54%	0,9946	0,5-25,0	71%
<b>22</b>	0,9962	0,5-75,0	47%	0,9956	0,5-75,0	49%
<b>23</b>	0,9966	1,0-75,0	54%	0,9967	0,5-75,0	63%
<b>24</b>	0,9963	0,5-75,0	38%	0,9902	0,5-75,0	43%
<b>26</b>	0,9963	1,0-75,0	63%	0,9924	0,5-75,0	75%
<b>27</b>	0,9961	0,5-75,0	62%	0,9922	0,5-25,0	48%
<b>28</b>	0,9979	1,0-75,0	59%	0,9953	0,5-75,0	69%
<b>29</b>	0,9980	0,5-75,0	51%	0,9959	0,5-75,0	61%
<b>30</b>	0,9968	3,0-75,0	51%	0,9964	0,5-75,0	64%
<b>31</b>	0,9873	75,0	78%	0,9912	0,5-75,0	40%
<b>32</b>	0,9954	0,5-75,0	51%	0,9944	0,5-75,0	68%
<b>33</b>	0,9952	1,0-75,0	35%	0,9950	0,5-25,0	57%
<b>34</b>	0,9921	0,5-75,0	57%	0,9920	0,5-75,0	69%
<b>35</b>	0,9966	0,5-75,0	57%	0,9961	0,5-75,0	75%
<b>36</b>	0,9982	0,5-75,0	56%	0,9955	0,5-25,0	68%
<b>37</b>	0,9975	0,5-75,0	53%	0,9941	0,5-25,0	71%
<b>38</b>	0,9766	0,5-75,0	67%	0,9939	0,5-25,0	68%

### 5.5.2 Výťažnosť a matricové efekty

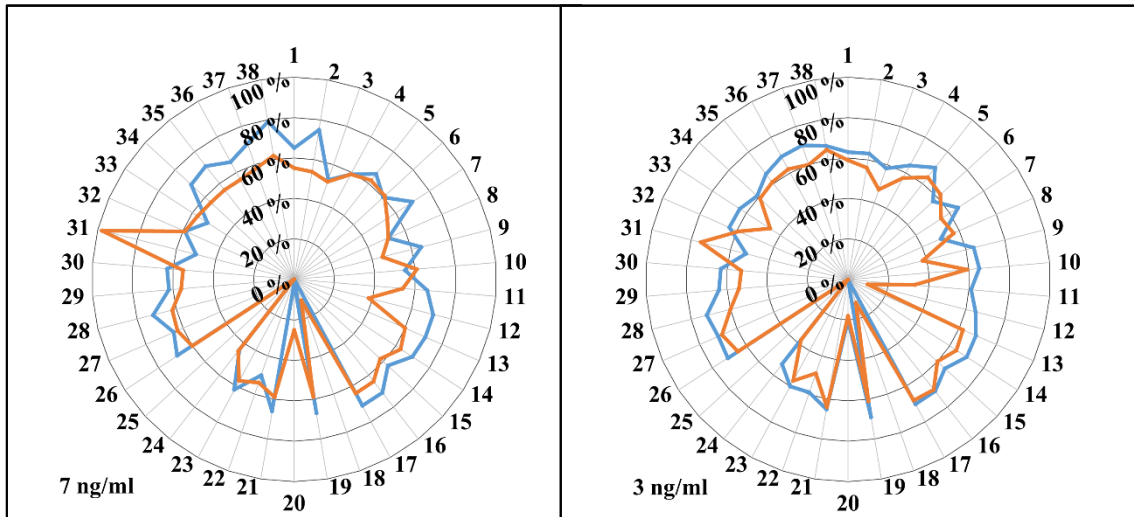
Výťažnosť metódy bola hodnotená na šiestich koncentračných hladinách: 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml, 7 ng/ml, 25 ng/ml a 75 ng/ml. Pre vyhodnotenie výťažnosti bola plazma obohatená prídavkom štandardov pred extrakciou. Matricové efekty boli hodnotené z plazmy obohatenej post-extrakčným prídavkom a korigované na vnútorný štandard. Vzorky boli pripravené v šiestich a štyroch replikátoch na danej koncentračnej hladine. Ako prijateľné boli hodnotené matricové efekty  $\pm 20\%$  na najnižšom koncentračnom bode a  $\pm 15\%$  na ostatných koncentračných bodoch.

Validačné parametre výťažnosť a matricové efekty neboli hodnotené pri analyte DHEA-S (25) v dôsledku jeho neextrahovateľnosti. Priemerné hodnoty výťažnosti naprieč koncentračnými hladinami sa pohybovali v rozmedzí 35-78% v prípade analógového manifoldu a 40-76% v prípade poloautomatizovaného manifoldu. Pri analyte AlloTHDOC (12), CL (18) a E (20) sa priemerné výťažnosti pohybovali pod 25% za použitia analógového manifoldu a u analytov CL (18) a E (20) aj v prípade poloautomatizovaného manifoldu. Obrázky č. 23, 24 a 25 ilustrujú porovnanie výťažnosti na jednotlivých koncentračných hladinách naprieč manifoldmi. Z obrázkov je očividný pokles výťažnosti v prípade analógového manifoldu závislý na znižujúcej sa koncentračnej hladine. Na analógovom manifolde nebola koncentračná hladina 25 ng/ml hodnotená z dôvodu chyby pri príprave vzorky.

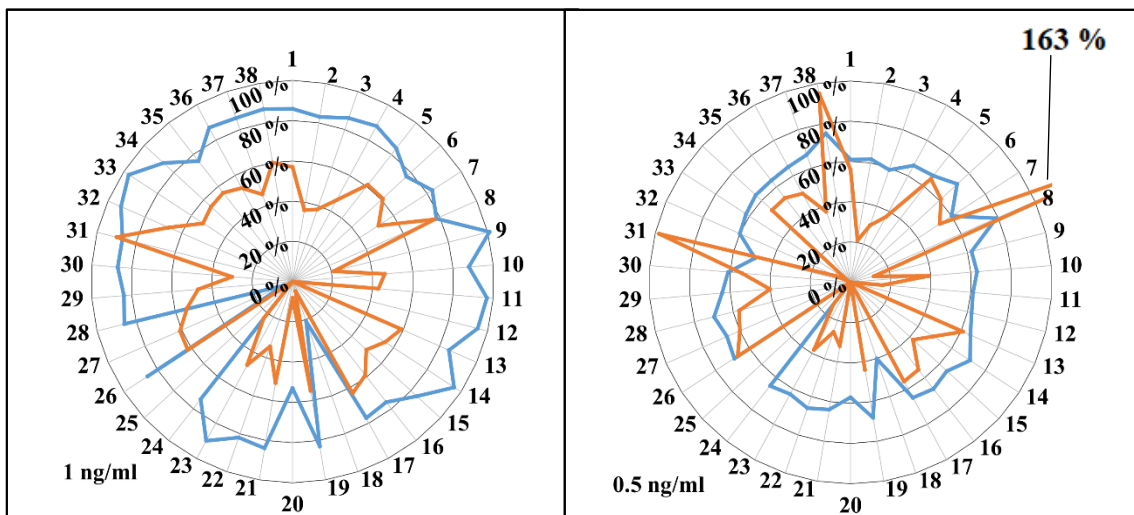
Matricovými efektmi boli najviac zaťažené nízke koncentračné hladiny, porovnateľne v prípade oboch typov manifoldov. Matricovými efektmi boli najviac zaťažené analyty 5 $\alpha$ DHP4 (6), ALLO-P-ONE (8), 20 $\alpha$ OHP4 (9), THDOC (11), AlloTHDOC (12), F (18), E (20), DHEA (24) a AN (31) a to dôsledku ich vysokej prítomnosti v nulových vzorkách. Tabuľky č. 19 a 20 znázorňujú matricové efekty pre jednotlivé steroidy na testovaných koncentračných hladinách naprieč manifoldmi.



Obrázok č. 23: Porovnanie výťažnosti analyzovaných steroidov nameraných na analógovom (červená čiara) a poloautomatizovanom (modrá čiara) manifolde na koncentračných hladinách 75 ng/ml a 25 ng/ml. Čísla analytov sú priradené podľa Tabuľky č.1



Obrázok č. 24: Porovnanie výťažnosti analyzovaných steroidov nameraných na analógovom (červená čiara) a poloautomatizovanom (modrá čiara) manifolde na koncentračných hladinách 7 ng/ml a 3 ng/ml. Čísla analytov sú priradené podľa Tabuľky č.1



Obrázok č. 25: Porovnanie výťažnosti analyzovaných steroidov nameraných na analógovom (červená čiara) a poloautomatizovanom (modrá čiara) manifolde na koncentračných hladinách 1 ng/ml a 0,5 ng/ml. Čísla analytov sú priradené podľa Tabuľky č.1

Tabuľka č. 19: Matricové efekty analyzovaných steroidov namerané na analógovom manifolde. Červenou farbou sú zobrazené hodnoty nespĺňajúce limit stanovený validačnou smernicou [64]. Č.- čísla analytov priradené podľa Tabuľky č. 1.

Č.	75 ng/ml	7 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,5 ng/ml	Č.	75 ng/ml	7 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,5 ng/ml
1	-7%	-5%	13%	3%	17%	20	-9%	-57%	-82%	-310%	-500%
2	-10%	-21%	-14%	-68%	-104%	21	-8%	-10%	8%	-4%	-6%
3	-9%	-23%	-27%	-88%	132%	22	-8%	-13%	2%	-39%	-73%
4	-6%	-9%	2%	-26%	-49%	23	-8%	-12%	-6%	-28%	-39%
5	-7%	-3%	13%	0%	3%	24	-10%	-48%	-83%	-194%	-283%
7	-8%	-4%	19%	-2%	-1%	26	-7%	-7%	7%	-15%	1%
8	-11%	-11%	1870%	7209%	7708%	27	-14%	-9%	9%	0%	10%
9	-10%	-36%	-65%	-212%	458%	28	-6%	-8%	5%	-5%	-34%
10	-8%	-13%	-8%	-42%	-58%	29	-6%	-11%	2%	-36%	-60%
11	-5%	-1%	102%	23%	270%	30	-9%	-13%	-3%	-72%	-90%
12	-10%	-47%	0%	-359%	-1234%	31	-7%	2564%	6968%	17665%	29623%
13	-5%	-6%	15%	-1%	-66%	32	-10%	-3%	23%	24%	-69%
14	-4%	-8%	10%	-6%	-9%	33	0%	-10%	25%	-18%	76%
15	-4%	-8%	12%	-6%	-9%	34	-10%	-7%	8%	-10%	-7%
16	-7%	-12%	1%	-25%	-40%	35	-3%	-4%	13%	-4%	-9%
17	-7%	-12%	6%	-12%	-26%	36	-94%	-2%	13%	4%	11%
18	-42%	-299%	-558%	-1769%	-3582%	37	-1%	-5%	14%	-14%	-14%
19	0%	-6%	18%	-4%	8%	38	-7%	-7%	12%	-1%	3%

Tabuľka č. 20: Hodnoty maticových efektov analyzovaných steroidov namerané na poloautomatizovanom manifolde. Červenou farbou sú zobrazené hodnoty nespĺňajúce limit stanovený validačnou smernicou [64]. Č.- čísla analytov priradené podľa Tabuľky č. 1.

Č.	75 ng/ml	25 ng/ml	7 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,5 ng/ml	Č.	75 ng/ml	25 ng/ml	7 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,5 ng/ml
1	-107%	-7%	0%	-63%	-2%	1%	20	-1671%	-665%	-183%	-76%	-28%	-6%
2	1312%	6%	28%	23%	-1%	4%	21	-99%	-49%	-7%	11%	2%	2%
3	-186%	-102%	-22%	-2%	-4%	2%	22	-236%	-112%	-19%	1%	1%	0%
4	-148%	-78%	5%	9%	6%	3%	23	5%	-45%	1%	9%	-1%	0%
5	-45%	-33%	21%	11%	8%	3%	24	-239%	-146%	-46%	5%	-9%	-9%
7	-37%	-32%	38%	42%	-17%	-7%	26	-60%	-47%	-7%	7%	-5%	-7%
8	-136%	-66%	-19%	-8%	11%	-4%	27	-70%	-43%	-5%	10%	2%	-7%
9	-123%	-46%	4%	9%	15%	2%	28	-55%	-46%	-11%	4%	-10%	-12%
10	-89%	-72%	-18%	-5%	-1%	-1%	29	-45%	-30%	-7%	13%	-2%	-9%
11	0%	-6%	16%	25%	24%	0%	30	-70%	-60%	-6%	-3%	-14%	-5%
12	0%	0%	18%	14%	33%	-2%	31	n/a	n/a	-48%	-40%	-38%	-18%
13	-29%	-16%	2%	14%	-1%	1%	32	76%	-19%	8%	10%	0%	3%
14	-71%	-41%	5%	11%	7%	5%	33	42%	150%	-1%	5%	-1%	1%
15	-108%	-41%	7%	14%	15%	2%	34	54%	-27%	-10%	-3%	4%	1%
16	-31%	-23%	18%	23%	28%	11%	35	38%	-30%	1%	-5%	5%	1%
17	-51%	-20%	13%	22%	28%	8%	36	-34%	-43%	-2%	5%	11%	0%
18	-6187%	-2506%	-679%	-309%	-77%	-31%	37	-35%	-30%	1%	7%	17%	9%
19	-79%	-49%	0%	14%	33%	10%	38	-97%	-92%	56%	0%	0%	0%

### 5.5.3 Presnosť a precíznosť

Parameter presnosti bol stanovený výpočtom z priemeru šiestich opakovaní extrakcie na testovaných koncentračných hladinách 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 3 ng/ml, 7 ng/ml, 25 ng/ml a 75 ng/ml. Precíznosť bola stanovená ako relatívna smerodajná odchýlka zo šiestich opakovaní extrakcie na rovnakých koncentračných hladinách. Pre vyhodnotenie presnosti a precíznosti bola plazma obohatená prídavkom štandardov pred extrakciou a vzorky boli pripravené v šiestich replikátoch. Ako prijateľné boli hodnotené hodnoty oboch stanovovaných parametrov  $\pm 20\%$  na najnižšom koncentračnom bode a  $\pm 15\%$  na ostatných koncentračných bodoch. Hodnoty presnosti a precíznosti neboli v prípade analógového manifoldu hodnotené na koncentračnej hladine 25 ng/ml z dôvodu chyby pri príprave vzorky.

Tabuľky č. 21 a 22 znázorňujú hodnoty presnosti pre jednotlivé steroidy na testovaných koncentračných hladinách naprieč manifoldmi. Tabuľka č. 23 znázorňuje hodnoty precíznosti pre jednotlivé steroidy na testovaných koncentračných hladinách naprieč manifoldmi.

Pre oba hodnotené parametre bolo možné pozorovať trend znižujúcej sa presnosti a precíznosti so znižujúcou sa koncentračnou hladinou v prípade analógového manifoldu, v prípade poloautomatizovaného manifoldu bol trend opačný. Analyty CL (18) a  $\beta$ -estradiol (38) nespĺňali stanovené limity pre parameter presnosti na žiadnej testovanej koncentračnej hladine naprieč manifoldmi a to dôsledku ich vysokej prítomnosti v nulových vzorkách.



Tabuľka č. 21: Hodnoty presnosti analyzovaných steroidov namerané na analógovom manifolde. Červenou farbou sú zobrazené hodnoty nespĺňajúce limit stanovený validačnou smernicou [64]. Č.- čísla analytov priradené podľa Tabuľky č. 1.

Č.	75 ng/ml	7 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,5 ng/ml	Č.	75 ng/ml	7 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,5 ng/ml
1	90%	79%	81%	90%	97%	20	100%	153%	298%	715%	1319%
2	87%	103%	143%	199%	290%	21	91%	98%	114%	161%	175%
3	91%	117%	172%	335%	571%	22	92%	-1%	135%	228%	368%
4	98%	75%	80%	105%	143%	23	87%	89%	104%	140%	196%
5	86%	88%	92%	96%	99%	24	93%	150%	237%	485%	847%
7	88%	91%	95%	96%	100%	26	92%	90%	93%	100%	114%
8	90%	60%	1921%	11201%	0%	27	287%	311%	327%	361%	-305%
9	95%	128%	198%	390%	687%	28	92%	110%	115%	165%	231%
10	90%	97%	110%	146%	208%	29	90%	99%	115%	174%	248%
11	91%	78%	83%	97%	107%	30	86%	87%	93%	60%	127%
12	99%	112%	136%	178%	178%	31	84%	4488%	6815%	28869%	54757%
13	92%	84%	85%	87%	89%	32	86%	97%	106%	158%	22%
14	89%	92%	97%	112%	130%	33	0%	91%	92%	97%	12%
15	97%	87%	90%	111%	126%	34	87%	83%	86%	68%	76%
16	22%	29%	32%	32%	33%	35	92%	87%	92%	98%	97%
17	29%	28%	31%	33%	35%	36	94%	89%	91%	103%	112%
18	127%	1292%	3021%	9015%	17951%	37	90%	91%	98%	118%	147%
19	95%	88%	91%	113%	129%	38	49%	285%	532%	1222%	2197%

Tabuľka č. 22: Hodnoty presnosti analyzovaných steroidov namerané na poloautomatizovanom manifolde. Červenou farbou sú zobrazené hodnoty nespĺňajúce limit stanovený validačnou smernicou [64]. Č.- čísla analytov priradené podľa Tabuľky č. 1.

Č.	75ng/ml	25ng/ml	7ng/ml	3ng/ml	1ng/ml	0,5ng/ml	Č.	75ng/ml	25ng/ml	7ng/ml	3ng/ml	1ng/ml	0,5ng/ml
1	175%	174%	163%	13%	94%	97%	20	3474%	1895%	715%	377%	157%	130%
2	43%	250%	180%	118%	100%	120%	21	239%	126%	137%	112%	93%	109%
3	363%	252%	173%	133%	97%	113%	22	440%	300%	200%	142%	100%	115%
4	587%	409%	262%	180%	108%	97%	23	69%	116%	126%	108%	92%	108%
5	91%	126%	147%	123%	93%	104%	24	611%	332%	230%	146%	99%	113%
7	97%	136%	142%	153%	133%	135%	26	233%	161%	163%	133%	98%	105%
8	143%	106%	121%	102%	92%	117%	27	133%	150%	146%	121%	91%	107%
9	332%	261%	202%	146%	102%	102%	28	115%	148%	168%	138%	102%	108%
10	256%	204%	159%	127%	98%	106%	29	178%	148%	143%	106%	89%	104%
11	46%	72%	107%	99%	86%	115%	30	97%	112%	141%	124%	100%	110%
12	4%	114%	124%	108%	95%	126%	31	0%	0%	104%	99%	85%	97%
13	67%	101%	133%	114%	93%	111%	32	75%	97%	110%	107%	87%	107%
14	145%	157%	157%	120%	93%	109%	33	100%	111%	114%	111%	89%	103%
15	182%	178%	166%	131%	98%	110%	34	78%	102%	136%	111%	98%	104%
16	152%	115%	135%	110%	87%	125%	35	64%	92%	112%	97%	89%	129%
17	98%	120%	135%	108%	86%	113%	36	314%	115%	192%	157%	126%	147%
18	13746%	6915%	2327%	1045%	301%	134%	37	206%	143%	156%	123%	98%	115%
19	181%	173%	146%	107%	80%	103%	38	274%	187%	250%	199%	167%	189%

Tabuľka č. 23: Hodnoty preciznosti analyzovaných steroidov namerané na analógovom a poloautomatizovanom manifolde. Červenou farbou sú zobrazené hodnoty nespĺňajúce limit stanovený validačnou smernicou [64]. Č.- čísla analytov priradené podľa Tabuľky č. 1

Analógový manifold						Poloautomatizovaný manifold						
Č.	75 ng/ml	7 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,5 ng/ml	Č.	75 ng/ml	25 ng/ml	7 ng/ml	3 ng/ml	1 ng/ml	0,5 ng/ml
1	6%	5%	7%	8%	6%	1	19%	15%	8%	14%	3%	6%
2	7%	9%	13%	7%	15%	2	29%	22%	12%	15%	13%	4%
3	5%	4%	6%	3%	6%	3	7%	10%	7%	7%	5%	7%
4	6%	5%	7%	3%	6%	4	7%	8%	7%	5%	4%	1%
5	6%	4%	7%	4%	4%	5	11%	10%	11%	7%	5%	3%
6	9%	8%	9%	15%	23%	6	20%	11%	12%	24%	10%	14%
7	6%	6%	7%	8%	11%	7	52%	45%	19%	15%	7%	9%
8	7%	12%	118%	35%	60%	8	16%	9%	8%	7%	5%	5%
9	6%	4%	6%	4%	7%	9	13%	10%	9%	8%	5%	8%
10	6%	4%	6%	14%	9%	10	40%	19%	10%	9%	5%	6%
11	5%	6%	8%	12%	17%	11	42%	45%	25%	10%	7%	6%
12	5%	5%	12%	37%	31%	12	28%	17%	13%	8%	6%	3%
13	5%	5%	7%	4%	6%	13	14%	10%	8%	6%	6%	3%
14	5%	6%	7%	4%	6%	14	11%	8%	9%	6%	8%	6%
15	7%	5%	7%	6%	9%	15	44%	12%	9%	6%	6%	4%
16	4%	7%	13%	19%	32%	16	19%	17%	11%	6%	7%	6%
17	4%	6%	7%	10%	19%	17	2%	3%	3%	2%	3%	1%
18	1%	0%	1%	0%	1%	18	12%	10%	6%	5%	6%	5%
19	5%	5%	8%	5%	7%	19	19%	15%	8%	14%	3%	6%
20	7%	6%	10%	6%	9%	20	4%	10%	7%	4%	5%	4%
21	6%	9%	4%	18%	43%	21	103%	15%	9%	7%	8%	8%
22	5%	0%	12%	3%	6%	22	5%	9%	8%	6%	5%	1%
23	5%	5%	6%	9%	1340%	23	35%	24%	12%	13%	5%	2%
24	5%	5%	9%	5%	5%	24	12%	16%	28%	18%	12%	5%
26	0%	0%	0%	0%	0%	26	90%	18%	9%	7%	7%	3%
27	7%	6%	8%	10%	21%	27	16%	12%	8%	7%	8%	7%
28	8%	6%	9%	9%	12%	28	17%	16%	8%	4%	9%	5%
29	9%	9%	6%	6%	23%	29	18%	17%	13%	8%	7%	4%
30	6%	4%	6%	4%	5%	30	65%	18%	7%	7%	5%	7%
31	5%	6%	7%	31%	56%	31	0%	0%	7%	12%	7%	7%
32	5%	42%	53%	26%	40%	32	24%	17%	21%	12%	6%	3%
33	5%	6%	10%	7%	20%	33	43%	13%	18%	13%	9%	4%
34	0%	6%	11%	20%	30%	34	19%	17%	15%	12%	5%	2%
35	6%	6%	9%	4%	8%	35	45%	16%	11%	13%	8%	2%
36	5%	6%	7%	8%	13%	36	19%	7%	8%	6%	8%	6%
37	6%	7%	7%	8%	10%	37	23%	12%	11%	6%	7%	3%
38	5%	6%	6%	5%	6%	38	48%	17%	28%	15%	36%	31%

#### 5.5.4 Porovnanie analógového manifoldu a poloautomatizovaného manifoldu

Z porovnania validačných parametrov v predchádzajúcej kapitole je možné zhodnotiť, že pričom analógový manifold vykazoval nižší vplyv matricových efektov a vyššiu presnosť a precíznosť výsledkov so zvyšujúcou sa koncentračnou hladinou, pri poloautomatizovanom manifolde bol trend opačný. Možným vysvetlením tohto javu a súbežne toho, že poloautomatizovaný manifold vykazoval na najvyššej koncentračnej hladine 75 ng/ml nižšiu výťažnosť než analógový manifold je nasledovné: poloautomatizovaný manifold aplikuje tlak na SLE doštičku rovnomernejšie a spoľahlivejšie než je tomu v prípade analógového manifoldu, kde je väčší priestor pre vznik ľudského pochybenia a nepresného nastavenia manifoldu. To však môže viesť ku komplikáciám pri vysokej koncentrácii analytov. Zvýšený prietok extrakčného činidla SLE systémom môže viesť ku skráteniu doby kontaktu analytu a doštičky v dôsledku čoho je extrakcia analytov nekompletná. Môže taktiež dôjsť k ovplyvneniu väzby analytov na zložky matrice – analyty zostávajú viazané na matricu namiesto toho, aby sa extrahovali do doštičky, čím sa znižuje výťažnosť. Tlak má taktiež vplyv na matricové efekty, kedy môže dôjsť ku spolu-extrakcii matrice s analytmi, čím sa znižuje selektivita.

Výsledky naznačujú, že aplikácia tlaku na SLE systém pomocou poloautomatizovaného manifoldu nebola vhodne optimalizovaná. Parametre, ktorých optimalizácia by mohla potenciálne viesť ku zvýšenej výťažnosti, väčšej presnosti a precíznosti hodnôt a menšiemu vplyvu matricových efektov sú tlak a počet extrakčných cyklov.

Oba manifoldy sú však využiteľné pre danú metódu. Výhodou poloautomatizovaného manifoldu oproti analógovému je eliminácia ľudskej chyby, možnosť analýzy vzoriek o nižšej koncentrácii a nižšia pracovná záťaž, nevýhodou je však vyššia cena.

## 6. Záver

V rámci diplomovej práce bola optimalizovaná a validovaná metóda prípravy vzorky plazmy za účelom následnej analýzy 38 steroidných hormónov pomocou UHPLC-MS/MS. Boli tak splnené všetky vytýčené ciele práce.

Boli porovnané dve metódy prípravy vzorky: PP a SLE. Ako prvá bola optimalizovaná metóda PP, kedy bol spomedzi štyroch porovnávaných precipitačných činidiel vybraný ACN. Analyzoval sa vplyv enzymatickej hydrolýzy a pridania fosfátového tlmivého roztoku v spojení s PP na extrahovateľnosť analytov, ako finálna metóda bola ale vybraná PP bez modifikácie.

Touto metódou však nebolo možné analyzovať celý set stanovovaných analytov, preto sa práca ďalej sústredila na optimalizáciu SLE metódy, ktorá bola po porovnaní s PP vybraná ako finálna metóda.

Ako extrakčné činidlo pre metódu SLE bola vybraná zmes MTBE/EtAc v pomere (80:20, v/v). Extrakcia týmto činidlom prebehla 2krát, vždy 1 ml činidla. Optimalizované množstvo vzorky nanášanej na SLE doštičku bolo 400  $\mu$ l a pozostávalo zo 40  $\mu$ l plazmy, 40  $\mu$ l H<sub>2</sub>O/IPA (50:50, v/v) a 320  $\mu$ l vody. SLE metódou bolo možné analyzovať celý set analytov okrem analytu DHEA-S (25).

Finálna SLE metóda bola na záver validovaná na dvoch manifoldoch podľa medzinárodnej validačnej smernice ICH10/EMA – poloautomatizovanom manifolde OttoSPEcialist a analógovom manifolde Positive Pressure-96 Processor. Manifoldy boli následne porovnané v hľadiska výťažnosti a matricových efektov.

## 7. Referencie

- [1] Wudy, S. A., Schuler, G., Sánchez-Guijo, A., & Hartmann, M. F. (2018). The art of measuring steroids: Principles and practice of current hormonal steroid analysis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *179*, 88–103. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.09.003>
- [2] Quanson, J. L., Stander, M. A., Pretorius, E., Jenkinson, C., Taylor, A. E., & Storbeck, K. H. (2016). High-throughput analysis of 19 endogenous androgenic steroids by ultra-performance convergence chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, *1031*, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.07.024>
- [3] Arthur, K. E., Wolff, J. C., & Carrier, D. J. (2004). Analysis of betamethasone, dexamethasone and related compounds by liquid chromatography/electrospray mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, *18*(6), 678–684. <https://doi.org/10.1002/rcm.1386>
- [4] Karatt, T. K., Sayed, R., Nalakath, J., Perwad, Z., Albert, P. H., & Abdul Khader, K. K. (2018). Separation and identification of the epimeric doping agents - Dexamethasone and betamethasone in equine urine and plasma: A reversed phase chiral chromatographic approach. *Steroids*, *140*, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2018.10.003>
- [5] Andrew R. (2001). Clinical measurement of steroid metabolism. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, *15*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1053/beem.2001.0116>
- [6] Greaves, R. F., Jevalikar, G., Hewitt, J. K., & Zacharin, M. R. (2014). A guide to understanding the steroid pathway: new insights and diagnostic implications. *Clinical biochemistry*, *47*(15), 5–15. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.07.017>
- [7] Quanson, J. L., Stander, M. A., Pretorius, E., Jenkinson, C., Taylor, A. E., & Storbeck, K. H. (2016). High-throughput analysis of 19 endogenous androgenic steroids by ultra-performance convergence chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, *1031*, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.07.024>
- [8] Kolatorova, L., Vitku, J., Suchopar, J., Hill, M., & Parizek, A. (2022). Progesterone: A Steroid with Wide Range of Effects in Physiology as Well as Human Medicine. *International journal of molecular sciences*, *23*(14), 7989. <https://doi.org/10.3390/ijms23147989>
- [9] Schumacher, M., Robel, P., & Baulieu, E. E. (2009). Neurosteroids. *Encyclopedia of Neuroscience*, 1015–1020. <https://doi.org/10.1016/b978-008045046-9.01190-6>
- [10] Schiffer, L., Barnard, L., Baranowski, E. S., Gilligan, L. C., Taylor, A. E., Arlt, W., Shackleton, C. H. L., & Storbeck, K. H. (2019). Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *194*, 105439. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105439>

- [11] Poulos, T. L. (1995). Cytochrome P450. *Current Opinion in Structural Biology*, 5(6), 767–774. [https://doi.org/10.1016/0959-440x\(95\)80009-3](https://doi.org/10.1016/0959-440x(95)80009-3)
- [12] Chatuphonprasert, W., Jarukamjorn, K., & Ellinger, I. (2018). Physiology and Pathophysiology of Steroid Biosynthesis, Transport and Metabolism in the Human Placenta. *Frontiers in pharmacology*, 9, 1027. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01027>
- [13] Kanu A. B. (2021). Recent developments in sample preparation techniques combined with high-performance liquid chromatography: A critical review. *Journal of chromatography. A*, 1654, 462444. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462444>
- [14] Hyötyläinen T. (2009). Critical evaluation of sample pretreatment techniques. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 394(3), 743–758. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2772-2>
- [15] French D. (2017). Advances in Clinical Mass Spectrometry. *Advances in clinical chemistry*, 79, 153–198. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2016.09.003>
- [16] Fraissinet, F., Pereira, T., Violin, A., Feugray, G., Bach-Ngohou, K., & Brunel, V. (2022). A novel fully-automated method to measure steroids in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry and advances in the clinical lab*, 27, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.jmsacl.2022.12.004>
- [17] Kong, R. (2005). LC/MS application in high-throughput adme screen. *Separation Science and Technology*, 413–446. [https://doi.org/10.1016/s0149-6395\(05\)80061-3](https://doi.org/10.1016/s0149-6395(05)80061-3)
- [18] Stone, J. (2017). Sample preparation techniques for mass spectrometry in the clinical laboratory. *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*, 37–62. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800871-3.00003-1>
- [19] Kyle, P. (2017). Toxicology: GCMS. *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory*, 131–163. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800871-3.00007-9>
- [20] Prasada Rao, T., & Biju, V. (2005). SPECTROPHOTOMETRY | Organic Compounds. *Encyclopedia of Analytical Science*, 358–366. <https://doi.org/10.1016/b0-12-369397-7/00721-4>
- [21] L. (2021, June 20). 2.3: LIQUID-LIQUID EXTRACTION. Retrieved April 20, 2024, from [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Book%3A\\_How\\_to\\_be\\_a\\_Successful\\_Organic\\_Chemist\\_\(Sandtorv\)/02%3A\\_COMMON\\_ORGANIC\\_CHEMISTRY\\_LABORATORY\\_TECHNIQUES/2.03%3A\\_LIQUID-LIQUID\\_EXTRACTION](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_How_to_be_a_Successful_Organic_Chemist_(Sandtorv)/02%3A_COMMON_ORGANIC_CHEMISTRY_LABORATORY_TECHNIQUES/2.03%3A_LIQUID-LIQUID_EXTRACTION)
- [22] Ötles, S., & Kartal, C. (2016). Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Applications in Food Samples. *Acta scientiarum polonorum. Technologia alimentaria*, 15(1), 5–15. <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2016.1.1>
- [23] Nováková, L., & Douša, M. (2021). In *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. (2nd ed.). Česká chromatografická škola.
- [24] Keçili, R., Büyüktiryaki, S., Dolak, B., & Hussain, C. M. (2020). The use of magnetic nanoparticles in sample preparation devices and tools. *Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry*, 75–95. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816699-4.00005-0>

- [25] Sargazi, M., Hossein Hashemi, S., & Kaykhahi, M. (2021). Modern Sample Preparation Techniques: A Brief Introduction. *Sample Preparation Techniques for Chemical Analysis*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.100715>
- [26] Bylda, C., Thiele, R., Kobold, U., & Volmer, D. A. (2014). Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *The Analyst*, 139(10), 2265. <https://doi.org/10.1039/c4an00094c>
- [27] Qi, F. F., Tao, L. M., Dai, Y. M., Zhang, B. M., Wang, X., & Yu, Y. (2021). Optimization and application of high-throughput supported liquid extraction for simultaneous determination of carotenoids and fat-soluble vitamins in serum. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1173, 122672. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122672>
- [28] Moon, J. Y., Lee, H. S., Kim, J. H., Lee, J. H., & Choi, M. H. (2018). Supported liquid extraction coupled to gas chromatography-selective mass spectrometric scan modes for serum steroid profiling. *Analytica chimica acta*, 1037, 281–292. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.059>
- [29] Priego-Capote, F. (2021). Solid–liquid extraction techniques. *Analytical Sample Preparation With Nano- and Other High-Performance Materials*, 111–130. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822139-6.00002-x>
- [30] Jiang, H., Cao, H., Zhang, Y., & Fast, D. M. (2012). Systematic evaluation of supported liquid extraction in reducing matrix effect and improving extraction efficiency in LC-MS/MS based bioanalysis for 10 model pharmaceutical compounds. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 891-892, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.02.031>
- [31] Aurorabiodev, A. (n.d.). Liquid-Liquid vs Supported-Liquid vs Solid-Phase Extraction. Retrieved April 20, 2024, from <https://www.aurorabiomed.com/comparing-liquid-liquid-extraction-supported-liquid-extraction-and-solid-phase-extraction/>
- [32] Deng, F., Guo, C., Zeng, W., Zhong, Y., Luo, X., Pan, X., Zhang, L., & Tan, L. (2023). Supported liquid extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of urinary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites and their application for human biomonitoring. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 224, 115201. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115201>
- [33] Waters Otto SPecialist Positive Pressure Manifold Improves Reproducibility and Reliability of Solid-Phase Extraction. (2021, January 28). Retrieved April 20, 2024, from <https://www.technologynetworks.com/analysis/product-news/waters-otto-specialist-positive-pressure-manifold-improves-reproducibility-and-reliability-of-solid-344992>
- [34] Nováková, L., Douša, M., & Česla, P. (2021). *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. (2nd ed.). Česká chromatografická škola.
- [35] HPLC Basics | Thermo Fisher Scientific - IE. (n.d.). Retrieved April 20, 2024, from



- <https://www.thermofisher.com/sk/en/home/industrial/chromatography/chromatography-learning-center/liquid-chromatography-information/hplc-basics.html>
- [36] Chen, L., Dean, B., & Liang, X. (2021). A technical overview of supercritical fluid chromatography-mass spectrometry (SFC-MS) and its recent applications in pharmaceutical research and development. *Drug Discovery Today: Technologies*, 40, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.10.002>
- [37] Plachká, K., Pilařová, V., Horáček, O., Gazárková, T., Vlčková, H. K., Kučera, R., & Nováková, L. (2023). Columns in analytical-scale supercritical fluid chromatography: From traditional to unconventional chemistries. *Journal of separation science*, 46(18), e2300431. <https://doi.org/10.1002/jssc.202300431>
- [38] Storbeck, K. H., Gilligan, L., Jenkinson, C., Baranowski, E. S., Quanson, J. L., Arlt, W., & Taylor, A. E. (2018). The utility of ultra-high performance supercritical fluid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPSFC-MS/MS) for clinically relevant steroid analysis. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1085, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.03.033>
- [39] Yuan, T. (2022). A review on analysis of steroid profile in different biological matrices. *Microchemical Journal*, 172, 106897. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106897>
- [40] Stauffer, E., Dolan, J. A., & Newman, R. (2008). Gas Chromatography and Gas Chromatography—Mass Spectrometry. *Fire Debris Analysis*, 235–293. <https://doi.org/10.1016/b978-012663971-1.50012-9>
- [41] Forgács, E., & Cserhádi, T. (2003). Gas chromatography. *Food Authenticity and Traceability*, 197–217. <https://doi.org/10.1533/9781855737181.1.197>
- [42] Pratima, N. A. (2018). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Its Applications: A Brief Review. *Archives of Organic and Inorganic Chemical Sciences*, 1(1). <https://doi.org/10.32474/aoics.2018.01.000103>
- [43] Gross, J. H. (2017). Basic Principle of Mass Spectrometry. In *Mass Spectrometry: A textbook* (3rd ed., p. 8). Springer. Retrieved from [http://books.google.ie/books?id=PdMnDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=978-3-319-54397-0&hl=&cd=1&source=gbs\\_api](http://books.google.ie/books?id=PdMnDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=978-3-319-54397-0&hl=&cd=1&source=gbs_api)
- [44] Pitt J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical biochemist. Reviews*, 30(1), 19–34
- [45] Amoresano, A., & Pucci, P. (2022). Mass spectrometry in metabolomics. *Metabolomics Perspectives*, 109–147. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85062-9.00004-0>
- [46] Mass Analyzer Technology Overview | Thermo Fisher Scientific - IE. (n.d.). Retrieved April 20, 2024, from <https://www.thermofisher.com/sk/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/mass-spectrometry-technology-overview/mass-analyzer-technology-overview.html#:~:text=The%20triple%20quadrupole%20%28QQQ%29%20mass%20spectrometer,Q2%20acts%20as%20a%20collision%20cell.&text=The%20triple>

%20quadrupole%20%28QQQ%29,as%20a%20collision%20cell.&text=quadrupole  
%20%28QQQ%29%20mass%20spectrometer,Q2%20acts%20as%20a

- [47] Anderson, J., Berthod, A., Pino, V., & Stalcup, A. M. (2016). Basic HPLC Theory and Definitions: Retention, Thermodynamics, Selectivity, Zone Spreading, Kinetics and Resolution. In *Analytical Separation Science, 5 Volume Set* (p. 1). John Wiley & Sons.
- [48] Hankele, A. K., Rehm, K., Berard, J., Schuler, G., Bigler, L., & Ulbrich, S. E. (2020). Progesterone profiling in plasma during the estrous cycle in cattle using an LC-MS based approach. *Theriogenology*, *142*, 376–383. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.10.005>
- [49] Travers, S., Martinerie, L., Bouvattier, C., Boileau, P., Lombès, M., & Pussard, E. (2017). Multiplexed steroid profiling of gluco- and mineralocorticoids pathways using a liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *165*(Pt B), 202–211. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.06.005>
- [50] Matysik, S., & Liebisch, G. (2017). Quantification of steroid hormones in human serum by liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, *1526*, 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.10.042>
- [51] Yuan, T. F., Le, J., Wang, S. T., & Li, Y. (2020). An LC/MS/MS method for analyzing the steroid metabolome with high accuracy and from small serum samples. *Journal of lipid research*, *61*(4), 580–586. <https://doi.org/10.1194/jlr.D119000591>
- [52] Wang, R., Hartmann, M. F., & Wudy, S. A. (2021). Targeted LC-MS/MS analysis of steroid glucuronides in human urine. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *205*, 105774. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105774>
- [53] Won, E. J., Yi, A., & Ko, Y. J. (2023). Analytical Performance Evaluation for Estradiol using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Biochemistry*, *113*, 59–63. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2023.01.003>
- [54] Luque-Córdoba, D., & Priego-Capote, F. (2021). Fully automated method for quantitative determination of steroids in serum: An approach to evaluate steroidogenesis. *Talanta*, *224*, 121923. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121923>
- [55] Lee, C., Kim, J. H., Moon, S. J., Shim, J., Kim, H. I., & Choi, M. H. (2020). Selective LC-MRM/SIM-MS based profiling of adrenal steroids reveals metabolic signatures of 17 $\alpha$ -hydroxylase deficiency. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *198*, 105615. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105615>
- [56] Olesti, E., Garcia, A., Rahban, R., Rossier, M. F., Boccard, J., Nef, S., González-Ruiz, V., & Rudaz, S. (2020). Steroid profile analysis by LC-HRMS in human seminal fluid. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, *1136*, 121929. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121929>
- [57] Häkkinen, M. R., Heinosalo, T., Saarinen, N., Linnanen, T., Voutilainen, R., Lakka, T., Jääskeläinen, J., Poutanen, M., & Auriola, S. (2018). Analysis by LC–MS/MS of endogenous steroids from human serum, plasma, endometrium and

- endometriotic tissue. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 152, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.01.034>
- [58] Gomez-Gomez, A., Miranda, J., Feixas, G., Arranz Betegon, A., Crispi, F., Gratacós, E., & Pozo, O. J. (2020). Determination of the steroid profile in alternative matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 197, 105520. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105520>
- [59] Rehm, K., Hankele, A. K., Ulbrich, S. E., & Bigler, L. (2024). Quantification of glucocorticoid and progestogen metabolites in bovine plasma, skimmed milk and saliva by UHPLC-HR-MS with polarity switching. *Analytica chimica acta*, 1287, 342118. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2023.342118>
- [60] Bredendiek, F., & Parr, M. K. (2023). SFC-MS/MS for orthogonal separation of hydroxylated 17 $\alpha$ -methyltestosterone isomers. *Drug testing and analysis*, 10.1002/dta.3620. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/dta.3620>
- [61] Supported Liquid Extraction (SLE) Guide and FAQ's. (2014). Retrieved April 21, 2024, from <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/TG-21068-SP-Supported-Liquid-Extraction-SLE-User-FAQ-TG21068-EN.pdf>
- [62] Waters Positive Pressure-96 Processor: operator's guide. (2014). Retrieved April 21, 2024, from <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715002662en.pdf>
- [63] HROMÁDKO, Jiří. Vývoj UHPLC-MS/MS metody a postupu přípravy vzorků pro stanovení steroidních látek v potkaní plasmě. Rigorózní práce, vedoucí Kočová Vlčková, Hana. Hradec Králové: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie, 2021.
- [64] European medicines agency. (2022). *ICH Guideline M10 on Bioanalytical Method Validation and Study Sample Analysis*. Retrieved July 7, 2024, from [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf)
- [65] Nováková, L., Plachká, K., Khalikova, M., & Švec, F. (2018). 2. Supercritical fluid chromatography in bioanalysis. In *De Gruyter eBooks* (pp. 33–76). <https://doi.org/10.1515/9783110618983-002>
- [66] Gazárková, T., Kočová Vlčková, H., Plachká, K., Vagnerová, K., Dubecová, D., Klusoňová, K., Pácha, J., Svec F. & Nováková, L. (2024). Comprehensive Targeted Profiling of Multiple Steroid Classes in Rodent Plasma Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta* (v recenznom riadení)