

# Abstrakt

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

**Katedra:** Katedra analytické chemie

**Kandidát:** Dominika Dubecová

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

**Konzultant:** Mgr. Taťána Gazárková

**Názov diplomovej práce:** Vývoj a validace SLE metódy 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 výťažnosti boli dosiahnuté pri použití acetonitrilu. Najvyššie hodnoty výťažnosti spomedzi spomínaných metód boli dosiahnuté pri samotnej PP a to >50% s RSD <15% u väčšiny analytov. Táto metóda však bola zaťažená významnými matricovými 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 µl plazmy nariadenej 40 µl 50% isopropanolu a 320 µl vody. Ako extrakčné činidlo bola vybraná kombinácia metyl-terc-butyléteru a etylacetátu v pomere 80:20. Takto optimalizovaná metóda umožnila dosiahnuť výťažnosť väčšiny stanovovaných analytov >60% s RSD <15%. SLE vykazovala oproti PP niekoľko výhod, medzi ktoré patrili vyššia výťažnosť 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