

## ERRATA

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

1. (Str. č. 42, sekcia 4.7.3 Příprava fosfátového tlmivého roztoku) Zásobný fosfátový tlmivý roztok (TR) bol pripravený navážením 3 480 mg  $K_2HPO_4$  a 2 720 mg  $KH_2PO_4$  a ich následným rozpusteným v odmernej banke o objeme 100 ml; pH roztoku sa pohybovalo v rozmedzí 6-6,5.
2. (Str. č. 45, sekcia 4.9 Podmienky použitej UHPLC-MS/MS metódy) *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]	SRM 2 qualifier	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
38	6,8	5	254,8 > 158,7	20	254,8 > 132,9	20

- (Str. č. 46, sekcia 4.10.2 Optimalizácia SLE metódy) Optimalizácia metódy prebehla pomocou poloautomatizovaného manifoldu OttoSPEcialist.
- (Str. č. 50, sekcia 4.11 Overenie validačných parametrov) Matricové efekty boli stanovené výpočtom z pomeru plôch píku analytu a vnútorného štandardu z merania vzoriek obohatených po extrakcii a štandardných roztokov – od hodnôt vzoriek obohatených po extrakcii boli odčítané hodnoty stanovené výpočtom z pomeru plôch píku analytu a vnútorného štandardu slepej vzorky plazmy (Rovnica č. 2).  
(Str. č. 50, sekcia 4.11 Overenie validačných parametrov) Presnosť bola stanovená výpočtom z pomeru plôch píku analytu a vnútorného štandardu z priemeru šiestich opakovaní extrakcie na danej koncentračnej hladine (Rovnica č. 3).  
(Str. č. 50, sekcia 4.11 Overenie validačných parametrov) Precíznosť bola stanovená ako relatívna smerodajná odchýlka z pomeru plôch píku analytu a vnútorného štandardu zo šiestich opakovaní extrakcie (Rovnice č. 4).  
(Str. č. 68, sekcia 5.5.2 Výťažnosť a matricové efekty) Matricové efekty boli hodnotené z plazmy obohatenej post-extrakčným prídavkom a korigované na vnútorný štandard výpočtom z pomeru plôch píku analytu a vnútorného štandardu.  
(Str. č. 72, sekcia 5.5.3 Presnosť a precíznosť) Parameter presnosti bol stanovený výpočtom z pomeru plôch píku analytu a vnútorného štandardu 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 z pomeru plôch píku analytu a vnútorného štandardu zo šiestich opakovaní extrakcie na rovnakých koncentračných hladinách.
- (Str. č. 51, sekcia 5.1 Analyzovanie vplyvu enzymatickej hydrolýzy na výťažnosť proteínovej precipitácie) Pri metóde EH-PP bolo však možné pozorovať nízku presnosť výsledkov, čo znamená že stanované hodnoty nevyhovovali limitu  $\pm 20\%$  pre najnižší koncentračný bod a  $\pm 15\%$  pre ostatné koncentračné body, čiže limitom

stanoveným vo validačnej smernici, ktorou sa táto práca riadila [64], čo bolo pravdepodobne spôsobené chybou pri príprave vzorky.

7. (Str. č. 66, sekcia 5.5.1 Kalibračné rozmedzie) Tabuľka č. 18: Porovnanie kalibračných rozmedzí a determináčnych koeficientov ( $R^2$ ) naprieč manifoldmi. Priemerná výťažnosť bola stanovaná ako hodnota aritmetického priemeru daného analytu na stanovovaných koncentračných hladinách. Č. – číslo analytu priradené podľa Tabuľky č. 1
  
8. (Str. č. 68, sekcia 5.5.2 Výťažnosť a matricové efekty) V prípade Tabuľky č. 20 nedošlo k chybe prehodenia výsledkov, chyba nastala v samotnom texte, ktorý tieto výsledky hodnotil (str. č. 68). Výrok: „Matricovými efektmi boli najviac zaťažené nízke koncentračné hladiny, porovnateľne v prípade oboch typov manifoldov.“ by mal byť teda správne formulovaný ako: „Matricovými efektmi boli najviac zaťažené nízke koncentračné hladiny v prípade analógového manifoldu a vyššie koncentračné hladiny v prípade poloautomatizovaného manifoldu.“

9. (Str. č. 16, sekcia 3.1.4 Steroidy analyzované v tejto práci) 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, MW – molekulová hmotnosť

Č.	Triviálny názor	Skratka	Systematický názov	Sumárny vzorec	MW	logP	pKa
1	pregnenolon	P5	5-pregnen-3β-ol-20-on	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	316,24	3,98	15,00
2	17-hydroxypregnenolon	17αOHP5	5-pregnen-3β,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	17α-hydroxyprogesterón	17αOHP4	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	17α,20β-dihydroxyprogesterón	17α,20βOHP4	4-pregnen-17,20β-diol-3-on	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	332,24	2,70	14,79
6	5α-dihydroprogesterón	5αDHP4	5α-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	5α-pregnan-3β-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	5α-pregnan-3α-ol-20-on	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	318,26	4,46	15,12
9	20α-hydroxyprogesterón	20αOHP4	4-pregnen-20α-ol-3-on	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	316,24	3,62	14,69
10	11β-hydroxyprogesterón	11βOHP4	4-pregnen-11β-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	5β-pregnan-3α,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	5α-pregnan-3α,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-11β, 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	5α-dihydrokortikosterón	5αDHC	5α-pregnan-11β, 21-diol-3,20-dion	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>	348,23	2,09	12,98
17	5β-dihydrokortikosterón	5βDHC	5β-pregnan-11β, 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-11β,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-11β,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-17β-ol-3-on	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	288,21	3,31	15,06
23	5α-dihydrotestosterón	5αDHT	5α-androstan-17β-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-3β-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-3β-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	7αOHDHEA	5-androsten-3β,7α-diol-17-on	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub>	304,42	2,69	14,06
27	7b-hydroxyDHEA	7βOHDHEA	5-androsten-3β,7β-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-3β,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	5α-androstan-3β-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