

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Optimalizace detekce steroidních látek a jejich konjugátů v moči  
s využitím hmotnostní spektrometrie**

Bakalářská práce

**Ludmila Kovandová**

Vedoucí práce: RNDr. Petr Šimek CSc.

České Budějovice 2015

KOVANDOVÁ, Ludmila. Optimalizace detekce steroidních látek a jejich konjugátů v moči s využitím hmotnostní spektrometrie. 48 str., Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice, Česká republika

**Anotace:**

Tato bakalářská práce se zabývá steroidními látkami a jejich detekcí za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Jsou zde popsány vlastnosti steroidních látek a jejich vliv v těle. Dále práce přibližuje různé druhy ionizace, analyzátorů a detektorů využívaných v hmotnostní spektrometrii. Experimentální část bakalářské práce pojednává o optimalizaci elektrospreje při měření steroidních látek.

KOVANDOVÁ, Ludmila. Optimalizace detekce steroidních látek a jejich konjugátů v moči s využitím hmotnostní spektrometrie [Optimization the detection of steroid compounds and their conjugates in urine using mass spectrometry. Bc. Thesis, In Czech] – 48 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, CzechRepublic.

**Annotation:**

This thesis deals with steroid substances and their detection using high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. It describes properties of steroids and their influence in the body. Different types of ionization, analysers and detectors used in mass spectrometry are described. The experimental part of this thesis deals with the optimization elektrospray in the measurement of steroids.

## **Poděkování**

Velmi ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Petrovi Šimkovi CSc, za příležitost k vypracování mé bakalářské práce v Laboratoři analytické biochemie a metabolomiky. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Heleně Zahradníčkové Ph.D. za trpělivost a cenné rady při psaní teoretické části. V neposlední řadě velmi děkuji Ing. Petře Berkové Ph.D. za ochotu a odbornou pomoc v laboratoři. Nakonec bych ráda poděkovala své rodině za jejich podporu během studia.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce.

Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 24. 4. 2015

.....

Ludmila Kovandová

# Obsah

|   |        |
|---|--------|
| Úvod .....  | - 1 -  |
| I. TEORETICKÁ ČÁST .....  | - 2 -  |
| 1. Steroidy .....   | - 2 -  |
| 1.1. Steroly .....  | - 3 -  |
| 1.1.1. Cholesterol .....  | - 3 -  |
| 1.1.2. Provitamin D (Ergosterol) .....  | - 4 -  |
| 1.2. Žlučové kyseliny .....   | - 4 -  |
| 1.3. Steroidní hormony .....  | - 4 -  |
| 1.3.1. Kortikosteroidy .....  | - 4 -  |
| 1.3.1.1. Glukokortikoidy .....  | - 4 -  |
| 1.3.1.2. Mineralokortikoidy .....   | - 5 -  |
| 1.3.2. Kalcitriol .....   | - 5 -  |
| 1.3.3. Pohlavní hormony .....   | - 6 -  |
| 1.3.3.1. Androgeny .....  | - 6 -  |
| 1.3.3.2. Ženské pohlavní hormony .....  | - 6 -  |
| 1.3.3.2.1. Estrogeny .....  | - 6 -  |
| 1.3.3.2.2. Gestageny .....  | - 7 -  |
| 2. Moč .....  | - 8 -  |
| 3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) ..... | - 11 - |
| 4. Hmotnostní spektrometrie .....   | - 13 - |
| 4.1. Ionizační techniky .....   | - 13 - |
| 4.1.1. Ionizační techniky za sníženého tlaku .....  | - 14 - |
| 4.1.1.1. Elektronová ionizace (Electron Ionization - EI) .....                                  | - 14 - |
| 4.1.1.2. Chemická ionizace (Chemical Ionization - CI) .....                                     | - 15 - |

|  |        |
|--|--------|
| 4.1.2. Techniky ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Ionization - API) .....                             | - 16 - |
| 4.1.2.1. Ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization – ESI).....  | - 16 - |
| 4.1.2.2. Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization - APCI).....                  | - 17 - |
| 4.1.2.3. Fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Photoionization - APPI).....                           | - 17 - |
| 4.1.3. Duální iontové zdroje .....   | - 18 - |
| 4.1.3.1. Ionizace laserem za účasti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - MALDI) .....                    | - 18 - |
| 4.1.3.2. Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (Second Ion Mass Spectrometry - SIMS) .....                           | - 18 - |
| 4.1.4. Starší ionizační techniky .....   | - 18 - |
| 4.1.4.1. Termosprej (Thermospray Ionization - TSI).....  | - 18 - |
| 4.1.4.2. Ionizace urychlenými atomy (Fast Atom Bombardment - FAB) /ionty (Fast Ion Bombardment - FIB).....                 | - 19 - |
| 4.1.4.3. Ionizace polem (Field Ionization - FI) .....  | - 19 - |
| 4.1.4.4. Desorpce polem (Field Desorption-FD).....   | - 19 - |
| 4.2. Hmotnostní analyzátor .....   | - 19 - |
| 4.2.1. Magnetický sektorový analyzátor .....   | - 20 - |
| 4.2.2. Kvadrupólový analyzátor (Quadrupole - Q) .....  | - 20 - |
| 4.2.2.1. Trojitý kvadrupólový analyzátor (Triple Quadrupole - QqQ).....  | - 20 - |
| 4.2.3. 3D iontová past (Ion trap - IT) .....   | - 21 - |
| 4.2.4. Lineární iontová past (Linear ion trap - LIT).....  | - 21 - |
| 4.2.5. Analyzátor doby letu (Time-of-Flight - TOF).....  | - 21 - |
| 4.2.6. Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance - FT-ICR)..... | - 22 - |
| 4.2.7. Orbitrap .....  | - 22 - |
| 4.2.8. Hybridní hmotnostní spektrometry .....  | - 22 - |

|  |      |
|--|------|
| 4.2.9. Analyzátor iontové mobility (Ion Mobility Spectrometry - IMS).....        | 22 - |
| 4.2.10. Tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem mass spectrometry - MS/MS ) - | 23 - |
| 4.3. Detektor.....   | 23 - |
| 4.4. Stanovení steroidů a jejich konjugátů pomocí MS .....                       | 23 - |
| 5. Cíl práce .....   | 24 - |
| II. PRAKTICKÁ ČÁST .....   | 25 - |
| 6. Experimentální část.....  | 25 - |
| 6.1. Přístrojové vybavení .....  | 25 - |
| 6.2. Chemikálie .....  | 25 - |
| 6.3. Příprava vzorku.....  | 26 - |
| 6.4. Optimalizace elektrospreje.....   | 26 - |
| 7. Výsledky a diskuse .....  | 28 - |
| 8. Závěr .....   | 35 - |
| 10. Literatura.....  | 36 - |
| 11. Přílohy.....   | 38 - |

# Úvod

Steroidy jsou organické sloučeniny, které hrají v lidském těle mnoho různých rolí. Mezi nejznámější zástupce patří například cholesterol, provitamin D a estrogen. Hladiny těchto látek mohou pozitivně nebo negativně ovlivňovat zdravotní stav člověka. Díky nízkým hladinám a různorodosti navázaných funkčních skupin jsou steroidy poměrně špatně měřitelné.

Spojením vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem získáme dostatečně citlivou metodu k měření těchto látek. Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii se steroidní látky rozdělují podle jejich afinity ke stacionární fázi. Zásadní vliv na rozdělení látek má výběr kolony. Kolony se mohou lišit délkou, šířkou, druhem navázaných funkčních skupin na sorbentu a velikostí částic.

Po separaci na koloně dochází k eluci jednotlivých steroidů do hmotnostního spektrometru. Podle typu studovaného vzorku a sledovaných analytů vybíráme druh ionizace a analyzátoru. Důležitým faktorem je znalost základních fyzikálně chemických vlastností měřené látky. V mé práci jsem detekovala konkrétně estradiol-17-sulfát, androsteronsulfát a pregnenolon-sulfát. Pro tyto látky jsem zvolila měkkou ionizační techniku elektrosprej, jako hmotnostní analyzátor byl použit trojitý kvadrupól.

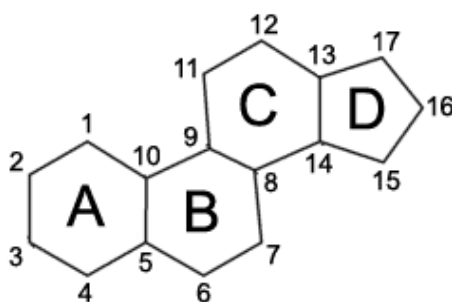
Cílem práce byla optimalizace podmínek elektrospreje, pro dosažení nejvyšší selektivity a odezvy hmotnostního detektoru pro mnou sledované látky.



# I. TEORETICKÁ ČÁST

## 1. Steroidy

Steroidy jsou organické sloučeniny, jejichž struktura se skládá ze tří šestiuhlíkatých kruhů a jednoho pětiuhlíkatého kruhu. Tato struktura se označuje jako cyklopentanoperhydrofenanthren (steran). Dohromady obsahuje 17 uhlíků (značení jednotlivých uhlíků můžeme vidět na Obr. 1) a jednotlivé kruhy se značí písmeny A, B, C a D.



Obr. 1 Značení jednotlivých uhlíků a kruhů steranu<sup>1</sup>.

Z chemického hlediska jsou steroidy společně s terpeny řazeny do skupiny isoprenoidů. Steroidy se mohou lišit různými funkčními skupinami a umístěním dvojných vazeb. Díky charakteristickým funkčním skupinám se dělí do několika skupin.

Dělení:

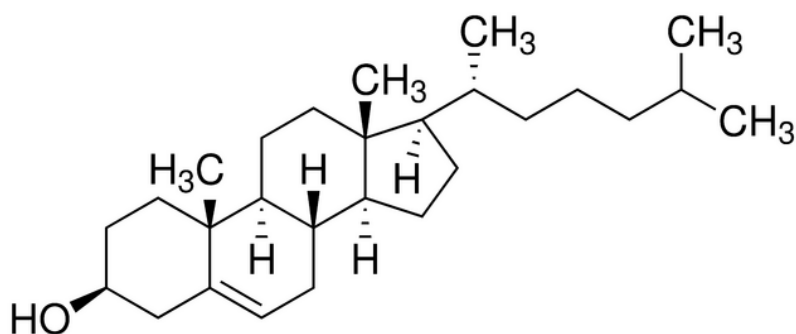
1. Steroly (steroidní alkoholy): Zoosteroly  
Fytosteroly  
Mykosteroly
2. Žlučové kyseliny
3. Steroidní hormony – hormony kůry nadledvin, pohlavní hormony
4. Steroidní glykosidy

## 1.1. Steroly

Steroly jsou steroidy, které mají v poloze 3 hydroxylovou skupinu a v poloze 17 alifatický postranní řetězec. Tyto látky se běžně nacházejí v rostlinných (mykosteroly, fytosteroly) i živočišných (zoosteroly) buňkách. Steroly se mohou vyskytovat volně nebo ve formě esterů mastných kyselin navázaných na sacharidy glykosidovou vazbou. Mezi nejdůležitější steroly patří například cholesterol, ergosterol (provitamin D), stigmasterol aj<sup>2</sup>.

### 1.1.1. Cholesterol

Cholesterol je nejrozšířenější sterol v živých organismech. Je to steroidní alkohol, který je v lidském těle syntetizován zejména v játrech. Vyskytuje se v buněčných membránách a krevních lipoproteinech (cca 2 mg·ml<sup>-1</sup> krve) a to z části volný a z části esterifikovaný vyššími mastnými kyselinami. Jeho přítomnost v buněčných membránách zapříčiňuje to, že jsou biomembrány pružnější. Cholesterol je předstupeň při biosyntéze steroidních hormonů. Při jeho rozpadu v játrech z něj vznikají žlučové kyseliny. Přestože v našem těle hraje cholesterol důležitou roli, jeho příliš velké množství může naopak zvyšovat riziko aterosklerózy (tj. kornatění tepen). Tento sterol se vyskytuje ve dvou formách. V prvním případě se jedná o lipoprotein s nízkou hustotou, který obsahuje méně bílkovin než tuku (tj. LDL forma). V druhém případě se jedná o lipoprotein s vysokou hustotou, který obsahuje více bílkovin než tuku (tj. HDL forma). Forma LDL-cholesterolu má na naše zdraví negativní vliv, zatímco forma HDL-cholesterolu má opačný efekt. HDL-cholesterol snižuje nadbytek LDL-cholesterolu v krvi, díky kterému dochází k usazování tukových plátů v tepnách. Největší množství cholesterolu se vyskytuje v tučném vepřovém a hovězím mase<sup>2</sup>.



Obr. 2 Strukturální vzorec cholesterolu<sup>3</sup>.

### 1.1.2. Provitamin D (Ergosterol)

Provitamin D je nejdůležitější rostlinný sterol. Vyskytuje se v houbách a droždí. Má velký vliv na fluiditu membrán. Při působení ultrafialového záření se přeměňuje na aktivní formu vitamínu D<sup>2</sup>.

## 1.2. Žlučové kyseliny

Žlučové kyseliny jsou steroidní sloučeniny, které vznikají zkrácením postranního řetězce a oxidací cholesterolu. Primární žlučové kyseliny – kyselina cholová a chenodoexycholová se syntetizují v játrech následně se shromažďují a zahušťují ve žluči. Poté jsou vylučovány do tenkého střeva. Jejich hlavní role spočívá v emulgaci tuků ve střevech, metabolismu cholesterolu a jeho následném odstranění z těla. Denně se v těle tvoří cca 20-30 g žlučových kyselin. Množství, které se vytvoří, vždy odpovídá ztrátám ve stolici<sup>4</sup>.

## 1.3. Steroidní hormony

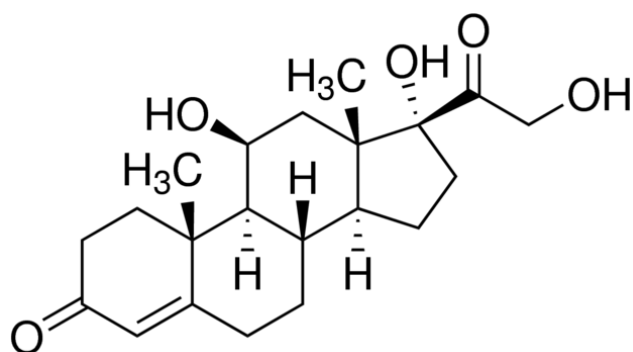
Mezi steroidní hormony patří hormony, které vznikají z cholesterolu tzv. steroidogenezí. Tyto hormony se dělí na hormony produkované kůrou nadledvin (kortikosteroidy) a na pohlavní hormony. Díky svému lipofilnímu charakteru snadno pronikají do buněk a prochází biomembránami<sup>4</sup>.

### 1.3.1. Kortikosteroidy

Kortikosteroidy jsou steroidní hormony, které vznikají v kůře nadledvin. Mají vysoký protizánětlivý účinek. Dělí se na glukokortikoidy a mineralokortikoidy. Jejich množství je regulováno adrenokortikotropním hormonem (ACTH). Tento hormon se vytváří v adenohipofýze<sup>4</sup>.

#### 1.3.1.1. Glukokortikoidy

Glukokortikoidy mají vliv na metabolismus cukrů, tuků a bílkovin. Jejich tvorba je řízena předním lalokem hypofýzy. Nejdůležitější glukokortikoid je kortizol.



Obr. 3 Strukturní vzorec kortizolu<sup>5</sup>.

Jeho syntéza je regulována ACTH. Množství kortizolu podléhá zpětnovazebnému mechanismu. Tedy čím více se nachází v krvi, tím méně je stimulována syntéza ACTH. Má důležitou funkci při stresových, fyzicky náročných situacích a infekčních chorobách. Podílí se na udržení optimálního množství vody a elektrolytu. Díky tomu udržuje krevní tlak a chrání lidský organismus před náhlými změnami fyziologické rovnováhy. Má katabolický ale i anabolický účinek (v játrech). Dále ovlivňuje metabolismus bílkovin a tuků. Jeho hladina se v průběhu dne mění. Celkově tělo vyprodukuje 10- 20 mg kortizolu za den<sup>6</sup>.

### 1.3.1.2. Mineralokortikoidy

Mineralokortikoidy jsou hormony ovlivňující metabolismus minerálů v organismu, především hladiny sodíku a draslíku. Za hlavní mineralokortikoid můžeme považovat aldosteron. Tento hormon se nijak výrazně neváže, proto je jeho výskyt v plasmě krátkodobý. Má schopnost retence  $\text{Na}^+$  v ledvinách. Díky tomu dochází k pasivnímu vstřebávání vody a poté ke zvýšení krevního tlaku<sup>6</sup>.

### 1.3.2. Kalcitriol

Kalcitriol je název pro nejaktivnější formu vitamínu D (1,25-dihydroxycholecalciferol). Tento hormon se běžně vytváří v ledvinách a jeho funkce spočívá v regulaci vápníku a fosforečnanů. Kalcitriol zapříčiňuje větší vstřebávání vápníku ve střevě, resorpci z kostí a vyšší koncentraci v krevním oběhu. V lékařství hraje důležitou roli při léčbě osteoporózy<sup>6</sup>.

### 1.3.3. Pohlavní hormony

Pohlavní hormony jsou hormony zodpovídající za správný vývoj a funkci pohlavních orgánů, sekundárních pohlavních znaků a sexuální chování. Receptory pro pohlavní hormony se vyskytují nejčastěji v cytoplazmě. Díky tomu se navazují na jadernou DNA a tím ovlivňují transkripci daných genů. Dělí se na androgeny, estrogeny a gestageny.

#### 1.3.3.1. Androgeny

Androgeny jsou mužské pohlavní hormony produkované varlaty. Nejvýznamnější androgen je testosteron, jehož prekurzorem je cholesterol. Testosteron se vytváří v Leydigových buňkách, jeho množství je regulováno luteinizačním hormonem. Vliv testosteronu se projevuje při spermatogenezi a při vývoji sekundárních znaků. Z obecného pohledu tento hormon zapříčiňuje specifické chování muže v podobě agresivity, dominance či zvýšeného libida. Jeho hladina se v průběhu života mění. U mužů se hladina testosteronu pohybuje v rozmezí 6 až 10 mg za den. V lékařství se testosteron využívá při léčbě jeho nedostatku. Podává se v injekční nebo perorální formě. Ovšem u každého léku může docházet i k jeho zneužití, v tomto případě ve sportu. Při zvýšených dávkách testosteronu dochází k rychlému nárůstu svalové hmoty a tím i k získání síly. Proto je testosteron považován za nedovolený doping. Také je velmi důležité zmínit fakt, že testosteron není pouze mužský hormon, ale vytváří se i u žen v mnohem menší koncentraci (tj. 0,5 mg za den)<sup>4, 6</sup>.

#### 1.3.3.2. Ženské pohlavní hormony

Do této skupiny patří estrogeny a gestageny. Střídáním těchto hormonů dochází k periodickému cyklu u žen.

##### 1.3.3.2.1. Estrogeny

Nejdůležitější zástupci estrogenů jsou estriol a estradiol. Tyto hormony se u žen vytvářejí ve vaječnicích a v kůře nadledvin. Estrogeny ovlivňují růst a vývoj dělohy i pochvy, ale také ovlivňují vývoj ženských sekundárních pohlavních znaků (tj. vývoj prsů, specifické rozložení tukové tkáně). Hladina estrogenů je přímo ovlivňována menstruačním cyklem, nejvyšší je těsně před ovulací a další zvýšená hladina se objevuje uprostřed luteální fáze díky žlutému tělísku. V následující tabulce jsou uvedeny měnící se hladiny estrogenů.

Tab. 1 Mění se hodnoty estrogenů v těle ženy<sup>7</sup>.

| <b>Fáze</b>  | <b>Koncentrace v nmol·l<sup>-1</sup></b> |
|--------------|--|
| Folikulární  | 0,11-0,33                                |
| Ovulační pík | 0,48-1,17                                |
| Luteální     | 0,26-0,73                                |
| Menopauza    | 0,04-0,15                                |

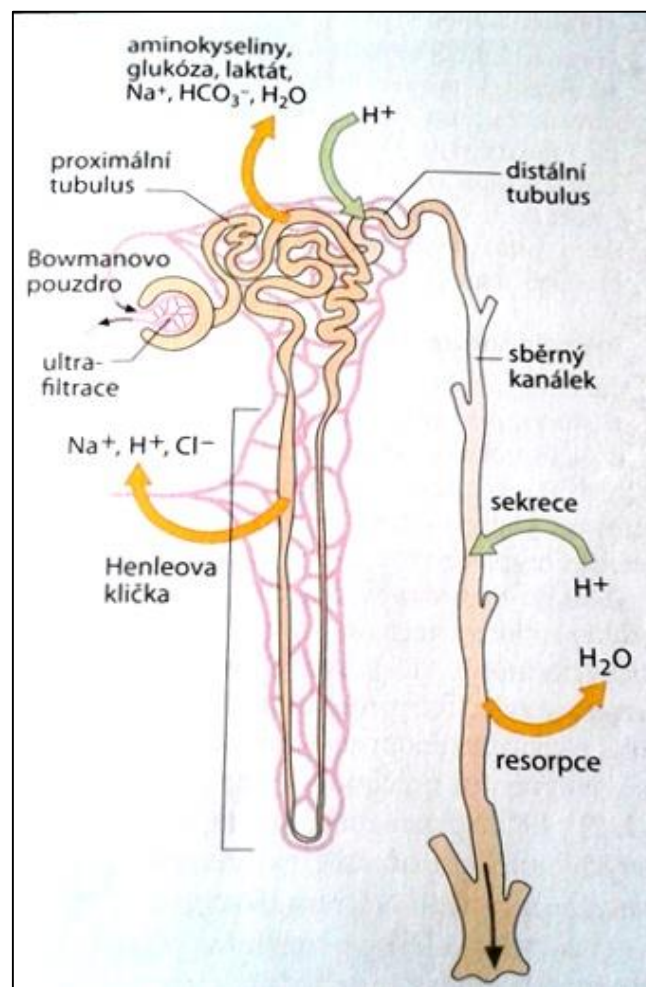
Mezi hlavní funkce estrogenů patří stimulace děložní sliznice, zadržování vody, úbytek svalové hmoty, snižování cholesterolu (to zapříčiňuje menší výskyt aterosklerózy u žen) a obnova kostí. V lékařství jsou estrogény nejvíce využívány u hormonálních antikoncepcí a u léků podávaných při menopauze. I muži mají v těle určité množství estrogenů, podobně jako ženy testosteronu<sup>4</sup>.

#### 1.3.3.2.2. Gestageny

Gestageny jsou ženské pohlavní hormony, které hrají velmi důležitou roli v těhotenství. Nejvýznamnější je progesteron. Tvoří se ve žlutém tělísku a v placentě. Ovlivňuje vznik a udržení těhotenství, zabráňuje opakovanému oplodnění během těhotenství. Také působí na vývin mléčných žláz, zúžení děložního hrdla a vyšší viskozitu cervikálního hlenu. Během normálního cyklu, kdy se žena nesnaží otěhotnět, tedy neoplodní-li se vajíčko, nedochází k dalšímu vytváření progesteronu, a následuje menstruace. Množství progesteronu se během těhotenství 30-40 x zvětší<sup>4</sup>.

## 2. Moč

Hlavní funkcí ledvin je udržování stálého vnitřního prostředí (homeostáze). V ledvinách dochází k vylučování vody, látek pro tělo škodlivých a látek, které jsou v těle v nadbytku. Základní jednotkou ledvin je nefron. Ten se skládá z glomerulu, Bowmanova pouzdra, proximálního tubulu, Henleovy kličky, distálního tubulu a sběrného kanálku. Tepnou je do ledvin přiváděna krev, která se filtruje v glomerulech. Odpadní látky přecházejí z krevní plazmy do primární moče. V nefronech dochází k postupné zpětné resorpci vody a látek pro tělo důležitých. Díky tomu se moč postupně zahušťuje a mění se na moč definitivní<sup>8,9,10</sup>.



Obr. 4 Stavba nefronu<sup>10</sup>.

Definitivní moč je průhledná lehce nažloutlá kapalina. Množství závisí na příjmu tekutin, stravě, věku ale i pohlaví. Denně se v těle vytvoří 500 – 2000 ml moči, pH se pohybuje od

4,8 do 7,5 (průměrně 5,8), hustota moči je 1,015-1,022 kg·l<sup>-1</sup>, osmolalita je v rozmezí mezi 50-1300 mmol·kg<sup>-1</sup>. V následující tabulce můžeme vidět různé látky a jejich koncentrace v moči.

Tab. 2 Přibližné složení definitivní moči za normálních podmínek<sup>8</sup>.

| <b>Organické látky</b> | <b>Mmol·24 hod<sup>-1</sup></b> | <b>Anorganické látky</b> | <b>Mmol·24 hod<sup>-1</sup></b> |
|------------------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| močovina               | 325-390                         | chloridy                 | 235                             |
| kreatinin              | 10,3                            | sodík                    | 217,4                           |
| amoniak                | 34                              | draslík                  | 53,3                            |
| kyselina močová        | 3,8                             | fosfor                   | 40,3                            |
| kreatin                | 64                              | síra                     | 20,8                            |
| kyselina hippurová     | 2,8                             | vápník                   | 8,3                             |
| puriny                 | 6,3                             | hořčík                   | 5,1                             |
| kyselina šťavelová     | 0,16                            |                          |                                 |

### Chemické vyšetření moči

Mezi nejčastější vyšetření moči patří měření pH, přítomnost: bílkovin, krve, cukru a bilirubinu. Velmi často se tyto testy provádí za pomoci vyšetřovacích proužků.

Proteinurie je onemocnění, při němž je v moči obsaženo více než 150 mg bílkovin za den. Proteinurie se objevuje při onemocnění nebo poškození ledvin.

Glykosurie je onemocnění související s vysokým obsahem cukru v moči. Toto onemocnění se projevuje nejčastěji u lidí s cukrovkou (diabetes mellitus).

Ketonurie, neboli zvýšené vylučování ketolátek močí, je nemoc často postihující diabetiky nebo lidi, kteří dlouho hladoví.

Hematurie se projevuje přítomností erytrocytů v moči. Při krvácení z ledvin nebo močových cest mají erytrocyty klasický tvar. Ale při poruše glomerulů dochází ke změně vzhledu erytrocytů (morušovitý tvar).

Hemoglobinurie značí přítomnost hemoglobinu v moči. Vznik tohoto onemocnění souvisí např. s nevhodnou transfúzí.



Bilirubinurie je onemocnění, které vzniká při poškození jaterních buněk nebo ucpání žlučvodů. V moči se za normálních okolností vyskytuje pouze konjugovaný bilirubin. Výskyt konjugovaného i nekonjugovaného bilirubinu signalizuje bilirubinurii.

V moči zdravého člověka se urobilinogeny obvykle nevyskytují. Jejich přítomnost v moči značí špatnou funkci jaterních buněk, které nejsou schopny urobilinogeny vylučovat<sup>8,9,10</sup>.

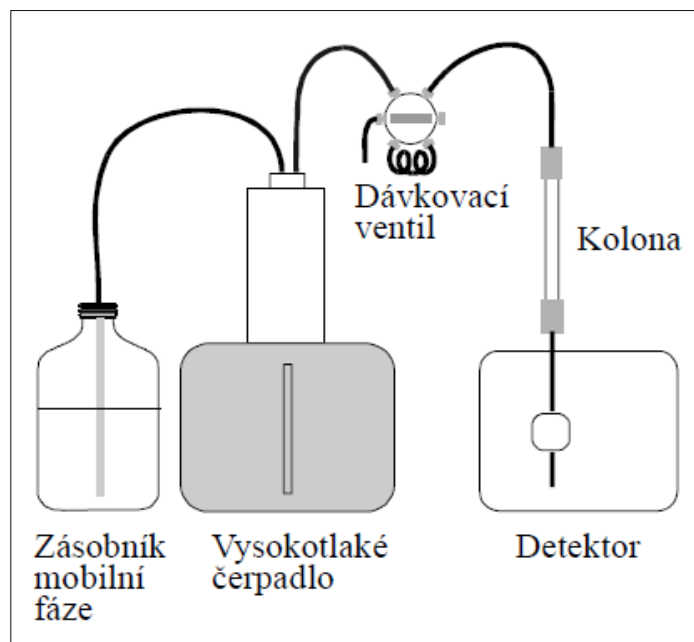
### **3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography - HPLC)**

HPLC je separační metoda, při které se rozdělují látky vzorku mezi mobilní a stacionární fázi. Mobilní fáze (kapalina) prochází přes stacionární fázi (sorbent). Principem separace zkoumaného vzorku je rozdílná afinita látek ke stacionární fázi. Díky HPLC můžeme měřit i sloučeniny, které by byly jinak obtížně nebo vůbec neměřitelné.

Přístroj, na němž dochází k separaci směsi, se nazývá kapalinový chromatograf. Kapalinový chromatograf se skládá z několika částí: zásobník mobilní fáze s vysokotlakým čerpadlem, dávkovač vzorku, kolona, detektor a počítač k vyhodnocení naměřených dat.

Zásobník mobilní fáze musí být uzavřený, aby nedocházelo k úniku par a ke znečištění z okolí. V prvním kroku dochází k transportu mobilní fáze ze zásobníku do dávkovače. Vzorek je při tom filtrován od některých tuhých částic, které se mohou ve vzorku vyskytovat. Také dochází k odplynění, které by mohlo způsobit vznik bublinek a tím nepřesnost v měření. U vysokotlakých čerpadel je důležitá flexibilita objemu průtoku mobilní fáze, velké rozmezí tlaku a neměnný průtok. Poté je vzorek dávkován na kolonu. Nejběžněji se používají manuální smyčkové nebo automatické dávkovače. Automatické dávkovače hrají důležitou roli při zpracovávání velkého množství vzorků. Na koloně se studovaná látka zachytává na stacionární fázi a tím je různě zpoždována a zbytek vzorku odchází do detektoru. Existuje mnoho druhů kolon, které se od sebe mohou lišit např. druhem sorbentu nebo velikostí částic. Kolony jsou vyrobeny převážně z nerezové oceli. Průměrná šířka se pohybuje mezi 1 – 5 mm a délka mezi 30 – 300 mm. Kolony se skládají ze dvou částí: tělo kolony a koncovka kolony. Tělo je rovná trubička, zatím co koncovka těsní, udržují výplň sorbentu a zajišťují rovnoměrné naplnění mobilní fázi. Výplň tvoří různé sorbenty, např. upravený oxid křemičitý. Jeho úprava spočívá v navázání různých funkčních skupin a tím určení polaritu sorbentu. Na HPLC koloně dojde k separaci látek, k jejich detekci můžeme využít několik typů detektorů, např. fluorescenční detektor, elektrochemický detektor, refraktometrický detektor nebo hmotnostní spektrometr. Hmotnostní spektrometr nejprve převede neutrální molekuly na ionty, poté jsou ionty rozděleny podle poměru  $m/z$  (hmotnost/náboj) a detekovány v detektoru. Chromatogram nám pak ukazuje závislost signálu na elučním čase. Hmotnostní detektor umožňuje získat strukturní informace o jednotlivých sloučeninách. Velmi často je možné identifikovat jednotlivé složky neznámé

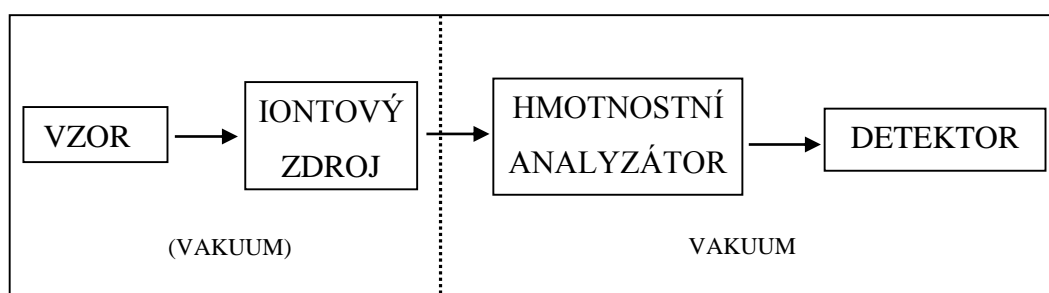
směsi nebo alespoň částečně odvodit jejich struktury. Výsledky jsou ovlivňovány jak stálostí průtoku kapaliny, tak i velikostí objemů mimo kolonu<sup>11,12,13</sup>.



Obr. 5 Schéma HPLC<sup>12</sup>.

## 4. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je analytická metoda, která se provádí na přístroji zvaném hmotnostní spektrometr. Tento přístroj se skládá ze tří hlavních částí. První částí je iontový zdroj, který převádí neutrální molekuly studovaného analytu na nabitě částice (ionty) procesem zvaným ionizace. Druhou část tvoří hmotnostní analyzátor, jehož účelem je rozčlenění iontů podle poměru  $m/z$ . Tento proces, někdy i ionizace probíhá ve vakuu. Poslední část se nazývá detektor. Detektor slouží k měření relativní četnosti rozdělených iontů<sup>14,15</sup>.



Obr. 6 Stručné schéma hmotnostního spektrometru<sup>16</sup>.

### 4.1. Ionizační techniky

Existuje několik druhů ionizace, díky různorodosti chemických látek je důležité vybrat správný druh pro danou látku.

Základní dělení je na tvrdé a měkké ionizační techniky. Kritériem dělení je množství energie dodané molekule při ionizaci.

- **Tvrdé ionizační techniky** (například elektronová ionizace - EI) jsou techniky, při nichž molekuly získávají přemíru vnitřní energie, což vede k fragmentaci molekulových iontů na menší části.
- **Měkké ionizační techniky** (například chemická ionizace – CI, elektrosprej) poskytují molekulám mnohem menší množství energie než EI. Díky tomu se ve spektrech nachází protonované a deprotonované molekuly a velmi malé množství fragmentů.

Proces ionizace analytu lze provádět jak za **atmosférického**, tak i za **sníženého tlaku**. Mezi nejčastější metody probíhající za atmosférického tlaku patří ESI (ionizace elektrosprejem), APCI (chemická ionizace za atmosférického tlaku) a APPI (fotoionizace za atmosférického

tlaku). Při sníženém tlaku probíhá například EI, CI (chemická ionizace) a MALDI (ionizace laserem za účasti matrice).

Za nejčastěji používané ionizační techniky lze považovat ESI, APCI a APPI při využití s HPLC/MS (vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií), jedna z nejčastějších ionizačních technik je MALDI.

Vlastnosti ovlivňující ionizaci jsou např.:

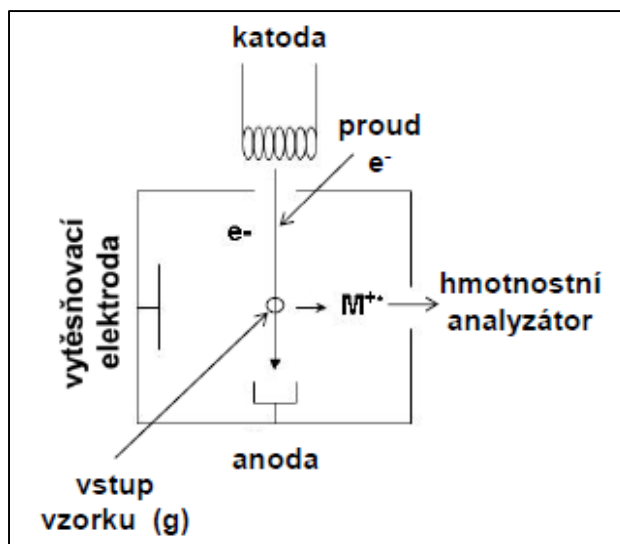
- Těkavost
- Molekulová hmotnost
- Tepelná stabilita
- Nekovalentní interakce
- Chemické individuum<sup>17</sup>

#### 4.1.1. Ionizační techniky za sníženého tlaku

##### 4.1.1.1. Elektronová ionizace (Electron Ionization - EI)

Elektronová ionizace je nejstarší technika, při které dochází k rozpadu molekul na fragmenty. Tento rozpad je způsoben získáním velkého množství vnitřní energie. Elektronová ionizace probíhá při teplotě 150 – 400°C a tlaku  $10^{-3}$ - $10^{-5}$ Pa, proto musí být látky v plynném skupenství dobře těkavé.

Na následujícím obrázku je uvedeno jednoduché schéma EI. Molekuly vzorku se v iontovém zdroji dostávají do proudu elektronů mezi anodou a žhavenou katodou, kde dochází k jejich ionizaci. Energii elektronů udává potenciálový rozdíl mezi elektrodami. Při ionizaci dochází k uvolnění valenčního elektronu a ke vzniku radikálkationtu  $M^+$ . Tento děj můžeme vyjádřit jednoduchou rovnicí:  $M + e^- \rightarrow M^+ + 2 e^-$ . Poté vytěšňovací elektroda vytlačí vzniklé ionty ze zdroje. Ty následně zrychleně putují do analyzátoru. Energie ionizace bývá nejčastěji 70 eV a dosahuje se při ní optimální citlivosti<sup>17</sup>.



Obr.7 Schéma elektronové ionizace<sup>17</sup>.

#### 4.1.1.2. Chemická ionizace (Chemical Ionization - CI)

Chemická ionizace patří k měkkým technikám. CI metoda je podobná EI, ovšem liší se přítomností tzv. reakčního plynu. Reakční plyn se nachází v iontovém zdroji ve větším množství než měřený analyt. Tlak reakčního plynu se vyskytuje v rozmezí 50 – 150 Pa. Proces ionizace probíhá tak, že jsou jako první ionizovány molekuly reakčního plynu, díky kterým jsou ionizovány molekuly analytu. Velký tlak zapříčiňuje dostatečné množství srážek mezi analytem a reakčním plynem.

Nejčastěji používané reakční plyny jsou např. methan, amoniak a isobutan. CI se hojně využívá při GC/MS technice.

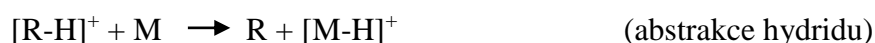
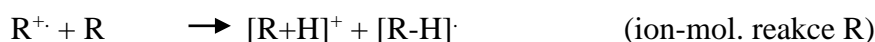
##### CI a vznik iontů

- reakční plyn (R), molekula analytu (M)

- o ionizace reakčního plynu (EI ionizace):

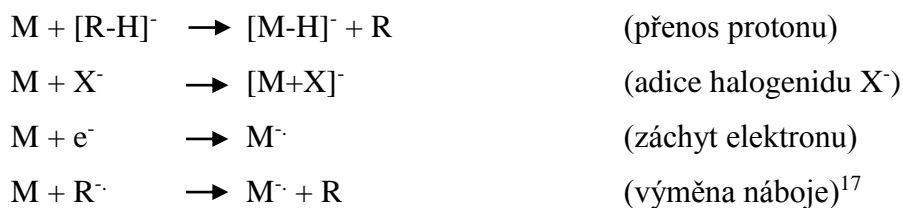


- o ionty vznikají ion-molekulárními reakcemi:



Při CI mohou vznikat i záporné ionty. Tento vznik je typický např. pro halogeny nebo analyty s kyselým vodíkem.

- o Reakce, při nichž vznikají záporné ionty (halogen (X)):



#### 4.1.2. Techniky ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Ionization - API)

Jsou to techniky probíhající při atmosférickém tlaku. Patří sem ESI, APCI a APPI. Objevení těchto technik zapříčinilo velký rozvoj techniky HPLC/MS. ESI/APCI mají v současnosti velký význam v oborech jako je chemie, farmacie, medicína, biochemie aj. API techniky lze nazývat také sprejovacími technikami, protože je analyt „nasprejován“ k místu, kterým vstupují ionizované molekuly do hmotnostního spektrometru. Jako u předešlé techniky i tady mohou být tvořeny jak kladné tak i záporné ionty, ovšem kladné ionty se vyskytují častěji<sup>17</sup>.

##### 4.1.2.1. Ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization – ESI)

ESI je nejvyužívanější technika v souvislosti s HPLC/MS. Je to měkká ionizační technika využívaná zejména pro středně polární až iontové látky. Při tvorbě nabitých molekul dochází pouze k velmi malé fragmentaci.

ESI probíhá tak, že měřený roztok prochází kovovou kapilárou s napětím několik kV. Po průchodu je kapalina rozstříknuta na kapičky, které se smísí se zmlžujícím plynem. Kapičky analytu, které mají velký náboj, se následkem vypařování rozpouštědla a zvětšení povrchového náboje rozdělí až na ionty. Ionty následně putují do hmotnostního analyzátoru. Tyto ionty se přesouvají z atmosférického prostředí do prostředí vakua, což má za následek snížení teploty iontů a vznik klastrů. Tvorbě klastrů můžeme předcházet dvěma způsoby. Prvním způsobem je protiproud sušícího plynu (dusíku), v druhém případě nám pomáhá zahřívání iontového zdroje na teplotu 250°C<sup>17</sup>.

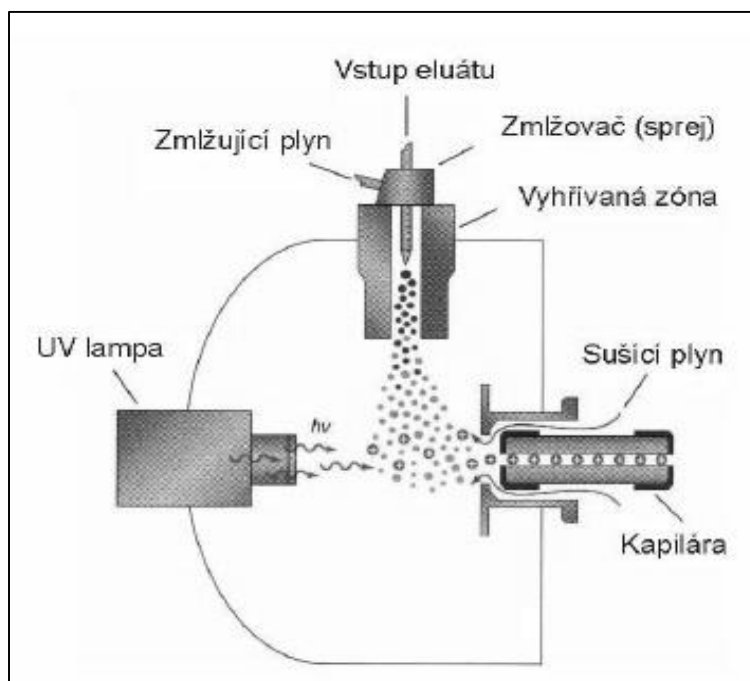
#### 4.1.2.2. Chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization - APCI)

APCI je další hojně využívaná měkká ionizační technika pro HPLC/MS nepolárních až středně polárních látek. Analyt se při APCI vyskytuje v plynném skupenství.

Mechanismus APCI: Analyt je po průchodu kapilárou rozstříknut do předem zahřáté oblasti, kde se setkává s výbojovou jehlou. Výbojová jehla má na svém povrchu napětí několik kV a slouží zde jako zdroj  $e^-$ . První se ionizují molekuly mobilní fáze a poté molekuly analytu. Ionty, které vznikly, dále putují do hmotnostního analyzátoru<sup>17</sup>.

#### 4.1.2.3. Fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Photoionization - APPI)

APPI je měkká technika téměř totožná s APCI. Liší se pouze tím, že má místo výbojové jehly UV lampu (zdroj UV záření). Metoda je vhodná pro nepolární až středně polární látky, stejně jako u APCI. U této techniky je důležité zmínit vliv tzv. dopantů. Dopanty jsou látky, které podněcují vznik většího počtu iontů. Děj spočívá v tom, že první jsou ionizovány dopanty, ty pak následně reagují s molekulami analytu tak, že dojde k výměně náboje nebo k přenosu protonu. Jako dopant se dnes používá např. aceton, toluen nebo benzen<sup>17</sup>.



Obr. 8 Schéma fotoionizace za atmosférického tlaku<sup>17</sup>.



### 4.1.3. Duální iontové zdroje

#### 4.1.3.1. Ionizace laserem za účasti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - MALDI)

MALDI je měkká ionizační technika určená zejména pro nepolární a polární látky, které mají velkou molekulovou hmotnost. Velikost těchto molekul se pohybuje v řádu desítek až stovek Da (např. polymery, proteiny, lipidy aj.). Za výhodu můžeme považovat to, že k ionizaci molekul může docházet ve vakuu, za sníženého tlaku (nejběžnější) ale i za atmosférického tlaku. V prvním kroku je měřený analyt smíchaný s matricí nanesen na MALDI terčik. Poté je tato směs ozářena pulsem laseru, díky tomu matrice pohltí energii a svým rozbitím ionizuje molekuly analytu. Nakonec jsou vzniklé ionty urychleny do analyzátoru.

V dnešní době se využívají převážně UV lasery, u kterých se používají jako matrice aromatické karboxylové kyseliny. V případě IČ laserů jako matrice poslouží všechny látky, jenž absorbují IČ záření<sup>17</sup>.

#### 4.1.3.2. Hmotnostní spektrometrie sekundárních iontů (Second Ion Mass Spectrometry - SIMS)

SIMS je technika využitelná zejména pro měření povrchů materiálů. Dochází zde k odstřelování povrchu materiálu proudem zrychlených iontů, sekundární ionty emitované z povrchu materiálu se využívají k analýze chemického složení materiálu. Velkou výhodou SIMS je velká citlivost a rozlišení<sup>17</sup>.

### 4.1.4. Starší ionizační techniky

#### 4.1.4.1. Termosprej (Thermospray Ionization - TSI)

TSI je šetrná sprejová ionizační technika, nyní již nahrazená elektrosprejem. TSI byla využívána zejména ve spojitosti s HPLC. Analyt smíchaný s rozpouštědlem prochází zahřátou kapilárou do vyhřívaného bloku iontového zdroje. Díky teplotě 150-300°C dochází ke vzniku malých kapiček analytu a neúplnému odpaření rozpouštědla. Kapičky analytu jsou poté neustále zahřívány, dokud náboj na povrchu není tak velký, aby se kapičky rozdělily na ionty. Následně pak putují do hmotnostního analyzátoru<sup>17</sup>.

#### 4.1.4.2. Ionizace urychlenými atomy (Fast Atom Bombardment - FAB) /ionty (Fast Ion Bombardment - FIB)

Princip FAB spočívá v interakci neutrálních molekul inertních plynů s molekulami analytu. Vzorek analytu musí být smíchán s viskózní matricí. U FIB urychlené ionty „střílí“ po molekulách analytu.

TSI i FIB metody mají velmi komplikovaný průběh, při kterém dochází k velkému počtu různých reakcí. Jako matrice se zde využívá zejména glycerolu<sup>17</sup>.

#### 4.1.4.3. Ionizace polem (Field Ionization - FI)

FI je využitelná pouze pro látky v plynném skupenství. Základní částí FI je tenký drát (anoda) mající na svém konci vysoké napětí. Toto napětí způsobuje uvolnění elektronu z molekuly a tedy vznik iontů. FI je málo citlivá proto se dnes už nevyužívá<sup>17</sup>.

#### 4.1.4.4. Desorpce polem (Field Desorption-FD)

FD vznikla z FI, ovšem u FD jsou analyzované látky v pevném skupenství. Stejně jako u FI i tady silné napětí rozbije molekulu analytu, aby mohlo dojít k úniku elektronu<sup>17</sup>.

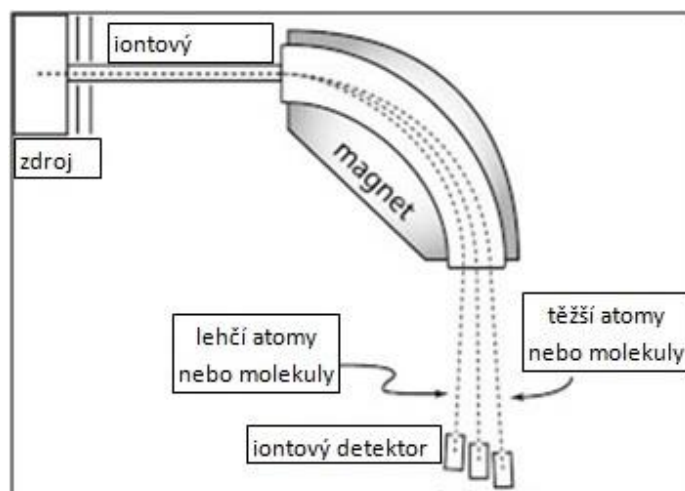
## 4.2. Hmotnostní analyzátor

V hmotnostním analyzátoru dochází k rozdělování iontů podle poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ). V této fázi analýzy jsou látky vždy v plynném skupenství, vše probíhá ve vakuu při cca  $10^{-3}$ - $10^{-11}$  Pa.

V dnešní době existuje mnoho druhů analyzátorů a díky tomu i různé principy, na kterých tyto analyzátory pracují. Některé z nich dělí ionty na základě odlišné délky letu, zakřivení trasy, kterou ionty uletěly nebo podle rozdílné absorpce energie<sup>18</sup>.

### 4.2.1. Magnetický sektorový analyzátor

Jeden z nejstarších analyzátorů využívaný zejména pro GC/MS (plynová chromatografie ve spojení s hmotností spektrometrií). V magnetickém sektorovém analyzátoru procházejí ionty analytu skrze magnetické pole, jež způsobuje ohnutí trasy, kterou ionty urazí. Díky tomu dochází k většímu ohybu u iontů, jejichž  $m/z$  je menší a naopak u iontů s větším poměrem  $m/z$  dojde k menšímu ohybu.



Obr. 9 Jednoduché schéma magnetického sektorového analyzátoru<sup>19</sup>.

Zvláštním případem magnetického sektorového analyzátoru může být přidání elektrostatické fokusace. Elektrostatický analyzátor vyrovnává rozdíly kinetické energie iontů, aby mohly být rozdělovány pouze podle  $m/z$ <sup>18</sup>.

### 4.2.2. Kvadrupólový analyzátor (Quadrupole - Q)

Analyzátor se skládá ze čtyř kovových tyčí. Vždy dvě protější tyče mají shodné stejnosměrné napětí (kladné nebo záporné). V analyzátoru je na všechny tyče vkládáno vysokofrekvenční střídavé napětí. Ionty mající určitý poměr  $m/z$  projdou skrze analyzátor k detektoru. Zbylé ionty po styku s tyčemi ztratí svoji energii<sup>18</sup>.

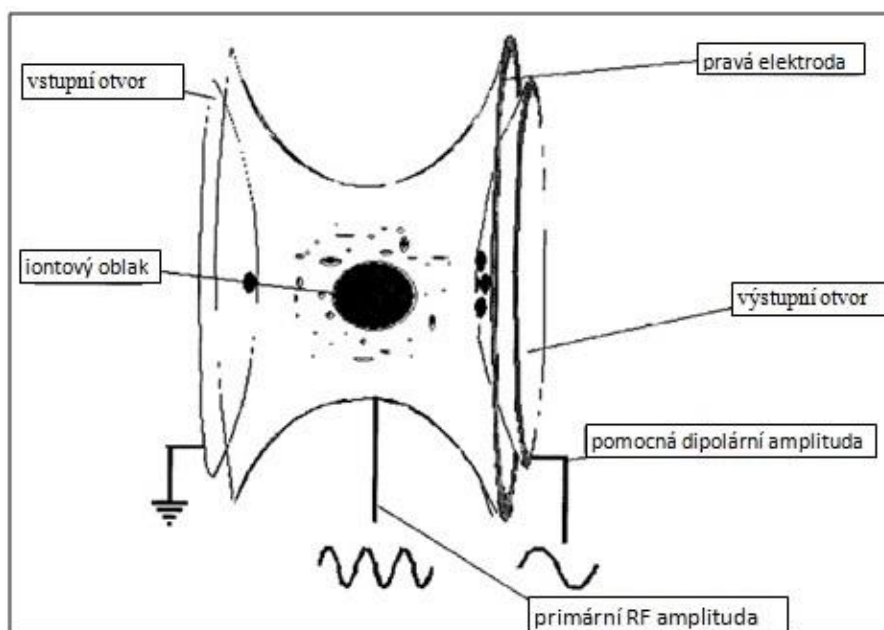
#### 4.2.2.1. Trojitý kvadrupólový analyzátor (Triple Quadrupole - QqQ)

Tento analyzátor se skládá ze tří za sebou jdoucích kvadrupólů. První a třetí kvadrupól slouží k propouštění iontů o určitém  $m/z$ . V prostředním kvadrupólu se nachází kolizní plyn. Díky

koliznímu plynu dochází k četným srážkám mezi ionty analytu a kolizním plynem. Kolizní energie se změní na vnitřní energie iontů, což vede k fragmentaci iontů. V posledním kvadrupólu jsou fragmenty znovu tříděny podle  $m/z$  a nakonec jsou detekovány<sup>18</sup>.

#### 4.2.3. 3D iontová past (Ion trap - IT)

IT se skládá z prstencové elektrody a dvou koncových elektrod. Elektrody mají napětí, které udržuje ionty v pasti. Ionty se do pasti dostávají vstupním otvorem a při jednotlivých změnách napětí ji opouští (podle poměru  $m/z$ ). Poté výstupním otvorem dále putují na detektor<sup>18</sup>.



Obr. 10 Jednoduché schéma 3D iontové pasti<sup>18</sup>.

#### 4.2.4. Lineární iontová past (Linear ion trap - LIT)

LIT se skládá z kvadrupólu, který má na obou stranách elektrody. Díky elektrodám mohou být ionty uvnitř zadržovány. Velkou výhodou LIT je to, že může zadržovat až 50x větší množství iontů než IT. Také je tato metoda citlivější a má lepší detekci<sup>18</sup>.

#### 4.2.5. Analyzátor doby letu (Time-of-Flight - TOF)

TOF pracuje na principu měření času, za který ionty ulétnou předem stanovenou dráhu. Ionty jsou urychleny a poslány do letové trubice (bez elektrického pole). Zde se ionty dělí podle své

rychlosti, která závisí na velikosti  $m/z$ . Logicky vyplývá, že malé ionty poletí rychleji a proto budou detekovány dříve než ionty větší. TOF má neomezené rozmezí  $m/z$  hodnoty<sup>18</sup>.

#### 4.2.6. Iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací (Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance - FT-ICR)

FT-ICR cela se nachází uvnitř silného magnetického pole. Poté co ionty vstoupí do tohoto pole, začnou obíhat po kruhové trajektorii. Za pomoci frekvence otáček se vypočte hodnota  $m/z$ . Díky Fourierovy transformaci se z frekvencí otáček dá získat hmotnostní spektrum<sup>18</sup>.

#### 4.2.7. Orbitrap

Orbitrap se skládá z vnější elektrody ve tvaru soudku a vnitřní elektrody, která má tvar připomínající vřeteno. Ionty kmitají okolo a podél vnitřní elektrody. Frekvenci lze spočítat jako nepřímou úměrnost odmocniny z  $m/z$ <sup>18</sup>.

#### 4.2.8. Hybridní hmotnostní spektrometry

Hybridní hmotnostní spektrometry mají dva nebo více druhů analyzátorů. Sloučením více analyzátorů můžeme docílit lepších výsledků.

Některé typy hybridních spektrometrů:

- IT-TOF
- Q-TOF
- IT-orbi
- QQQ-IT<sup>15</sup>

#### 4.2.9. Analyzátor iontové mobility (Ion Mobility Spectrometry - IMS)

Díky IMS mohou být rozdělovány ionty podle tvaru, hmotnosti, velikosti a náboje. IMS pracuje na podobném principu jako elektroforéza. U IMS jsou ionty rozděleny podle své pohyblivosti v netečném plynu v elektrickém poli. Dnes se ovšem využívá zejména TWIMS (traveling-wave ion mobility spectrometry) a DMS/FAIMS (differential-mobility spectrometry/field-asymmetric waveform ion mobility spectrometry)<sup>18</sup>.

#### 4.2.10. Tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem mass spectrometry - MS/MS )

MS/MS se provádí v čase nebo prostoru. V prostoru se MS/MS skládá ze dvou analyzátorů, mezi nimiž leží kolizní cela (např. QqQ). Kolizní cela je naplněna netečným plynem. Při průchodu prvním analyzátozem se ionty klasicky dělí na základě svého m/z poměru. Poté ionty vstupují do cely, ve které se střetávají s molekulami netečného plynu. Tato reakce se nazývá kolizně indukovaná disociace (CID). V cele dochází k fragmentaci. Dále pak vzniklé fragmenty, určitého typu iontu, jsou znovu separovány podle m/z. Nakonec jdou k detekci. V čase se MS/MS uskutečňuje v jednom analyzátozem, ale jednotlivé kroky se uskutečňují v různých časech (např. IT)<sup>18</sup>.

### 4.3. Detektor

Je zařízení, které zachycuje elektrický signál dopadajících iontů. Signál je poté digitalizován a zpracován v počítači. První jednoduchý detektor se nazývá ‚Faradayova miska‘. Detektor je tvořen elektrodou pokrytou BeO nebo GaP. Principem je uvolnění elektronů při dopadu iontů. Poté je elektrický proud, který vznikne, zesílen zesilovačem.

Další detektor je elektronový násobič ve tvaru zúžené trubice. V elektronovém násobiči jsou elektrody, které mnohonásobně zesilují elektrický proud. Tento typ detektoru vyniká svojí velkou citlivostí.

Detektor s konverzní dynodou a fotonásobičem přemění dopadající iont na elektron, který při dopadu na fosforescenční stínítko vystřelí foton. Nakonec foton dopadá na fotonásobič<sup>14</sup>.

### 4.4. Stanovení steroidů a jejich konjugátů pomocí MS

Steroidní látky a jejich konjugáty se ionizují různými měkkými ionizačními technikami. Ve své práci jsem tyto látky měřila pomocí ESI a MS s trojitým kvadrupólem.

V jiných literárních zdrojích můžeme najít celou řadu různých technik měření. Qi Jia prováděl měření 17-ketosteroidních sulfátů a glukoronidů pomocí LC/MS, která využívala sonickou sprejovací ionizaci a iontovou past<sup>20</sup>. 19-nortestosteron stanovoval E. Strahm pomocí LC/MS/MS<sup>21</sup>. V dalším případě E. Strahm použil ionizaci elektrosprejem ve spojení s iontovou

pastí pro deriváty testosteronu, epitestosteronu, androsteronu, etiocholanolonu a dehydroepiandrosteronu. Metoda zaznamenala velmi dobré výsledky pro testosteronsulfát, a epitestosteronsulfát<sup>22</sup>. Testosteron a epitestosteron byly pomocí trojitého kvadrupólu s elektrosprejem měřeny např. D. J. Bortsem<sup>23</sup>. Z uvedených literárních zdrojů je patrné, že nejčastěji využívaný typ ionizace u steroidních látek je elektrosprej, který byl použit i v této práci.

## **5. Cíl práce**

Cílem práce byla optimalizace parametrů elektrospreje u TSQ QUANTUM ULTRA (Thermo Scientific, Waltham, USA) hmotnostního spektrometru za účelem dosažení co nejlepší ionizace vybraných steroidních konjugátů.

## II. PRAKTICKÁ ČÁST

### 6. Experimentální část

#### 6.1. Přístrojové vybavení

Mezi základní přístrojové vybavení, které jsem používala, patří automatický dávkovač vzorků CTC ANALYTICS (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland), pumpa Rheos Allegro (Flux Instruments, Basel, Switzerland) a hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem TSQ QUANTUM ULTRA (Thermo Scientific, Waltham, USA). Steroidní konjugáty byly separovány na HPLC koloně Gemini C18 3 $\mu$  110A, 150 x 2 mm (Phenomenex, Torrance, USA).



Obr. 11 HPLC-MS

#### 6.2. Chemikálie

Měřila jsem následující konjugáty steroidů: estradiol-17-sulfát (E2-17S), androsteron sulfát (A-S) a pregnenolon-sulfát (Pen-S) (všechny Steraloids, Newport, USA). Pro přípravu mobilních fází jsem používala mravenčan amonný (Sigma Aldrich, CZ), methanol (Fisher Chemical,



Fisher Scientific, UK) a deionizovanou vodu (deionizace na Barnstead NANOPure, Thermo Scientific, USA).

### 6.3. Příprava vzorku

Připravila jsem 500 $\mu$ l směsného standardu E2-17S, A-S, Pen-S v methanolu o koncentraci 40  $\mu$ g·ml<sup>-1</sup>.

Steroidní konjugáty byly separovány na koloně Geminy C18 3 $\mu$  110A, 150 x 2 mm (Phenomenex, Torrance, USA). Jako mobilní fáze byly použity 5 mmol·l<sup>-1</sup> mravenčan amonný v metanolu a 5 mmol·l<sup>-1</sup> mravenčan amonný ve vodě, průtok mobilních fází byl 300  $\mu$ l·min<sup>-1</sup>, na kolonu bylo dávkováno 5 $\mu$ l vzorku. Kolona byla vložena do termostatu temperovaného na 35°C. Gradient mobilních fází je uveden v tabulce č. 3, přičemž mobilní fáze B je 5 mmol·l<sup>-1</sup> mravenčan amonný v metanolu a C je 5 mmol·l<sup>-1</sup> mravenčan amonný ve vodě.

Tab. 3 Nastavení gradientu kolony.

| Time         | A%  | B%   | C%   | D%  | $\mu$ l/min |
|--------------|-----|------|------|-----|-------------|
| <b>0.00</b>  | 0.0 | 55.0 | 45.0 | 0.0 | 300.0       |
| <b>5.00</b>  | 0.0 | 80.0 | 20.0 | 0.0 | 300.0       |
| <b>10.00</b> | 0.0 | 95.0 | 5.0  | 0.0 | 300.0       |
| <b>10.10</b> | 0.0 | 55.0 | 45.0 | 0.0 | 300.0       |
| <b>15.00</b> | 0.0 | 55.0 | 45.0 | 0.0 | 300.0       |

### 6.4. Optimalizace elektrospreje

K tomu, abych dosáhla co nejvyšší odezvy analytů (steroidních konjugátů) v hmotnostním spektrometru, bylo třeba optimalizovat parametry elektrospreje. Mezi nejdůležitější parametry, které ovlivňují vznik iontů v elektrospreji, patří teplota iontového zdroje, teplota vstupní kapiláry a průtoky sušících plynů. Nejdříve jsem se zaměřila na změny teplot iontového zdroje a vstupní kapiláry. Vyzkoušela jsem tři různé teploty iontového zdroje: 150°C, 250°C a 350°C a dvě teploty vstupní kapiláry: 150°C a 250°C (viz tabulka č. 4), přičemž jsem při jejich zadávání vycházela z literatury a zkušeností kolegů v laboratoři. Po každé změně parametru jsem provedla tři měření standardu kvůli statistickému vyhodnocení. Steroidní konjugáty jsem měřila v negativním spektru, kde dávají největší odezvu, a u každého steroidu jsem sledovala několik nejintenzivnějších iontů, jejichž intenzity za různých podmínek jsem následně

porovnávala. Intenzity jsem porovnávala na základě ploch píků jednotlivých iontů (viz tabulka č. 6 - 9).

Tab. 4 Optimalizace teplot iontového zdroje a kapiláry v ESI

| <b>Iontový zdroj</b> | <b>Kapilára</b> | <b>Sušící plyn</b> | <b>Pomocný sušící plyn</b> |
|----------------------|-----------------|--------------------|----------------------------|
| [°C]                 | [°C]            | [Arb]              | [Arb]                      |
| <b>150</b>           | 150             | 50                 | 10                         |
| <b>250</b>           | 150             | 50                 | 10                         |
| <b>350</b>           | 150             | 50                 | 10                         |
| <b>150</b>           | 250             | 50                 | 10                         |
| <b>250</b>           | 250             | 50                 | 10                         |
| <b>350</b>           | 250             | 50                 | 10                         |

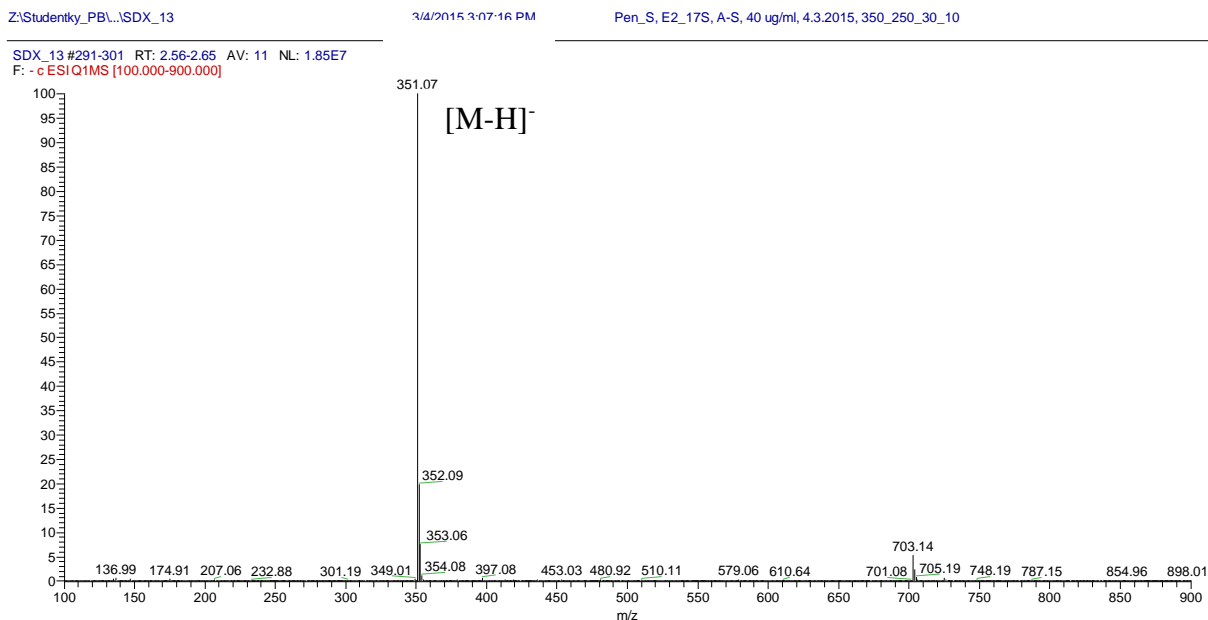
Po nalezení optimálních hodnot teploty iontového zdroje a kapiláry jsem se zaměřila na průtoky sušícího (sheath) a přídavného sušícího (aux) plynu. Hodnoty sušícího plynu jsem postupně nastavila na 30, 40 a 50 interních jednotek (Arb) a hodnoty přídavného sušícího plynu na 5 a 10 Arb (viz tabulka č. 5). Výsledky změn intenzity iontů jednotlivých konjugátů jsou uvedeny v tabulkách č. 6 - 9.

Tab. 5 Optimalizace průtoku plynů v ESI

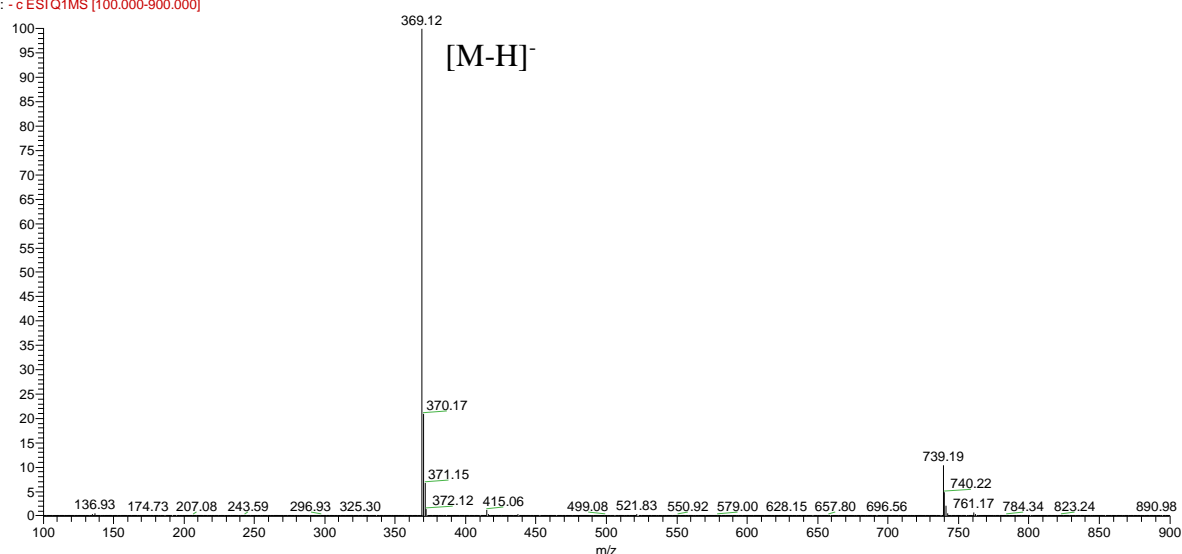
| <b>Iontový zdroj</b> | <b>Kapilára</b> | <b>Sušící plyn</b> | <b>Pomocný sušící plyn</b> |
|----------------------|-----------------|--------------------|----------------------------|
| [°C]                 | [°C]            | [Arb]              | [Arb]                      |
| <b>350</b>           | 250             | 50                 | 10                         |
| <b>350</b>           | 250             | 50                 | 5                          |
| <b>350</b>           | 250             | 40                 | 10                         |
| <b>350</b>           | 250             | 40                 | 5                          |
| <b>350</b>           | 250             | 30                 | 10                         |
| <b>350</b>           | 250             | 30                 | 5                          |

## 7. Výsledky a diskuse

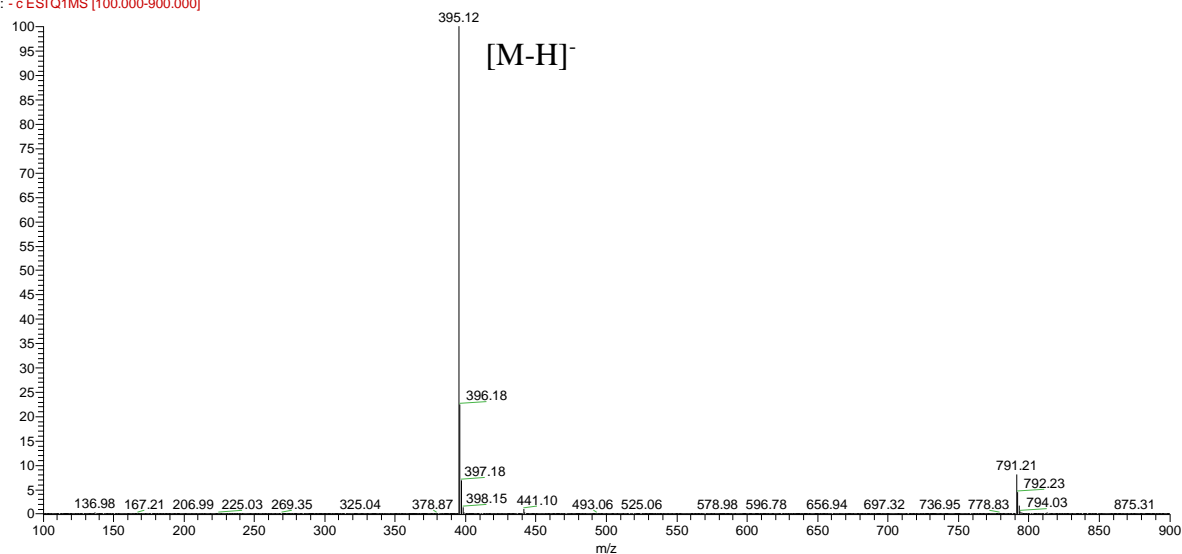
Výsledkem HPLC-MS analýzy jsou chromatogramy a hmotnostní spektra látek. Osa x chromatogramu udává čas, ve kterém jsou ionty zaznamenány analyzátozem. Osa y udává relativní četnost, při čemž nejintenzivnější pík má hodnotu 100. V hmotnostním spektru jsou zaznamenány ionty prošlé analyzátozem v daném čase. Konjugáty steroidů jsem měřila v negativním spektru, snímala jsem celé spektrum iontů od 100 do 900 Da. Pro každý měřený konjugát jsem našla několik charakteristických iontů, jejichž intenzitu jsem při změnách parametrů ESI porovnávala. Pro E2-17S jsem našla následující charakteristické ionty (viz. Obr. 13): m/z 351.1, který odpovídá iontu, kdy se z molekuly odštěpil vodík  $[M-H]^-$ , dále m/z 397.1, který odpovídá aduktu E2-17S s mravenčanem  $[M+HCOO]^-$  a m/z 703.14, který odpovídá iontu  $[2M-H]^-$ . Pro androsteron sulfát jsem našla tyto charakteristické ionty (viz. Obr. 14): m/z 369.2, který odpovídá  $[M-H]^-$  a m/z 739.2, odpovídající  $[2M-H]^-$ . Pro pregnenolon sulfát jsem zvolila následující charakteristické ionty (viz. Obr. 15): m/z 395.2, odpovídající  $[M-H]^-$ , m/z 441.2, odpovídající  $[M+HCOO]^-$  a m/z 791.3, který značí  $[2M-H]^-$ . Nejdůležitějšími a nejintenzivnějšími ionty jsou ty, které odpovídají  $[M-H]^-$ .



Obr. 13 Hmotnostní spektrum estradiol-17-sulfátu

SDX\_13 #484-492 RT: 4.27-4.34 AV: 9 NL: 2.88E7  
F: -c ESI Q1 MS [100.000-900.000]

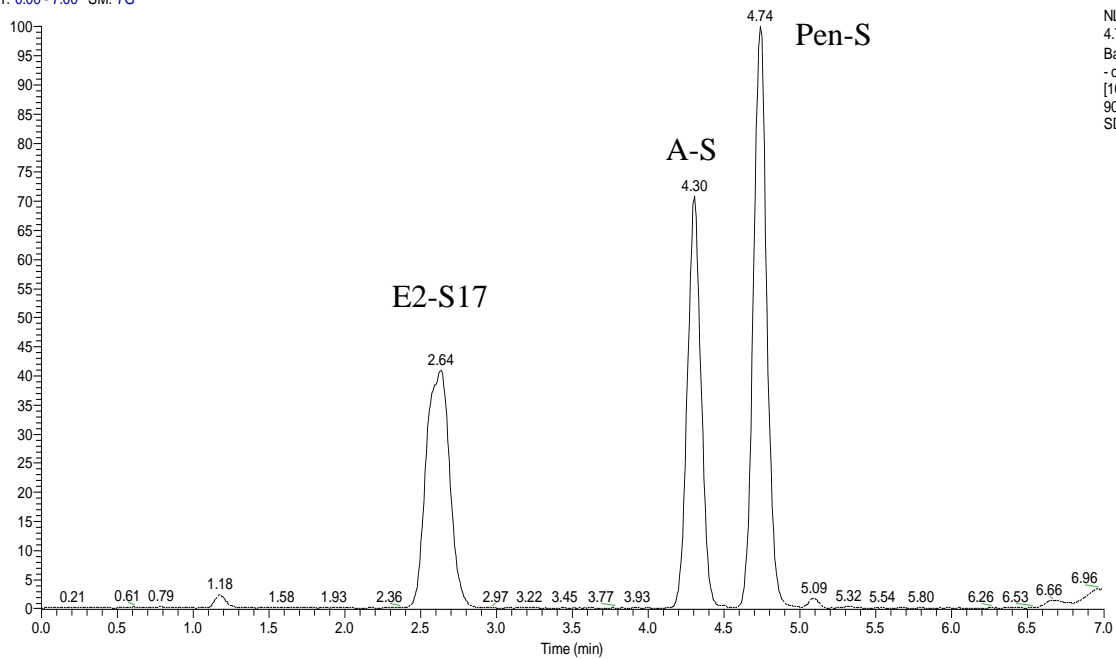
Obr. 14 Hmotnostní spektrum androsteron sulfátu

SDX\_13 #534-540 RT: 4.71-4.76 AV: 7 NL: 4.43E7  
F: -c ESI Q1 MS [100.000-900.000]

Obr. 15 Hmotnostní spektrum pregnenolon sulfátu

Retenční čas E2-17S je 2.64 min, A-S 4.3 min a Pen-S 4.74 min (viz. Obr. 16). Změnami parametrů ESI lze docílit výrazného zvýšení ionizace steroidů. Na Obr. 17 je ukázka chromatogramu, kdy dochází k velmi špatné ionizaci steroidů a při snímání širokého spektra iontů od 100-900 Da dochází k potlačení iontů steroidů v iontech pozadí (v šumu).

RT: 0.00 - 7.00 SM: 7G

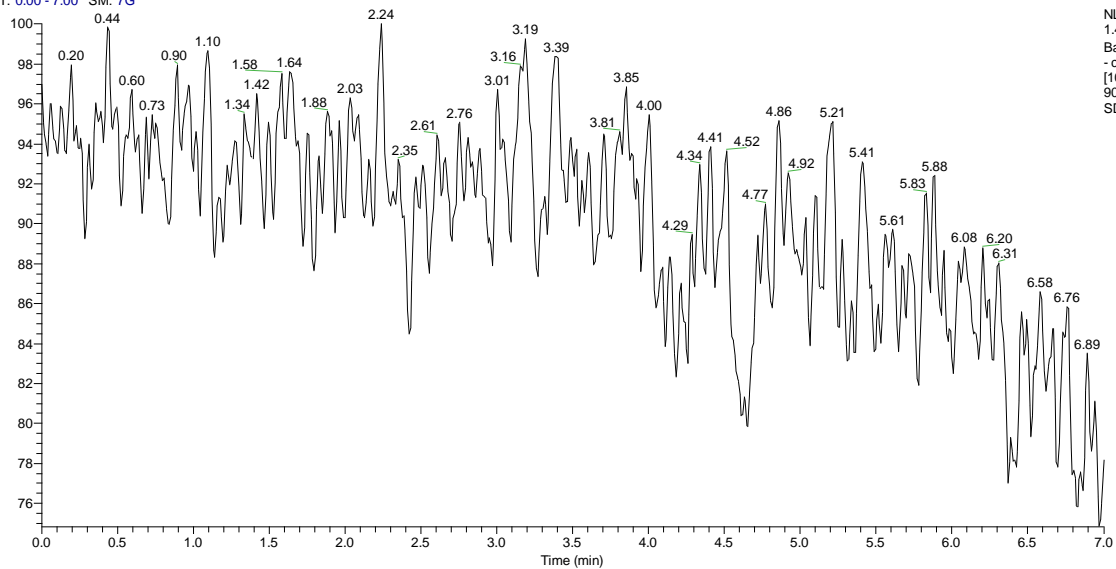


NL:  
4.72E7  
Base Peak F:  
- c ESI Q1MS  
[100.000-  
900.000] MS  
SDX\_13

Obr. 16 Ukázka chromatogramu E2-17S, A-S a Pen-S za optimálních podmínek ESI

Pen\_S, E2\_17S, A-S, 40 ug/ml, 4.3.2015, 150\_150\_50\_10

RT: 0.00 - 7.00 SM: 7G



NL:  
1.42E8  
Base Peak F:  
- c ESI Q1MS  
[100.000-  
900.000] MS  
SDX\_03

Obr. 17 Ukázka chromatogramu E2-17S, A-S a Pen-S při špatných podmínkách ionizace

Intenzitu charakteristických iontů jednotlivých steroidů při různých podmínkách nastavení ESI jsem porovnávala na základě ploch jejich píků. Plochy byly vypočteny pomocí programu Xcalibur Quan Browser (Thermo Scientific, USA). Výsledky jsou shrnuty v tabulkách č. 6 - 9.

Tab. 6 Hodnoty ploch pík charakteristických iontů E2-17S a A-S při optimalizaci teploty iontového zdroje a vstupní kapiláry (sušící plyn 50 Arb, pomocný sušící plyn 10 Arb)

| <b>Iontový zdroj</b><br>[°C] | <b>Kapilára</b><br>[°C] | <b>E2-17S</b><br><b>351.2</b> | <b>E2-17S</b><br><b>397.2</b> | <b>E2-17S</b><br><b>703.2</b> | <b>A-S</b><br><b>369.2</b> | <b>A-S</b><br><b>739.2</b> |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 150                          | 150                     | 43379881                      | 3144399                       | 1797067                       | 37923727                   | 1685282                    |
| 150                          | 150                     | 45388807                      | 3403650                       | 1880289                       | 39679978                   | 1763328                    |
| 150                          | 150                     | 41067139                      | 2785861                       | 1701259                       | 35901873                   | 1595433                    |
| 250                          | 150                     | 55395953                      | 4953510                       | 2722382                       | 53796297                   | 2986687                    |
| 250                          | 150                     | 58426748                      | 5072448                       | 2871328                       | 56739573                   | 3150093                    |
| 250                          | 150                     | 50819295                      | 4639495                       | 2497466                       | 49351798                   | 2739935                    |
| 350                          | 150                     | 76882283                      | 8342886                       | 4186703                       | 74332531                   | 5979145                    |
| 350                          | 150                     | 78650682                      | 9003641                       | 4283003                       | 76042283                   | 6116674                    |
| 350                          | 150                     | 73147428                      | 8009999                       | 3983318                       | 70721540                   | 5688685                    |
| 150                          | 250                     | 115701244                     | 12266906                      | 5458120                       | 115461803                  | 7461811                    |
| 150                          | 250                     | 123846014                     | 13360607                      | 5842343                       | 123589718                  | 7987084                    |
| 150                          | 250                     | 113059445                     | 11657664                      | 5333495                       | 112825471                  | 7291436                    |
| 250                          | 250                     | 142178160                     | 14553450                      | 6943552                       | 139151805                  | 9496480                    |
| 250                          | 250                     | 153959361                     | 14845206                      | 7518910                       | 150682235                  | 10283380                   |
| 250                          | 250                     | 125876283                     | 13942906                      | 6147418                       | 123196924                  | 8407632                    |
| 350                          | 250                     | 172163267                     | 17308899                      | 8292346                       | 164030693                  | 12643123                   |
| 350                          | 250                     | 178746186                     | 18656746                      | 8609416                       | 170302650                  | 13126552                   |
| 350                          | 250                     | 166766386                     | 15541085                      | 8032402                       | 158888748                  | 12246793                   |

Tab. 7 Hodnoty ploch pík charakteristických iontů Pen-S při optimalizaci teploty iontového zdroje a vstupní kapiláry (sušící plyn 50 Arb, pomocný sušící plyn 10 Arb)

| <b>Iontový zdroj</b><br>[°C] | <b>Kapilára</b><br>[°C] | <b>Pen-S</b><br><b>395.2</b> | <b>Pen-S</b><br><b>441.2</b> | <b>Pen-S</b><br><b>791.3</b> |
|------------------------------|-------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 150                          | 150                     | 37988058                     | 27219793                     | 6286943                      |
| 150                          | 150                     | 41120114                     | 29464022                     | 6805292                      |
| 150                          | 150                     | 33656501                     | 24116078                     | 5570079                      |
| 250                          | 150                     | 60517604                     | 35896162                     | 9772780                      |
| 250                          | 150                     | 61970680                     | 36758057                     | 10007432                     |
| 250                          | 150                     | 56681251                     | 33620620                     | 9153260                      |
| 350                          | 150                     | 105836115                    | 46353855                     | 12644715                     |
| 350                          | 150                     | 114218321                    | 50025074                     | 13646175                     |
| 350                          | 150                     | 101613179                    | 44504303                     | 12140182                     |
| 150                          | 250                     | 157558385                    | 4810597                      | 11354754                     |
| 150                          | 250                     | 171606084                    | 5239504                      | 12367129                     |
| 150                          | 250                     | 149733166                    | 4571676                      | 10790814                     |
| 250                          | 250                     | 185698494                    | 3648688                      | 13312047                     |
| 250                          | 250                     | 189421226                    | 3721834                      | 13578916                     |
| 250                          | 250                     | 177908097                    | 3495619                      | 12753582                     |
| 350                          | 250                     | 220734725                    | 2857650                      | 16992660                     |
| 350                          | 250                     | 237923383                    | 3080176                      | 18315882                     |
| 350                          | 250                     | 198190371                    | 2565789                      | 15257144                     |

Tab. 8 Hodnoty ploch pík charakteristických iontů E2-17S a A-S při optimalizaci průtoku sušících plynů (teplota iontového zdroje 350 °C, teplota kapiláry 250°C)

| Sušící plyn<br>[Arb] | Pom. sušící plyn<br>[Arb] | E2-17S<br>351.1 | E2-17S<br>397.1 | E-17S<br>703.2 | A-S<br>369.2 | A-S<br>739.2 |
|----------------------|---------------------------|-----------------|-----------------|----------------|--------------|--------------|
| 50                   | 10                        | 173220395       | 18356192        | 9648023        | 165750734    | 12753949     |
| 50                   | 10                        | 185675948       | 19735403        | 10341772       | 177669175    | 13671032     |
| 50                   | 10                        | 160833542       | 17740766        | 8958101        | 153898031    | 11841924     |
| 50                   | 5                         | 159612730       | 16127746        | 8318544        | 153145520    | 12137358     |
| 50                   | 5                         | 177828516       | 17914675        | 9267897        | 170623236    | 13522533     |
| 50                   | 5                         | 149507765       | 14721637        | 7791903        | 143449989    | 11368951     |
| 40                   | 10                        | 198134973       | 18944583        | 9573550        | 186609610    | 14696989     |
| 40                   | 10                        | 208545223       | 20325675        | 10076556       | 196414304    | 15469187     |
| 40                   | 10                        | 183704072       | 18386745        | 8876273        | 173018143    | 13626553     |
| 40                   | 5                         | 167350678       | 16987541        | 8682214        | 165420428    | 13022328     |
| 40                   | 5                         | 174227323       | 17429690        | 9038977        | 172217757    | 13557431     |
| 40                   | 5                         | 152142957       | 15333818        | 7893232        | 150388115    | 11838945     |
| 30                   | 10                        | 197737948       | 20890917        | 8391767        | 196832961    | 16627012     |
| 30                   | 10                        | 230175122       | 21602484        | 9768362        | 229121679    | 19354527     |
| 30                   | 10                        | 210069778       | 20392243        | 8915115        | 209108352    | 17663947     |
| 30                   | 5                         | 170766450       | 21260286        | 7889053        | 180292865    | 17353338     |
| 30                   | 5                         | 191053485       | 20015287        | 8826271        | 201711637    | 19414912     |
| 30                   | 5                         | 176021062       | 20503287        | 8131805        | 185840612    | 17887313     |

Tab. 9 Hodnoty ploch pík charakteristických iontů Pen-S při optimalizaci průtoku sušících plynů (teplota iontového zdroje 350 °C, teplota kapiláry 250°C)

| Sušící plyn<br>[Arb] | Pom. sušící plyn<br>[Arb] | Pen-S<br>395 | Pen-S<br>441 | Pen-S<br>791 |
|----------------------|---------------------------|--------------|--------------|--------------|
| 50                   | 10                        | 233100649    | 1861922      | 17080640     |
| 50                   | 10                        | 250614904    | 2001819      | 18364011     |
| 50                   | 10                        | 225285509    | 1799498      | 16507979     |
| 50                   | 5                         | 217479948    | 3646801      | 15438657     |
| 50                   | 5                         | 241576390    | 4050861      | 17149236     |
| 50                   | 5                         | 198518808    | 3328852      | 14092627     |
| 40                   | 10                        | 262318188    | 1258109      | 17575797     |
| 40                   | 10                        | 281441629    | 1349827      | 18857102     |
| 40                   | 10                        | 254594019    | 1221063      | 17058264     |
| 40                   | 5                         | 227228555    | 5099535      | 17366759     |
| 40                   | 5                         | 233142830    | 5232265      | 17818779     |
| 40                   | 5                         | 205108050    | 4603100      | 15676120     |
| 30                   | 10                        | 294138168    | 2291266      | 21646739     |
| 30                   | 10                        | 304156831    | 2369309      | 22384050     |
| 30                   | 10                        | 287116981    | 2236573      | 21130023     |
| 30                   | 5                         | 262827863    | 6014068      | 21646687     |
| 30                   | 5                         | 247436707    | 5661886      | 20379061     |
| 30                   | 5                         | 253469551    | 5799930      | 20875930     |

V předchozích tabulkách č. 6. – 9. jsem zaznamenala plochy píků naměřených při různých změnách parametrů elektrospreje.

V prvním kroku jsem optimalizovala teplotu iontového zdroje a vstupní kapiláry za použití nejvyšších hodnot průtoků sušících plynů, které jsou doporučeny pro daný tok mobilní fáze výrobcem hmotnostního spektrometru (pro 300  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$  - sušící plyn 50 Arb, pomocný sušící plyn 10 Arb). Při teplotě iontového zdroje 150°C a teplotě kapiláry 150 °C jsou plochy píku A-S 209108352, E2-17S 210069778 a Pen-S 294138168 (použité hodnoty jsou z 1. měření). Z chromatogramu na Obr. 17 je patrné, že charakteristické ionty zanikají v iontech pozadí. Při zvýšení teploty iontového zdroje na 250°C došlo k zvětšení ploch píků cca o 1/3. Při dalším zvýšení teploty iontového zdroje na 350°C došlo k opětovnému zvětšení ploch píků cca o 1/3 proti předchozímu nastavení. Lze tak usoudit, že zvyšováním teploty iontového zdroje dochází k výraznému zlepšení ionizace. V dalším kroku jsem zkoušela upravovat teplotu vstupní kapiláry. Při zvýšení teploty kapiláry ze 150°C na 250°C při jakémkoli nastavení teploty iontového zdroje došlo k poměrně velkému zvětšení ploch píků. Při zvýšení teploty iontového zdroje ze 150°C na 250°C a při teplotě kapiláry 250°C došlo ke zvětšení ploch píků o cca 10 – 20 %. Nejvyšších hodnot ploch nejintenzivnějších a charakteristických iontů, odpovídajících iontům  $[\text{M-H}]^+$ , bylo dosaženo při nastavení nejvyšších teplot iontového zdroje na 350°C a kapiláry na 250°C. Při těchto teplotách dochází k nejlepší ionizaci vybraných sulfátů steroidů a z chromatogramu na Obr. 16 je zřejmé, že charakteristické ionty výrazně vystupují nad signály iontů pozadí.

V dalším kroku jsem za podmínek optimálních teplot zdroje a kapiláry optimalizovala průtoky sušících plynů. Průtok sušícího plynu byl postupně nastaven na 50, 40 a 30 Arb, průtok pomocného sušícího plynu na 10 a 5. Z tabulky č. 8 a 9 jasně vyplývá, že snížením průtoků pomocného sušícího plynu dochází ke snížení ploch charakteristických iontů jednotlivých sulfátů. Naopak snížením průtoků sušícího plynu postupně z 50 na 30 při průtoku sušícího plynu 10 Arb dochází ke zvýšení hodnot ploch nejdůležitějšího charakteristického a nejintenzivnějšího iontu sulfátů, který odpovídá iontům  $[\text{M-H}]^+$ .

Z výsledků měření jasně vyplývá, že optimalizací parametrů elektrospreje došlo k výraznému zvýšení ionizace sulfátů steroidů. Optimální nastavení je následující: Teplota iontového zdroje 350°C, teplota vstupní kapiláry 250°C, průtok sušícího plynu 50 Arb a průtok pomocného sušícího plynu 30 Arb,



Z literární rešerše vyplývá, že ionizace elektrosprejem patří mezi nejčastěji využívané ionizační techniky pro měření steroidních látek a jejich konjugátů. Výsledky, které jsme získali při optimalizaci elektrospreje, nám teoretické poznatky potvrdily.

## 8. Závěr

Cílem práce bylo popsat fyzikálně-chemické vlastnosti steroidních látek a jejich konjugátů. Kvůli nízkým hladinám a různorodým funkčním skupinám jsou tyto látky obtížně detekovatelné a náchylné k fragmentacím. Pro detekci steroidů byla použita hmotnostní spektrometrie a ionizace elektrosprejem (měkká ionizační technika).

Před samotnou MS hraje důležitou roli HPLC jako separační technika. Spojení HPLC-MS umožnila po optimalizaci podmínek pro měření tří důležitých steroidních metabolitů, konkrétně A-S, E2-17S a Pen-S.

Hlavním praktickým cílem bakalářské práce byla optimalizace podmínek ionizace cílových sulfátů steroidů elektrosprejem. Byly zkoumány tyto faktory: teplota iontového zdroje, teplota vstupní kapiláry a průtoky sušících plynů. Na základě porovnávání intenzity charakteristických iontů se podařilo nalézt optimální hodnoty s nejvyššími výtěžky iontů. Nalezené parametry umožňují citlivou HPLC-MS analýzu zkoumaných steroidů.

## 10. Literatura

1. <http://nksf.narod.ru/steroids.html>
2. Prof.RNDr.Milan Kodíček, CSc.:BIOCHEMICKÉ POJMY výkladový slovník, Praha 2004, str. 50, 78, 153
3. Sigma Aldrich, [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com), Katalog strukturních vzorců sloučenin [on-line], [cit. 2014-11-29], Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c8667?lang=en&region=CZ>
4. Miroslav FERENČÍK, Bohumil ŠKÁRKA: BIOCHÉMIA, Bratislava 2000, str. 100, 509, 511, 512, 768
5. Sigma Aldrich, [www.sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com), Katalog strukturních vzorců sloučenin [on-line], [cit. 2014-11-29], Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h4001?lang=en&region=CZ>
6. Robert K. Murray, Daryl K Granner, Peter A. Mayes, Victor W. Rodwell: Harperova BIOCHEMIE, Praha 1998, str. 544-547, 553-556, 561, 572
7. MAFRA. Estrogen (estrogeny) – Vitalion.cz, Vitalion – Lepší informace, lepší zdraví [on-line], Praha [cit. 2014-11-29], Dostupné z: <http://laborator.vitalion.cz/estrogen/>
8. Machová J.: Biologie člověka pro učitele, Univerzita Karlova v Praze 2008, str. 114
9. Dostál J., Paulová H., Slanina J., Táborská E.:Biochemie pro bakaláře, Brno 2005, str. 156-158
10. Koohman J., Klaus-Heinrich Röhm, Barevný atlas biochemie, překlad 4. vydání, Praha 2012, str. 334-335
11. Nováková L., Douša M. a kol.: Moderní HPLC separace v teorii a praxi I., Praha 2013, str. 11-57
12. Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: Základní ANALYTICKÁ CHEMIE, Praha 2002, str. 165-167
13. Holčapek M., Jandera P.: Chemické Listy – SPOJENÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (HPLC/MS), Pardubice 1998, str. 278-286
14. Klouda P.: Moderní analytické metody, Ostrava 2003, str. 52
15. Hoffmann E., Stroobant V.: Mass Spectrometry, UK 2007, str. 15-211
16. Holčapek M., Lída M., Jirásko R.: SBORNÍK – 9. ročník Školy hmotnostní spektrometrie, Pardubice 2008, str. 6

17. Holčapek Michal, Výuka – Hmotnostní spektrometrie v organické analýze – Ionizační techniky, Mass Spectrometry Group at University of Pardubice [on-line], Pardubice: 2006-2014 [cit. 2014-11-29], Dostupné z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/02\\_Ionizacni Techniky.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/02_Ionizacni_Techniky.pdf)
18. Holčapek Michal, Výuka – Hmotnostní spektrometrie v organické analýze – Hmotnostní analyzátory, Mass Spectrometry Group at University of Pardubice [on-line], Pardubice: 2006-2014 [cit. 2014-11-29], Dostupné z: [http://holcapek.upce.cz/teaching/03\\_Hmotnostni Analyzatory.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/03_Hmotnostni_Analyzatory.pdf) (Pozn. u Obr. 10 – přeložené popisky)
19. ORGANIC SPECTROSCOPY, Magnetic -Deflection or Sector Mass Analyzer [on-line], [cit. 2014-11-29], Dostupné z: <http://orgchemguide.blogspot.cz/2011/04/magnetic-deflection-or-sector-mass.html> (Pozn. u Obr. 9 – přeložené popisky)
20. Jia Q. et al., Journal of Chromatography B, 750: Quantification of urine 17 - ketosteroid sulfates and glucuronides by high-performance liquid chromatography – ion trap mass spectrometry, USA 2001, str. 81 – 91
21. Strahm E. et al., ANALYTICA CHIMICA ACTA 613: Profiling of 19 - norsteroid sulfoconjugates in human urine by liquid chromatography mass spectrometry, Switzerland 2008, str. 228 – 237
22. Strahm E. et al., Journal of Chromatography A, 1196 – 1197: Isolation and quantification by high-performance liquid chromatography–ion-trap mass spectrometry of androgen sulfoconjugates in human urine. Switzerland 2008, str. 153 - 160
23. D. J. Borts, L. D. Bowers, JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY, *J. Mass Spectrom.* 35: Direct measurement of urinary testosterone and epitestosterone conjugates using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, Indiana 2000, str. 50 - 61

# 11. Přílohy

Příloha 1. Přehled SRM přechodů.

| Parent | Product | Col.E | Tube Lens | Polarity | Name                    |
|--------|---------|-------|-----------|----------|-------------------------|
| 215.06 | 175.1   | 20    | 63        | -        | E2-SS                   |
| 215.06 | 350.3   | 17    | 63        | -        | E2-SS                   |
| 263.2  | 97      | 35    | 100       | -        | E2-3G-17S               |
| 263.2  | 351.2   | 17    | 100       | -        | E2-3G-17S               |
| 265.16 | 80      | 60    | 115       | -        | E1S                     |
| 265.16 | 97      | 30    | 115       | -        | E1S                     |
| 271.2  | 253.2   | 10    | 80        | +        | Estradiol               |
| 279.16 | 80      | 62    | 126       | -        | E1S                     |
| 279.16 | 97      | 30    | 126       | -        | E1S                     |
| 288.2  | 133.1   | 27    | 80        | +        | Estron                  |
| 288.2  | 271.3   | 5     | 80        | +        | Estron                  |
| 289.2  | 79.1    | 38    | 115       | +        | Testosterone            |
| 289.2  | 109.1   | 26    | 115       | +        | Testosterone            |
| 291.2  | 255.3   | 13    | 140       | +        | Allodihydrotestosterone |
| 306.2  | 253.3   | 15    | 85        | +        | Estriol                 |
| 306.2  | 289.3   | 5     | 85        | +        | Estriol                 |
| 308.2  | 291.3   | 7     | 85        | +        | Allodihydrotestosterone |
| 315.3  | 97.2    | 21    | 65        | +        | Progesterone            |
| 315.3  | 109.1   | 26    | 65        | +        | Progesterone            |
| 323.2  | 291.3   | 5     | 140       | +        | Allodihydrotestosterone |
| 331.2  | 97.1    | 28    | 105       | +        | 17a-OH-Progesterone     |
| 331.2  | 109.1   | 29    | 105       | +        | 17a-OH-Progesterone     |

|               |       |    |     |   |                           |
|---------------|-------|----|-----|---|---------------------------|
| <b>333.2</b>  | 109.1 | 30 | 100 | + | 17a-20a-diOH-Progesterone |
| <b>333.2</b>  | 271.2 | 15 | 100 | + | 17a-20a-diOH-Progesterone |
| <b>334.3</b>  | 281.3 | 14 | 90  | + | Pregnenolone              |
| <b>334.3</b>  | 317.4 | 5  | 90  | + | Pregnenolone              |
| <b>336.2</b>  | 283.3 | 17 | 97  | + | Pregnanolone              |
| <b>336.2</b>  | 301.4 | 10 | 107 | + | Pregnanolone              |
| <b>349.1</b>  | 145   | 58 | 115 | - | E1S                       |
| <b>349.1</b>  | 269.3 | 34 | 115 | - | E1S                       |
| <b>351.17</b> | 80    | 65 | 135 | - | E2-17S                    |
| <b>351.17</b> | 97    | 42 | 135 | - | E2-17S                    |
| <b>351.18</b> | 183.1 | 57 | 125 | - | E2-3S                     |
| <b>351.18</b> | 271.2 | 35 | 125 | - | E2-3S                     |
| <b>363.2</b>  | 121.1 | 25 | 100 | + | Cortisol                  |
| <b>363.2</b>  | 327.2 | 14 | 100 | + | Cortisol                  |
| <b>367.15</b> | 171   | 55 | 137 | - | E3-3S                     |
| <b>367.15</b> | 287.2 | 36 | 137 | - | E3-3S                     |
| <b>367.17</b> | 80    | 70 | 137 | - | DHEA-S, T-S, EpiT-S       |
| <b>367.17</b> | 97    | 40 | 137 | - | DHEA-S, T-S, EpiT-S       |
| <b>367.2</b>  | 80    | 57 | 128 | - | E3-17S                    |
| <b>367.2</b>  | 97    | 44 | 128 | - | E3-17S                    |
| <b>369.15</b> | 80    | 74 | 137 | - | A-S, EA-S                 |
| <b>369.15</b> | 97    | 43 | 137 | - | A-S, EA-S                 |
| <b>369.18</b> | 80    | 73 | 137 | - | Etiocholanolone S         |
| <b>369.18</b> | 97    | 43 | 137 | - | Etiocholanolone S         |
| <b>383.16</b> | 80    | 74 | 139 | - | 16a-OH-DHEA-S             |
| <b>383.16</b> | 97    | 40 | 139 | - | 16a-OH-DHEA-S             |

|                |       |    |     |   |                       |
|----------------|-------|----|-----|---|-----------------------|
| <b>383.17</b>  | 80    | 74 | 139 | - | 7a-OH-DHEA-S          |
| <b>383.17</b>  | 97    | 34 | 139 | - | 7a-OH-DHEA-S          |
| <b>395.2</b>   | 80    | 74 | 140 | - | P-en-S                |
| <b>395.2</b>   | 97    | 40 | 140 | - | P-en-S                |
| <b>397.2</b>   | 80    | 76 | 141 | - | P-an-S                |
| <b>397.2</b>   | 97    | 43 | 141 | - | P-an-S                |
| <b>399.16</b>  | 80    | 74 | 115 | - | Pregnenolone-S-D4     |
| <b>399.16</b>  | 97    | 47 | 115 | - | Pregnenolone-S-D4     |
| <b>399.18</b>  | 80    | 74 | 141 | - | Epi-Allo-P-an-diol 3S |
| <b>399.18</b>  | 97    | 45 | 141 | - | Epi-Allo-P-an-diol 3S |
| <b>411.2</b>   | 80    | 75 | 143 | - | DHP-S                 |
| <b>411.2</b>   | 97    | 43 | 143 | - | DHP-S                 |
| <b>425.2</b>   | 80    | 50 | 118 | - | Corticosterone-S      |
| <b>425.2</b>   | 97    | 45 | 118 | - | Corticosterone-S      |
| <b>445.2</b>   | 145.1 | 66 | 126 | - | E1G                   |
| <b>445.2</b>   | 269.2 | 40 | 126 | - | E1G                   |
| <b>447.2</b>   | 85    | 31 | 133 | - | E2G                   |
| <b>447.2</b>   | 271.2 | 31 | 133 | - | E2G                   |
| <b>450.2</b>   | 274.5 | 47 | 101 | - | E2-3D-36G             |
| <b>463.2</b>   | 85.1  | 34 | 159 | - | T-G                   |
| <b>463.2</b>   | 113.1 | 29 | 159 | - | T-G                   |
| <b>463.201</b> | 113   | 29 | 149 | - | E3-17G                |
| <b>463.201</b> | 287.2 | 33 | 149 | - | E3-17G                |
| <b>463.202</b> | 113   | 23 | 149 | - | E3-3G                 |
| <b>463.202</b> | 287.2 | 43 | 149 | - | E3-3G                 |
| <b>463.23</b>  | 75.1  | 32 | 149 | - | DHEA-G                |

|               |       |    |     |   |               |
|---------------|-------|----|-----|---|---------------|
| <b>463.23</b> | 113   | 28 | 149 | - | DHEA-G        |
| <b>465.2</b>  | 75.1  | 37 | 149 | - | A-G, EA-G     |
| <b>465.2</b>  | 113   | 30 | 149 | - | A-G, EA-G     |
| <b>465.3</b>  | 75.4  | 37 | 112 | - | Etiochol-G    |
| <b>465.3</b>  | 85.3  | 39 | 112 | - | Etiochol-G    |
| <b>491.2</b>  | 71.2  | 36 | 159 | - | P-en-G        |
| <b>491.2</b>  | 113   | 30 | 159 | - | P-en-G        |
| <b>493.2</b>  | 75.1  | 36 | 152 | - | 17a-OH-P-an-G |
| <b>493.2</b>  | 85.1  | 36 | 152 | - | 17-OH-P-an-G  |
| <b>493.2</b>  | 113   | 35 | 152 | - | 17a-OH-P-an-G |
| <b>495.3</b>  | 75.5  | 39 | 122 | - | Pan-diol-G    |
| <b>495.3</b>  | 113.3 | 34 | 122 | - | Pan-diol-G    |
| <b>507.27</b> | 85.1  | 39 | 154 | - | DHP-G         |
| <b>507.27</b> | 113   | 33 | 154 | - | DHP-G         |
| <b>511.3</b>  | 75    | 34 | 180 | - | DHT-G         |
| <b>511.3</b>  | 113   | 31 | 180 | - | DHT-G         |
| <b>527.18</b> | 97    | 62 | 151 | - | E2-3G-17S     |
| <b>527.18</b> | 351.2 | 36 | 151 | - | E2-3G-17S     |
| <b>537.2</b>  | 113.1 | 36 | 146 | - | Cort-G        |
| <b>537.2</b>  | 331.2 | 35 | 146 | - | Cort-G        |