

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na stanovení  
vybraných pohlavních a stresových hormonů savců pomocí LC/MS**

**Bakalářská práce**

**Filip Štrach**

Školitel: Ing. David Kahoun, Ph.D.

České Budějovice 2023

Štrach, F., 2023: Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na stanovení vybraných pohlavních a stresových hormonů savců pomocí LC/MS. [Development, optimization and validation of an analytical method for determination of selected sex and stress hormones of mammals by LC/MS. Bc. Thesis in Czech.] – 75 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## **Anotace**

The aim of this bachelor thesis is to develop, optimize, and validate an analytical method for determination of three female sex hormones (progesterone, estrone, and estradiol) and two stress hormones (cortisol, and corticosterone) in hyena fecal samples. The importance of hormone monitoring is described in the theoretical part. Moreover, the characteristics of selected steroids hormones and the possibilities of their determination are also presented in the theoretical part. The practical part describes the optimization steps for high-performance liquid chromatography (injection volume) and mass detection (S and F lens potential, capillary voltage, collision energy, auxiliary and sheath gas flow rate, the effect of mobile phase additives on ionization). Furthermore, the validation of the analytical method and the application of the method to real samples are described here.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích 7.12.2023

.....

Filip Štrach

**Klíčová slova**

Steroidní hormony, progesteron, estron, estradiol, kortizol, kortikosteron, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie.

**Key words**

Steroid hormones, progesterone, estrone, estradiol, cortisol, corticosterone, liquid chromatography, mass spectrometry.

### **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěl poděkovat vedoucímu práce Ing. Davidu Kahounovi, Ph.D., také bych rád poděkoval Zoo Praha a MVDr. Romanu Vodičkovi, Ph.D. za poskytnutí vzorků.

A především bych chtěl vyjádřit obrovský dík svým blízkým za poskytnutou podporu a motivaci.

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Cíle práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Teoretická část</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Vliv hormonů na reprodukci</b> .....	<b>3</b>
3.1.1	Význam monitoringu hormonů .....	3
3.1.2	Regulace ovariálního cyklu hormonálním systémem.....	3
3.1.3	Vliv stresu na reprodukci .....	5
<b>3.2</b>	<b>Steroidy</b> .....	<b>6</b>
3.2.1	Charakteristika steroidů.....	6
3.2.2	Steroidní hormony .....	6
<b>3.3</b>	<b>Hormony vhodné pro sledování reprodukčních funkcí a míry stresu a metody odběru vzorků od zvířat</b> .....	<b>9</b>
<b>3.4</b>	<b>Možnosti stanovení steroidních hormonů</b> .....	<b>10</b>
3.4.1	Imunochemické metody.....	10
3.4.2	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí .....	10
<b>3.5</b>	<b>Stanovení steroidních hormonů pomocí LC-MS</b> .....	<b>11</b>
<b>4</b>	<b>Materiál a metody</b> .....	<b>15</b>
<b>4.1</b>	<b>Chemikálie</b> .....	<b>15</b>
<b>4.2</b>	<b>Přístroje a spotřební materiál</b> .....	<b>16</b>
<b>4.3</b>	<b>Příprava roztoků</b> .....	<b>17</b>
4.3.1	Příprava mobilních fází.....	17
4.3.2	Příprava individuálních zásobních roztoků .....	17
4.3.3	Příprava směsných pracovních roztoků .....	18
4.3.4	Příprava kalibračních roztoků.....	20
4.3.5	Příprava vzorků trusu.....	21
<b>5</b>	<b>Výsledky a diskuse</b> .....	<b>23</b>
<b>5.1</b>	<b>Optimalizace podmínek chromatografické separace</b> .....	<b>23</b>
5.1.1	Testovací analýza.....	23
5.1.2	Optimalizace objemu nástřiku .....	26

<b>5.2</b>	<b>Optimalizace podmínek hmotnostní detekce .....</b>	<b>27</b>
5.2.1	Optimalizace nastavení iontové optiky.....	28
5.2.2	Optimalizace podmínek elektrospreje .....	29
5.2.3	Optimalizace kolizní energie .....	32
5.2.4	Vliv mobilní fáze na ionizaci.....	32
5.2.5	Přehled metody po optimalizaci chromatografické separace a hmotnostní detekce ..	34
<b>5.3</b>	<b>Validace analytické metody .....</b>	<b>36</b>
5.3.1	Linearita.....	36
5.3.2	Správnost a přesnost .....	37
5.3.3	Rozsah metody.....	39
5.3.4	Mez stanovitelnosti.....	39
<b>5.4</b>	<b>Validace metody pro použití na reálné vzorky trusu .....</b>	<b>39</b>
<b>5.5</b>	<b>Výsledky analýz vzorků trusu .....</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>42</b>
<b>7</b>	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>43</b>
<b>8</b>	<b>Seznam symbolů a zkratk .....</b>	<b>47</b>
<b>9</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>49</b>
9.1	Příloha A.....	49
9.2	Příloha B.....	49
9.3	Příloha C.....	50
9.4	Příloha D.....	51
9.5	Příloha E.....	53
9.6	Příloha F .....	64
9.7	Příloha G .....	68
9.8	Příloha H .....	73

# 1 Úvod

Mnoho živočišných druhů se dnes ocitá na pomezí ohrožení vlivem ničení životního prostředí. Zvířata chovaná v zajetí tedy mohou sloužit k udržení stálé populace těchto zvířat a zachování druhové rozmanitosti. U zvířat chovaných v zajetí jsou však pozorovány potíže s reprodukcí, které této problematice nepřispívají. Pro dosažení úspěšné reprodukce v podmínkách zajetí, je podstatné znát reprodukční cyklus daných zvířat, zejména kdy u samic dochází či dojde k ovulaci, která je nejdůležitější fází pro úspěšnou reprodukci. Z toho důvodu je velmi důležité monitorovat hladiny hormonů spojených s aktivitou vaječnicků, které řídí reprodukci. Koncentrace těchto hormonů jsou v organismech velmi nízké, proto je nutné používat dostatečně citlivé metody, často se používají imunochemické techniky nebo LC/MS. Za účelem zjištění koncentrace hormonů v organismu je nutné odebírat vzorky, což je možné provádět invazivní a neinvazivní metodou. Invazivní metody jsou často poměrně stresující a vysoká míra stresu může mít negativní vliv na reprodukci. Proto je vhodné provádět neinvazivní odběry vzorků, jako je například sběr moči nebo trusu. Tato práce se bude zabývat vývojem metody pro měření pohlavních a stresových hormonů pomocí LC/MS. Metoda bude vyvíjena pro měření vzorků trusu pocházejících od hyen čabrakových chovaných v Zoo Praha. Metoda je vyvíjena za účelem monitorování vybraných hormonů, které mají vliv na reprodukci.

## 2 Cíle práce

- 1) Vypracovat literární rešerši na dané téma.
- 2) Vypracovat analytickou metodu na stanovení pohlavních a stresových hormonů savců pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (LC/MS) včetně provedení základní optimalizace této analytické metody.
- 3) Provést validaci analytické metody pro použití na analýzu modelových vzorků neobsahující přírodní matrici.
- 4) V případě dostupnosti vzorků a dostatečných časových možností vyzkoušet vhodnost analytické metody pro použití na analýzu reálných vzorků obsahující vybranou přírodní matrici (trus).



## 3 Teoretická část

### 3.1 Vliv hormonů na reprodukci

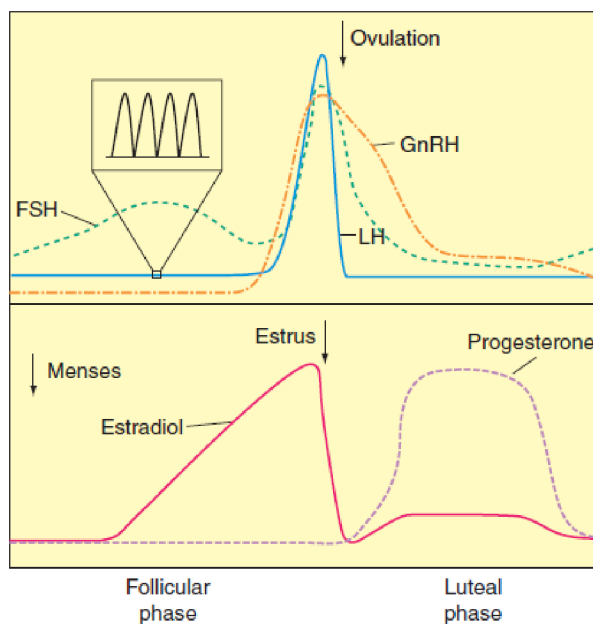
#### 3.1.1 Význam monitoringu hormonů

Monitoring hormonů v těle nebo exkrementech zvířat může být významnou pomůckou pro management chovu, protože znalost jejich aktuálního reprodukčního stavu může zefektivnit rozmnožování nejen přirozenou cestou, ale také asistovanou reprodukcí, jako je například umělé oplodnění. Z tohoto hlediska se jedná o důležitý nástroj při snaze o zvyšování početnosti konkrétní populace zvířat, zejména ohrožených druhů. Pro pochopení reprodukčních procesů je nutné také dobře znát endokrinní funkce, jelikož reprodukce je řízena hormony [1].

#### 3.1.2 Regulace ovariálního cyklu hormonálním systémem

U samic savců je činnost vaječníků, a tedy reprodukce, řízena vzájemným působením hormonů, které jsou produkovány v hypothalamu, hypofýze a vaječniku. V hypothalamu je syntetizován gonadotropiny uvolňující hormon (GnRH), jedná se o dekaeptidický hormon, který je transportován specializovanými kapilárami do hypofýzy. Hormon GnRH vyvolává v hypofýze syntézu folikuly stimulujícího hormonu (FSH) a luteinizačního hormonu (LH), oba tyto gonadotropní hormony patří mezi glykoproteiny s molekulovou hmotností kolem 30 kDa [2, 3]. Oběhovou soustavou jsou FSH a LH transportovány z hypofýzy do vaječníků, kde stimulují tvorbu steroidních hormonů. Jedná se o estrogeny a gestageny. Z estrogenů je nejvýznamnější estradiol. Z gestagenů je nejvýznamnější progesteron. Estrogeny mají jako hlavní funkci podnícení růstu a proliferace tkání pohlavních orgánů a dalších orgánů spojených s reprodukcí. Hlavní funkcí progesteronu je podnícení změn v endometriu dělohy ve druhé půlce ovariálního cyklu, aby došlo v případě oplození vajíčka k jeho zachycení. První fází ovariálního cyklu je fáze folikulární. Koncentrační hladiny hormonů FSH a LH v krvi se postupně zvyšují, čímž dochází k vysoké proliferaci a růstu folikulárních a thekálních buněk ve vaječnících, které v této fázi produkují hlavně estrogeny a v menší míře progesteron. S produkcí estrogenů souvisí růst folikulů, přičemž jeden z folikulů (u některých druhů i více) začne růst rychleji, postupně se stane dominantním a vyvine se z něho Graafův folikul. Poté dochází k ovulační fázi, přibližně v polovině cyklu. V této fázi dochází k prasknutí Graafova folikulu a vyplavení vajíčka do dělohy. Následuje luteální fáze. Z Graafova folikulu se stane *corpus luteum* (žluté tělísko), tato

změna je způsobena zejména LH. *Corpus luteum* začíná ve vysoké míře produkovat především progesteron a v menší míře i estrogeny. Pokud nedojde k oplození vajíčka, tak se *corpus luteum* regreduje a na konci cyklu zaniká [3–5]. Během ovariálního cyklu se v krvi mění koncentrace gonadotropních hormonů, estrogenů a gestagenů. Na obrázku Obr. 1 je znázorněno, jak se mění koncentrační hladiny v krevní plazmě hormonů GnRH, FSH, LH, estradiolu a progesteronu během estrálního nebo menstruačního cyklu.



**Obr. 1:** Změny koncentrací hormonů GnRH, LH, FSH, estradiolu a progesteronu v těle savců během estrálního nebo menstruačního cyklu [5].

Změny koncentrací výše uvedených hormonů během ovariálního cyklu lze vysvětlit jejich vzájemným působením na endokrinní žlázy, které je vylučují. Estrogeny mají negativní vliv na produkci FSH a LH přímo v hypofýze, ale i na produkci GnRH v hypothalamu, jejich negativní účinek může být ještě násoben přítomností progesteronu. Potlačení produkce FSH a LH přímo v hypofýze se navíc účastní ještě inhibin, jedná se o proteinový hormon, který je produkován v *corpus luteum*. Nicméně vylučování FSH a LH jeden až dva dny před ovulací nejdříve mírně poklesne a poté prudce vzroste. V publikaci [3] bylo popsáno, že se jedná o pozitivní účinek estrogenů na produkci gonadotropních hormonů, ale tento jev ještě nebyl důkladně prostudován. Pozitivní účinek na produkci gonadotropních hormonů má i aktivin, jedná se o proteinový hormon, který je produkován ve folikulárních buňkách. Výše uvedené efekty jednotlivých hormonů, které vzájemně působí na svou produkci, popisuje obrázek Obr. 2.

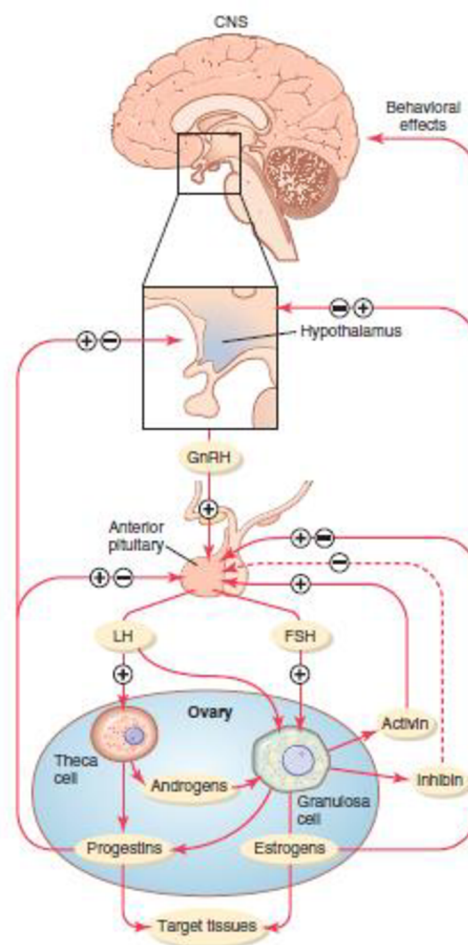
U většiny savců (všech placentálních savců vyjma primátů) se vyskytuje estrální cyklus, kdy během fáze estrus dochází k ovulaci. Ovulace může být spontánní nebo indukovaná.

Některá zvířata jsou polyestrická, kdy k fázi estrus dochází stále a pravidelně během celého roku, nebo i jen monoestrická, kdy k fázi estrus dojde jen jednou za rok během určitého období, přičemž délka estrálního cyklu je také specifická pro každý druh [2]. Monitoring pohlavních hormonů tedy může sloužit jako vhodný nástroj pro určení období, kdy dojde k ovulaci.

### 3.1.3 Vliv stresu na reprodukci

Stres lze popsat jako stav narušené homeostázy organismu, který je způsoben jakýmkoliv vnějším nebo vnitřním fyzickým nebo psychologickým podnětem čili stresem [6, 7].

Aby se zvířata zvládla vypořádat se stresem, dochází ke změně chování, fyziologických a endokrinních funkcí. Co se týče endokrinních funkcí, stres vyvolá změny v činnosti na ose hypothalamus, hypofýza a nadledviny. To zapříčiní, že v organismu dojde ke zvýšení hladiny glukokortikoidů, které jsou produkovány v nadledvinách. Glukokortikoidy se podílí na regulaci energetického metabolismu, srdeční činnosti, imunity i reprodukce [6, 8, 9]. Fyziologická hladina glukokortikoidů je důležitá pro celkové zdraví organismu a správnou činnost reprodukčního systému. Zvýšená koncentrační úroveň glukokortikoidů snižuje plodnost u obou pohlaví [9].

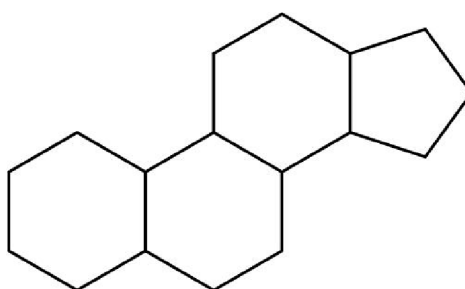


**Obr. 2:** Zpětnovazebná regulace produkce GnRH, gonadotropních a ženských steroidních hormonů [3].

## 3.2 Steroidy

### 3.2.1 Charakteristika steroidů

Steroidy představují jednu z významných skupin lipidů. Jedná se tedy nepolární látky, které lze extrahovat organickými rozpouštědly. Všechny steroidy mají společnou chemickou strukturu, která je odvozena od triterpenoidu lanosterolu, patří tedy do skupiny isoprenoidů. Základní skelet steroidů je tvořen tetracyklickým systémem, ve kterém jsou tři šestičlenné a jeden pětičlenný kruh. Tento skelet se nazývá steran, jedná se o cyklopentanoperhydrofenanthrenový systém [10, 11], který je zobrazen na obrázku Obr. 3.

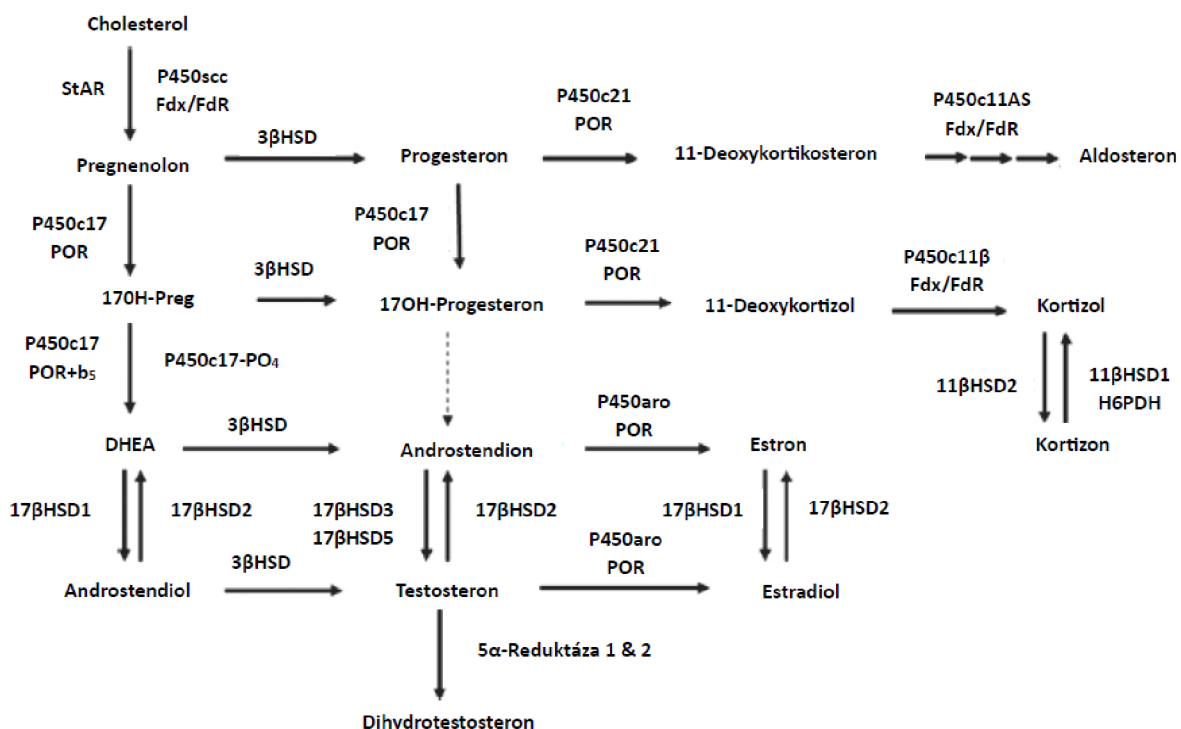


**Obr. 3:** Steran—základní skelet steroidů.

Steroidy jsou velkou a pestrou skupinou látek. Nacházejí se jak u živočichů, tak i u rostlin. Celkem je známo přes 20 000 steroidních látek, řada z nich plní regulační funkce v organismech. Různorodost steroidů je dána počtem a pozicí dvojných vazeb i odlišností substituentů a jejich počtem, pozicí a konfigurací ve steranovém systému [10].

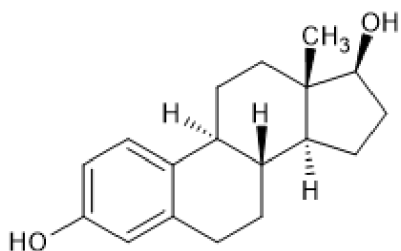
### 3.2.2 Steroidní hormony

Nejdůležitější jsou u savců dvě skupiny steroidů s hormonální aktivitou. Jsou to pohlavní hormony, které jsou především syntetizovány buď ve varlatech nebo ve vaječnících, a kortikoidy, které jsou vylučovány kůrou nadledvin. Syntéza všech steroidních hormonů vychází z cholesterolu [10]. Schéma biosyntézy některých pohlavních steroidních hormonů a kortikosteroidů je zobrazeno na Obr. 4

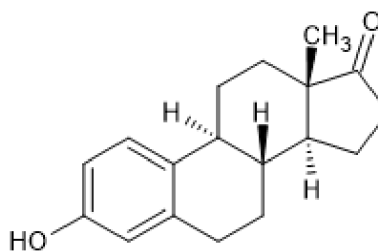


**Obr. 4:** Schéma hlavních metabolických drah syntézy steroidních hormonů, převzato z [12].

Funkce pohlavních hormonů spočívá v řízení dospívání, reprodukce a vývoje sekundárních pohlavních znaků. Mužské pohlavní hormony se nazývají androgeny. Jeden z nejdůležitějších zástupců androgenů je testosteron. Androgeny stimulují spermatogenezi a také anabolické procesy, které zejména vedou k růstu svalů. Ženské pohlavní hormony se dělí na dvě skupiny, a to estrogeny a gestageny. Estrogeny řídí vývoj sekundárních pohlavních znaků a průběh ženských pohlavních cyklů, nejdůležitějšími zástupci jsou 17β-estradiol (E2), estron (E1) a estriol. Na obrázku Obr. 5 je uvedena struktura 17β-estradiolu a na Obr. 6 je uvedena struktura estronu.

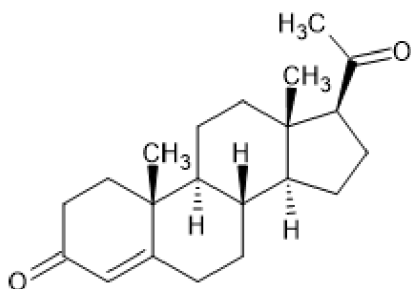


**Obr. 5:** Struktura 17β-estradiolu.



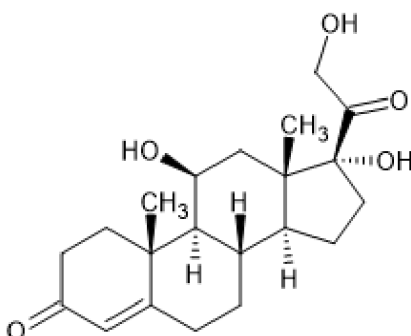
**Obr. 6:** Struktura estronu.

Gestageny řídí průběh těhotenství a připravují děložní sliznici pro implantaci oplozeného vajíčka, nejdůležitějším zástupcem je progesteron (P4). Na obrázku Obr. 7 je uvedena struktura progesteronu.

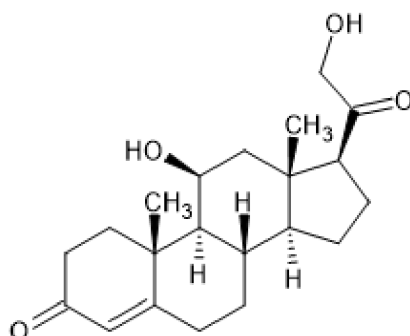


**Obr. 7:** Struktura progesteronu.

Kortikoidy se dělí na dvě skupiny. Mineralokortikoidy regulují v organismu koncentraci sodných, draselných, chloridových a hydrogenuhličitanových iontů, nejvýznamnějším zástupcem je aldosteron. Glukokortikoidy regulují metabolismus glukosy-stimulují tvorbu glykogenu a působí na zánětlivé procesy, nejvýznamnějšími zástupci jsou kortizol (F) a kortikosteron (B) [10, 11]. Na obrázku Obr. 8 je uvedena struktura kortizolu a na Obr. 9 je uvedena struktura kortikosteronu.



**Obr. 8:** Struktura kortizolu.



**Obr. 9:** Struktura kortikosteronu.

### 3.3 Hormony vhodné pro sledování reprodukčních funkcí a míry stresu a metody odběru vzorků od zvířat

Pro sledování reprodukčních funkcí se u samic savců používají steroidní hormony E2, E1, P4 a jejich metabolity. Využívají se jak ke sledování průběhu ovariálního a estrálního cyklu, tak i ke sledování průběhu těhotenství [1, 13–17]. Výše tři uvedené hormony lze stanovit přímo v krvi. Odběr krve je ovšem invazivní metoda, která je pro zvířata téměř vždy velmi stresující. Vlivem vysoké míry stresu pak může dojít ke zhoršení reprodukčních funkcí nebo i potratu. Proto je vhodnější zvolit neinvazivní způsob odběru vzorků [13]. Koncentrace pohlavních hormonů a jejich metabolitů lze stanovit například ve slinách, srsti, moči nebo trusu [1]. Odběr trusu má řadu výhod – je snadný, není potřeba manipulace se zvířaty, lze jej bez obtíží provádět opakovaně a je možné jej provést i u zvířat žijících volně v přírodě. Z těchto důvodů je odběr trusu dobře proveditelnou a vhodnou vzorkovací metodou [1, 18]. Byla zjištěna korelace koncentrací pohlavních hormonů a jejich metabolitů v krvi a trusu [13]. Významná korelace hodnot koncentrace progesteronu v krevním séru a v trusu byla zjištěna i v rámci studie, která byla provedena u dvou žirafích samic. Se zvyšující se anebo snižující se koncentrací progesteronu v krevním séru, se zvyšovala anebo snižovala koncentrace progesteronu a jeho metabolitů v trusu. Spolu s tím byla zjištěna souvislost mezi zvyšující se koncentrací progesteronu a estradiolu v trusu a růstem *corpus luteum* a Graafova folikulu [19].

Pro sledování míry stresu u zvířat se používají glukokortikoidy, často se jedná o kortizol, kortikosteron a jejich metabolity [6–8, 20]. Glukokortikoidy se používají také k monitoringu fyziologických funkcí a úrovně životní pohody (tzv. welfare) u mnoha druhů zvířat [8]. Z výše uvedených důvodů se používají vzorky trusu i pro měření hladiny glukokortikoidů v organismu [21]. Byla zjištěna korelace koncentrací glukokortikoidů v trusu a krevní plazmě [7]. Například v práci [22] byla u koní zjištěna významná korelace mezi koncentrací kortizolu v plazmě a koncentrací kortizolu a jeho metabolitů v trusu. V práci [23] byla u kuřat zjištěna významná korelace kortikosteronu v plazmě a metabolitů kortikosteronu v trusu. Glukokortikoidy se ve zvýšené míře tvoří jako odpověď na stres a svými účinky umožňují organismu se s ním vypořádat, nicméně je lze považovat jako důležité, ale nikoliv absolutní, ukazatele míry stresu [6].

## **3.4 Možnosti stanovení steroidních hormonů**

### **3.4.1 Imunochemické metody**

Principem imunochemických metod je vazba mezi konkrétní protilátkou a vybraným antigenem. S tím souvisí selektivita imunochemických metod, která je závislá hlavně na tom, v jak velké míře se protilátka specificky váže na vybraný antigen. U protilátek může docházet ke zkřížené reaktivitě, kdy se protilátka váže kromě vybraného antigenu také na antigeny s podobnou strukturou. Vzhledem k tomu, že všechny steroidy jsou si strukturně velmi podobné, jedná se o potenciálně významný problém při stanovení jen vybraných steroidů, zvláště ve velmi složitých matricích jako je například trus [24, 25]. Následkem nedostatečně vysoké specifity protilátky je snížení spolehlivosti metody, jelikož dochází ke zkřížené reaktivitě. Tudiž pokud mají protilátky nízkou specifitu k antigenu, nelze spolehlivě stanovit pouze jednu konkrétní látku, například estradiol, ale jako validní lze považovat stanovení jedné určité skupiny, například estrogenů [24]. Imunochemickými metodami lze stanovovat současně jen jednu látku a protilátky proti některým neobvyklým steroidům nemusí být dostupné. Nicméně imunochemické metody jsou poměrně snadné na provedení a na stanovení steroidních hormonů se využívají již mnoho let.

### **3.4.2 Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí**

Chromatografie se řadí mezi separační techniky a jejím cílem je, co nejlépe od sebe rozdělit jednotlivé složky v analyzované směsi. Při spojení s vhodným detektorem umožňuje dále provádět identifikaci a případně i stanovení obsahu chemických látek [26, 27].

Separace v chromatografii začíná nanesením vzorku na začátek stacionární fáze, která je ukotvena v koloně nebo na plochem povrchu. Proud mobilní fáze způsobí transport separovaných látek přes stacionární fázi, kde dochází vlivem rozdílné intenzity fyzikálně chemických interakcí analyzovaných látek se stacionární a mobilní fází k postupnému rozdělování do jednotlivých zón. [26–28]. V současné době je nejvíce rozšířeným typem eluční chromatografie vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [27, 28].

Hmotnostní spektrometrie (MS) je nejuniverzálnější a zároveň nejvíce specifickou detekční technikou používanou v kombinaci se separačními metodami. Pomocí této techniky lze získat informace nejen o kvantitativním složení vzorku, ale i o struktuře analyzovaných látek.



Základními částmi hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor iontů [26, 27].

V hmotnostní spektrometrii musí být analyzované látky nejprve převedeny na ionty. Ionty se poté dále pohybují systémem, kde jsou rozděleny podle svého poměru hmotnosti a náboje. Následně dopadají na detektor, kde podle množství iontů vzniká signál. Výstupem z hmotnostního spektrometru je hmotnostní spektrum, jedná se o graf závislosti relativního zastoupení iontů jako funkce jejich hodnot  $m/z$ . [27].

Spojení LC a MS přináší jedinečné výhody. Díky chromatografické separaci lze pro spolehlivější identifikaci látek použít i informace o retenčních časech, což v kombinaci se získanými hmotnostními spektry umožňuje zjistit i případnou koeluci více látek. Díky těmto výhodám je spojení těchto technik zvláště významné pro analýzu složitých směsí, jako jsou například biologické vzorky [26, 28].

Technika LC/MS umožňuje kvantitativní analýzu i více látek najednou během jedné analýzy, zatímco pomocí imunochemických metod lze během jedné analýzy kvantifikovat jen jednu látku, popř. strukturně podobnou skupinu látek. Dále se tato technika vyznačuje velmi vysokou selektivitou, ve srovnání s imunochemickými metodami, u kterých může docházet ke zkřížené reaktivitě. Co se týče kvantifikace analytů, metoda LC/MS také umožňuje použití vnitřních standardů, což v imunochemických metodách není možné. Avšak u LC/MS může být v některých případech velmi významný vliv matrice, který může potlačit nebo i naopak zvýšit míru ionizace analytu, což poté může vést k problémům či přímo k nemožnosti kvantitativního stanovení. Ve srovnání s imunochemickými metodami se sice jedná o instrumentálně náročnou techniku, nicméně řada výhod metody LC-MS vede ke stále zvyšující míře používání této metody při analýzách steroidních hormonů [25, 26].

### **3.5 Stanovení steroidních hormonů pomocí LC-MS**

Stanovením steroidních hormonů pomocí LC-MS se do současné doby zabývalo již poměrně velké množství prací. Jako vzorky byly použity různé biologické matrice, jako je například krev, moč, sliny nebo různé druhy tkání. Ovšem použití této techniky na analýzu vzorků trusu není příliš časté, a to i přes to, že tato technika má mnohé výhody oproti imunochemickým metodám, které se používají na tento druh vzorků poměrně často [25, 26].

V Tab. 1 je uvedeno několik příkladů metod, ve kterých byly analyzovány steroidní hormony. V přehledu je uvedeno, zda byla provedena derivatizace, dále použitá mobilní fáze, chromatografická kolona, typ hmotnostního analyzátoru, přehled dolní meze stanovitelnosti a meze detekce pro jednotlivé hormony a také je uveden typ analyzovaného vzorku. Pro lepší přehlednost byly některé původní údaje a jednotky přepočteny na pg/ml nebo pg/g.

Pět z šesti uvedených prací v Tab. 1 používají pro vyjádření meze detekce nebo stanovitelnosti stejné jednotky a v jedné práci používají odlišné jednotky, z toho důvodu nelze porovnávat všech šest uvedených prací.

Nejnižší meze detekce estronu i estradiolu bylo dosaženo v práci [29] a to  $1,67 \times$  nižší než v druhé práci [30]. Naproti tomu je zajímavé, že nejnižší meze detekce progesteronu bylo dosaženo právě v práci [30] a to dokonce  $30 \times$  nižší než v práci [29]. Může to být způsobeno odlišným složením mobilní fáze. V práci [29] byl použit methanol jako mobilní fáze s vyšší eluční silou, naproti tomu v práci [30] byl použit acetonitril. Jako mobilní fáze s nižší eluční silou byl v obou případech použit vodný roztok fluoridu amonného, ovšem v práci [29] byla jeho koncentrace nižší. Dále v práci [29] byla použita chromatografická kolona s bifenylovou náplní a v práci [30] kolona s oktadecylovou náplní. Naopak obě práce se shodovaly tím, že byl použit stejný způsob ionizace a stejný typ hmotnostního analyzátoru. V obou pracích se také pracovalo se shodnými MRM přechody všech tří látek.

Nejnižší dolní meze stanovitelnosti estronu a estradiolu bylo dosaženo v práci [31]. V tomto případě se dokonce podařilo dosáhnout meze stanovitelnosti, která je  $1,5 \times$  nižší, než je mez detekce v práci [29]. Toho mohlo být docíleno díky derivatizaci estronu a estradiolu pomocí dansylchloridu, což mohlo vést k vyšší citlivosti. Ve srovnání s ostatními metodami, ve kterých byl použit jako hmotnostní analyzátor pouze trojitý kvadrupól, byla v této práci použita kombinace trojitého kvadrupólu s orbitální pastí, což také mohlo přispět ke zvýšení citlivosti. Nicméně dolní mez stanovitelnosti pro estron je jen  $1,2 \times$  nižší než v práci [32] a pro estradiol je jen  $5 \times$  nižší než v práci [29]. Nejnižší dolní mez stanovitelnosti pro progesteron byla dosažena v práci [29], jednalo se o hodnotu, která byla téměř  $4,2 \times$  nižší než v práci [32] a dokonce  $10 \times$  nižší než v práci [31].

**Tab. 1:** Analyzované hormony, základní parametry metod, dolní mez stanovitelnosti, mez detekce.

Analyzované hormony	Derivatizace	Mobilní Fáze	Chromatografická kolona	Způsob ionizace	Hmotnostní analyzátor	Dolní mez stanovitelnosti	Mez detekce	Matrice	Citace
Estron Estradiol Progesteron	Neprovedena	A = 0,15 mM NH <sub>4</sub> F ve vodě B = Methanol	Raptor Biphenyl (50 mm × 2,1 mm, 2,7 μm)	ESI - ESI - ESI +	QqQ	10 pg/ml 10 pg/ml 10 pg/ml	3 pg/ml 3 pg/ml 3 pg/ml	Lidské sérum	[29]
Estron Estradiol Progesteron Kortizol Kortikosteron	Neprovedena	A = 0,2 mM NH <sub>4</sub> F ve vodě B = 0,2 mM NH <sub>4</sub> F v 95% methanolu	Kinetex Biphenyl (100 × 2,1 mm, 1,7 μm)	ESI - ESI - ESI + ESI - ESI -	QqQ	3,60 pg/ml 18,2 pg/ml 41,8 pg/ml 121 pg/ml 116 pg/ml	Neuvedena	Lidské sérum a tkáň endometria	[32]
Estron Estradiol Progesteron	Dansylchlorid Dansylchlorid Neprovedena	A = 0,02% NH <sub>4</sub> F ve vodě B = Acetonitril	BEH C18 (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm)	ESI - ESI - ESI +	QqQ- Orbitrap	2 pg/ml 2 pg/ml 100 pg/ml	Neuvedena	Koňské a bizoní sérum	[31]
Estron Estradiol Progesteron	Neprovedena	A = Acetonitril B = 1 mM NH <sub>4</sub> F ve vodě	EC-C18 (150 mm × 2,1 mm, 2,7 μm)	ESI - ESI - ESI +	QqQ	neuvedena	5 pg/ml 5 pg/ml 0,1 pg/ml	Vodovodní voda	[30]
Estron Estradiol Progesteron Kortizol Kortikosteron	Dansylchlorid Dansylchlorid Neprovedena Neprovedena Neprovedena	Pro progesteron, estron, estradiol: A = Methanol, B = Acetonitril A i B obsahovaly 0,1% kyselinu mravenčí. Pro kortizol, kortikosteron: A = Methanol, B = Voda A i B obsahovaly 0,1% kyselinu octovou.	Pro progesteron, estron, estradiol: Restek Ultra Biphenyl (250 mm × 4,6 mm, 5 μm) Pro kortizol, kortikosteron: Agilent Eclipse Plus C18 (150 mm × 21 mm, 5 μm)	ESI - ESI - ESI + ESI + ESI +	QqQ	13,6 pg/g 339 pg/g 56,0 pg/g 47,0 pg/g 399 pg/g	2,96 pg/g 76,9 pg/g 28,2 pg/g 3,37 pg/g 22,4 pg/g	Velrybí tuk z keporkaka	[33]
Progesteron	Neprovedena	A = Voda, B = Methanol A i B obsahovaly 0,1% kyselinu mravenčí a 5 mM octanu amonného	Accucore™ Polar Premium (150 mm × 2,1 mm; 2,6 μm)	ESI +	QqQ	5660 pg/ml	Neuvedena	Myší trus	[34]

To je poměrně překvapivý výsledek, vzhledem k použité kombinaci hmotnostních analyzátorů v práci [31], které přinesly horší výsledek. V práci [32] byly hodnoty dolní meze stanovitelnosti pro kortizol a kortikosteron velmi podobné, lišící se jen o téměř čtyři procenta. Zatímco v práci [33] byla pro kortizol  $8,5 \times$  nižší než pro kortikosteron. Mohlo to být způsobenou odlišnou polaritou ESI a také odlišnou látkou, která byla použita pro zvýšení ionizace analytů. V práci [32] se jednalo o fluorid amonný a v práci [33] se jednalo o kyselinu octovou.

Z prací v Tab. 1 vyplývá, že ke zvýšení citlivosti metody na estron a estradiol, lze tyto dvě látky derivatizovat pomocí dansylchloridu. Ve výše uvedených pracích pro analýzu steroidních hormonů byly použity jako mobilní fáze s vyšší eluční silou acetonitril nebo methanol a jako mobilní fáze s nižší eluční silou byla nejčastěji použita voda s přídavkem fluoridu amonného. Z prací v Tab. 1 také vyplývá, že je vhodné ke stanovení steroidů používat chromatografické kolony s bifenylovou nebo C18 fází. Na základě těchto prací, se jako vhodný způsob ionizace steroidů jeví použití ESI.

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Chemikálie

- Standardy analytů
  - Progesteron (VETRANAL, analytical standard) (M = 314,46 g/mol; čistota:  $\geq 98,0 \%$ ; CAS: 57-83-0)
  - Estron (VETRANAL, analytical standard) (M = 270,37 g/mol; čistota:  $\geq 98,0 \%$ ; CAS: 53-16-7)
  - Estradiol (Supelco, Pharmaceutical Secondary Standard) (M = 272,38 g/mol; čistota:  $\geq 96,5 \%$ ; CAS: 50-28-2)
  - Kortizol (VETRANAL, analytical standard) (M = 362,46 g/mol; čistota:  $\geq 98,0 \%$ ; CAS: 50-23-7)
  - Kortikosteron (VETRANAL, analytical standard) (M = 346,46 g/mol; čistota:  $98,0 \%$ ; CAS: 50-22-6)
- Vnitřní standardy analytů
  - Progesteron-2,3,4,20,21-<sup>13</sup>C<sub>5</sub> (Sigma Aldrich) (M = 319,42 g/mol; čistota:  $\geq 98 \%$ ; CAS: 2687960-32-1)
  - Estron-2,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> (Sigma Aldrich) (M = 273,34 g/mol; čistota:  $\geq 98,0 \%$ ; koncentrace = 90,0-110,0  $\mu\text{g/ml}$ ; CAS: 1241684-29-6)
  - Estradiol-2,3,4-<sup>13</sup>C<sub>3</sub> (Sigma Aldrich) (M = 275,33 g/mol; čistota:  $\geq 98 \%$ ; CAS: 1261254-48-1)
  - Kortizol-9,11,12,12-d<sub>4</sub> (Sigma Aldrich) (M = 366,48 g/mol; čistota:  $\geq 98 \%$ ; CAS: 73565-87-4)
  - Kortikosteron-9,11,12,12-d<sub>4</sub> (Sigma Aldrich) (M = 350,49 g/mol; čistota:  $\geq 97 \%$ ; CAS: neuvedeno)
- Fluorid amonný (Sigma Aldrich) (čistota:  $> 99,99 \%$ , LC/MS)
- Kyselina mravenčí (Merck KGaA) (čistota:  $98-100 \%$ )
- Acetonitril (VWR Chemicals) (čistota:  $100 \%$ , LC/MS)
- Deionizovaná voda generovaná přístrojem Water purification system Smart2Pure (Thermo)

## 4.2 Přístroje a spotřební materiál

- Kapalinový chromatograf UltiMate 3000 (Thermo) s hmotnostním detektorem Velos Pro (Thermo) vybavený vyhřívaným elektrosprejem
- Chromatografická kolona Kinetex EVO C18 (150 × 3,0 mm; 2,6 μm) s kompatibilní předkolonou (Phenomenex)
- Analytické váhy MS105DU (Mettler Toledo) – maximální váživost: 120 g s odečitatelností 0,1 mg (42 g s odečitatelností 0,01 mg)
- Výrobek deionizované vody Water purification system Smart2Pure (Thermo)
- Generátor dusíku 1022 (Peak Scientific)
- Termoblok SBH130D/3 (Stuart) s koncentrátorem vzorků SBHCONC/1 (Stuart)
- Vortex Analog Vortex Mixer (VWR)
- Orbitální třepačka Orbit 1000 (Labnet)
- Centrifuga 3-30 K (Sigma)
- Chromatografické krimpovací vialky 2 ml (Agilent Technologies)
- Krimpovací víčka 11 mm, PTFE/silikon (Agilent Technologies)
- Parafilm
- Centrifugační zkumavky 15 ml
- Skleněné kuličky o průměru 3 mm
- Sada automatických pipet v rozsahu 10–100 μl, 100–1000 μl, 1–10 ml
- Špičky pro pipety 10–100 μl, 100–1000 μl, 1–10 ml
- Skleněné vialky 24 ml
- Kádinky o objemu 25 ml
- Odměrné baňky o objemu 10, 25 a 100 ml, třída přesnosti A
- Software Thermo Scientific Xcalibur (Thermo)
- Software LTQ Tune Plus (Thermo)
- Validační software Effichem

## 4.3 Příprava roztoků

### 4.3.1 Příprava mobilních fází

Pro účely optimalizace metody bylo připraveno 5 různých mobilních fází A (MF-A). Nejprve byly připraveny 3 MF-A s obsahem fluoridu amonného. MF-A o koncentraci 10 mmol/l byla připravena navážením 0,03704 g  $\pm$  0,2 % fluoridu amonného do kádinky (25 ml). Fluorid amonný byl rozpuštěn v deionizované vodě a kvantitativně převeden do odměrné baňky (100 ml), která byla doplněna deionizovanou vodou po rysku. Dále byly připraveny i další dvě ředění MF-A tohoto typu o koncentracích 1 mmol/l a 0,1 mmol/l, a to desetinásobným ředěním za použití odměrné baňky (100 ml). Čtvrtou MF-A byla pouze deionizovaná voda a poslední hodnocenou MF-A byla 0,1% (obj.) kyselina mravenčí připravená odpipetováním 100  $\mu$ l kyseliny mravenčí automatickou pipetou (10-100  $\mu$ l) do odměrné baňky (10 ml) doplněním deionizovanou vodou po rysku, následně by roztok kvantitativně převeden do 100 ml odměrné baňky a doplněn deionizovanou vodou po rysku. Mobilní fáze A byly vždy spotřebovány v den přípravy. Jako mobilní fáze B (MF-B) byl použit vždy 100% acetonitril.

Pro účely rutinních analýz, tj. pro měření kalibračních roztoků, slepých, kontrolních i reálných vzorků, byly následně na základě výsledků optimalizace metody používány již výhradně jen MF-A s obsahem fluoridu amonného o koncentraci 0,1 mmol/l a MF-B obsahující 100% acetonitril.

### 4.3.2 Příprava individuálních zásobních roztoků

#### 4.3.2.1 Příprava individuálních zásobních roztoků standardů

Individuální zásobní roztoky standardu každého analytu (ST-A) o koncentraci přesně asi 1000 mg/l byly připraveny v odměrných skleněných baňkách dle Tab. 2. Každý zásobní roztok byl odpipetován po 260  $\mu$ l (kortizol a kortikosteron), resp. po 520  $\mu$ l (estradiol, estron a progesteron) do skleněných HPLC vialek (1,5 ml), uzavřeny krimpovacím víčkem s teflonovým septem a skladovány při teplotě -20 °C.

**Tab. 2:** Příprava individuálních zásobních roztoků standardů.

Analyt	Navážka [mg]	Celkový objem [ml]	Rozpouštědlo	Koncentrace [mg/l]
Kortizol	5,10	5	Methanol	1020
Kortikosteron	5,01	5	Methanol	1002
Estradiol	10,14	10	Acetonitril	1014
Estron	10,05	10	Methanol	1005
Progesteron	10,38	10	Acetonitril	1038

#### **4.3.2.2 Příprava individuálních zásobních roztoků vnitřních standardů**

Individuální zásobní roztok izotopicky značeného vnitřního standardu (VS-A) estronu byl dodán již komerčně připravený v objemu 1000  $\mu$ l o koncentraci 100 mg/l.

Zbývající 4 individuální zásobní roztoky vnitřních standardů o koncentraci přibližně 1000 mg/l byly připraveny odpipetováním 1000  $\mu$ l organického rozpouštědla (volba rozpouštědla analogicky dle Tab. 1) automatickou pipetou (100–1000  $\mu$ l) přímo do vialky od výrobce obsahující 1 mg dané sloučeniny.

Každý zásobní roztok vnitřního standardu byl odpipetován po 100  $\mu$ l do HPLC vialek (1,5 ml), vialky byly uzavřeny krimpovacím víčkem s teflonovým septem a skladovány při teplotě -20 °C.

#### **4.3.3 Příprava směsných pracovních roztoků**

##### **4.3.3.1 Příprava směsných pracovních roztoků standardů**

Směsný pracovní roztok všech standardů (ST-B) byl připraven odpipetováním zásobních roztoků standardů dle Tab. 3 do odměrné baňky (10 ml) a baňka byla po rysku doplněna acetonitrilem. Roztok ST-B byl skladován při -20 °C.



**Tab. 3:** Příprava směšného pracovního roztoku standardů.

Sloučenina	Objem ST-A [ $\mu$ l]	Celkový objem [ml]	Rozpouštědlo	Koncentrace [mg/l]
Kortizol	98,0	10	Acetonitril	10,00
Kortikosteron	99,8			10,00
Estradiol	197,2			20,00
Estron	99,5			10,00
Progesteron	192,7			20,00

Směšný pracovní roztok (ST-C) o koncentraci kortizolu, kortikosteronu a estronu 125  $\mu$ g/l a o koncentraci estradiolu a progesteronu 250  $\mu$ g/l byl připraven odpipetováním 125  $\mu$ l pracovního roztoku ST-B automatickou pipetou (20–200  $\mu$ l) do odměrné baňky (10 ml) a poté byla baňka doplněna po rysku 30% acetonitrilem. Roztok ST-C byl spotřebován v den přípravy.

Směšný pracovní roztok (ST-D) o koncentraci kortizolu, kortikosteronu a estronu 1,25  $\mu$ g/l a o koncentraci estradiolu a progesteronu 2,50  $\mu$ g/l byl připraven odpipetováním 250  $\mu$ l pracovního roztoku ST-C automatickou pipetou (100–1000  $\mu$ l) do odměrné baňky (25 ml) a poté byla baňka doplněna po rysku 30% acetonitrilem. Roztok ST-D byl spotřebován v den přípravy.

#### 4.3.3.2 Příprava směšných pracovních roztoků vnitřních standardů

Směšný pracovní roztok (VS-B) o koncentraci 500  $\mu$ g/l všech pěti vnitřních standardů byl připraven odpipetováním 10  $\mu$ l VS-A kortizolu, kortikosteronu, estradiolu a progesteronu a 100  $\mu$ l VS-A estronu automatickou pipetou (10–100  $\mu$ l) do vialky (24 ml) a do vialky bylo napipetováno 19,86 ml 100% acetonitrilu automatickou pipetou (1–10 ml). Roztok VS-B byl skladován při -20 °C.

Směšný pracovní roztok (VS-C) o koncentraci 100  $\mu$ g/l všech pěti vnitřních standardů byl připraven odpipetováním 1600  $\mu$ l roztoku VS-B automatickou pipetou (100–1000  $\mu$ l) do vialky (8 ml) a do vialky bylo napipetováno 6,40 ml deionizované vody automatickou pipetou (1–10 ml). Roztok VS-C byl skladován při +7 °C po dobu maximálně jednoho týdne.

#### 4.3.4 Příprava kalibračních roztoků

Příprava kalibračních roztoků je popsána v tabulce Tab. 4. Celkem bylo připraveno deset různých koncentračních úrovní kalibračních roztoků, z nichž pro konstrukci kalibrační křivky byly vybrány pouze ty koncentrační úrovně, pro které bylo dosaženo vyhovujících kritérií přijatelnosti všech hodnocených validačních parametrů. Do vialek byl nejprve odpipetován 30% acetonitril (30% ACN), poté roztok standardu ST-D a nakonec roztok vnitřního standardu VS-C. Roztoky byly připraveny do HPLC vialek (1,5 ml). K pipetování byly použity automatické pipety (10–100  $\mu$ l a 100–1000  $\mu$ l). Kalibrační roztoky byly spotřebovány v den přípravy.

**Tab. 4:** Příprava kalibračních roztoků.

Úroveň	Objem [ $\mu$ l]				Koncentrace [ $\mu$ g/l]		
	ST-D	VS-C	30% ACN	Celkem	VS	ST	
						F, B a E1	E2 a P4
K1	20	100	880	1000	10,0	0,025	0,050
K2	40	100	860	1000	10,0	0,050	0,100
K3	80	100	820	1000	10,0	0,100	0,200
K4	200	100	700	1000	10,0	0,250	0,500
K5	300	100	600	1000	10,0	0,375	0,750
K6	400	100	500	1000	10,0	0,500	1,000
K7	500	100	400	1000	10,0	0,625	1,250
K8	600	100	300	1000	10,0	0,750	1,500
K9	700	100	200	1000	10,0	0,875	1,750
K10	800	100	100	1000	10,0	1,000	2,000

Pro ověření čistoty používaných rozpouštědel, roztoků ST a VS i přístroje byly do HPLC vialek (1,5 ml) připraveny 3 kontrolní vzorky, jejichž příprava je popsána v tabulce Tab. 5.

**Tab. 5:** Příprava kontrolních vzorků.

Označení roztoku	Objem [ $\mu$ l]				Koncentrace [ $\mu$ g/l]		
	ST-D	VS-C	30% ACN	Celkem	VS	ST	
						F, B a E1	E2 a P4
MF	0	0	1000	1000	0	0	0
ST	400	0	600	1000	0	0,500	1,000
VS	0	100	900	1000	10	0	0

### 4.3.5 Příprava vzorků trusu

#### 4.3.5.1 Extrakce analytů z trusu do organického rozpouštědla

Bylo naváženo přesně asi 1,00000 g vzorku trusu do centrifugační zkumavky (15 ml). Ke vzorku bylo odpipetováno automatickou pipetou (1–10 ml) 8 ml methanolu a 2 ml deionizované vody. Ke vzorku bylo přidáno 5 skleněných kuliček o průměru 3 mm. Zkumavka byla zavřena a uzavřena parafilmem. Vzorek ve zkumavce byl nejprve intenzivně homogenizován pomocí vortexu po dobu 2 minut a poté na třepačce po dobu 100 minut a při rychlosti 300 ot/min. Po skončení homogenizace byl vzorek odstředěn na centrifuze při laboratorní teplotě po dobu 10 minut při relativní centrifugační síle  $9000 \times g$  a získaný supernatant byl odebrán do srdcovité baňky (25 ml). Stejným postupem jako vzorek byl připraven i slepý pokus, ale bez navážení trusu.

Supernatant byl následně naředěn na tři koncentrační úrovně (ředění supernatantu  $10\times$ ,  $50\times$  a  $100\times$ ) dle Tab. 6. Do vialky (24 ml) byl odpipetován methanol a voda automatickou pipetou (1–10 ml). Poté byl do vialky odpipetován buď supernatant nebo desetkrát zředěný roztok supernatantu (SN-10x) automatickou pipetou (100–1000  $\mu$ l).

**Tab. 6:** Příprava ředěných roztoků supernatantu.

Označení roztoku	Objem supernatantu [ml]	Objem SN-10x [ml]	Objem methanolu [ml]	Objem vody [ml]	Celkový objem [ml]
SN-10x	1,500	0	10,80	2,70	15,00
SN-50x	0	2,000	6,40	1,60	10,00
SN-100x	0	1,000	7,20	1,80	10,00

#### 4.3.5.2 Příprava vzorků k LC-MS analýze

Pro vlastní LC-MS analýzu byly připraveny vzorky extraktů trusu (VZ) a obohacené vzorky extraktů trusu (VZ-SPIKE) podle Tab. 7. Do HPLC vialek (1,5 ml) byl odpipetován 30% acetonitril nebo roztok ST-D, poté roztok VS-C, a nakonec zředěný roztok supernatantu. K pipetování byla použita automatická pipeta (100–1000  $\mu$ l).

**Tab. 7:** Příprava vzorků k LC-MS analýze.

Označení roztoku	Objem SN-10x [ $\mu$ l]	Objem SN-50x [ $\mu$ l]	Objem SN-100x [ $\mu$ l]	Objem 30% ACN [ $\mu$ l]	Objem ST-D [ $\mu$ l]	Objem VS-C [ $\mu$ l]	Celkový objem [ $\mu$ l]
VZ-10x	1000	0	0	400	0	100	1500
VZ-10x SPIKE				0	400		
VZ-50x	0	1000	0	400	0		
VZ-50x SPIKE				0	400		
VZ-100x	0	0	1000	400	0		
VZ-100x SPIKE				0	400		

Za účelem kontroly případné kontaminace vzorku v průběhu jeho přípravy k analýze byl dále připraven vzorek slepého pokusu (BLANK). Do HPLC vialky (1,5 ml) odpipetováním 400  $\mu$ l 30% acetonitrilu, 100  $\mu$ l roztoku VS-C a 1000  $\mu$ l supernatantu slepého pokusu.

Všechny vzorky k analýze byly odpařeny z původního objemu 1500  $\mu$ l na objem přibližně 200  $\mu$ l pomocí proudu dusíku ve vyhřívaném termobloku při teplotě 40 °C. Po odpaření přebytečného organického rozpouštědla byly všechny vzorky doplněny deionizovanou vodou na celkový konečný objem přibližně 500  $\mu$ l a analyzovány v den přípravy.

## 5 Výsledky a diskuse

### 5.1 Optimalizace podmínek chromatografické separace

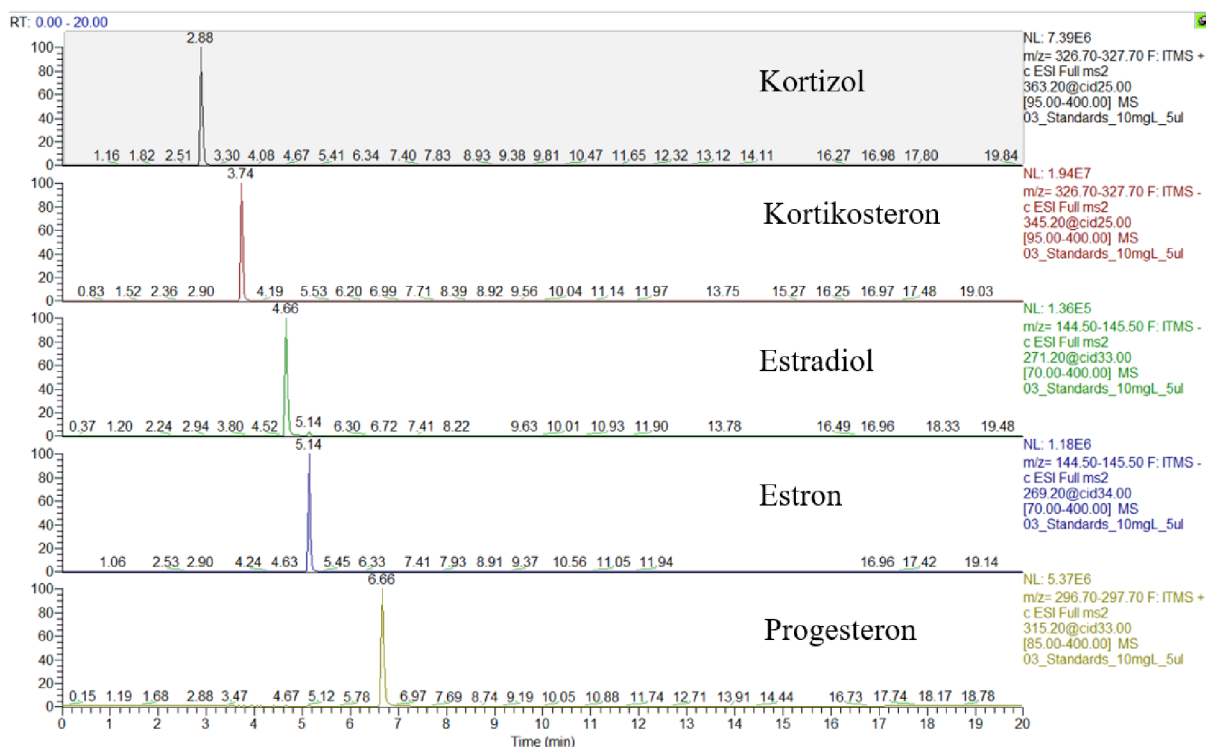
#### 5.1.1 Testovací analýza

Byla provedena testovací analýza, která měla za cíl identifikaci analytů. Pro tuto potřebu byl použit směsný roztok standardů estronu, estradiolu, progesteronu, kortizolu a kortikosteronu v acetonitrilu o koncentraci všech látek 10 mg/l. Po provedení analýzy proběhla identifikace jednotlivých píků a na základě toho, byly analytům přiřazeny retenční časy. Chromatografické podmínky testovací analýzy jsou uvedeny v přehledu níže a byly zvoleny na základě rešerše, částečně byly převzaty z prací [29, 30].

Chromatografické podmínky testovací analýzy:

- Chromatografická kolona: Kinetex EVO C18 (150 × 3,0 mm; 2,6 μm)
- Objem nástřiku: 5 μl
- Teplota kolonového prostoru: 35 °C
- Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min
- Mobilní fáze: MF-A: 1 mM NH<sub>4</sub>F v deionizované vodě  
MF-B: 100% acetonitril
- Doba analýzy: 20 min
- Gradient: typ gradientu: lineární; 0 min (30 % MF-B); 10–15 min (100 % MF-B); 15,5–20 min (30 % MF-B)

Na Obr. 10 jsou zobrazeny extrahované iontové chromatogramy vybraných produktových iontů analytů z testovací analýzy směsného roztoku standardů estronu, estradiolu, progesteronu, kortizolu a kortikosteronu. Píky analytů v chromatogramu byly identifikovány pomocí hmotnostní detekce.



**Obr. 10:** Výsledné chromatogramy testovací analýzy.

Účinnost a kvalita separace byla vyhodnocena pomocí výpočtu rozlišení a faktoru asymetrie píků analytů. Výpočet rozlišení dvou sousedních píků při gradientové eluci byl proveden podle rovnice (1) z publikace [28].

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_g} \quad (1)$$

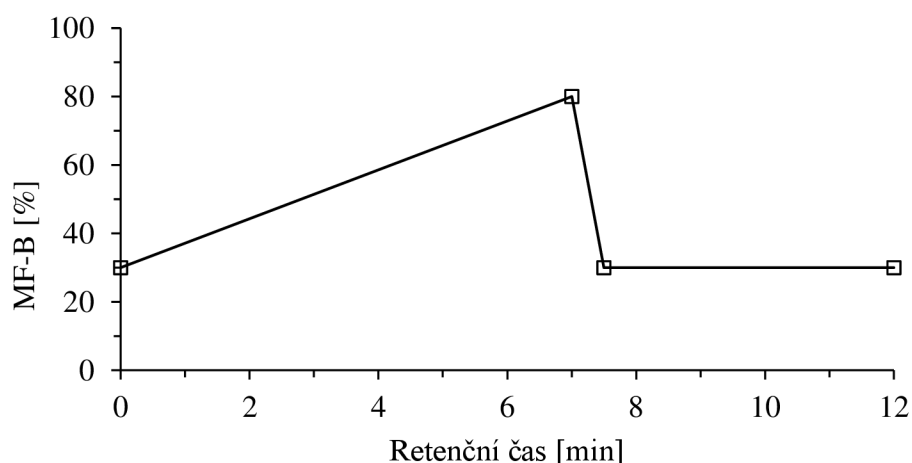
Kde  $R$  je rozlišení,  $t_{R1}$  a  $t_{R2}$  jsou retenční časy píků 1 a 2 a  $w_g$  je průměrná šířka píku v gradientu při jeho základně [28]. Přičemž píky se považují za dostatečně separované, pokud je hodnota rozlišení vyšší jak 1,5 [28]. Toto kritérium bylo splněno mezi všemi píky analytů, primární data a hodnoty rozlišení jsou uvedeny v příloze A. Všechny píky tedy byly dostatečně separovány a nedocházelo k nežádoucí koeluci analytů

Jako další parametr pro vyhodnocení kvality separace byl použit faktor asymetrie, který byl vypočten podle rovnice (2) uvedené v publikaci [28].

$$A = \frac{t}{f} \quad (2)$$

Kde  $A$  je faktor asymetrie,  $t$  je šířka sestupné části píku a  $f$  je šířka vzestupné části píku v 5 % jeho výšky. Přijatelný faktor asymetrie nabývá hodnot v rozmezí 0,8–1,5, kdy nedochází k příliš velkému frontování anebo chvostování píku [28]. Vypočtené faktory asymetrie u všech analytů byly větší než jedna. Všechny píky se tedy vyznačovaly určitou mírou chvostování, ovšem v přijatelné míře, neboť faktory asymetrie byly menší než 1,5. Primární data a vypočtené hodnoty faktoru asymetrie jsou uvedeny v příloze B.

Chromatografické podmínky testovací analýzy se na základě hodnot rozlišení a faktorů asymetrie ukázaly jako vhodné pro stanovení zájmových analytů. S ohledem na jejich retenční časy byla významně zkrácena celková doba analýzy z 20 na 12 minut. Gradient MF-B byl zachován do sedmé minuty analýzy, do tohoto času již byly eluovány všechny analyty. Upravený průběh gradientu MF-B je popsán na Obr. 11, toto nastavení bylo použito pro další analýzy.



**Obr. 11:** Graf gradientu MF-B pro analýzu standardů analytů.

Pro hmotnostní detekci bylo významné, že separace analytů je úplná a nedochází k jejich koeluci. Dosáhnout dostatečné separace zájmových látek bylo i cílem této práce. Eluce pouze jednoho analytu v jednom časovém úseku umožnila používat delší dobu plnění iontové pasti, což může vést k silnějšímu signálu analytu a nižší mezi stanovitelnosti.

Z důvodu očekávání velmi nízkých koncentrací zájmových hormonů ve vzorcích, bylo rozhodnuto o potřebě optimalizovat objem nástřiku. Vyšší objem nástřiku může přispět

k silnější odezvě analytu v detektoru, a tedy i nižší mezi stanovitelnosti. Bylo rozhodnuto, že jiné parametry chromatografické separace se optimalizovat již nebudou a práce se více zaměří na optimalizaci hmotnostní detekce.

### 5.1.2 Optimalizace objemu nástřiku

Optimalizace objemu nástřiku měla za cíl zvýšit objem nástřiku, za účelem zvýšení signálu analytů. Nicméně příliš velký objem nástřiku vede k přetížení kolony a nežádoucímu rozšíření chromatografické zóny [35]. Proto byly k testování zvoleny objemy nástřiku, které byly větší než při testovací analýze, ovšem ještě se u nich nepředpokládalo, že by zapříčinily rozmývání píku, jednalo se o 10  $\mu\text{l}$  a 25  $\mu\text{l}$ . Při těchto objemech nástřiku byly proměřeny směsné roztoky standardů o osmi různých koncentracích (10 mg/l, 1 mg/l, 100  $\mu\text{g/l}$ , 10  $\mu\text{g/l}$ , 1  $\mu\text{g/l}$ , 0,1  $\mu\text{g/l}$ , a 0,01  $\mu\text{g/l}$ ), přičemž nejdůležitější výsledky, vzhledem k prováděné optimalizaci, byly u vzorků o koncentracích 10  $\mu\text{g/l}$  a 1  $\mu\text{g/l}$ . V Tab. 8 je přehled poměru signálu ku šumu na úrovni základní linie (S/N) pro měření při objemu nástřiku 10  $\mu\text{l}$  a 25  $\mu\text{l}$  a při koncentracích analytů 10  $\mu\text{g/l}$  a 1  $\mu\text{g/l}$ .

**Tab. 8:** Přehled S/N při koncentracích analytů 10  $\mu\text{g/l}$  a 1  $\mu\text{g/l}$  a objemech nástřiku 10  $\mu\text{l}$  a 25  $\mu\text{l}$ .

Analyt	Objem nástřiku 10 $\mu\text{l}$		Objem nástřiku 25 $\mu\text{l}$	
	S/ N při koncentraci		S/ N při koncentraci	
	10 $\mu\text{g/l}$	1 $\mu\text{g/l}$	10 $\mu\text{g/l}$	1 $\mu\text{g/l}$
Kortizol	138	11	273	26
Kortikosteron	225	13	671	35
Estradiol	8	1	14	2
Estron	11	1	34	3
Progesteron	20	3	70	8

Z výsledků uvedených v Tab. 8 vyplývá, že při objemu nástřiku 25  $\mu\text{l}$  byl poměr signálu ku šumu větší, tedy signál byl silnější, a to u všech analytů a u obou koncentračních hladin. Mimo to bylo zjištěno, že nejvýraznější signál mají kortizol a kortikosteron, Naopak nejslabší signál byl zaznamenán u estradiolu s estronem, a to dokonce tak, že při koncentraci 1  $\mu\text{g/l}$  byly hodnoty S/N menší jak 3 a tedy signál analytů nešel prokazatelně rozlišit od šumu základní linie.



Zjištění, při kterých koncentrací jsou zájmové analyty měřitelné, bylo důležité pro budoucí validaci metody a stanovení pracovního rozsahu metody. Pro ověření, zda při větším objemu nástřiku nedochází k příliš velkému rozšiřování chromatografické zóny, byly vypočteny faktory asymetrie podle rovnice (2), které jsou uvedeny v tab. 9. Primární data k výpočtu jsou uvedeny v příloze C. Hodnota NF v Tab. 9 znamená, že pík analytu nebyl identifikován, kvůli hodnotě S/N, která byla nižší jak tři.

**Tab. 9:** Přehled faktorů asymetrie při koncentracích analytů 10 µg/l a 1 µg/l a objemech nástřiku 10 µl a 25 µl.

Analyt	Objem nástřiku 10 µl		Objem nástřiku 25 µl	
	Faktor asymetrie při koncentraci		Faktor asymetrie při koncentraci	
	10 µg/l	1 µg/l	10 µg/l	1 µg/l
Kortizol	1,20	1,40	1,40	1,40
Kortikosteron	1,17	1,40	1,17	1,33
Estradiol	1,25	NF	1,20	NF
Estron	1,25	NF	1,20	1,25
Progesteron	1,20	1,33	1,40	1,20

Z hodnot faktorů asymetrie vyplývá, že u všech analytů nedošlo k příliš velkému rozšíření chromatografické zóny. Podobně jako u testovací analýzy docházelo ke chvostování píků, ovšem v přijatelných mezích, faktor asymetrie byl nižší jak 1,5. Pro další použití byl zvolen objem nástřiku 25 µl, z důvodu dosažení vyšších hodnot S/N u píků analytů než při nižším objemu a přijatelně asymetrických píku při tomto objemu.

## 5.2 Optimalizace podmínek hmotnostní detekce

Pro kroky optimalizace 4.2.1–4.2.3 byla do hmotnostního spektrometru provedena přímá infúze směsného roztoku standardů estronu, estradiolu, progesteronu, kortizolu a kortikosteronu o koncentraci všech analytů 100 mg/l. Na základě rešerše byla zvolena polarita ionizace pro každý analyt. Před samotnou optimalizací byla proměřena hmotnostní spektra iontů prekurzoru analytů, tato spektra jsou uvedena v příloze D. Následně byly vybrány produktové ionty s nejintenzivnějším signálem. Vybrané hmotnostní přechody jsou uvedeny v Tab. 10.

**Tab. 10:** Hmotnostní přechody analytů.

Analyt	Polarita	Hmotnostní přechod
Estron	Negativní	269 → 145
Estradiol	Negativní	271 → 145
Progesteron	Pozitivní	315 → 297
Kortizol	Pozitivní	363 → 327
Kortikosteron	Pozitivní	347 → 329
Kortikosteron	Negativní	345 → 327

Z výsledků měření bylo vyhodnoceno, že z důvodu intenzivnějšího signálu iontů, bude kortikosteron dále měřen při negativní polaritě ionizace.

### 5.2.1 Optimalizace nastavení iontové optiky

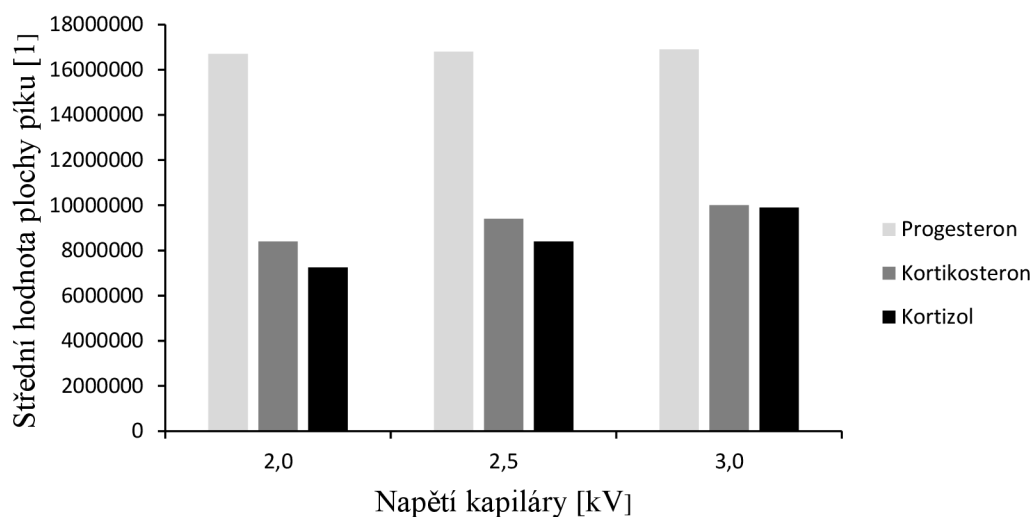
Tato optimalizace měla za cíl najít na S-čočkách a F-čočkách takové napětí, při kterém by bylo dosaženo nejvyššího celkového proudu iontů na detektoru. Měření bylo provedeno pro každý analyt. Nejprve bylo provedeno měření na S-čočkách v rozsahu 0–70 V. Poté bylo provedeno měření na F-čočkách v rozsahu 5–15 V při kladné anebo záporné hodnotě napětí, v závislosti na polaritě ionizace. Výsledky těchto měření jsou uvedeny v příloze E. V Tab. 11 je přehled, při kterých hodnotách napětí bylo dosaženo největšího celkového proudu iontů (TIC) pro daný analyt. Hodnoty napětí na S-čočkách pro estron a kortikosteron se odlišovaly od zbylých tří analytů, ovšem vzhledem k tomu, že i tyto dva analyty měly téměř maximum TIC při napětí 65 V, bylo rozhodnuto, zvolit tuto hodnotu napětí na S-čočkách pro měření všech analytů. Obdobně bylo zvoleno napětí na F-čočkách 7,0 V, kdy při této hodnotě dosahovaly téměř maxima TIC všechny analyty měřené při negativním módu ionizace. Napětí -7,0 V bylo zvoleno pro analyty měřené při pozitivním módu, také z důvodu téměř dosáhnutí maxima TIC při této hodnotě u obou analytů.

**Tab. 11:** Hodnoty napětí na S-čočkách a F-čočkách, při kterých byl nejvyšší celkový iontový proud.

Analyt	Napětí na S-čočkách [V]	Napětí na F-čočkách [V]
Estron	68	7,0
Estradiol	65	7,3
Progesteron	65	-7,2
Kortizol	65	-7,0
Kortikosteron	68	6,6

## 5.2.2 Optimalizace podmínek elektrospreje

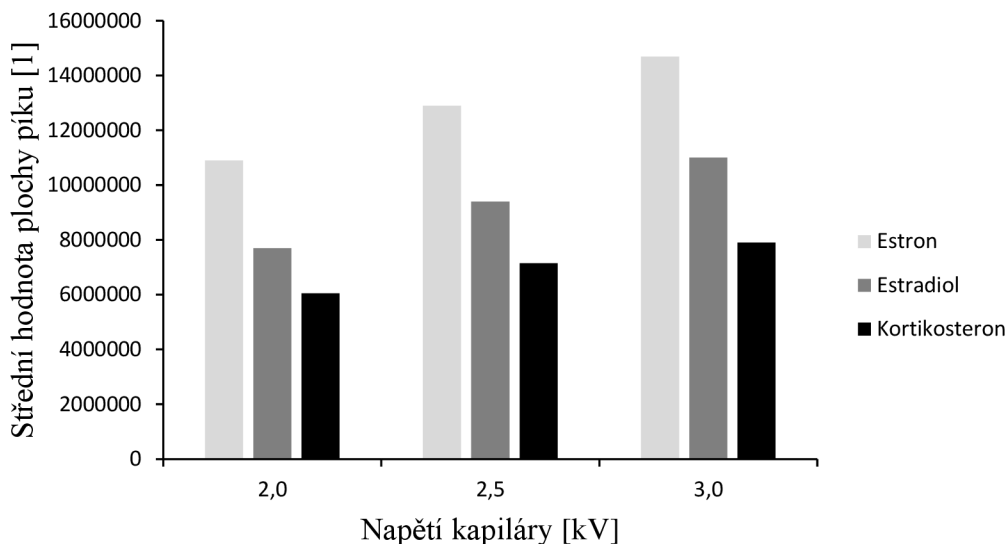
Cílem této optimalizace bylo najít vhodné napětí na kapiláře a takový průtok zmlžovacích plynů, které by poskytovaly stabilní signál analytů o co největší intenzitě. Při testování byly nastaveny tři hodnoty napětí na kapiláře (2,0 kV, 2,5 kV a 3,0 kV) a posuzovala se střední hodnota plochy pík analytů při jednotlivých hodnotách napětí. Výsledky měření při pozitivním módu jsou shrnuty v grafu na Obr. 12, primární data jsou uvedena v příloze F.



**Obr. 12:** Střední hodnota plochy píků progesteronu, kortikosteronu a kortizolu při pozitivním módu a napětí kapiláry 2,0 kV, 2,5 kV a 3,0 kV.

Napětí na kapiláře mělo naprosto minimální vliv na hodnotu plochy píku progesteronu, ovšem se zvyšujícím se napětím se zvyšovaly i plochy píků kortikosteronu a kortizolu

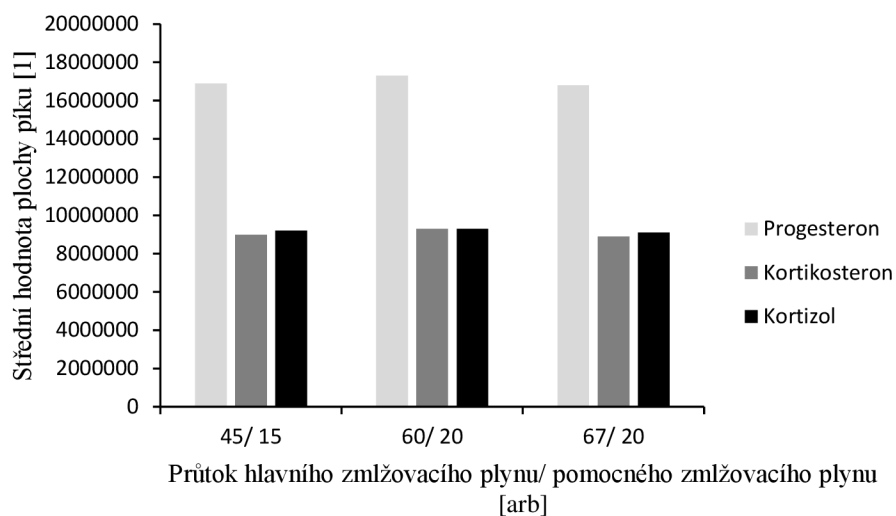
a nejvyšších hodnot bylo dosaženo při napětí 3,0 kV, kdy byl také signál všech analytů nejstabilnější. Dále bylo provedeno měření při negativním módu, výsledky jsou shrnuty v grafu na Obr. 13, primární data jsou uvedeny v příloze F.



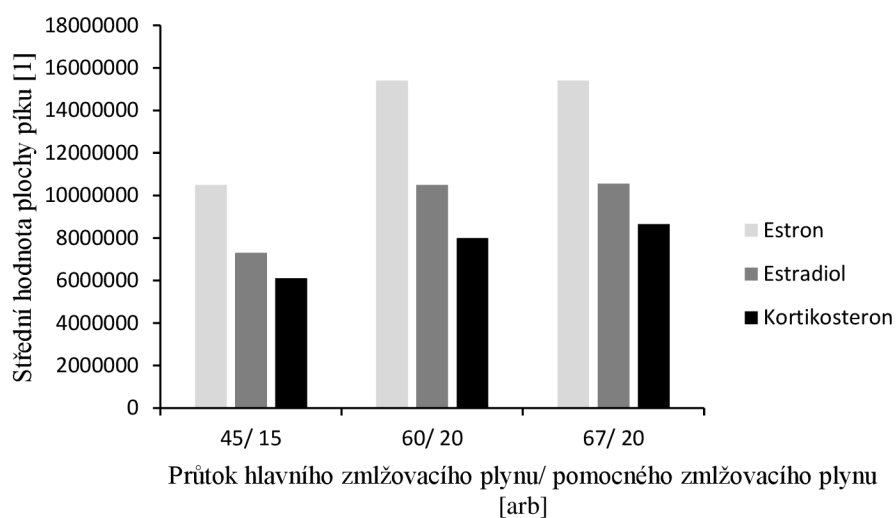
**Obr. 13:** Střední hodnota plochy píků estronu, estradiolu a kortikosteronu při negativním módu a napětí kapiláry 2,0 kV, 2,5 kV a 3,0 kV.

Napětí na kapiláře mělo při negativním módu výrazný vliv na plochu píků analytů, přičemž nejvyšších hodnot bylo dosaženo při napětí 3,0 kV. Pro použití při dalších měřeních bylo zvoleno napětí na kapiláře 3,0 kV, z důvodu nejvyšších hodnot plochy píku daných analytů při pozitivním i negativním módu a stabilního signálu.

Pro vyhodnocení vhodnosti určitého průtoku zmlžovacích plynů byla opět posuzována střední hodnota plochy píku daného analytu. Byly testovány tři typy nastavení průtoku hlavního zmlžovacího plynu ku pomocnému zmlžovacího plynu, jednalo se o hodnoty 45/15, 60/20 a 70/20. Nicméně poslední nastavené hodnoty 70/20 nebylo reálně dosaženo, přístrojové vybavení umožnilo dosáhnout maximálního průtoku zmlžovacích plynů 67/20. Výsledky měření jsou shrnuty v grafu na Obr. 14 pro pozitivní mód a na Obr. 15 pro negativní mód, primární data jsou uvedena v příloze F.



**Obr. 14:** Střední hodnota plochy píků progesteronu, kortikosteronu a kortizolu, měřeno při pozitivním módu a průtoku zmlžovacích plynů 45/15, 60/20 a 67/20.



**Obr. 15:** Střední hodnota plochy píků estronu, estradiolu a kortikosteronu, měřeno při negativním módu a průtoku zmlžovacích plynů 45/15, 60/20 a 67/20.

Průtok zmlžovacích plynů měl minimální vliv na střední hodnotu plochy píků analytů při pozitivním módu. Avšak byl pozorován významný vliv při negativním módu, kdy při průtoku 45/15 měly plochy píků výrazně nižší hodnoty než při průtoku 60/20. Plochy píků byly shodné při průtoku 60/20 a 67/20. Z důvodu stabilnějšího průtoku plynů při nastavení 60/20, bylo toto nastavení používáno pro další měření.

### 5.2.3 Optimalizace kolizní energie

Cílem této optimalizace bylo najít takovou hodnotu kolizní energie pro vybrané hmotnostní přechody, při které by měly vybrané produktové ionty největší intenzitu. Bylo rozhodnuto, že kolizní energie bude měřena jako normalizovaná kolizní energie a měření probíhalo v rozsahu 0–100 %. V Tab. 12 je přehled naměřené optimální normalizované kolizní energie pro vybrané hmotnostní přechody. Výsledky tohoto měření jsou uvedeny v příloze G.

**Tab. 12:** Optimální hodnoty normalizované kolizní energie pro vybrané hmotnostní přechody.

Hmotnostní přechod	Normalizovaná kolizní energie [%]
269 → 145	34
271 → 145	33
315 → 297	33
363 → 327	25
345 → 327	25

### 5.2.4 Vliv mobilní fáze na ionizaci

V této optimalizaci byl zkoumán vliv MF-A na ionizaci. Cílem bylo najít co nejvhodnější složení MF-A, které by co nejvíce zvýšilo ionizaci analytů, tedy aby analyty měly co nejintenzivnější signál a co nejvyšší poměr signálu ku šumu (S/N). Byly zkoumány tři různé typy MF-A, jednalo o vodný roztok fluoridu amonného o koncentracích 0,1 mmol/l, 1 mmol/l a 10 mmol/l, dále 0,1% roztok kyseliny mravenčí a čistá deionizovaná voda. Voda byla zvolena pro ověření, zda i velmi nízká koncentrace fluoridu amonného má významný vliv na ionizaci analytů. Pro účely tohoto měření byl používán směsný roztok standardů analytů o koncentraci každého analytu 1 µg/l. Výsledky měření jsou uvedeny v Tab. 13, hodnota „/“ v Tab. 13 znamená, že signál analytu byl na úrovni šumu základní linie a z toho důvodu nešlo identifikovat a popsat určité píky.

**Tab. 13:** Zkoumání vlivu složení MF-A na ionizaci analytů.

MF-A: 0,1 mM NH <sub>4</sub> F				MF-A: 1 mM NH <sub>4</sub> F			
Analyt	S/ N	Plocha píku	Výška píku	Analyt	S/ N	Plocha píku	Výška píku
Estron	7	1857	598	Estron	10	1896	577
Estradiol	3	639	145	Estradiol	3	411	131
Progesteron	21	28980	8790	Progesteron	14	21480	6772
Kortizol	112	22622	7469	Kortizol	83	13459	4493
Kortikosteron	88	50538	11110	Kortikosteron	133	45316	9867
MF-A: 10 mM NH <sub>4</sub> F				MF-A: 0,1 % HCOOH			
Analyt	S/ N	Plocha píku	Výška píku	Analyt	S/ N	Plocha píku	Výška píku
Estron	/	/	/	Estron	/	/	/
Estradiol	/	/	/	Estradiol	/	/	/
Progesteron	8	24799	7491	Progesteron	4	33710	9719
Kortizol	21	5317	1668	Kortizol	105	14874	4963
Kortikosteron	33	16690	3459	Kortikosteron	/	/	/
MF-A: voda							
Analyt	S/ N	Plocha píku	Výška píku				
Estron	/	/	/				
Estradiol	/	/	/				
Progesteron	32	26595	8132				
Kortizol	41	22525	41				
Kortikosteron	106	20718	4623				

Bylo zjištěno, že 0,1% kyselina mravenčí by byla vhodná pouze ke měření kortizolu, kdy v porovnání s ostatními typy MF-A dosahovala výška píku a S/N poměrně vysokých hodnot. Jediným dalším analytem, jehož pík bylo možné jasně odlišit od šumu, byl progesteron. Z toho důvodu byla 0,1% kyselina mravenčí vyhodnocena jako nevhodná pro měření zájmových analytů. Poměrně překvapivých výsledků bylo dosaženo při použití vody jako MF-A, kdy měly píky progesteronu a kortikosteronu vysoké hodnoty S/N ve srovnání s ostatními typy MF-A a také kortizol měl poměrně výrazný pík. Ovšem píky estronu a estradiolu opět nebylo možné jasně odlišit od šumu. Mimoto koncentrace fluoridu amonného 10 mmol/l se ukázala jako nevhodná, neboť signál některých hormonů byl na úrovni šumu a u ostatních analytů byly poměrně nízké hodnoty S/N. Nicméně nejlepších výsledků bylo dosaženo při koncentraci fluoridu amonného 0,1 mmol/l a 1 mmol/l, kdy byly poměrně vysoké hodnoty S/N, plochy a výšky píků. Pro další použití byla zvolena MF-A o koncentraci fluoridu amonného 0,1 mmol/l,

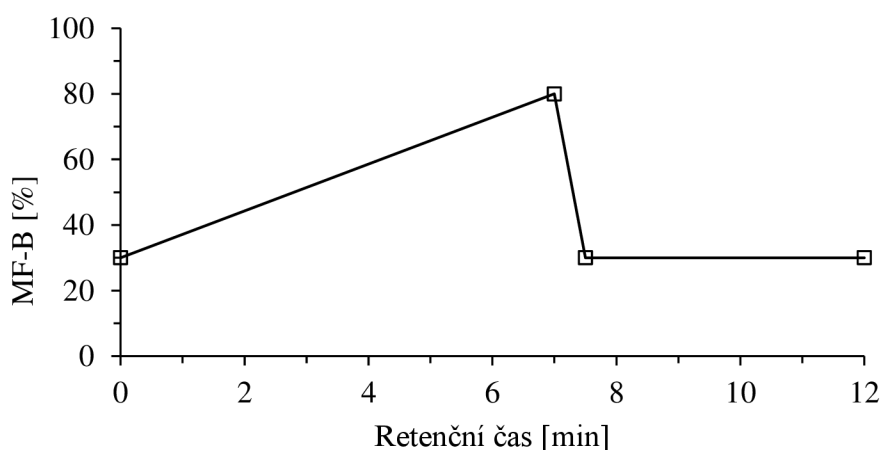
s ohledem na poměrně vysoké hodnoty S/N u většiny analytů a největší hodnoty ploch píků u všech analytů.

### 5.2.5 Přehled metody po optimalizaci chromatografické separace a hmotnostní detekce

Podle výsledků a zjištění získaných během optimalizace, bylo upravené nastavení a podmínky chromatografické separace a hmotnostní detekce. Konečný souhrn těchto podmínek je uveden v následujícím přehledu. V příloze H jsou uvedeny chromatogramy jednotlivých analytů po optimalizaci.

Podmínky chromatografické separace:

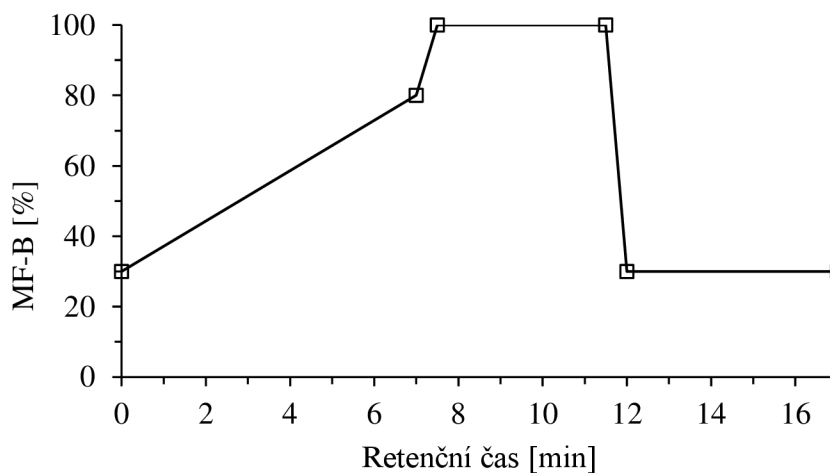
- Chromatografická kolona: Kinetex EVO C18 (150 × 3,0 mm; 2,6 μm) s plně kompatibilní předkolonou
- Objem nástřiku: 25 μl
- Teplota kolonového prostoru: 35 °C
- Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min
- Mobilní fáze: MF-A: 0,1 mM NH<sub>4</sub>F v deionizované vodě  
MF-B: 100% acetonitril
- Gradient: typ gradientu: lineární; 0 min (30 % MF-B); 7 min (80 % MF-B); 7,5–12 min (30 % MF-B)



**Obr. 16:** Gradientový program pro analýzu standardů.



- Gradient pro analýzu reálných vzorků: typ gradientu: lineární;  
0 min (30 % MF-B); 7 min (80 % MF-B); 7,5–11,5 min (100 % MF-B);  
12–17 min (30 % MF-B)



**Obr. 17:** Gradientový program pro analýzu reálných vzorků.

Podmínky hmotnostní detekce:

- Iontový zdroj: ESI
- Teplota iontového zdroje: 350 °C
- Teplota kapiláry: 350 °C
- Průtok hlavního zmlžovacího plynu: 60 arb
- Průtok pomocného zmlžovacího plynu: 20 arb
- Napětí na kapiláře: 3,0 kV
- Napětí na S-čočkách: 65 V
- Napětí na F-čočkách: 7,0 V (negativní polarita ionizace)  
-7,0 V (pozitivní polarita ionizace)
- Analyt, polarita ionizace, ion prekurzoru → produktový ion [m/z], normalizovaná kolizní energie [%]:
 

○ Estron	negativní	269 → 145	34
○ Estradiol	negativní	271 → 145	33
○ Progesteron	pozitivní	315 → 297	33
○ Kortizol	pozitivní	363 → 327	25
○ Kortikosteron	negativní	345 → 327	25

- Typ skenu: hmotnostní spektrum produktových iontů z vybraného iontu prekurzoru (Full Scan MS/MS)
- Maximální doba plnění iontové pasti: 200 ms
- Počet mikroskenů: 1

## 5.3 Validace analytické metody

Poté, co byla metoda optimalizována, bylo přikročeno k její validaci, která byla provedena na modelu kalibrační křivky. Nejprve proběhla měření, která určila rozsah metody pro každý analyt. Následně byla v tomto rozsahu pro všechny analyty zhodnocena linearita, přesnost, správnost a mez stanovitelnosti.

### 5.3.1 Linearita

Linearita byla vyhodnocena na základě požadavků publikace [36]. Pracovní rozsah metody, pro který byla hodnocena linearita, je u jednotlivých analytů různý, proto jsou v Tab. 14 uvedeny konkrétní pracovní rozsahy pro dané analyty.

**Tab. 14:** Pracovní rozsah metody pro jednotlivé analyty.

Analyt	Pracovní rozsah [ $\mu\text{g/l}$ ]
Estron	0,100–1,000
Estradiol	0,500–2,000
Progesteron	0,500–2,000
Kortizol	0,050–1,000
Kortikosteron	0,050–1,000

Důležitým prvkem pro popis linearit je rovnice kalibrační křivky, uvedena je jako rovnice (3).

$$y = kx + q \quad (3)$$

Kde  $y$  je poměr plochy píku standardu ku ploše píku vnitřního standardu,  $x$  je koncentrace standardu,  $k$  je směrnice kalibrační křivky a  $q$  je intercept kalibrační křivky. Parametry popisující kalibrační křivku a její linearitu jsou uvedeny v Tab. 15 a byly vypočteny v programu Effichem.

**Tab. 15:** Validační parametry týkající se linearity.

Analyt	Směrnice	Intercept	Korelační koeficient	QC koeficient [%]
Estron	0,1139	-0,0013	0,9965	4,86
Estradiol	0,0692	0,0101	0,9919	4,96
Progesteron	0,0841	-0,0007	0,9959	3,97
Kortizol	0,1483	-0,0007	0,9983	4,07
Kortikosteron	0,2451	0,0006	0,9996	1,91

Podle publikace [37] je linearita považována za prokázanou, pokud je korelační koeficient vyšší jak 0,9900 a QC koeficient je nižší jak 5 %. Vypočtené hodnoty korelačního a QC koeficientu splňují tato kritéria, linearita metody tedy byla prokázána v daném rozsahu pro všechny analyty.

### 5.3.2 Správnost a přesnost

Správnost metody byla vyhodnocena jako její výtěžnost. Přesnost metody byla vyhodnocena jako opakovatelnost pomocí relativní směrodatné odchylky. Tyto dva validační parametry byly hodnoceny podle kritérií přijatelnosti v publikaci [38], kdy pro koncentrace analytů v řádu jednotek ppb je třeba dosáhnout správnosti metody v rozsahu 40–120 % a přesnosti do 30 %. Vypočtené validační parametry správnosti a přesnosti jsou uvedeny v Tab. 16 pro každý z analytů a pro každou koncentraci kalibračních bodů. Pro každý kalibrační bod byla provedena tři nezávislá opakování.

Jak lze vyčíst z dat v Tab. 16, požadovaným kritériím na správnost a přesnost vyhovovaly všechny hodnoty. U metody tedy byla prokázána přijatelná správnost a přesnost.

**Tab. 16:** Validační parametry správnost a přesnost.

<b>Estron</b>		<b>Estradiol</b>		<b>Progesteron</b>	
Koncentrace analytu [ $\mu\text{g/l}$ ]	Správnost [%]	Koncentrace analytu [ $\mu\text{g/l}$ ]	Správnost [%]	Koncentrace analytu [ $\mu\text{g/l}$ ]	Správnost [%]
0,100	111	0,500	100	0,500	98
0,250	104	0,750	103	0,750	105
0,375	97	1,000	97	1,000	94
0,500	99	1,250	98	1,250	102
0,625	98	1,500	103	1,500	99
0,750	99	2,000	99	2,000	99
1,000	102				
Koncentrace analytu [ $\mu\text{g/l}$ ]	Přesnost [%]	Koncentrace analytu [ $\mu\text{g/l}$ ]	Přesnost [%]	Koncentrace analytu [ $\mu\text{g/l}$ ]	Přesnost [%]
0,100	1,0	0,500	7,0	0,500	8,2
0,250	3,6	0,750	1,1	0,750	4,1
0,375	2,5	1,000	6,3	1,000	4,5
0,500	5,3	1,250	3,1	1,250	3,8
0,625	6,8	1,500	6,9	1,500	2,0
0,750	1,5	2,000	5,4	2,000	1,3
1,000	4,2				
<b>Kortizol</b>		<b>Kortikosteron</b>			
Koncentrace analytu [ $\mu\text{g/l}$ ]	Správnost [%]	Koncentrace analytu [ $\mu\text{g/l}$ ]	Správnost [%]		
0,050	109	0,050	106		
0,100	108	0,100	103		
0,250	101	0,250	100		
0,375	97	0,375	99		
0,500	97	0,500	99		
0,625	99	0,625	100		
0,750	103	0,750	100		
1,000	100	1,000	100		
Koncentrace analytu [ $\mu\text{g/l}$ ]	Přesnost [%]	Koncentrace analytu [ $\mu\text{g/l}$ ]	Přesnost [%]		
0,050	11,4	0,050	1,1		
0,100	3,2	0,100	1,7		
0,250	3,6	0,250	1,3		
0,375	8,4	0,375	0,9		
0,500	3,7	0,500	2,8		
0,625	2,5	0,625	2,9		
0,750	1,0	0,750	1,2		
1,000	2,5	1,000	1,2		

### 5.3.3 Rozsah metody

Z výsledků posuzování linearity, správnosti a přesnosti, bylo vyhodnoceno, že metoda poskytuje výsledky s přijatelnou správností a přesností pro každý analyt v rozsahu dle Tab. 14.

### 5.3.4 Mez stanovitelnosti

Meze stanovitelnosti byly určeny na základě požadavku publikace [36], tak aby při určité koncentraci analytu byl poměr signálu ku šumu alespoň deset. Jednotlivé meze stanovitelnosti pro dané analyty jsou uvedeny v Tab. 17 a pro přehlednější porovnání s pracemi v Tab. 1 je koncentrace uvedena také v pg/ml.

**Tab. 17:** Meze stanovitelnosti.

Analyt	Estradiol	Progesteron	Estron	Kortizol	Kortikosteron
<b>Mez stanovitelnosti [pg/ml]</b>	500	500	100	50	50

V porovnání s pracemi uvedenými v Tab. 1 bylo dosaženo vyšší meze stanovitelnosti, řádově desetkrát až stokrát, pro estron, estradiol a progesteron. Nicméně se podařilo dosáhnout více jak dvakrát nižší meze stanovitelnosti pro kortizol a kortikosteron než v práci [32].

## 5.4 Validace metody pro použití na reálné vzorky trusu

Vhodnost metody pro měření zájmových analytů bylo nutné validovat i pro měření reálných vzorků. Pro tuto potřebu byly připraveny spikované vzorky, tedy vzorky obohacené o dané množství jednotlivých analytů. Vzorky byly připraveny ze zředěného extraktu vzorku, jednalo o ředění 10×, 50× a 100×. Každý vzorek byl změřen ve třech nezávislých opakováních. Na základě výsledků analýzy bylo zjištěno, že u méně zředěných vzorků je příliš vysoká úroveň šumu nebo nebylo možné píky identifikovat, pravděpodobně z důvodu vysokých matričních efektů, a u některých typů ředění jsou koncentrace daného analytu mimo rozsah metody. Proto pro vyhodnocení validace byla vypočtena správnost a přesnost jen u vybraných typů ředění, výsledky jsou uvedeny v Tab. 18.

**Tab. 18:** Správnost a přesnost u reálných vzorků.

Analyt	Ředění vzorku	Očekávaná koncentrace [μg/l]	Naměřená koncentrace [μg/l]	Správnost [%]	Přesnost [%]
Estron	100 ×	1,000	0,970	97	4,0
		1,000	0,931		
		1,000	1,008		
Estradiol	50 ×	1,500	1,434	92	4,1
		1,500	1,402		
		1,500	1,325		
Progesteron	10 ×	2,000	1,928	92	5,1
		2,000	1,741		
		2,000	1,845		
Kortizol	100 ×	0,500	0,562	113	0,4
		0,500	0,562		
		0,500	0,566		
Kortizol	50 ×	0,500	0,571	111	3,9
		0,500	0,530		
		0,500	0,563		
Kortizol	10 ×	0,500	0,727	145	4,1
		0,500	0,692		
		0,500	0,751		
Kortikosteron	100 ×	0,500	0,527	104	1,5
		0,500	0,513		
		0,500	0,525		
Kortikosteron	50 ×	0,500	0,544	108	2,4
		0,500	0,525		
		0,500	0,550		

Přijatelná správnost a přesnost dle kritérií publikace [38] byly zjištěny u všech analytů a míry ředění vzorku, vyjma 10 × zředěného vzorku kortizolu, kdy měření bylo sice přesné, ovšem nesprávné a tedy nevyhovující.

## 5.5 Výsledky analýz vzorků trusu

Obsah analytů ve vzorku bylo možné stanovit pouze u estronu, estradiolu a progesteronu. U kortizolu a kortikosteronu byly naměřené hodnoty pod mezi stanovitelnosti. Obsah analytů ve vzorku byl vypočten metodou vnitřního standardu. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 19 a to jako střední hodnota  $\pm 2 \times$  směrodatná odchylka. Jednalo se o vzorek trusu samice hyeny čabrakové Jubari ze Zoo Praha.

**Tab. 19:** Obsah estronu, estradiolu a progesteronu ve vzorku trusu.

Analyt	Obsah analytu ve vzorku trusu [ng/g]
Estron	482 $\pm$ 22
Estradiol	178 $\pm$ 36
Progesteron	93 $\pm$ 12

Bylo zjištěno, že obsah analytů se v 1 g vzorku pohybuje řádově ve vyšších desítkách až nižších stovkách ng.

## 6 Závěr

Teoretická část se zabývala významem monitoringu hormonů, dále zde byla shrnuta hormonální regulace reprodukčního systému a vliv stresu na reprodukci. Také byla popsána struktura a vlastnosti steroidů, hormony vhodné pro sledování reprodukčních funkcí, výhody a nevýhody invazivního a neinvazivního odběru vzorků. Na konci teoretické části byly popsány výhody a nevýhody analýzy steroidních hormonů pomocí imunochemických metod a kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí a bylo porovnáno několik prací zabývajících se stanovením vybraných steroidních hormonů pomocí LC/MS.

Praktická část se zabývala optimalizací a validací analytické metody. V rámci optimalizace chromatografické separace byl upraven objem nástřiku a celková doba analýzy. Pro zlepšení hmotnostní detekce byly optimalizovány hodnoty kolizní energie hmotnostních přechodů analytů, napětí na S-čočkách a F-čočkách, průtok a poměr hlavního a pomocného zmlžovacího plynu, napětí na kapiláře a také se testoval vliv fluoridu amonného a kyseliny mravenčí na ionizaci analytů. Metoda byla úspěšně validována v rozsahu 0,500–2,000  $\mu\text{g/l}$  pro estradiol a progesteron, v rozsahu 0,100–1,000  $\mu\text{g/l}$  pro estron a v rozsahu 0,050–1,000 pro kortizol a kortikosteron. Dále byla ověřena správnost a přesnost metody při použití na reálných vzorcích trusu a také bylo zjištěno, že koncentrace estronu, estradiolu a progesteronu se ve vzorku trusu pohybuje řádově ve vyšších desítkách až stovkách ng na 1 g vzorku. Z důvodu příliš nízké odezvy a vysokých matričních efektu nebylo možné touto metodou stanovit kortizol a kortikosteron.

Metoda vyvinutá v této práci umožňuje stanovovat estron, estradiol a progesteron v trusu. Na výsledky této práce také navázala kolegyně Klára Švihovcová svou již publikovanou bakalářskou prací, kde se zabývala vlivem jiného typu ionizace (APCI namísto ESI) na stanovení zájmových analytů a také extrakcí analytů z trusu pomocí SPE.



## 7 Použitá literatura

- [1] SCHWARZENBERGER, Franz a Janine L BROWN. Hormone monitoring: An important tool for the breeding management of wildlife species. *Wiener tierärztliche Monatsschrift*. 2013, **100**, 209–225.
- [2] BROWN, Janine L. Comparative ovarian function and reproductive monitoring of endangered mammals. *Theriogenology* [online]. 2018, **109**, 2–13. ISSN 0093691X. Dostupné z: doi:10.1016/j.theriogenology.2017.12.004
- [3] HALL, John E a Arthur C GUYTON. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. In: . THIRTEENTH EDITION. 2016, s. 1036–1049. ISBN 978-1-4557-7005-2.
- [4] TROJAN, S. *Lékařská fyziologie*. B.m.: Grada Publishing, 2003. ISBN 9788024705125.
- [5] SMITH, M. S. Estrus and menstrual cycles: Neuroendocrine control. In: *Encyclopedia of Neuroscience* [online]. B.m.: Elsevier Ltd, 2009 [vid. 2022-03-27], s. 1–5. ISBN 9780080450469. Dostupné z: doi:10.1016/B978-008045046-9.01170-0
- [6] PALME, Rupert. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiology and Behavior* [online]. 2019, **199**, 229–243. ISSN 1873507X. Dostupné z: doi:10.1016/j.physbeh.2018.11.021
- [7] TURNER, John W, Peter TOLSON a Noel HAMAD. Remote Assessment of Stress in White Rhinoceros (*Ceratotherium sirum*) and Black Rhinoceros (*Diceros bicornis*) by Measurement of Adrenal Steroids in Feces. *Source: Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2002, **33**(3), 214–221.
- [8] BASHAW, Meredith J., Florian SICKS, Rupert PALME, Franz SCHWARZENBERGER, Adrian S.W. TORDIFFE a Andre GANSWINDT. Non-invasive assessment of adrenocortical activity as a measure of stress in giraffe (*Giraffa camelopardalis*). *BMC Veterinary Research* [online]. 2016, **12**(1). ISSN 17466148. Dostupné z: doi:10.1186/s12917-016-0864-8
- [9] WHIRLEDGE, Shannon a John CIDLOWSKI. A Role for Glucocorticoids in Stress-Impaired Reproduction: Beyond the Hypothalamus and Pituitary. *Endocrinology* [online]. 2013, **154**. Dostupné z: doi:10.1210/en.2013-1652
- [10] VODRÁŽKA, Zdeněk. Biochemie. In: . B.m.: Academia, 2002, s. 76–84. ISBN 978-80-200-0600-4.
- [11] MCMURRY, John. Organická chemie. In: . 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2015, s. 952–958. ISBN 978-80-7080-930-3.
- [12] BREMER, Andrew A. a Walter L. MILLER. Regulation of Steroidogenesis. In: *Cellular Endocrinology in Health and Disease* [online]. B.m.: Academic Press, 2014 [vid. 2022-03-20], s. 207–227. ISBN 9780124081345. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-408134-5.00013-5
- [13] PETER, Innocent Damudu, Abd Wahid HARON, Faez Firdaus Abdullah JESSE, Mokrish AJAT, Mark Hiew Wen HAN, Wan Nor FITRI, Muhammad Sanusi YAHAYA a Mohammed Saad M. ALAMAARY. Opportunities and challenges associated with fecal progesterone metabolite analysis. *Veterinary World* [online]. 2018, **11**(10), 1466–1472. ISSN 22310916. Dostupné z: doi:10.14202/vetworld.2018.1466-1472
- [14] KUMAR, Ashok, S. MEHROTRA, S. S. DANGI, G. SINGH, Subhash CHAND, Lakhanpal SINGH, A. S. MAHLA, Sachin KUMAR a K. NEHRA. Faecal steroid metabolites assay as a non-invasive monitoring of reproductive status in animals.

- Veterinary World* [online]. 2013, **6**(1), 59–63. ISSN 09728988. Dostupné z: doi:10.5455/vetworld.2013.59-63
- [15] ISOBE, Naoki, Toshihiko NAKAO, Masayuki SHIMADA, Yukio FUKUMOTO, Hitoshi WATANABE, Shinji MINAMI, Ayako NODA a Yukinori YOSHIMURA. Fecal Progesterone and Estrone During Pregnancy in a Giraffe: A Case Report. *Journal of Reproduction and Development*. 2007, **53**(1).
- [16] SCHWARZENBERGER, Franz, Wolfram RIETSCHER, Jiri VAHALA, Dana HOLECKOVA, Pat THOMAS, Julia MALTZAN, Katrin BAUMGARTNER a Willem SCHAFTENAAR. Fecal progesterone, estrogen, and androgen metabolites for noninvasive monitoring of reproductive function in the female Indian rhinoceros, *Rhinoceros unicornis*. *General and Comparative Endocrinology* [online]. 2000, **119**(3), 300–307. ISSN 10956840. Dostupné z: doi:10.1006/gcen.2000.7523
- [17] MEUNIER, Maxime, Franz SCHWARZENBERGER a Baptiste MULOT. Use of a simplified non-invasive technic to monitor fecal progesterone metabolites and reproduction function in several zoo species: Efficacy of mini VIDAS® automate (bioMérieux). *Theriogenology* [online]. 2022, **179**, 69–77. ISSN 0093691X. Dostupné z: doi:10.1016/j.theriogenology.2021.11.015
- [18] KUMAR, Ashok, S. MEHROTRA, S. S. DANGI, G. SINGH, Subhash CHAND, Lakhanpal SINGH, A. S. MAHLA, Sachin KUMAR a K. NEHRA. Faecal steroid metabolites assay as a non-invasive monitoring of reproductive status in animals. *Veterinary World* [online]. 2013, **6**(1), 59–63. ISSN 09728988. Dostupné z: doi:10.5455/vetworld.2013.59-63
- [19] LUEDERS, Imke, Thomas B. HILDEBRANDT, Jason POOTOOLAL, Peter RICH, Charlie S. GRAY a Cheryl A. NIEMULLER. Ovarian ultrasonography correlated with fecal progestins and estradiol during the estrous cycle and early pregnancy in giraffes (*Giraffa camelopardalis rothschildi*). *Biology of Reproduction* [online]. 2009, **81**(5), 989–995. ISSN 00063363. Dostupné z: doi:10.1095/biolreprod.109.077743
- [20] WOLF, Tanja E., Norbert MANGWIRO, Folorunso O. FASINA a Andre GANSWINDT. Non-invasive monitoring of adrenocortical function in female domestic pigs using saliva and faeces as sample matrices. *PLOS ONE* [online]. 2020, **15**(6). Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0234971
- [21] KEAY, Jessica M, Jatinder SINGH, Matthew C GAUNT a Taranjit KAUR. Fecal Glucocorticoids and Their Metabolites as Indicators of Stress in Various Mammalian Species: A Literature Review. *Source: Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2006, **37**(3), 234–244.
- [22] PAWLUSKI, Jodi, Patrick JEGO, Séverine HENRY, Anaëlle BRUCHET, Rupert PALME, Caroline COSTE a Martine HAUSBERGER. Low plasma cortisol and fecal cortisol metabolite measures as indicators of compromised welfare in domestic horses (*Equus caballus*). *PLOS ONE* [online]. 2017, **12**(9). ISSN 19326203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0182257
- [23] DEHNHARD, M., A. SCHREER, O. KRONE, K. JEWGENOW, M. KRAUSE a R. GROSSMANN. Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). *General and Comparative Endocrinology* [online]. 2003, **131**(3), 345–352. ISSN 10956840. Dostupné z: doi:10.1016/S0016-6480(03)00033-9
- [24] DUFOUR, Patrice, Justine COURTOIS, Ysaline SEYNAEVE, Stéphanie PEETERS, Caroline LE GOFF, Etienne CAVALIER a Jérôme PONTHER. Development and

- validation of a liquid chromatography coupled to mass spectrometer (LC-MS) method for the simultaneous quantification of estrone-3-sulfate, progesterone, estrone and estradiol in serum of mares and American bison. *Research in Veterinary Science* [online]. 2021, **136**, 343–350. ISSN 15322661. Dostupné z: doi:10.1016/j.rvsc.2021.03.014
- [25] MURTAGH, R, V BEHRINGER a T DESCHNER. LC-MS as a method for non-invasive measurement of steroid hormones and their metabolites in urine and faeces of animals. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift-Veterinary Medicine Austria*. 2013, **100**.
- [26] WUDY, S. A., G. SCHULER, A. SÁNCHEZ-GUIJO a M. F. HARTMANN. The art of measuring steroids: Principles and practice of current hormonal steroid analysis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* [online]. 2018, **179**, 88–103 [vid. 2022-03-23]. ISSN 18791220. Dostupné z: doi:10.1016/J.JSBMB.2017.09.003
- [27] CROUCH, Stanley R, F James HOLLER, Donald M WEST a Douglas A SKOOG. *Analytická chemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2019. ISBN 978-80-7592-043-0.
- [28] NOVÁKOVÁ, Lucie, Michal DOUŠA a Petr ČESLA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. upravené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
- [29] ERIKSON, David W., Steven W. BLUE, Kristopher M. FECTEAU, Alison B. EDELMAN, Jeffrey T. JENSEN a Diana L. BLITHE. Simultaneous assay of segesterone acetate (Nestorone®), estradiol, progesterone, and estrone in human serum by LC–MS/MS. *Contraception* [online]. 2020, **102**(5), 361–367. ISSN 18790518. Dostupné z: doi:10.1016/j.contraception.2020.08.006
- [30] FERRER, Imma, E Michael THURMAN a Jerry A ZWEIGENBAUM. Application Note Environmental Authors Mass Spectrometry Analysis of Hormones in Water by Direct Injection Using the Agilent 6470 Triple Quadrupole Mass Spectrometer 2. 2018, **5994–0317EN**, 1–6.
- [31] DUFOUR, Patrice, Justine COURTOIS, Ysaline SEYNAEVE, Stéphanie PEETERS, Caroline LE GOFF, Etienne CAVALIER a Jérôme PONTHER. Development and validation of a liquid chromatography coupled to mass spectrometer (LC-MS) method for the simultaneous quantification of estrone-3-sulfate, progesterone, estrone and estradiol in serum of mares and American bison. *Research in Veterinary Science* [online]. 2021, **136**, 343–350. ISSN 15322661. Dostupné z: doi:10.1016/j.rvsc.2021.03.014
- [32] HÄKKINEN, Merja R., Taija HEINOSALO, Niina SAARINEN, Tero LINNANEN, Raimo VOUTILAINEN, Timo LAKKA, Jarmo JÄÄSKELÄINEN, Matti POUTANEN a Seppo AURIOLA. Analysis by LC–MS/MS of endogenous steroids from human serum, plasma, endometrium and endometriotic tissue. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2018, **152**, 165–172. ISSN 1873264X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2018.01.034
- [33] LUCHE, Greta Dalle, Susan Bengtson NASH, John R. KUCKLICK, Fletcher M.J. MINGRAMM a Ashley S.P. BOGGS. Liquid chromatography tandem mass spectrometry for the quantification of steroid hormone profiles in blubber from stranded humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). *Conservation Physiology* [online]. 2019, **7**(1). ISSN 20511434. Dostupné z: doi:10.1093/conphys/coz030
- [34] JOHN, Clara, Philipp WERNER, Anna WORTHMANN, Katrin WEGNER, Klaus TÖDTER, Ludger SCHEJA, Sascha ROHN, Joerg HEEREN a Markus FISCHER. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based method for the simultaneous determination of hydroxy sterols and bile acids. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, **1371**, 184–195. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.10.064

- [35] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. upravené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8560-6.
- [36] CENTER FOR BIOLOGICS EVALUATION AND RESEARCH, Center for Drug Evaluation and Research. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (Q2(R1))*. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q2r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology-guidance-industry>. 2005.
- [37] VAN LOCO, Joris, Marc ELSKENS, Christophe CROUX a Hedwig BEERNAERT. Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. *Accreditation and Quality Assurance* [online]. 2002, 7(7), 281–285. Dostupné z: doi:10.1007/s00769-002-0487-6
- [38] ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES. *Guidelines for Standard Method Performance Requirements: Appendix F*. <https://www.aoac.org/resources/guidelines-for-standard-method-performance-requirements/>.

## 8 Seznam symbolů a zkratk

A	Faktor asymetrie
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
Arb	Arbitrární jednotka
B	Kortikosteron
C18	Oktadecylsilikagel
E1	Estron
E2	Estradiol
ESI	Ionizace elektrosprejem
F	Kortizol
FSH	Folikuly stimulující hormon
GnRH	Gonadotropiny uvolňující hormon
IS	Vnitřní standard
k	Směrnice kalibrační křivky
LC	Kapalinová chromatografie
LH	Luteinizační hormon
m/z	Poměr hmotnosti ku náboji
MF	Mobilní fáze
MF-A	Mobilní fáze A
MF-B	Mobilní fáze B
MS	hmotnostní spektrometrie
NF	Pík nebyl identifikován
P4	Progesteron
PTFE	Polytetrafluorethylen
q	Intercept
QqQ	Trojité kvadrupól
R	Rozlišení
S/N	poměr signálu ku šumu
SPE	Extrakce na tuhou fázi
ST	Standard
TIC	Celkový iontový proud

$t_R$	Retenční čas
VZ	Vzorek
$w_g$	průměrná šířka píku při gradientové eluci při jeho základně

## 9 Přílohy

### 9.1 Příloha A

**Tab. 20:** Primární data k výpočtu rozlišení.

Analyt	$t_R$ [min]	Šířka píku [min]
Kortizol	2,88	0,14
Kortikosteron	3,74	0,12
Estradiol	4,66	0,13
Estron	5,14	0,12
Progesteron	6,66	0,15

**Tab. 21:** Hodnoty rozlišení mezi jednotlivými analyty.

Rozlišení mezi píky	R
Kortizol–Kortikosteron	6,5
Kortikosteron–Estradiol	7,0
Estradiol–Estron	3,6
Estron–Progesteron	11,5

### 9.2 Příloha B

**Tab. 22:** Primární data a hodnoty faktoru asymetrie.

Analyt	Retenční čas [min]	Retenční čas ve vzestupné části píku v 5 % jeho výšky [min]	Retenční čas v sestupné části píku v 5 % jeho výšky [min]	A
Kortizol	2,88	2,83	2,95	1,40
Kortikosteron	3,74	3,69	3,80	1,20
Estradiol	4,66	4,61	4,73	1,40
Estron	5,14	5,09	5,20	1,20
Progesteron	6,66	6,61	6,73	1,40

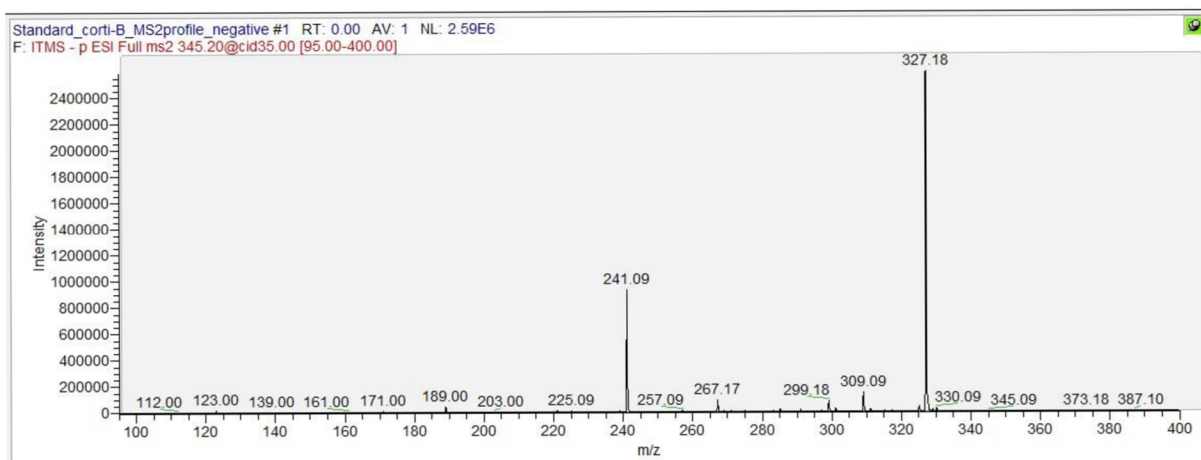
### 9.3 Příloha C

**Tab. 23:** Primární data pro výpočet faktoru asymetrie, optimalizace objemu nástřiku.

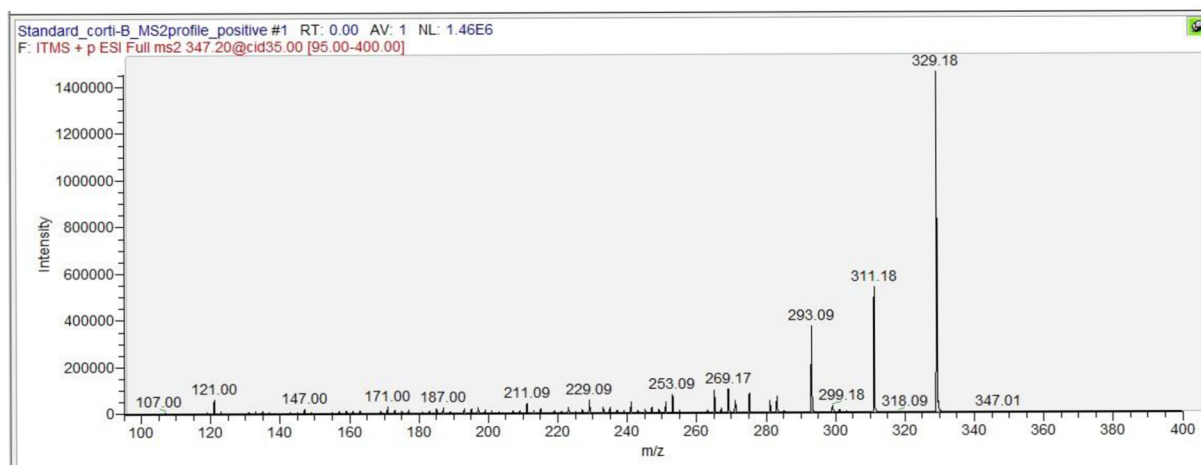
Objem nástřiku; koncentrace analytů	Analyt	Retenční čas [min]	Retenční čas ve vzestupné části píku v 5 % jeho výšky [min]	Retenční čas v sestupné části píku v 5 % jeho výšky [min]	A
10 µl; 10 µg/l	Kortizol	2,88	2,83	2,94	1,20
	Kortikosteron	3,71	3,65	3,78	1,17
	Estradiol	4,62	4,58	4,67	1,25
	Estron	5,09	5,05	5,14	1,25
	Progesteron	6,59	6,54	6,65	1,20
10 µl; 1 µg/l	Kortizol	2,88	2,83	2,95	1,4
	Kortikosteron	3,7	3,65	3,77	1,4
	Estradiol	/	/	/	/
	Estron	/	/	/	/
	Progesteron	6,58	6,55	6,62	1,33
25 µl; 10 µg/l	Kortizol	2,89	2,84	2,96	1,40
	Kortikosteron	3,72	3,66	3,79	1,17
	Estradiol	4,63	4,58	4,69	1,20
	Estron	5,10	5,05	5,16	1,20
	Progesteron	6,59	6,54	6,66	1,40
25 µl; 1 µg/l	Kortizol	2,89	2,84	2,96	1,40
	Kortikosteron	3,71	3,65	3,79	1,33
	Estradiol	/	/	/	/
	Estron	5,09	5,05	5,14	1,25
	Progesteron	6,59	6,54	6,65	1,20



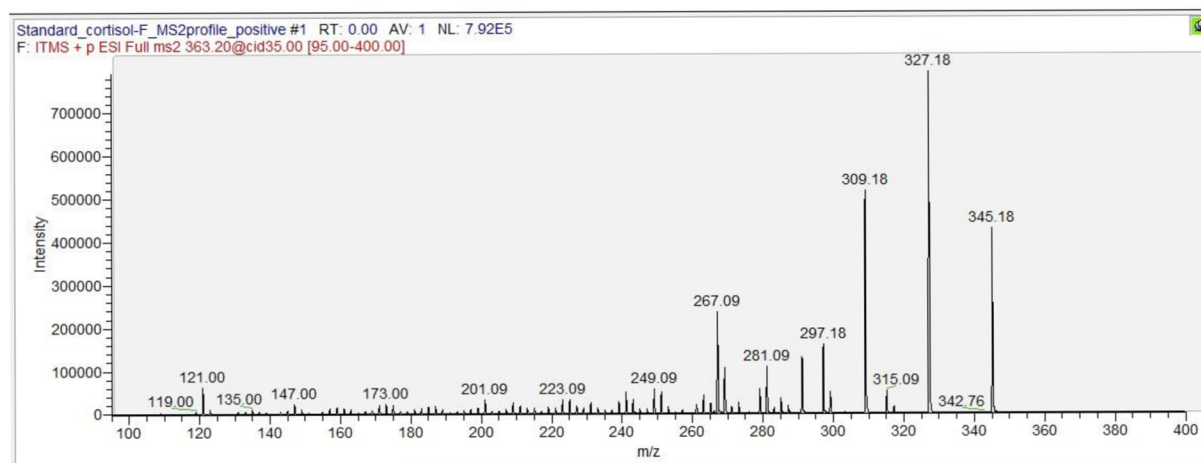
## 9.4 Příloha D



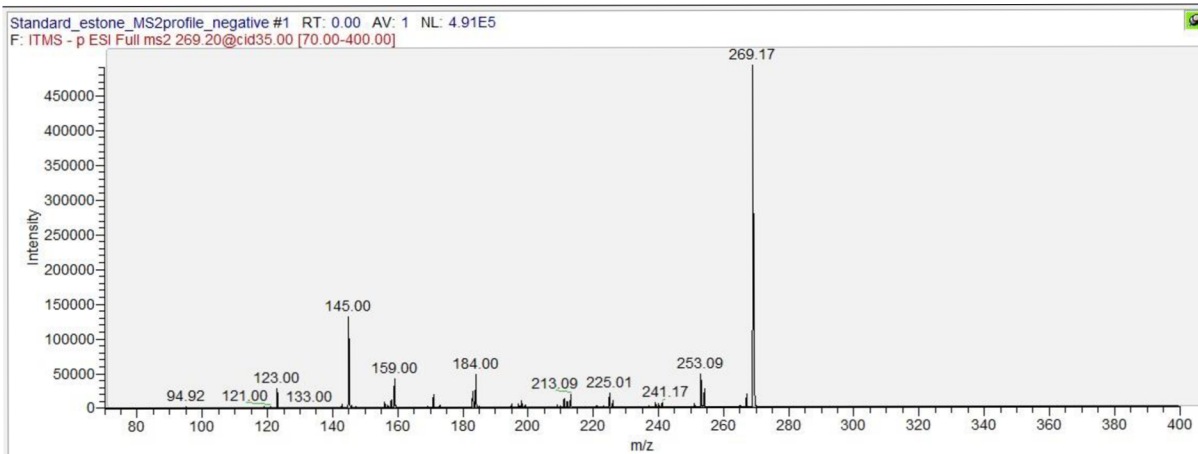
Obr. 18: Hmotnostní spektrum kortikosteronu, negativní mód ionizace.



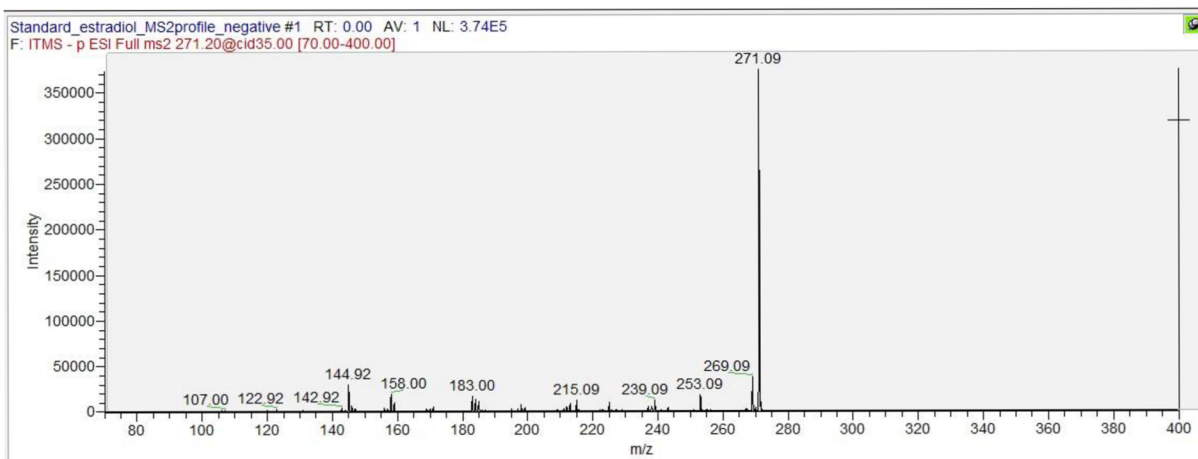
Obr. 19: Hmotnostní spektrum kortikosteronu, pozitivní mód ionizace.



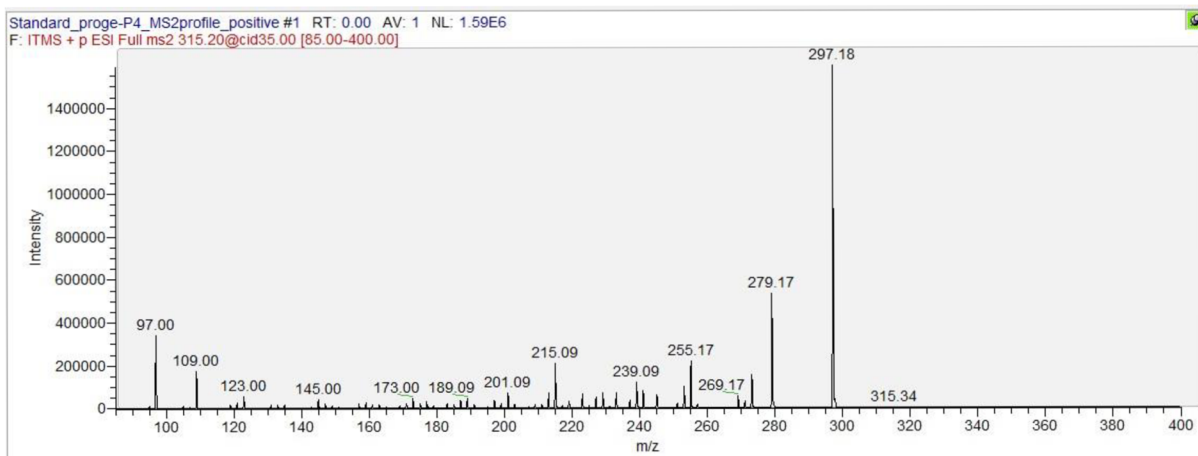
Obr. 20: Hmotnostní spektrum kortizolu, pozitivní mód ionizace.



**Obr. 21:** Hmotnostní spektrum estronu, negativní mód ionizace.

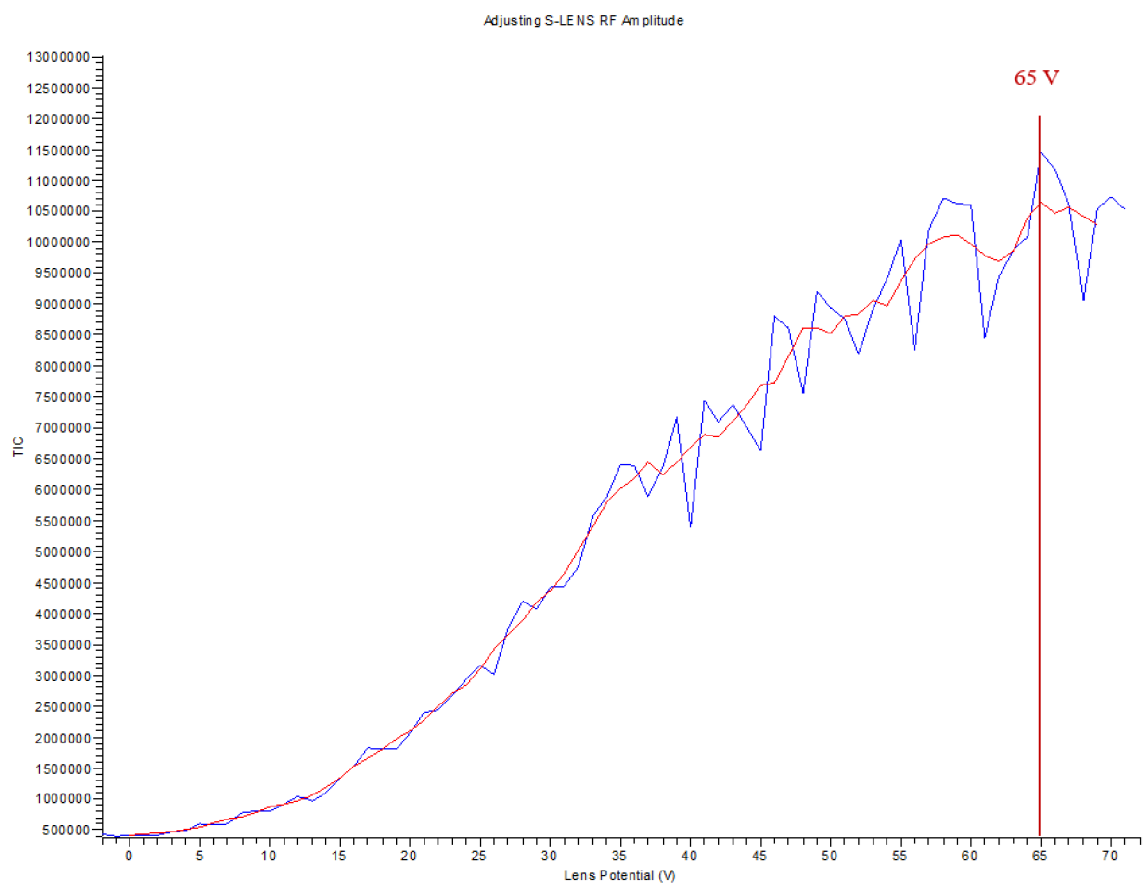


**Obr. 22:** Hmotnostní spektrum estradiolu, negativní mód ionizace.

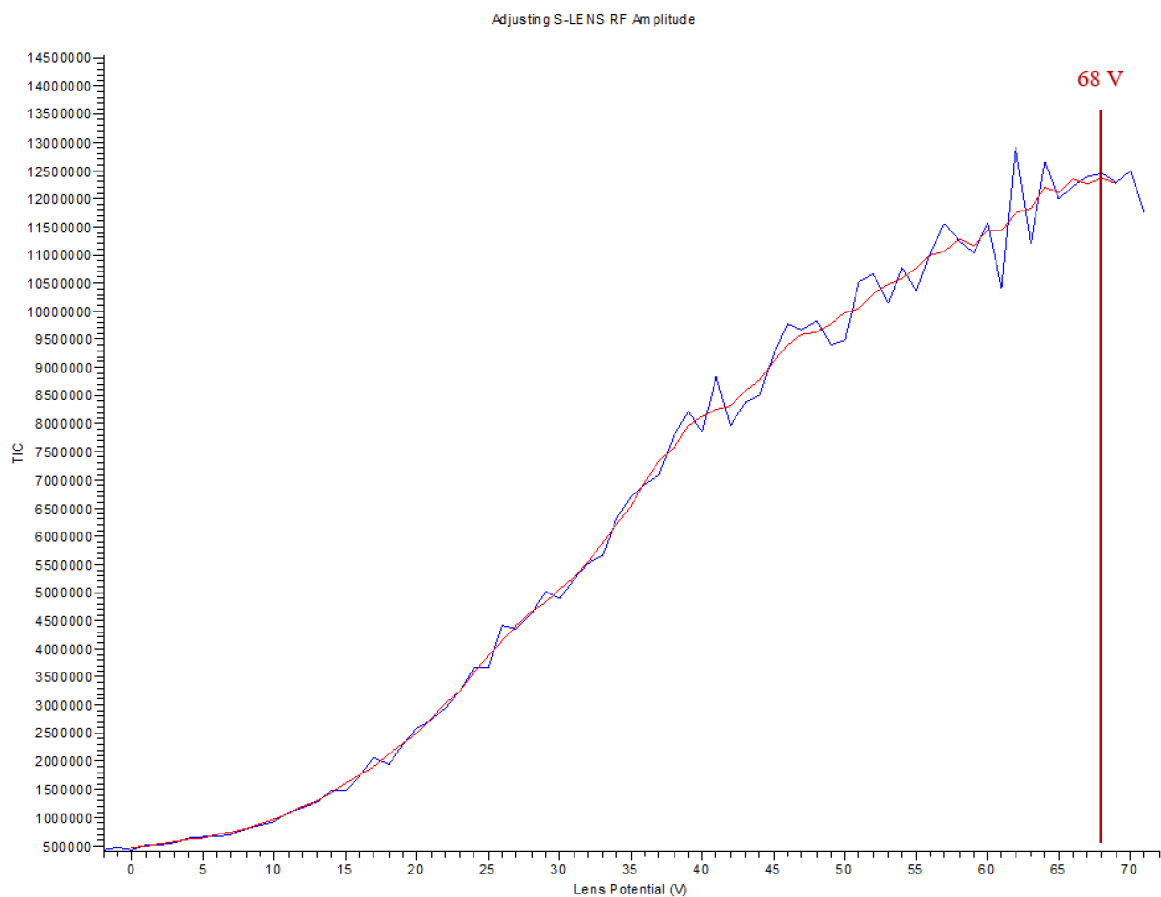


**Obr. 23:** Hmotnostní spektrum progesteronu, pozitivní mód ionizace.

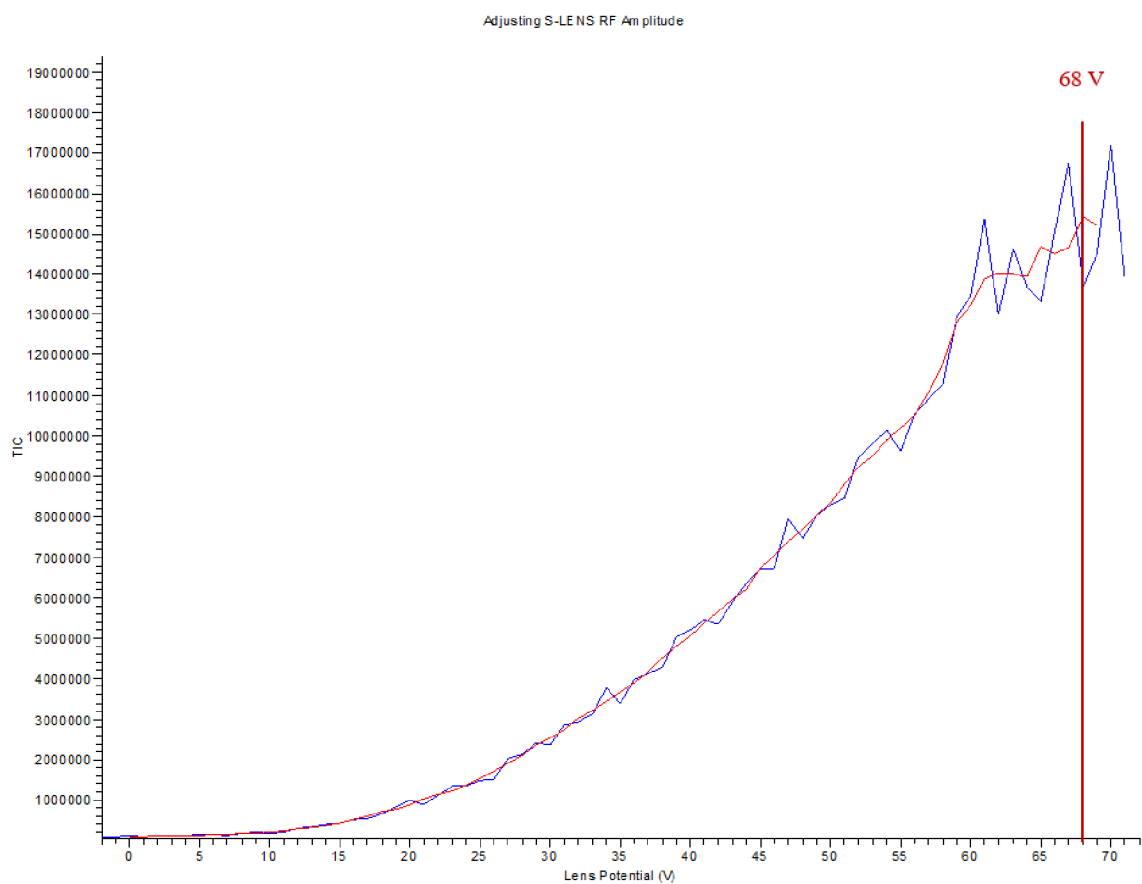
## 9.5 Příloha E



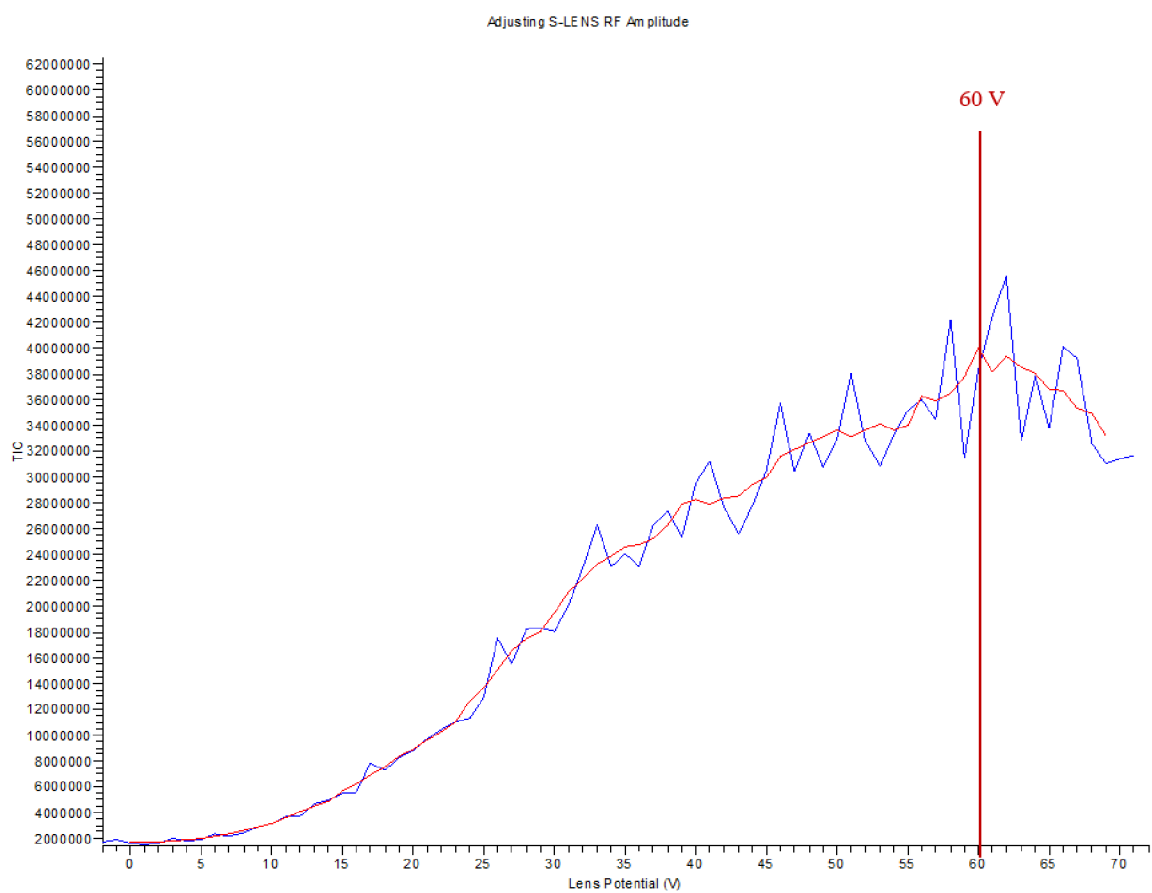
**Obr. 24:** Optimalizace napětí na S-čočkách pro estradiol.



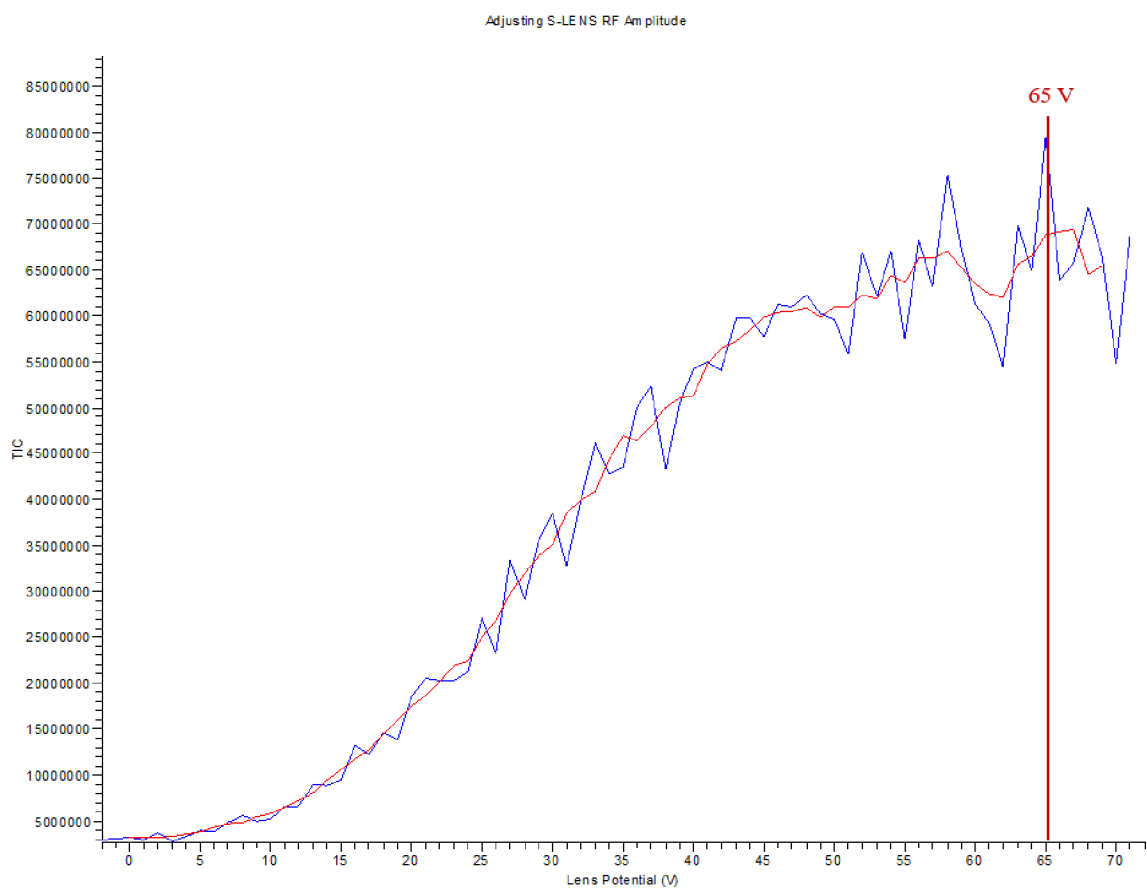
**Obr. 25:** Optimalizace napětí na S-čočkách pro estron.



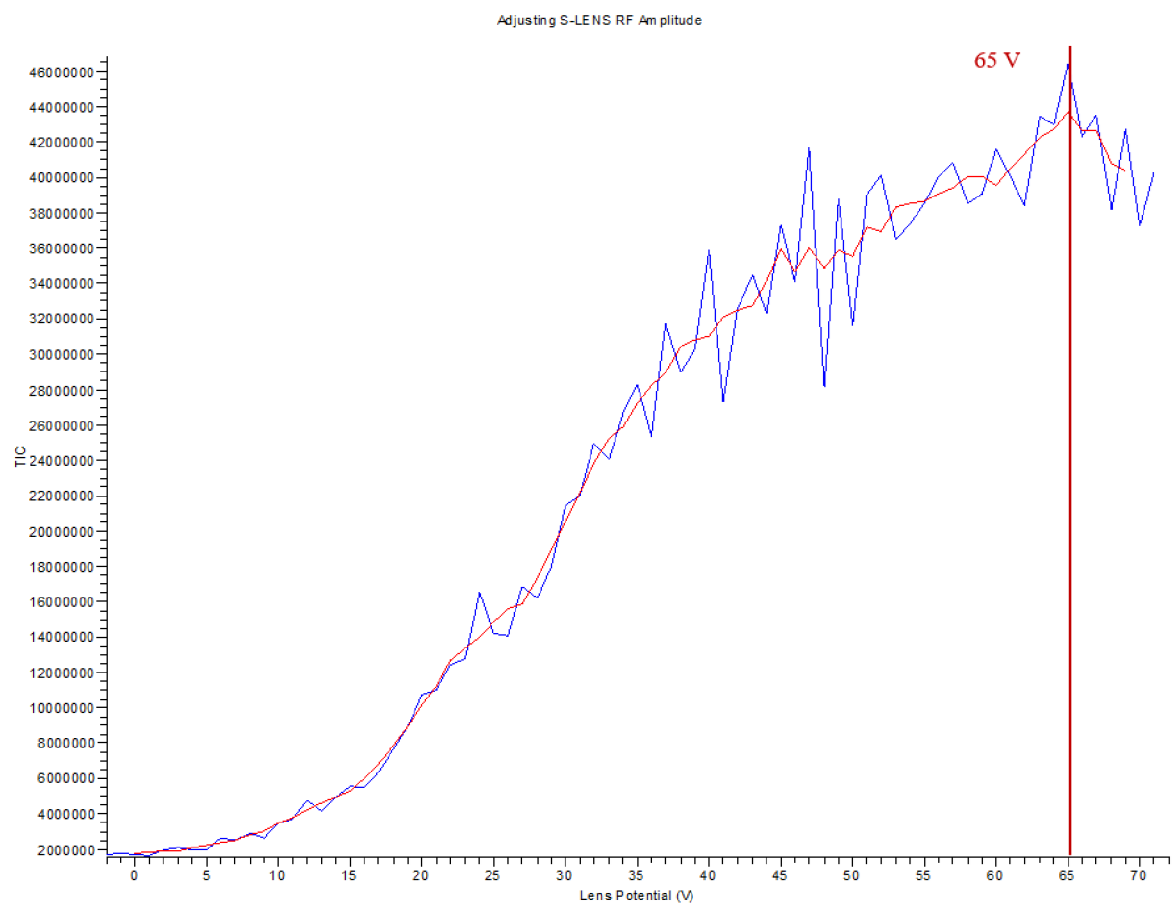
**Obr. 26:** Optimalizace napětí na S-čočkách pro kortikosteron, negativní mód ionizace.



**Obr. 27:** Optimalizace napětí na S-čočkách pro kortikosteron, pozitivní mód ionizace.

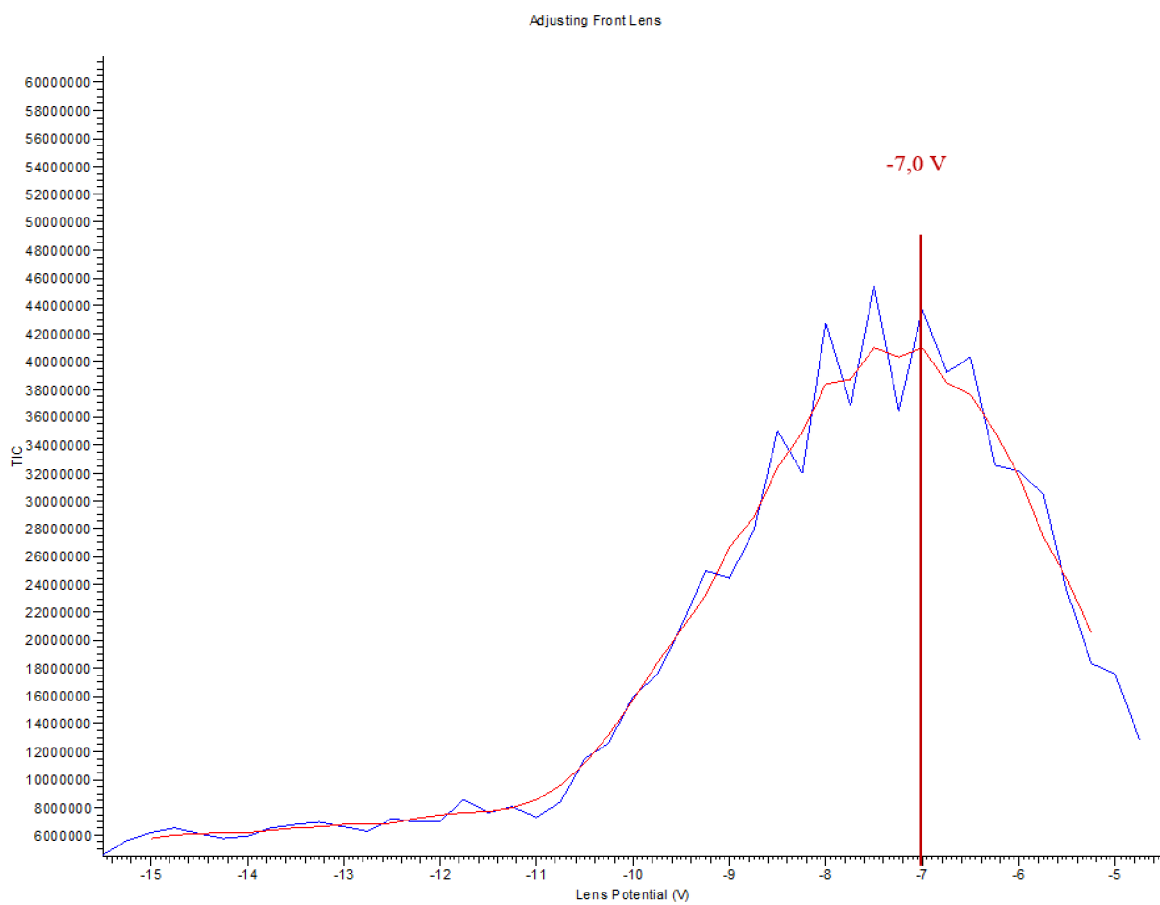


**Obr. 28:** Optimalizace napětí na S-čočkách pro progesteron.

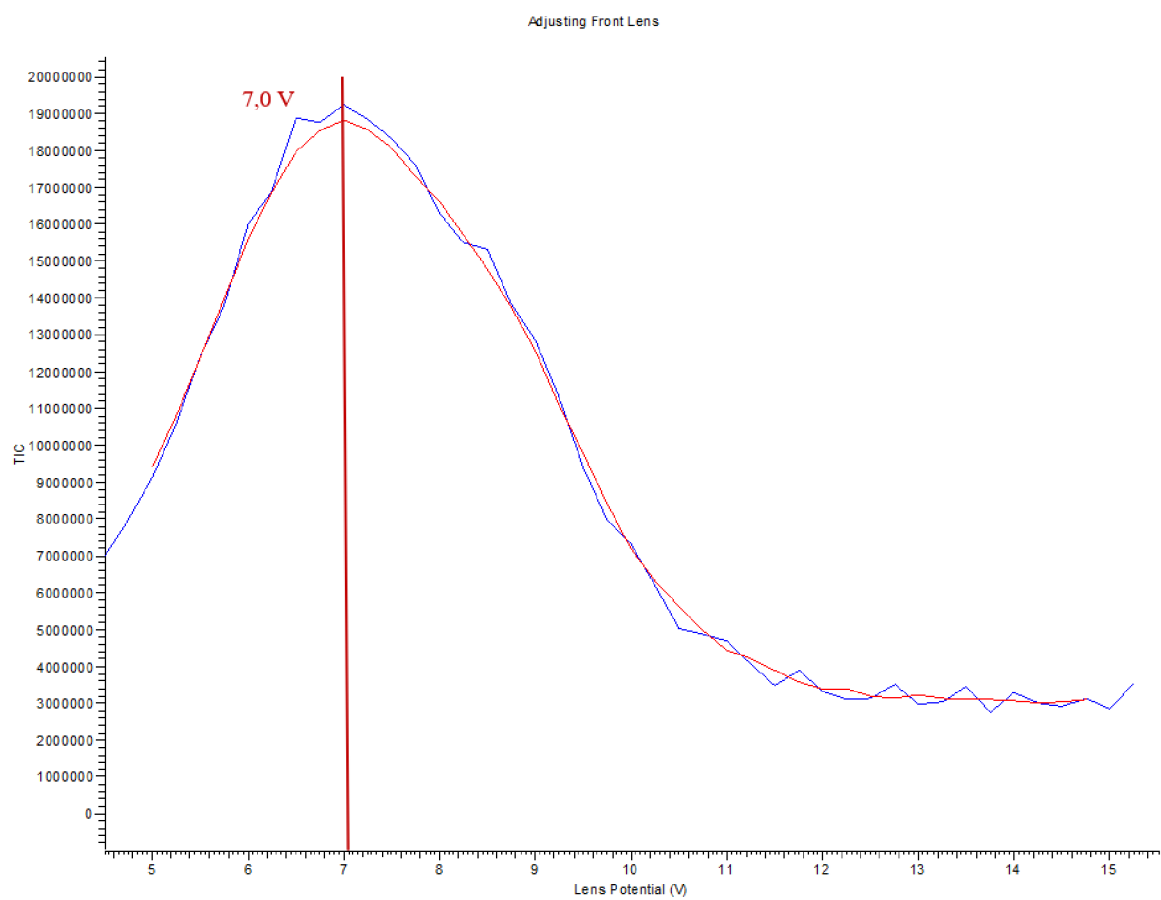


**Obr. 29:** Optimalizace napětí na S-čočkách pro kortizol.

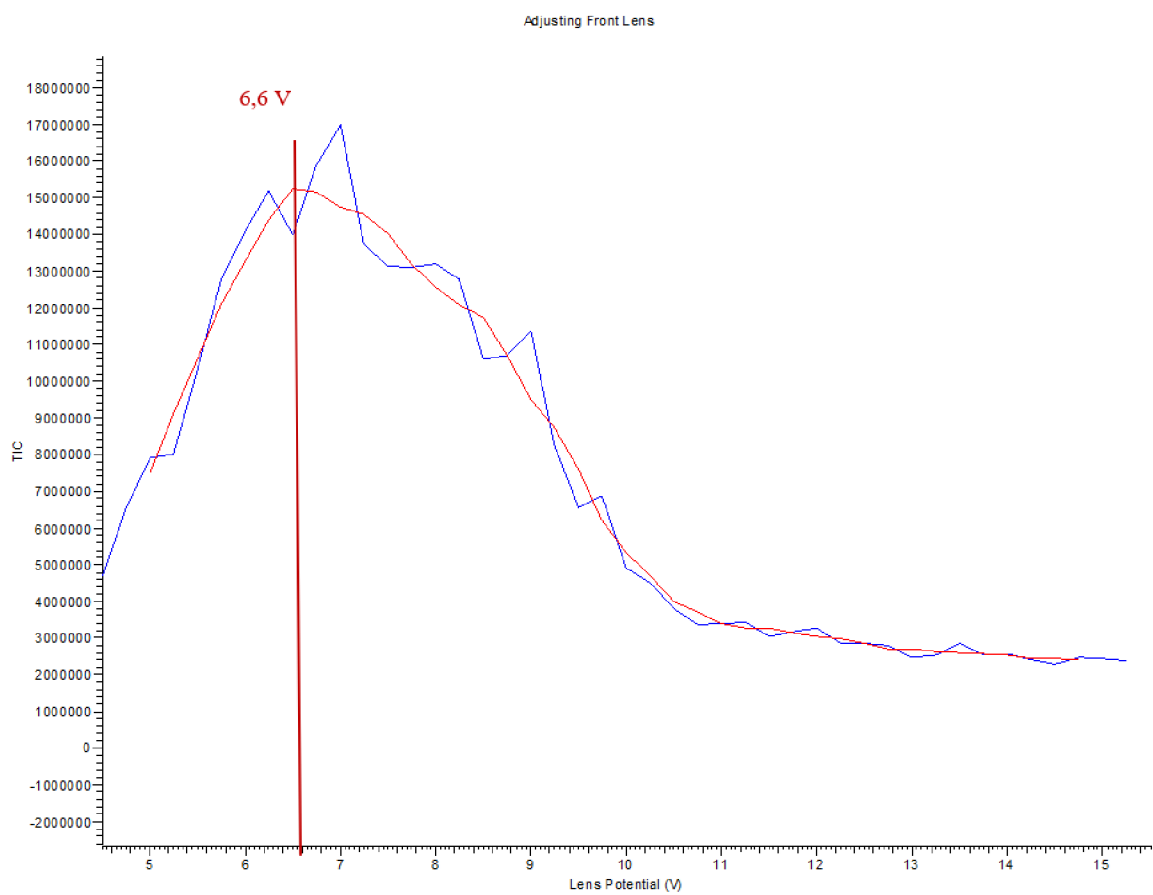




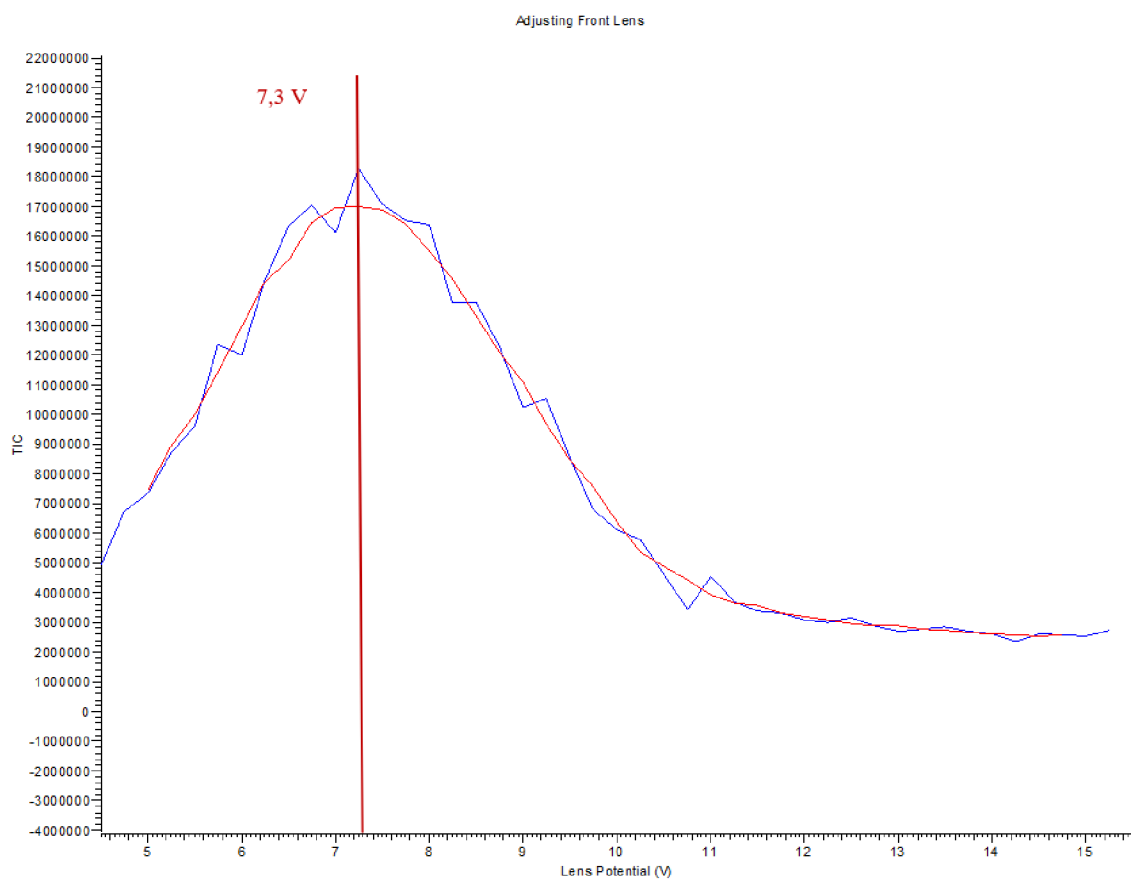
**Obr. 30:** Optimalizace napětí na F-čočkách pro kortizol.



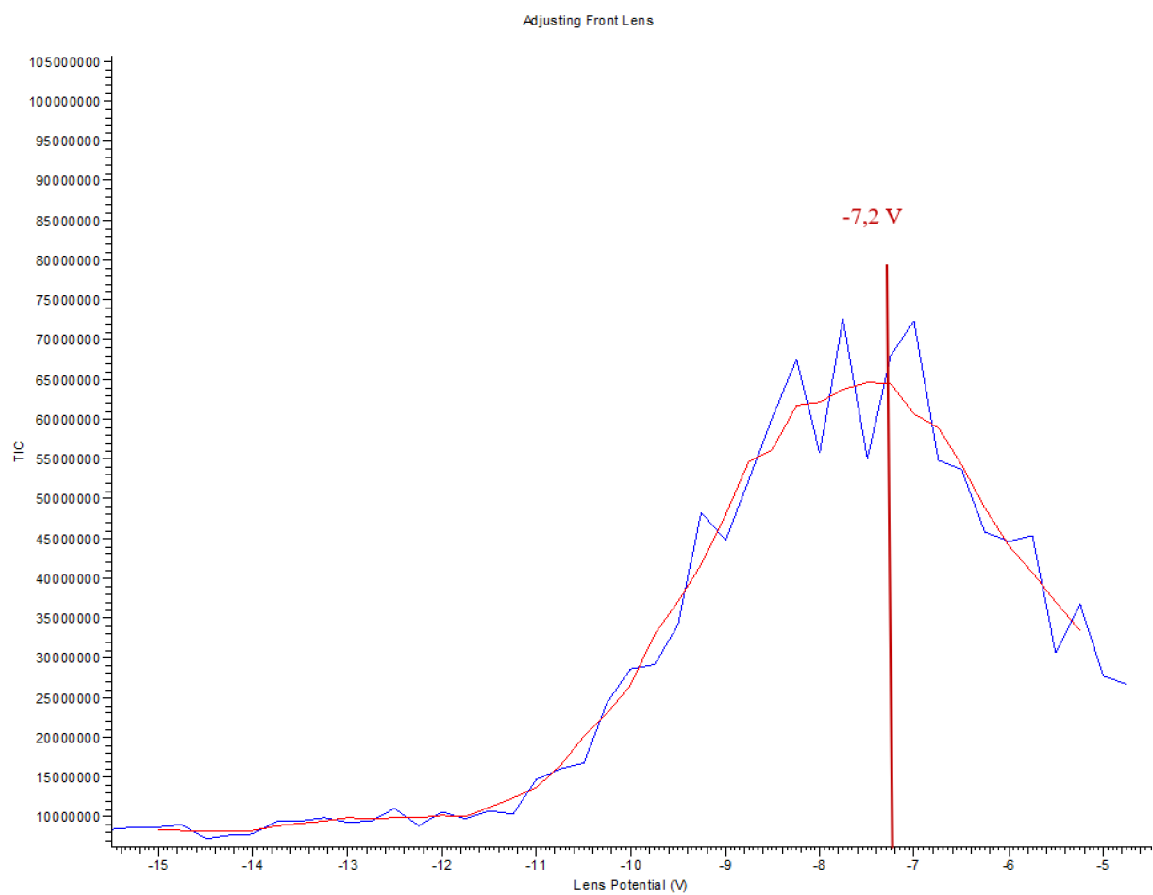
**Obr. 31:** Optimalizace napětí na F-čočkách pro estron.



**Obr. 32:** Optimalizace napětí na F-čočkách pro kortikosteron, negativní mód ionizace.

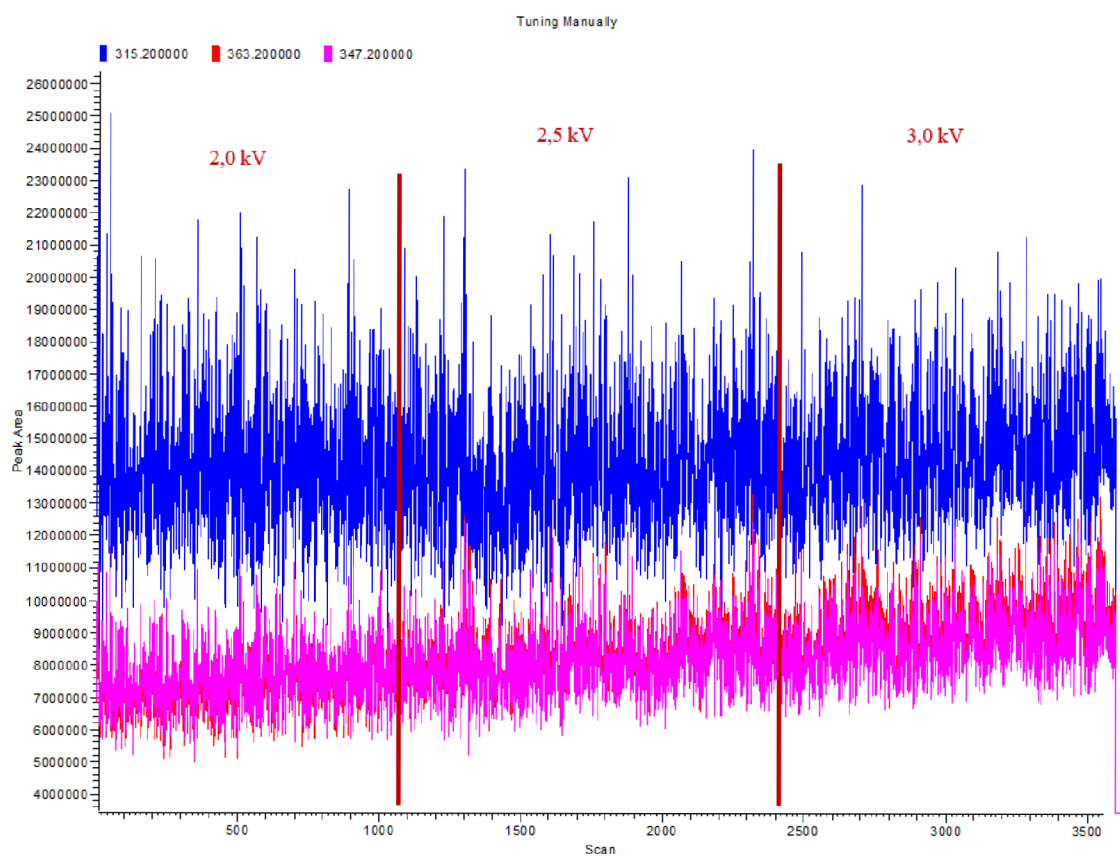


**Obr. 33:** Optimalizace napětí na F-čočkách pro estradiol.

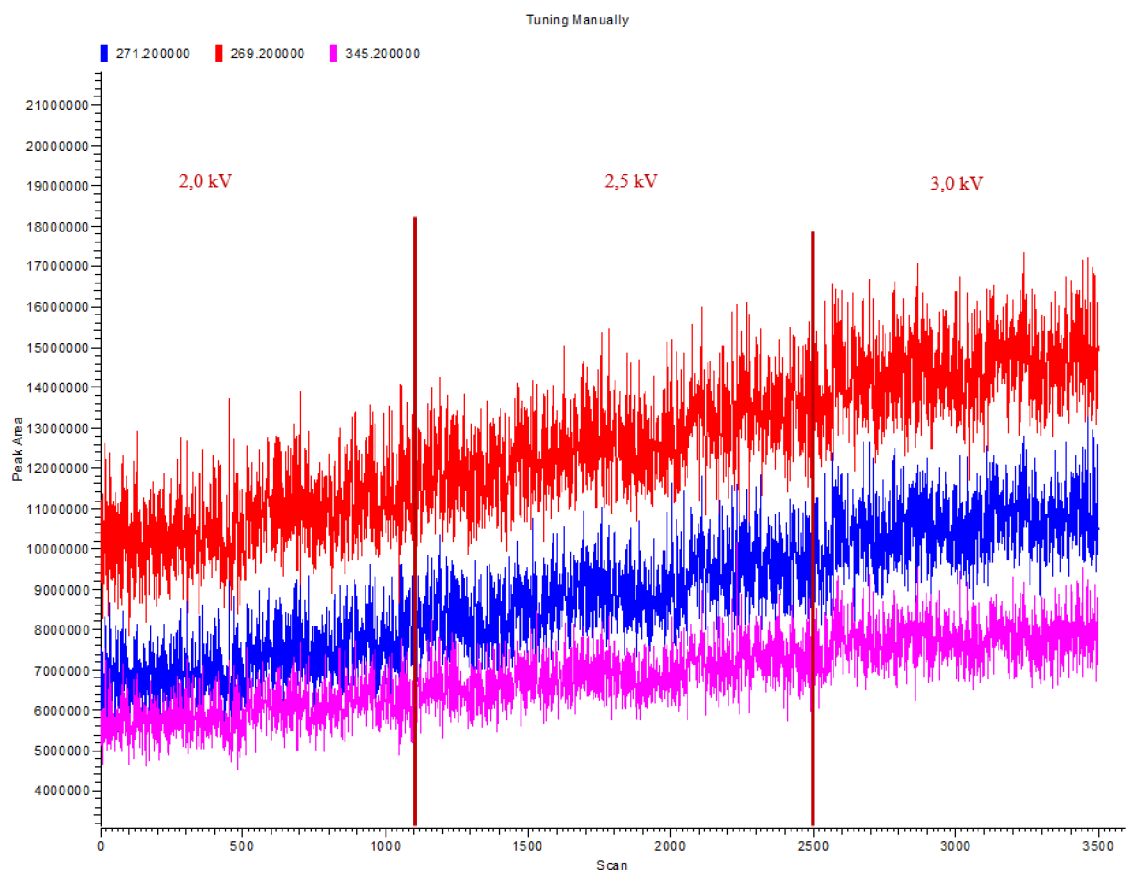


**Obr. 34:** Optimalizace napětí na F-čočkách pro progesteron.

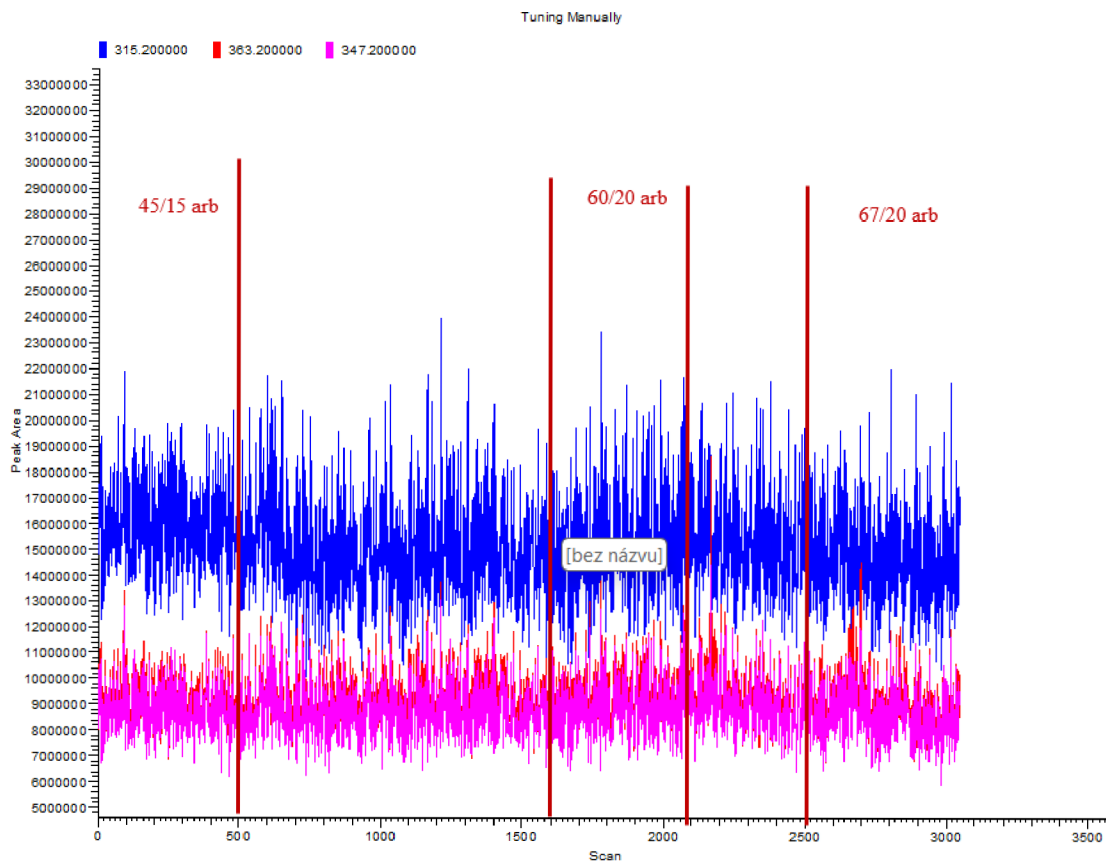
## 9.6 Příloha F



Obr. 35: Optimalizace napětí na kapiláře, pozitivní mód ionizace.

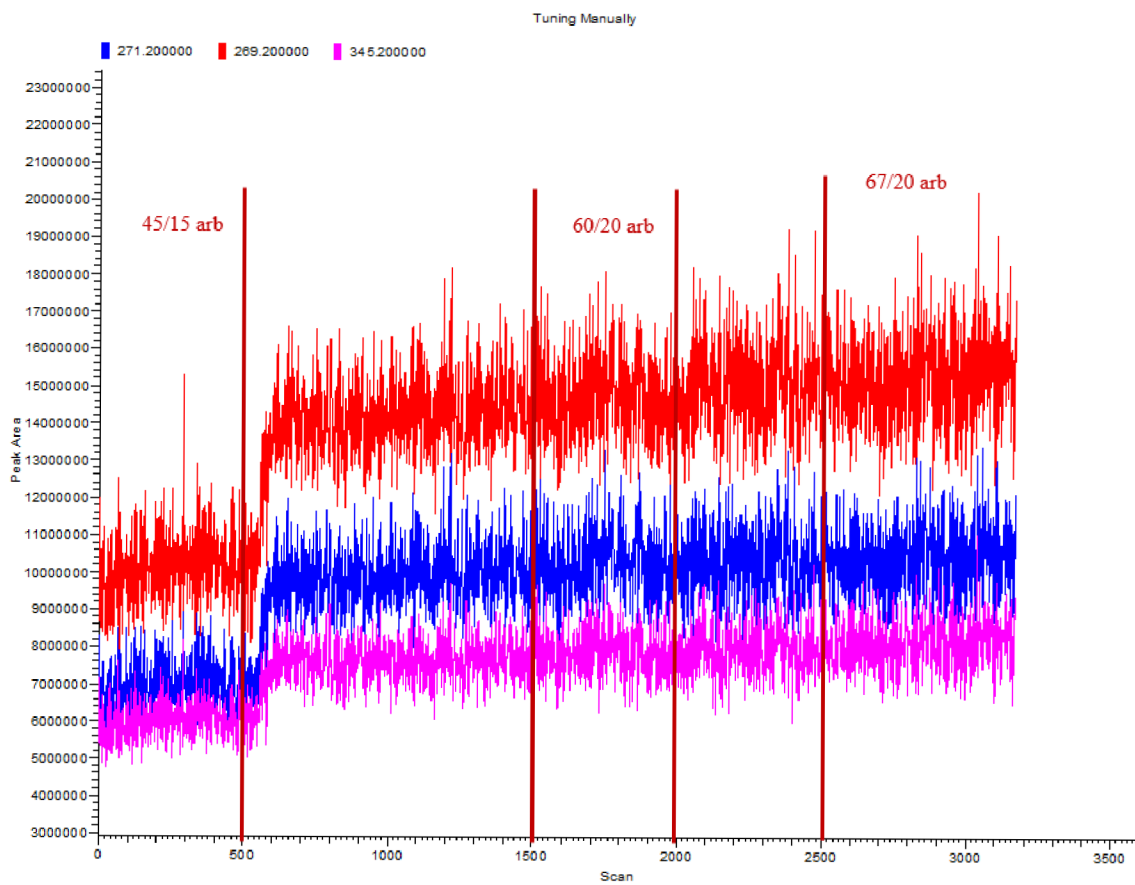


**Obr. 36:** Optimalizace napětí na kapiláře, negativní mód.



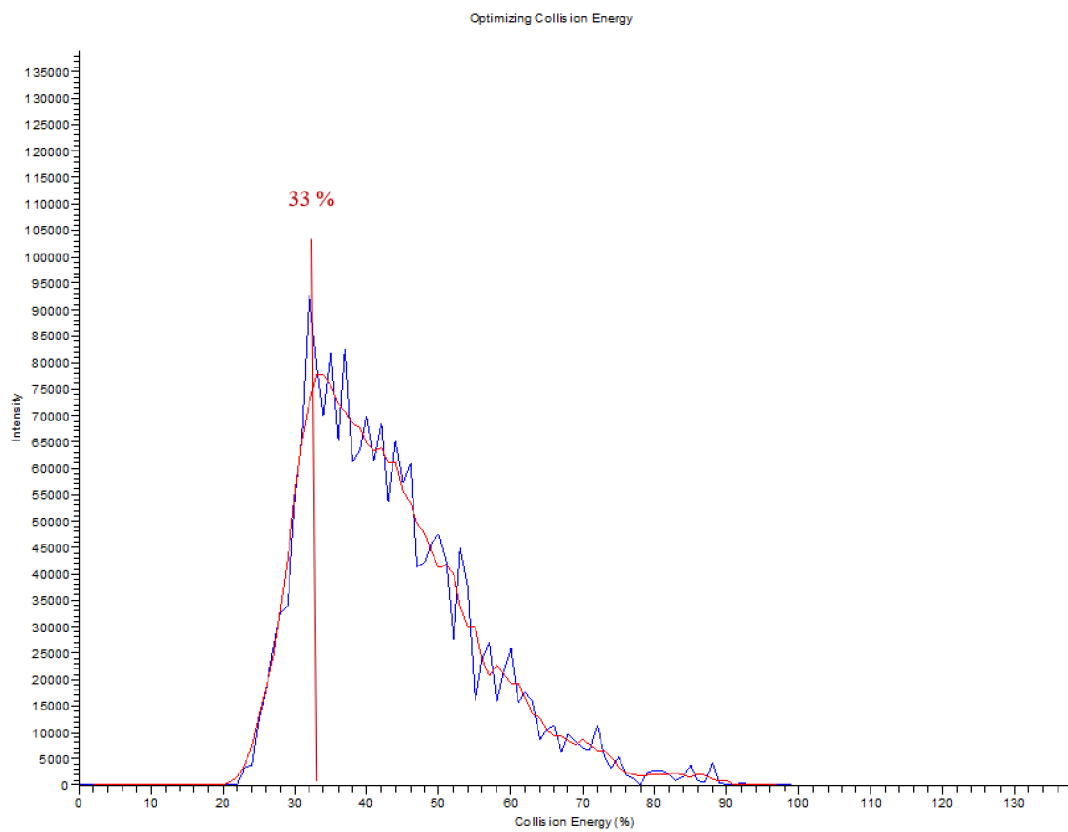
**Obr. 37:** Optimalizace průtoku hlavního a pomocného zmlžovacího plynu, pozitivní mód ionizace.



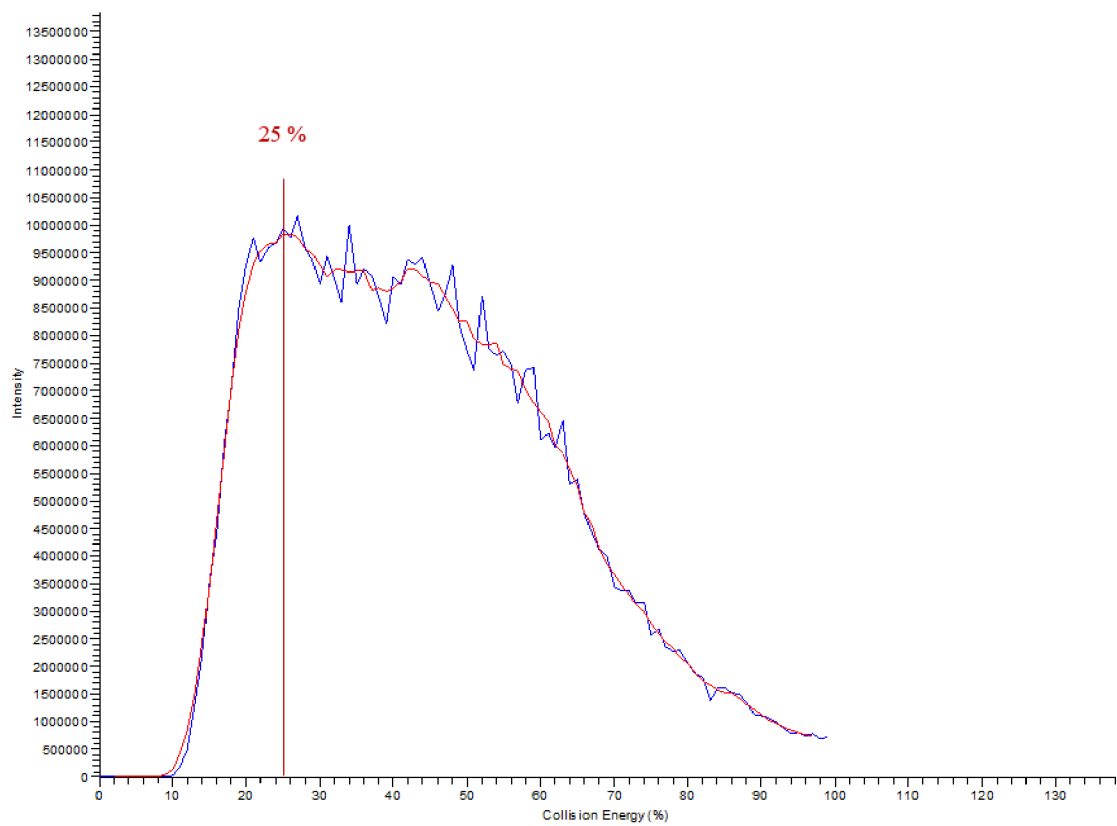


**Obr. 38:** Optimalizace průtoku hlavního a pomocného zmlžovacího plynu, negativní mód ionizace.

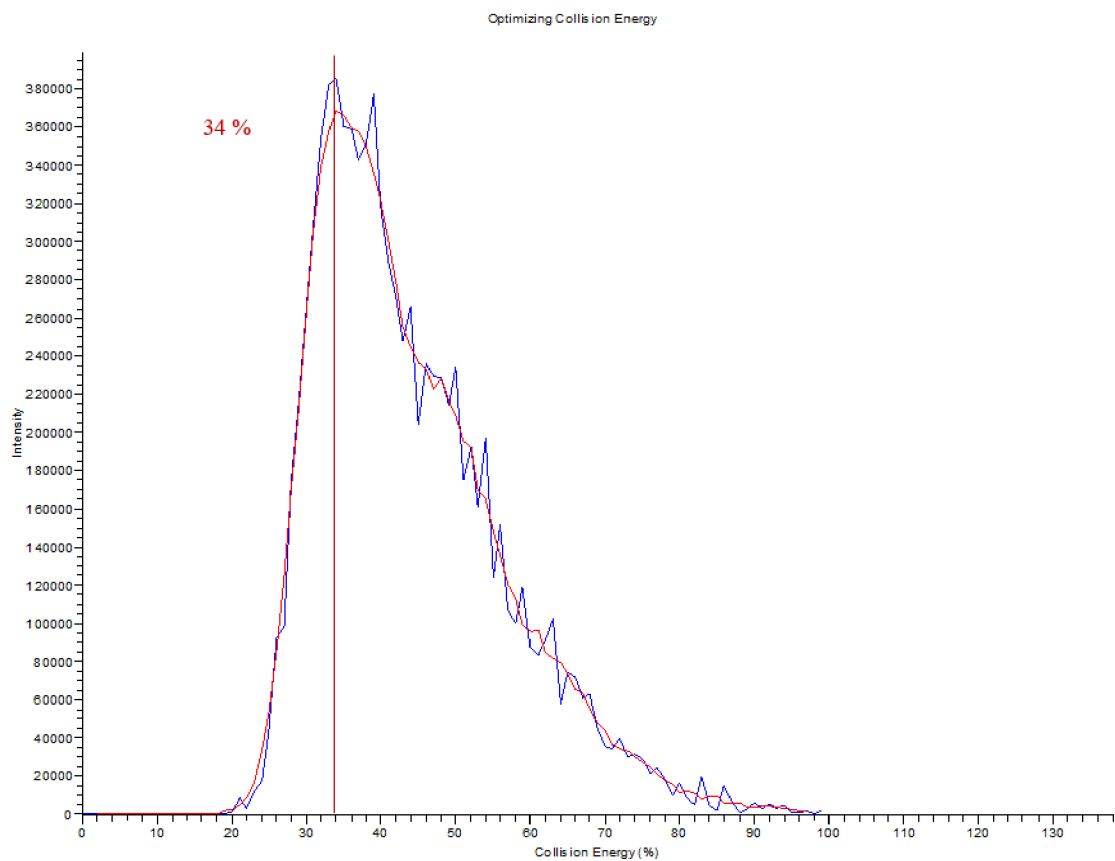
## 9.7 Příloha G



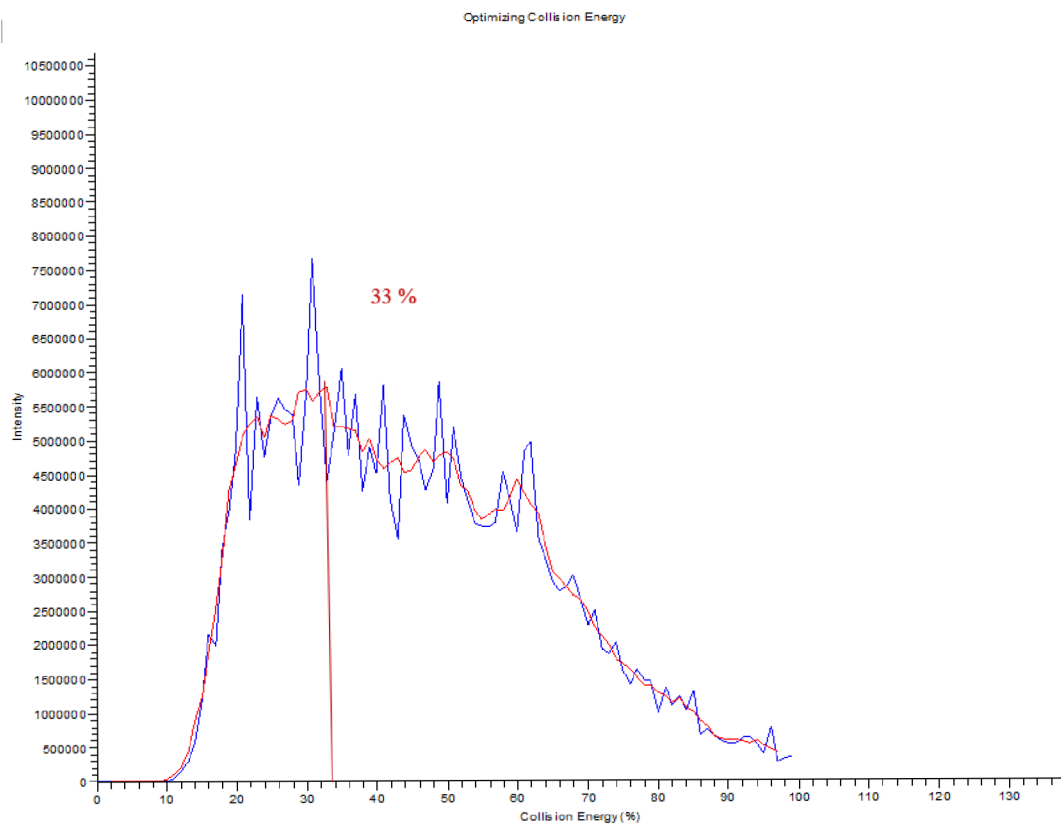
**Obr. 39:** Optimalizace kolizní energie pro hmotnostní přechod 271 → 145.



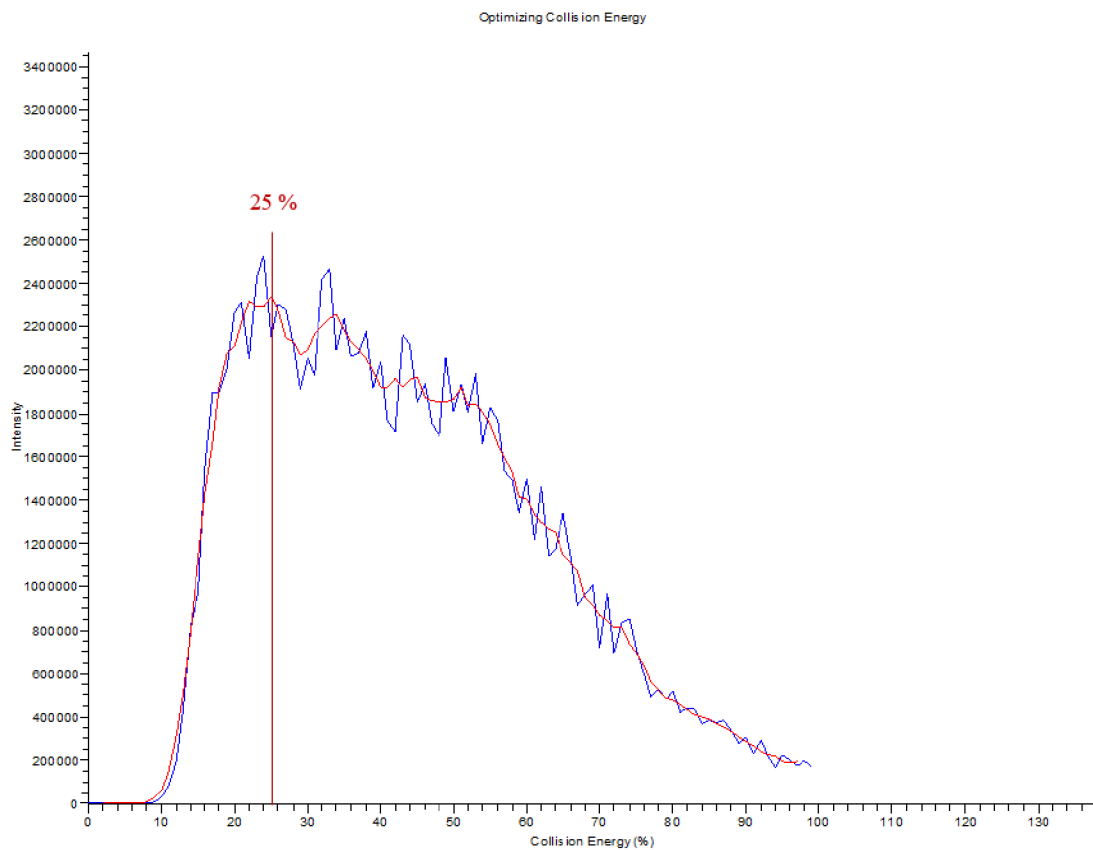
**Obr. 40:** Optimalizace kolizní energie pro hmotnostní přechod 345→327.



**Obr. 41:** Optimalizace kolizní energie pro hmotnostní přechod 269→145.



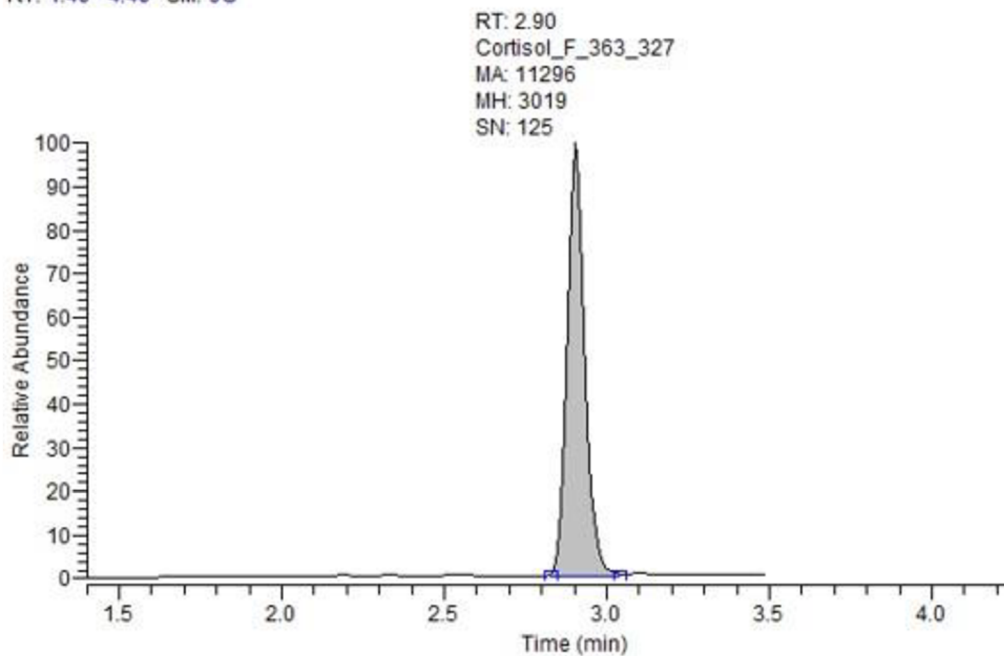
**Obr. 42:** Optimalizace kolizní energie pro hmotnostní přechod 315→297.



**Obr. 43:** Optimalizace kolizní energie pro hmotnostní přechod 363→327.

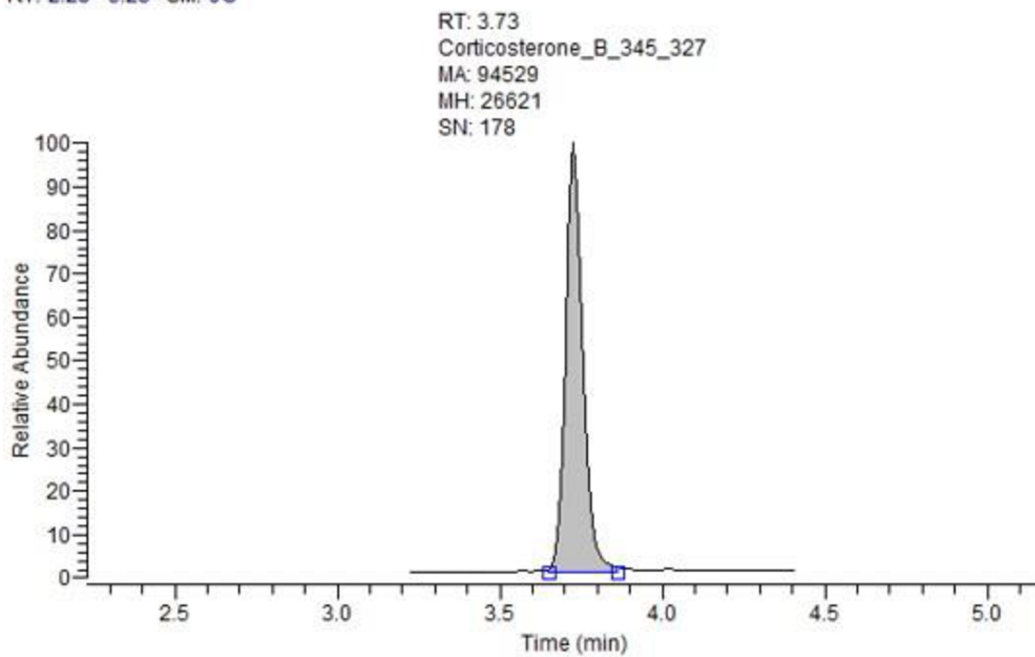
## 9.8 Příloha H

RT: 1.40 - 4.40 SM: 9G



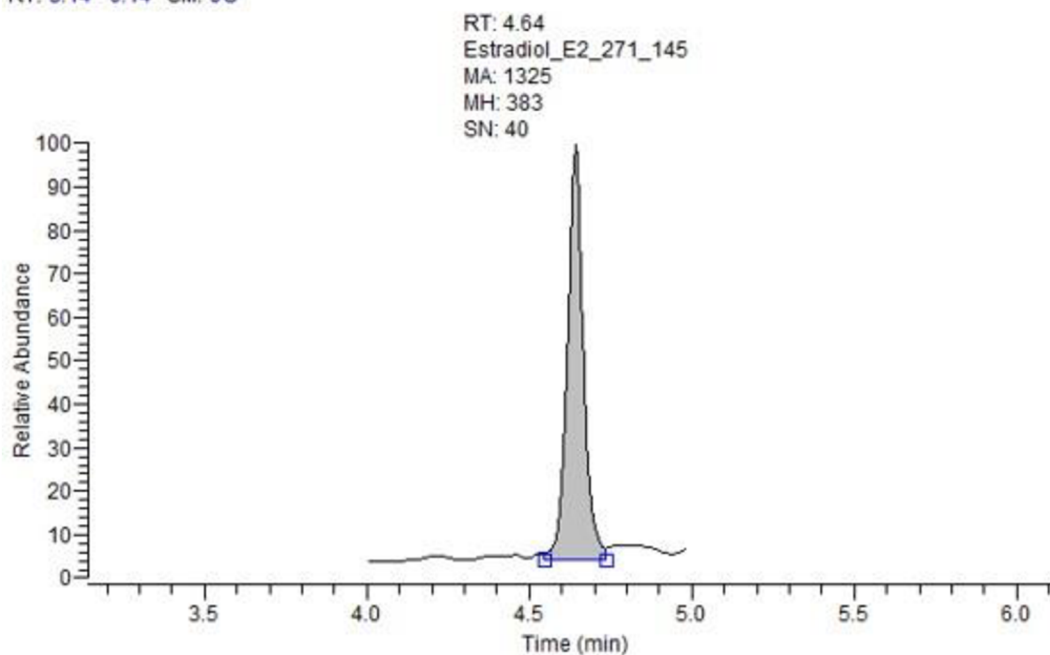
**Obr. 44:** Extrahovaný iontový chromatogram vybraného produktového iontu kortizolu.

RT: 2.23 - 5.23 SM: 9G



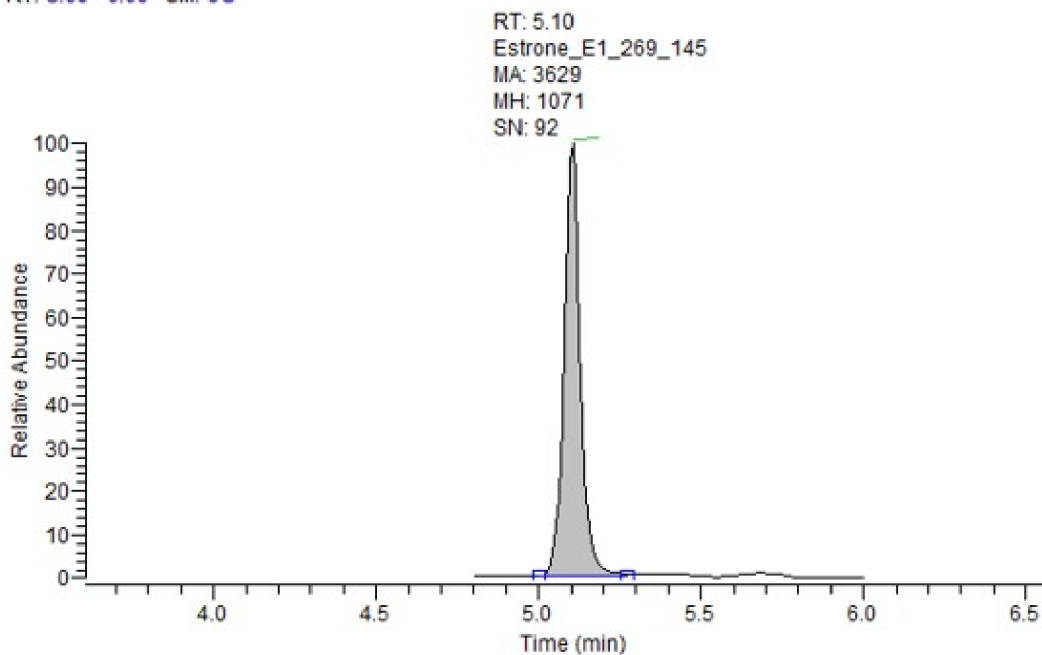
**Obr. 45:** Extrahovaný iontový chromatogram vybraného produktového iontu kortikosteronu.

RT: 3.14 - 6.14 SM: 9G



**Obr. 46:** Extrahovaný iontový chromatogram vybraného produktového iontu estradiolu.

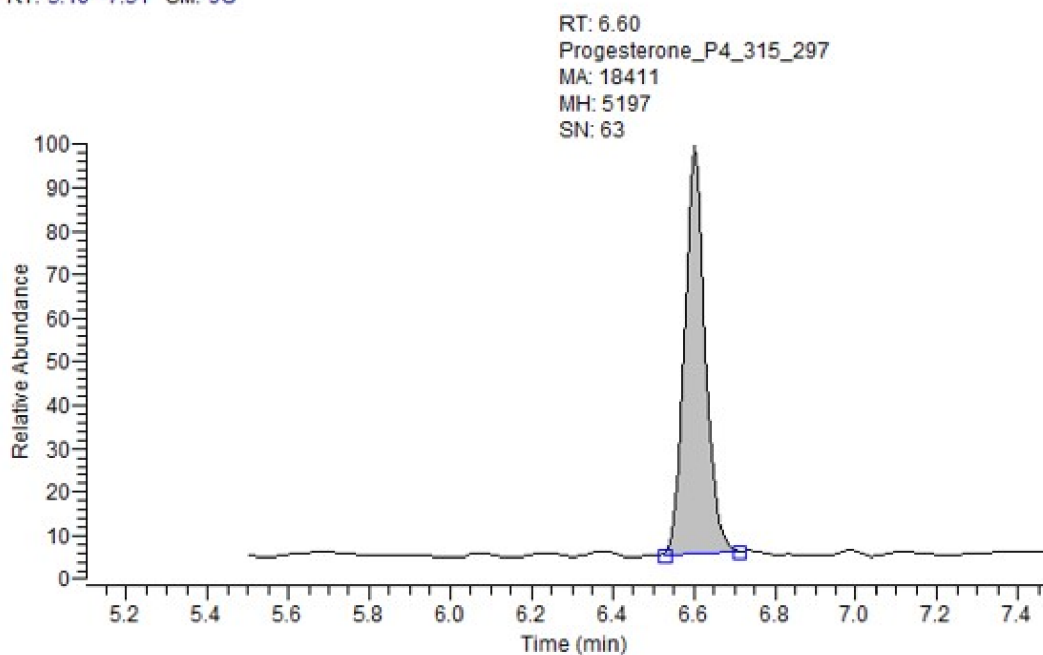
RT: 3.60 - 6.60 SM: 9G



**Obr. 47:** Extrahovaný iontový chromatogram vybraného produktového iontu estronu.



RT: 5.10 - 7.51 SM: 9G



**Obr. 48:** Extrahovaný iontový chromatogram vybraného produktového iontu progesteronu.