

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Separace a detekce konjugovaných steroidů technikou
vysokoučinné kapalinové chromatografie - hmotnostní
spektrometrie**

Bakalářská práce

Klára Kocihová

Vedoucí práce: RNDr. Petr Šimek, CSc.

České Budějovice 2016

KOCIHOVÁ, Klára. Separace a detekce konjugovaných steroidů technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie - hmotnostní spektrometrie. 52 str., Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice, Česká republika.

Anotace:

Tato bakalářská práce se zabývá steroidními látkami a jejich separací za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Jsou zde popsány vlastnosti steroidních látek a jejich vliv na člověka. Experimentální část bakalářské práce pojednává o optimalizaci podmínek pro správnou separaci při měření vybraných steroidních látek.

KOCIHOVÁ, Klára. Separace a detekce konjugovaných steroidů technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie - hmotnostní spektrometrie [Separation and detection of conjugated steroids technique high performance liquid chromatography - mass spectrometry. Bc. Thesis, In Czech] - 52p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This thesis deals with steroid compounds and their separation with the aid of high performance liquid chromatography and mass spectrometry. It describes characteristics of steroids and their impact on humans. The experimental part of the thesis deals with the optimization of conditions for good separation in the measurement of selected steroids.

Poděkování

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

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

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

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

V Českých Budějovicích,

.....

Klára Kocihová

Obsah

Úvod.....	1
I. Teoretická část	2
1. Steroidy	2
1.1 Steroly	2
1.1.1 Zoosteroly	2
1.1.2 Fytosteroly	3
1.1.3 Mykosteroly	4
1.2 Žlučové kyseliny	4
1.3 Steroidní hormony.....	4
1.3.1 Pohlavní hormony	5
1.4 Kalciferoly (vitamin D).....	7
1.4.1 Ergokalciferol (vitamin D ₂)	8
1.4.2 Cholekalciferol (vitamin D ₃).....	8
1.5 Výskyt konjugovaných forem steroidů	9
2. Výskyt konjugovaných steroidů v lidském organismu	10
2.1 Výskyt steroidních konjugátů v krvi	10
2.2 Výskyt steroidních konjugátů v moči	10
3. Analýza steroidů a jejich konjugátů metodami kapalinové chromatografie.....	12
3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography)	12
3.1.1 Mobilní fáze	13
3.1.2 Chromatografické kolony a stacionární fáze	13
3.2 Metody detekce steroidů	13
3.2.1 Iontový zdroj	13
3.2.2 Hmotnostní analyzátor	14
3.3 Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC/MS)	15
3.4 Metody vyhodnocení HPLC chromatogramu	16
3.4.1 Asymetrie píku	18
3.4.2 Rozlišení.....	18
3.4.3 Vyjádření množství látky	19
3.5 Stanovení steroidů a jejich konjugátů pomocí HPLC	19
4. Cíle práce	21

II. Praktická část	22
5. Materiál a metody	22
5.1 Chemikálie	22
5.2 Postup přípravy standardů.....	22
5.3 Přístrojové vybavení a materiál pro HPLC separaci	23
5.4 Hmotnostní spektrometrie.....	23
6. Výsledky a diskuse.....	24
7. Závěr	35
8. Seznam citované literatury.....	36
9. Seznam obrázků	40
10. Seznam tabulek	41
11. Přílohy.....	42

Úvod

Steroidy patří do velké skupiny nesaponifikovatelných lipidů, které hrají důležitou roli v lidském těle. Mezi nejdůležitější steroidy patří cholesterol, všechny steroidní hormony a vitamin D. Jejich funkce v organismu je různorodá. Jde převážně o poměrně málo polární chemické sloučeniny, strukturně blízké, často izomerní struktury, které se v organismu vyskytují v nízkých koncentracích, a proto jsou jejich hladiny často poměrně obtížně měřitelné běžnými analytickými metodami.

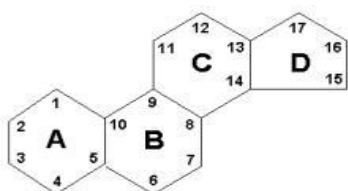
Pro analýzu steroidů se začíná stále více používat jejich separace metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s hmotnostním spektrometrem (MS) jako detektorem. U HPLC se látky rozdělují podle jejich afinity ke stacionární fázi. Pro tuto metodu je velice důležitý výběr typu kolony, mobilní fáze a nastavení gradientu. Po separaci se jednotlivé látky dostávají do hmotnostního spektrometru a dochází k detekci látek. Důležitým faktorem je znalost fyzikálně-chemických vlastností měřených látek. U hmotnostního spektrometru vybíráme správný typ ionizace a analyzátoru.

Cílem této bakalářské práce byla optimalizace a popis podmínek HPLC pro separace mnou zkoumaného souboru lidských steroidních látek na vhodně zvolené reverzní stacionární fázi.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1. Steroidy

Do velice rozšířené skupiny steroidů patří přirozené látky rostlinného či živočišného původu. Dokážou je vyrábět i primitivní organismy, jako například kvasinky, plísně či bakterie. Jsou nezbytnou součástí buněčných membrán, regulují životní procesy a emulgují trávení. Některé steroidy mohou být toxické, ale i nenahraditelná léčiva. Chemicky patří do skupiny isoprenoidů, jejichž základní skelet tvoří nasycený tetracyklický uhlovodík steran. Molekula steranu je tvořena plochým cyklopentanoperhydrofenantrenovým systémem a označuje se velkými tiskacími písmeny A, B, C, D.



Obr. 1 Strukturní vzorec steranu¹.

Steroidy se liší jak druhem, tak i počtem a pozicí substituentů a konfigurací jejich vazeb i počtem a pozicí dvojných vazeb. U přírodních steroidů existuje jediný způsob spojení kruhů, pouze kruhy A a B mají dvojí možnosti. Jelikož je skelet planární, lze rozlišit dva typy substituentů: α - steroidy (A/B trans) a β - steroidy (A/B cis)².

Hlavní skupiny steroidů jsou:

1.1 Steroly

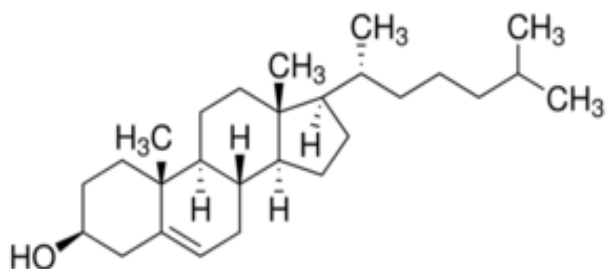
Steroly jsou steroidní alkoholy s 3β - hydroxylovou skupinou a 17β - alifatickým postranním řetězcem. Vyskytují se v buňkách jako volné alkoholy nebo estery mastných kyselin. Jsou důležitou součástí membrán. Dělíme je na zoosteroly, fytosteroly, mykosteroly.

1.1.1 Zoosteroly

Jsou to steroly živočišného původu, nejvýznamnější ze zoosterolů je cholesterol.

1.1.1.1 Cholesterol

Cholesterol je nenasycený alkohol odvozený od cholestanu (10,13-dimethyl-17-isoooktylsteranu). Je rozšířen u eukaryot, například u rostlin, kvasinek a hub. Nevyskytuje se u prokaryot. Cholesterol tvoří hlavní část plazmatických živočišných membrán, 30 až 40 % plazmatických membrán lipidů. Cholesterol se může esterifikovat na cholesterol s dlouhým řetězcem mastných kyselin za vzniku cholesterylesterů. Hladina cholesterolu je udržována poklesem biosyntézy při příjmu z potravy. Vylučuje se po přeměně na žlučové kyseliny v játrech. Ukládá se ve stěnách krevních cév, žlučových kamenech a vyvolává aterosklerózu^{3,4}.



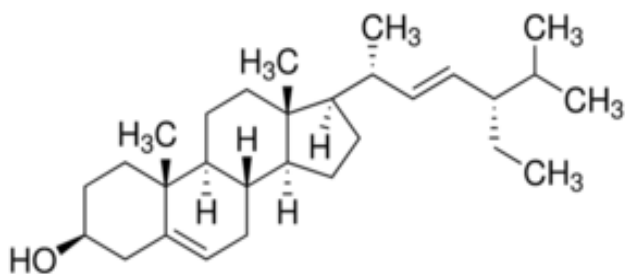
Obr. 2 Strukturální vzorec cholesterolu⁵.

1.1.2 Fytosteroly

Jsou to rostlinné steroly neboli triterpeny, které se vyskytují v přírodě a mají úzkou strukturální podobnost s cholesterolem, ale mají na rozdíl od cholesterolu různé konfigurace postranních řetězců. Jsou důležité pro výrobu léčiv (terapeutické steroidy), ve výživě (přísada do potravin) a v kosmetice (krémy). Získávají se z rostlinných olejů nebo z průmyslových odpadů. Hlavní role je ve stabilizaci fosfolipidové dvojvrstvy v buněčné membráně. Nejhojnější fytosteroly jsou stigmasterol, sitosterol a campesterol⁶.

1.1.2.1 Stigmasterol

Široce rozšířený fytosterol, který se využívá jako výchozí surovina při syntéze steroidních hormonů.



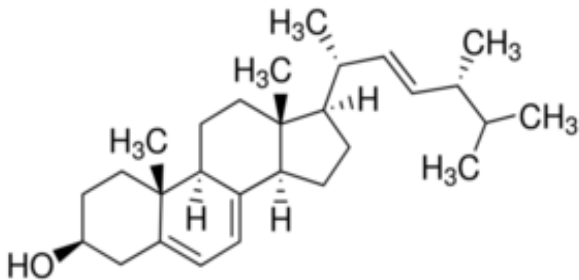
Obr. 3 Strukturální vzorec stigmasterolu⁷.

1.1.3 Mykosteroly

Mykosteroly jsou steroly nižších hub. Nejrozšířenější mykosterol je ergosterol.

1.1.3.1 Ergosterol

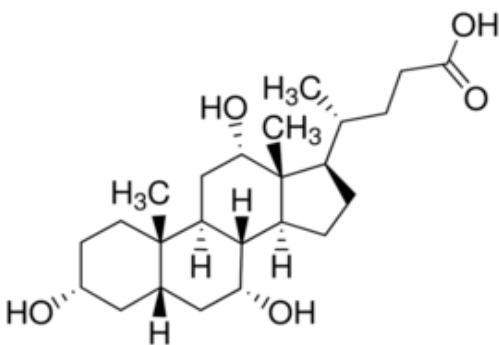
Je součástí membrán buněk a mycelií nižších hub. Ozářením ultrafialovým zářením se přeměňuje na vitamin D₂².



Obr. 4 Strukturální vzorec ergosterolu⁸.

1.2 Žlučové kyseliny

Žlučové kyseliny jsou steroidní karboxylové kyseliny. Tvoří se z cholesterolu, který se přeměňuje na trihydroxykoprostanóat a dále na cholyl-CoA. Ve své molekule mají polární i nepolární část, a proto jsou amfipatické a velice povrchově aktivní. Jsou hlavní součástí žluče. Syntetizují se v játrech, skladují a koncentrují ve žlučníku a následně se uvolňují do duodena a tenkého střeva, kde žlučové kyseliny převádějí lipidy a lipofilní vitamíny do micel. Také aktivují lipázy, zvětšují povrch lipidů, a tím usnadňují jejich trávení a vstřebávání. Jsou to bezbarvé krystalické látky, hořké chuti, které jsou rozpustné v zásadách za vzniku solí. Nejznámější žlučové kyseliny jsou kyselina cholová a deoxycholová².



Obr. 5 Strukturální vzorec kyseliny cholové⁹.

1.3 Steroidní hormony

Do této skupiny patří látky s hormonální aktivitou. Rozdělují se na dvě skupiny: adrenokortikoidní hormony a gonadální hormony. Do adrenokortikoidních hormonů patří kortikoidy a kortikosteroidy,

do gonadálních neboli pohlavních hormonů patří estrogeny (estron, estradiol, estriol), gestageny (progesteron) a androgeny (testosteron). Jejich struktury mají zachovanou cholesterolovou dvojnou vazbu a na uhlíku 17 mají kyslíkové funkce².

1.3.1 Pohlavní hormony

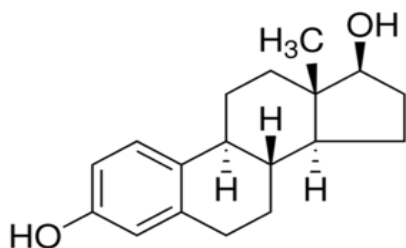
Ovlivňují normální vývoj a funkci pohlavních orgánů, a tak určují pohlaví organismu a vytvářejí jejich sekundární pohlavní znaky.

1.3.1.1 Estrogeny

Jsou ženské pohlavní orgány velice důležité pro vývoj sekundárních pohlavních znaků, vývoje vajíčka a průběh pohlavních cyklů. Užívají se také při léčení menstruačních potíží a s gestageny jsou inhibitory ovulace.

1.3.1.1.1 Estradiol

Tento estrogen, podmiňuje vytváření ženských sekundárních pohlavních znaků, proliferaci endometria, ukládání podkožního tuku a zástavu růstu dlouhých kostí. Vzniká z testosteronu odstraněním C₁₉. V organismu se mění na estron a estriol¹⁰.



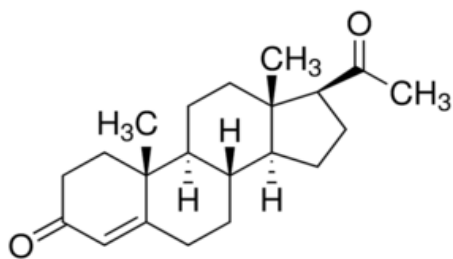
Obr. 6 Strukturální vzorec estradiolu¹¹.

1.3.1.2 Gestageny

Druhá skupina ženských pohlavních hormonů. Přípravují děložní sliznici k zahánění oplozeného vajíčka, uplatňují se při korigování menstruačního cyklu a regulují reprodukci u zvířat.

1.3.1.2.1 Progesteron

Nejvýznamnější z gestagenů, progesteron, je meziprodukt při vzniku steroidních hormonů z cholesterolu. Indukuje změny v endometriu a mléčné žláze a ve žlutém tělísku. Vzniká z pregnenolonu oxidací 3-OH skupiny a přesmykem dvojně vazby. Reguluje vznik a udržení progestačního stádia (gravidity). Metabolizuje na pregnandiol^{10,12}.



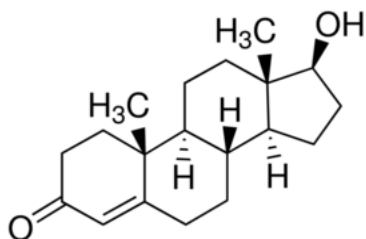
Obr. 7 Strukturní vzorec progesteronu¹³.

1.3.1.3 Androgeny

Varlata neboli testes produkují samčí pohlavní hormony androgeny. Jsou potřebné pro zrání spermatu, stimulují anabolické procesy, např. výrobu bílkovin. Také regulují vývoj sekundárních pohlavních znaků, jako je růst vousů, chlupů, mohutné vyvinutí kostry a kosterního svalstva, hrubší hlas a způsob myšlení. U geneticky slabších jedinců může zapříčinit předčasnou plešatost u mužů¹².

1.3.1.3.1 Testosteron

Nejznámější androgen (mužský pohlavní hormon). Je zodpovědný za průběh spermiogeneze, stimuluje žlázy mužského genitálního traktu, vznik seminální plazmy, podporuje syntézu proteinů. Syntetizuje se z cholesterolu přes progesteron nebo z kortikoidu. V krvi se přenáší v komplexu s β -globulinem^{10,12}.



Obr. 8 Strukturní vzorec testosteronu¹⁴.

1.3.2.4 Adrenokortikoidní hormony

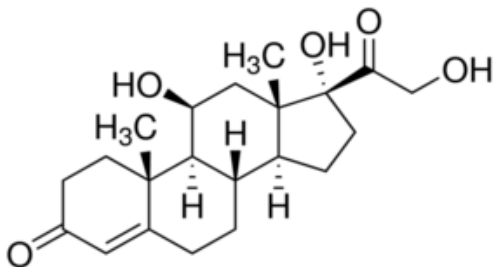
Jsou vylučovány kůrou nadledvin po stimulaci peptidovým hormonem ACTH (adrenokortikotropní hormon). Produkce se zvyšuje při fyzickém i duševním stresu.

1.3.2.4.1 Glukokortikoidy

Regulují metabolismus sacharidů, biosyntézu glykogenu. Brzdí proteosyntézu a podporují degradaci bílkovin na aminokyseliny, které se pak využívají jako prekurzory pro výrobu glykogenu. Mají protizánětlivé a protialergické účinky a používají se při léčení astmatu, revmatismu a kožních onemocnění².

1.3.2.4.1.1 Kortizol

Nejznámější glukokortikoid z kůry nadledvin. Zvyšuje odbourávání proteinů v periferních tkáních a aktivaci glukoneogeneze z uvolněných aminokyselin v hepatocytech. Urychluje lipolytické štěpení tuků v adipocytech. Je to hlavní regulující hormon při stresových situacích¹⁰.



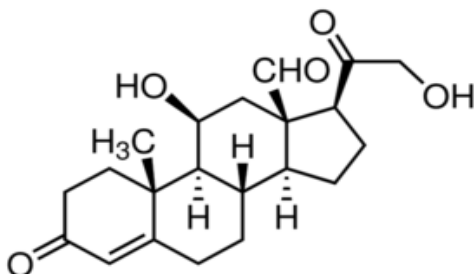
Obr. 9 Strukturní vzorec kortizolu¹⁵.

1.3.2.4.2 Mineralokortikoidy

Kontrolují metabolismus minerálních látek zadržováním iontů Na^+ , Cl^- a HCO_3^- ledvinami a vylučováním iontů K^+ dochází ke zvyšování krevního objemu a krevního tlaku².

1.3.2.4.2.1 Aldosteron

Nejznámější mineralokortikoid. V ledvině vyvolává větší retenci Na^+ ¹⁵.



Obr. 10 Strukturní vzorec aldosteronu¹⁶.

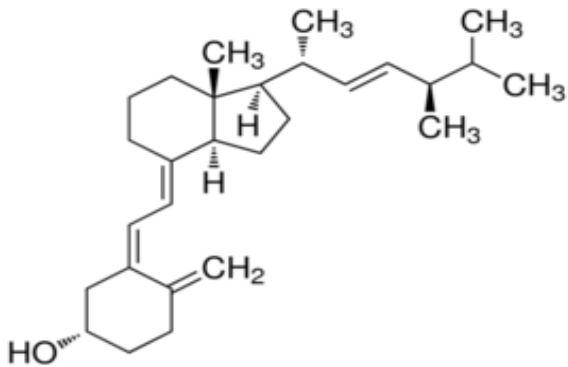
1.4 Kalciferoly (vitamin D)

Vitamin D zahrnuje několik kalciferolů. D_2 - ergokalciferol je rostlinného a D_3 – cholekalciferol je živočišného původu. Vitamin D_3 vzniká v lidské kůži působením UV záření B z 7-dehydrocholesterolu. Tyto dva vitamíny jsou inaktivované, aktivní forma se produkuje jejich enzymatickou hydroxylací prováděnou v játrech a ledvinách. Aktivní forma vitamínu D zvyšuje v krvi koncentraci vápenatých iontů. To zvyšuje ukládání Ca^{2+} v kostech, zubech a tukových tkáních. Nadměrný příjem vitamínu D po delší dobu má za následek intoxikaci organismu. Dochází k abnormální kalcifikaci měkkých kostí a poruše funkce ledvin až k jejich selhání. Nedostatek

vitamínu D způsobuje onemocnění zvané křivice. Exogenním zdrojem je řada potravin (vaječný žloutek, máslo, sýry, mléko či vepřová játra)^{3,4,17}.

1.4.1 Ergokalciferol (vitamin D₂)

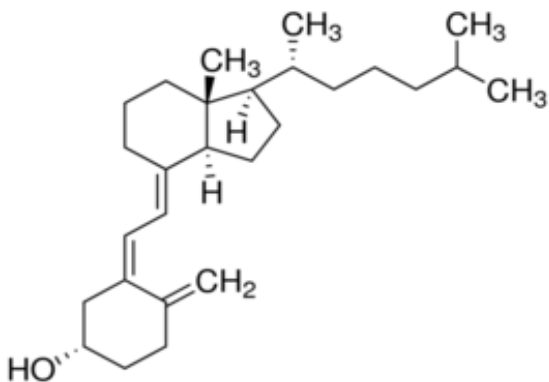
Tento kalciferol je odvozený od ergosterolu jako provitaminu.



Obr. 11 Strukturní vzorec ergokalciferolu¹⁸.

1.4.2 Cholekalciferol (vitamin D₃)

Vzniká z 7-dehydrocholesterolu, který je ve vysokém množství v lidské pokožce.



Obr. 12 Strukturní vzorec cholekalciferolu¹⁹.

1.5 Výskyt konjugovaných forem steroidů

Konjugovaná forma steroidu vzniká jeho připojením ke vhodnému aniontu kyseliny (sulfát, glukuronid nebo sukcinát). V této formě je steroidní konjugát více polární, a tím lépe rozpustný ve vodě a je snadněji transportován. Konjugované formy steroidů se vyskytují ve vyšších koncentracích v tělních tekutinách, proto je jejich analýza perspektivní pro klinickou diagnostiku²⁰.

Přehled steroidních konjugátů měřených v této práci:

1. Androsteron sulfát (A-S)
2. Etiocholanolon sulfát (ETIOCHOL-S)
3. Epiandrosteron sulfát (EA-S)
4. Testosteron sulfát (T-S)
5. Dehydroepiandrosteron sulfát (DHEA-S)
6. 16α -hydroxydehydroepiandrosteron 3-sulfát (16α -OH-DHEA-3S)
7. 17β -estradiol 3-sulfát (17β -E2-3S)
8. 17β -estradiol 17-sulfát (17β -E2-17S)

2. Výskyt konjugovaných steroidů v lidském organismu

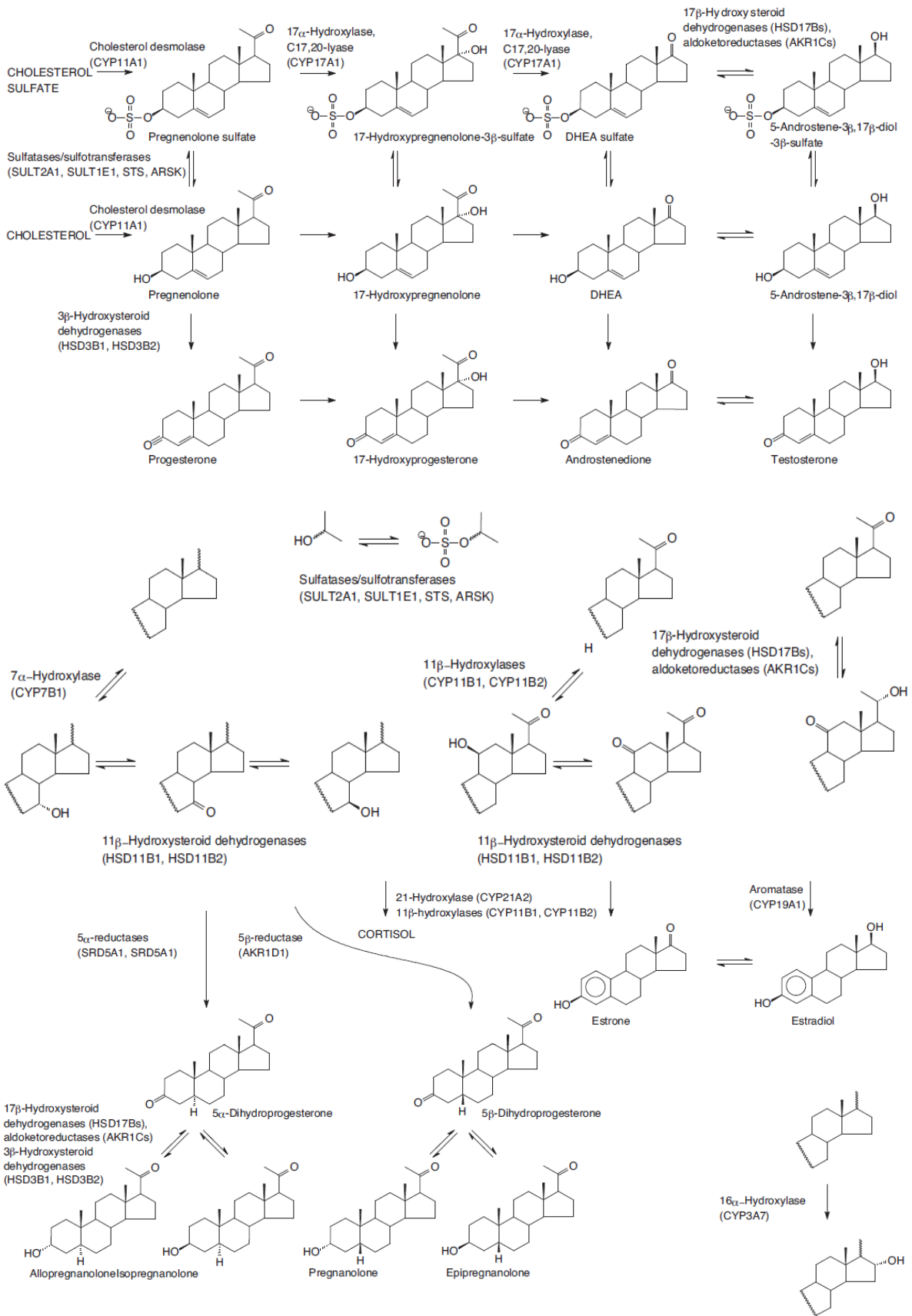
Steroidy s výjimkou cholestanů se vyskytují v organismu typicky v koncentracích nmol.l^{-1} a nižších. Jednoduché schéma metabolismu steroidů je znázorněno na obr. 13.

2.1 Výskyt steroidních konjugátů v krvi

Cirkulující hladiny steroidních sulfátů jsou mnohem vyšší než jejich volné nekonjugované formy, a tím je měření méně náročné. Díky sulfonizaci se steroidy stávají více polární a díky vysoké rozpustnosti ve vodě jsou snadněji uvolňovány do krve²⁰. V krvi je nejvíce obsažen dehydroepiandrosteron sulfát (DHEA-S) v koncentracích od 200 ng.ml^{-1} do 5500 ng.ml^{-1} a estron sulfát (E1-S) od 0.13 ng.ml^{-1} u postmenopauzních žen do 105 ng.ml^{-1} u těhotných žen v třetím trimestru. E1-S má 10x až 20x vyšší koncentraci v krvi než nekonjugovaný estron (E1) a estradiol (E2)²². Hladina estrogenů v krvi je sledována u žen po menopauze. Výskyt vysoké hladiny estrogenů má za následek zvýšené riziko onemocnění rakoviny prsu a děložní sliznice²³. V těhotenství se sledují hlavně hladiny testosteronu a estrogeneru²². Dalšími konjugáty jsou např. androsteron sulfát (A-S), estradiol glukuronid (E2-G), estradiol sulfát (E2-S), testosteron sulfát (T-S) v koncentraci 2166 ng.ml^{-1} ²⁴, $5,5 \text{ pg.ml}^{-1}$ ²³, $288,4 \text{ pg.ml}^{-1}$ ²³, 173 pg.ml^{-1} ²³, v tomto pořadí.

2.2 Výskyt steroidních konjugátů v moči

Močí se vylučují steroidy hlavně v podobě sulfátových a glukuronových konjugátů ve vyšší koncentraci než v krvi. Hlídané jsou především hladiny testosteronu (T) o koncentraci $37,8 \text{ ng.ml}^{-1}$ a epitestosteronu (EPIT) $54,4 \text{ ng.ml}^{-1}$ kvůli nezákonnému podávání testosteronu u sportovců (doping)²⁴. Testosteron se vylučuje močí především jako glukuronid, ale epitestosteron se vylučuje také jako sulfát²⁵. Dalšími konjugáty vyskytující se v moči jsou např. androsteron sulfát (A-S), androsteron glukuronid (A-G), etiocholanolon glukuronid (ETIO-G), dehydroepiandrosteron sulfát (DHEA-S), o koncentraci $200\text{-}300 \text{ ng.ml}^{-1}$, $500\text{-}8000 \text{ ng.ml}^{-1}$, $500\text{-}8000 \text{ ng.ml}^{-1}$ ²⁶, 746 ng.ml^{-1} ²⁴, v tomto pořadí.



Obr. 13 Zjednodušené schéma metabolismu steroidů²¹.

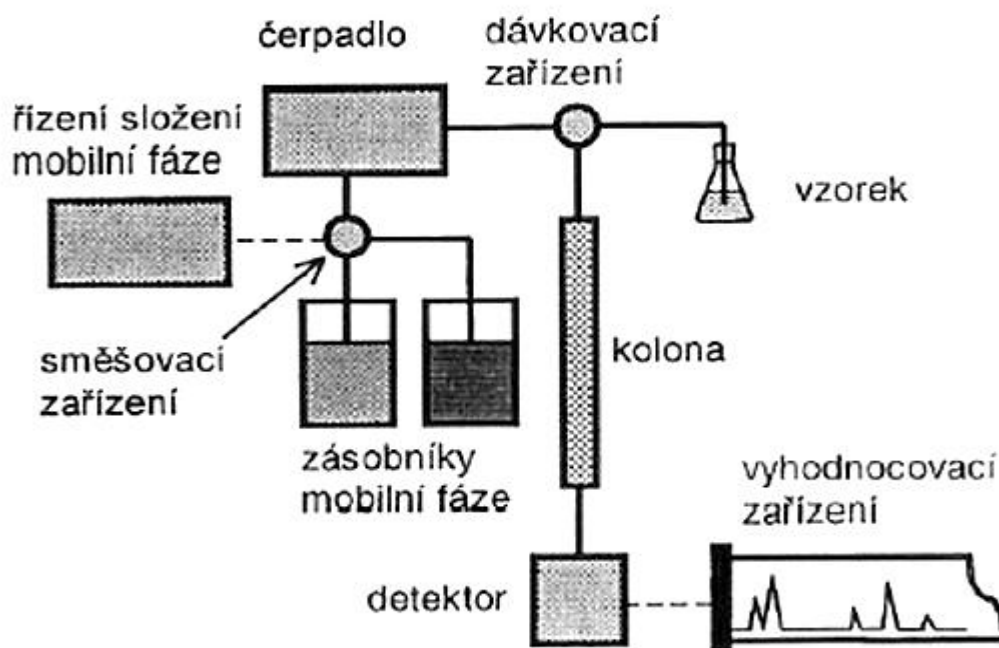
3. Analýza steroidů a jejich konjugátů metodami kapalinové chromatografie

3.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography)

Tato metoda je v současnosti velice využívána, zejména pro analýzy v oblasti biochemie, potravinářství, toxikologii či farmacie. Pomocí HPLC lze analyzovat až 80% organických látek.

Kapalinový chromatograf se skládá z těchto částí:

1. Zásobníky mobilní fáze
2. Směšovač mobilní fáze
3. Čerpadlo
4. Dávkovací ventil nebo smyčka
5. Chromatografická kolona a předkolona
6. Detektor



Obr. 14 Znárodnění částí kapalinového chromatografu⁴⁹.

Jednotlivé části jsou spojeny kapilárami z teflonu nebo z nerezové oceli, jejichž průměr se pohybuje v rozmezí μm až mm . Zejména spojovací kapiláry mezi dávkovačem, kolonou a detektorem musejí být co nejkratší a mít malý vnitřní průměr. Kapiláry musí být chemicky a mechanicky odolné, musí mít co nejmenší vnitřní objem a maximální těsnost celého systému, nesmí být povrchově aktivní³⁸.

3.1.1 Mobilní fáze

Mobilní fází může být voda, vodný roztok anorganické či organické soli, kyseliny, pufr či směs vody/vodného roztoku a organických rozpouštědel³⁸.

Nejdůležitější vlastností mobilní fáze je polarita. Zde jsou seřazeny rozpouštědla podle jejich rostoucí polarity:

Pentan < hexan < cyklohexan < ethylether < chloroform < dioxan < tetrahydrofuran < ethylacetát < acetonitril < 2-propanol < ethanol < methanol < ethylenglykol < voda

Při stanovení steroidních sulfátových a glukuronidových konjugátů v plazmě a moči jsou v literatuře používány nejčastěji mobilní fáze na vodné a organické bázi (metanol, acetonitril) s možným obsahem pufrů (octan amonný, mravenčan amonný) a organických kyselin (kyselina octová, kyselina mravenčí) upravujících pH^{20,25,27,28}. V této bakalářské práci byly použity mobilní fáze 5 mmol.l⁻¹ mravenčan amonný v metanolu a 5 mmol.l⁻¹ mravenčan amonný ve vodě.

3.1.2 Chromatografické kolony a stacionární fáze

Na měření steroidních konjugátů se nejčastěji používají nerezové kolony. Stacionárních fází existuje mnoho druhů, liší se fyzikálně chemickými vlastnostmi. Pro stanovení steroidních konjugátů se nejčastěji používají reverzní fáze. U tohoto typu fází je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární, tvořena většinou směsí vody a polárních rozpouštědel mísitelných s vodou. Nepolární látky jsou více zadržovány stacionární fází a polární látky se eluují z kolony jako první. Stacionární fázi tvoří většinou silikagel, jehož funkční skupiny jsou chemicky modifikovány nepolárními organickými skupinami, zejména uhlovodíkovými řetězci (methyl, butyl, oktyl, oktadecyl) či polárnějšími fenylovými skupinami. Funkční skupiny určují charakter reverzních fází a oblast jejich použití. Mezi nepoužívanější reverzní fáze patří silikagel modifikovaný oktadecylovými uhlovodíkovými řetězci (RP-C18)³⁸.

Při stanovení steroidních konjugátů v plazmě a moči jsou v literatuře nejčastěji používány HPLC kolony C18 lišící se rozměry (50-150mm na délku s průměry 2.1-4.6mm) a velikostmi částic (1.7-5μm)^{20,25,26,27,30,31,32}. V této práci byla použita pro měření steroidních konjugátů kolona C18 (150 x 2 mm) plněná částicemi o průměru 3μm.

3.2 Metody detekce steroidů

Konjugované steroidy se detekují hmotnostním spektrometrem. Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru iontů³³.

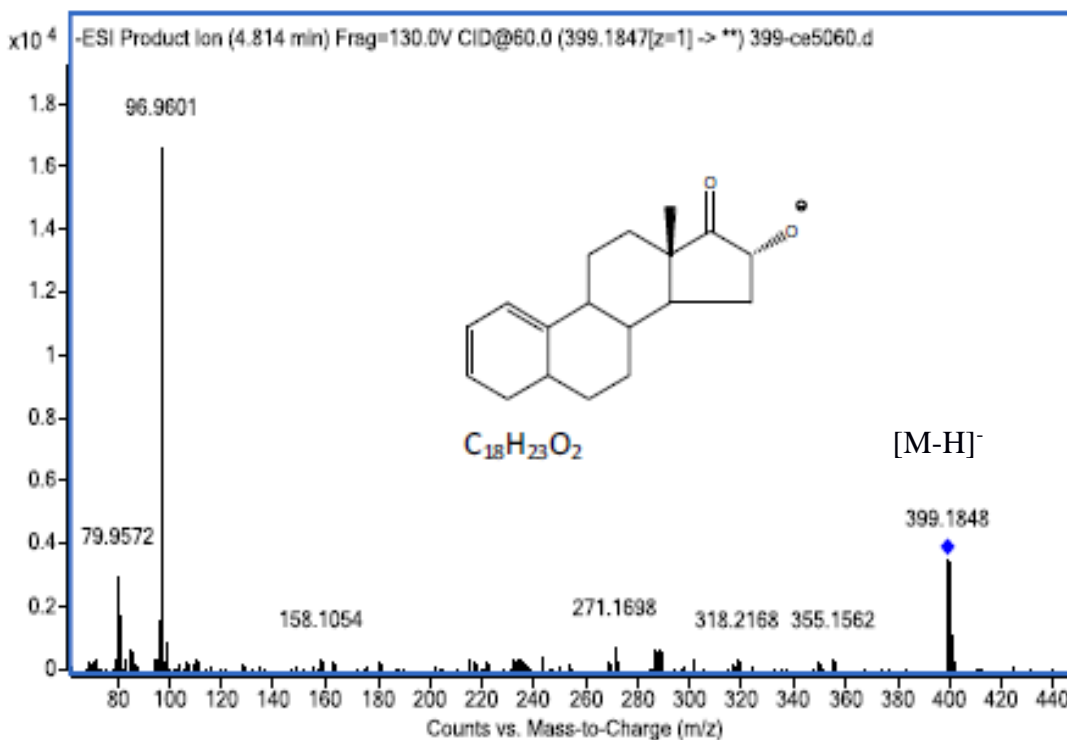
3.2.1 Iontový zdroj

V iontovém zdroji se neutrální molekuly vzorků převádí na nabitě částice (ionty). Ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii spojené s hmotnostním spektrometrem se používají ionizace za atmosférického tlaku (API-atmospheric pressure ionization). Patří sem chemická ionizace (APCI-atmospheric pressure chemical ionization), fotoionizace (APPI-atmospheric pressure

photoionization) a ionizace elektrosprejem (ESI-electrospray ionization). ESI je měkká ionizační technika využívaná pro analýzu malých molekul (steroidní látky, aminokyseliny, organické kyseliny) i velkých molekul, jako jsou proteiny a jiné biomolekuly. Je vhodná zejména pro polární a iontové látky, avšak nelze použít při práci s nepolárními mobilními fázemi a pro nepolární sloučeniny. Rozpuštěná látka je vedena kovovou kapilárou s vysokým napětím. Na výstupu z kapiláry se kapalina rozpráší na kapičky, které nesou na svém povrchu velké množství nábojů. Při kontaktu se zmlžujícím plynem se kapičky následkem vypařování rozpouštědla a tudíž zvýšení hustoty povrchového náboje rozpadnou až na ionty. Poté se ionty transportují do hmotnostního analyzátoru. Při vstupu z atmosférického tlaku do vakua dochází k ochlazení iontů a nežádoucí tvorbě klastrů. APCI je druhá nejčastěji používaná měkká ionizační technika ve spojení s HPLC/MS. Probíhá v plynné fázi, a proto není vhodná pro ionizaci biomolekul. Využívá se pro látky nepolární až středně polární. Tato technika je vhodná i pro použití s nepolárními mobilními fázemi. Analyt je po průchodu kapilárou zmlžen do vyhřáté oblasti, kde je výbojová jehla. Výbojová jehla má na svém povrchu vysoké napětí (3-4 kV). Nejprve jsou výbojem ionizovány molekuly mobilní fáze a poté molekuly analytu. Vzniklé ionty jsou pak elektrodami usměrněny do hmotnostního analyzátoru. APPI patří také do měkkých ionizačních technik. Tato technika je stejná s APCI, s tím rozdílem, že se pro ionizaci molekul používá místo jehly UV lampa. Je vhodná pro látky nepolární až středně polární. V této metodě je velice důležitý vliv dopantů. Dopanty jsou látky, které zvyšují tvorbu iontů. Princip spočívá v tom, že nejprve se ionizují dopanty. Ty pak reagují s molekulami analytu, kde dojde k výměně náboje či k přenosu protonu. Jako dopanty se používají aceton, toluen či benzen³⁴.

3.2.2 Hmotnostní analyzátor

Hmotnostní analyzátory dělí ionty podle jejich poměru m/z , kde m je hmotnost iontu a z je počet elementárních nábojů, které ion nese. Většina iontů malých molekul nese jeden elementární náboj, a proto jsou ionty děleny podle hmotnosti. Prvním typem analyzátoru, který se používá pro analýzu steroidních konjugátů je kvadrupólový. Skládá se ze čtyř nebo více tyčí kruhového nebo hyperbolického průřezu, které jsou symetricky uspořádány, a vždy protilehlé dvojice jsou napojeny na společném potenciálu. Ionty se pohybují v elektrickém poli o délce 20 až 30 cm. Pole má dvě složky: statickou a radiofrekvenční. Ionty v iontovém zdroji jsou urychleny malým potenciálem a vstupují do osy kvadrupólu, kde oscilují mezi elektrodami opačné polarity. Při určité hodnotě radiofrekvence dosáhnou ionty o určité hmotnosti stability, ale ionty s odlišnou hmotností oscilují s rostoucí amplitudou a jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu²². Druhým typem analyzátoru je iontová past. Rozděluje se na 3D iontovou past (IT-ion trap) a lineární iontovou past (LIT-linear ion trap). IT je tvořena prstencovou elektrodou a dvěma koncovými elektrodami, na které je vloženo napětí. Ionty jsou napěťovým pulzem přivedeny do pasti. Vhodnými poměry napětí jsou ionty zadrženy uvnitř pasti. Podle jejich poměru m/z jsou vypuzovány na detektor. LIT je kvadrupól na jehož koncích jsou elektrody s potenciálem, pomocí něhož se uvnitř uchovávají ionty³⁵.



Obr. 15 Hmotnostní spektrum produktivního iontu sulfátového metabolitu S9 s kolizní energií 60 eV v negativním spektru²⁹.

Při stanovení steroidních konjugátů v moči a plazmě je v literatuře nejčastěji používána a ionizací elektrosprejem (ESI) spojená s různými typy hmotnostních detektorů - trojitý kvadrupól^{25,28,36}, průletový analyzátor doby letu (TOF)²⁹, iontová past^{26,28,30}. Steroidní hormony v séru byly měřeny hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem a ionizací elektrosprejem³⁶. V literatuře lze nalézt pro stanovení steroidů také jiné typy ionizací- APCI^{28,36} a APPI³⁷. V této práci byl pro detekci steroidních konjugátů použit hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem a ionizací ESI.

3.3 Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC/MS)

Spojení LC/MS je klíčové pro analýzu složitých reálných vzorků, jako jsou biologické tkáně či tekutiny. Vzorky jsou komplexní s vysokým počtem komponent, a proto je volba detektoru na prvním místě. Hmotnostní spektrometr je jediným detektorem, který může potvrdit identitu vzorku na základě molekulové hmotnosti a strukturně specifických částic. Hlavními výhodami LC/MS jsou:

1. možnost odhalení koeluce píků díky MS detekci
2. větší jistota identifikace látek díky strukturní informaci hmotnostního spektra a retenčnímu času
3. analýza složitých směsí
4. menší spotřeba vzorku
5. zlepšení kvality spektrálních dat odstraněním interferencí díky separaci
6. minimalizace potlačení signálu odstraněním interferencí díky separaci
7. lepší spolehlivost kvantitativní analýzy díky izotopicky značeným vnitřním standardům³⁸.

3.4 Metody vyhodnocení HPLC chromatogramu

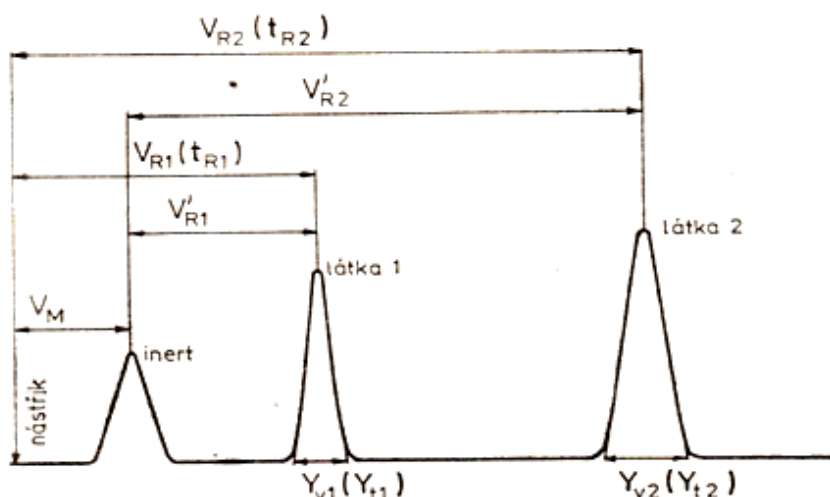
Charakteristickou veličinou pro každou látku v chromatografickém systému je eluční čas t_R nebo eluční objem V_R . Eluční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení maxima eluční křivky, a eluční objem je objem mobilní fáze, který protekl za tuto dobu. Obě tyto veličiny se dají popsat vztahem:

$$V_R = t_R F_m$$

F_m je objem mobilní fáze proteklý za jednotku času. Eluční objem V_R je dán součtem dvou objemových veličin.

$$V_R = V'_R + V_M$$

V'_R je redukovaný eluční objem a V_M je mrtvý objem (někdy označován V_0). Mrtvý objem je objem, který zaujímá mobilní fáze od místa nástřiku přes kolonu až po detektor. Zjistí se jako eluční objem nesorbující se látky.



Obr. 16 Chromatografický záznam dvou látek a nesorbujícího se inertu³⁹.

Kapacitní poměr k je poměr celkového množství separované látky ve stacionární fázi k jejímu celkovému množství v mobilní fázi.

$$k = K_D (V_S/V_M)$$

kde K_D je distribuční konstanta, V_S je objem stacionární fáze a V_M je mrtvý objem kolony.

Velikost kapacitního poměru určuje, jak dlouho bude analýza trvat. Jestliže k bude malé, pak trvání analýzy bude krátké a naopak. Velikost je ovlivněna vlastnostmi sorbentu, elučního činidla a analyzovaných látek, a také poměrem objemu stacionární fáze a mobilní fáze. Účinnost separace může být vyjádřena jako počet teoretických pater N nebo výška odpovídající teoretickému patru (height equivalent to a theoretical plate - HETP).

$$N = (t_R/\delta)^2 = 16(t_R/w)^2 = 5,5 (t_R/w_{1/2})^2$$

N = počet teoretických pater

t_R = retenční čas

δ = rozptyl kolony

w = šířka píku při základně

$w_{1/2}$ = šířka píku v polovině výšky

N je přímo úměrný době, kterou stráví analyt na sloupci a nepřímo úměrný šířce píku tohoto analytu. N je pomyslná část sloupce, ve kterém dochází k ustálení rovnováhy mezi stacionární fází a mobilní fází.

$$H (HETP) = L/N$$

H = výškový ekvivalent teoretického patra

L = délka kolony

N = počet teoretických pater

Teoretický počet pater charakterizuje kvalitu chromatografické kolony. Velký počet pater nebo malá H hodnota, má za následek úzké píky, a proto je považován za “dobrý“ sloupec. Hlavní nevýhodou teoretického počtu pater je nedostatek spojení mezi účinností chromatografické kolony, velikostí částic, difúze, průtoku a teploty. Pro optimalizaci separace chromatografické kolony se používá van Deemterova rovnice.

$$H = A + B/u + Cu$$

$A = 2\lambda d_p$ (vířivá difúze)

$B = 2\gamma D_m$ (podélná molekulová difúze)

$C = \omega d_p^2 / D_m$ (odpor proti přenosu hmoty ve stacionární a mobilní fází)

u = lineární rychlost toku mobilní fáze

H = výškový ekvivalent teoretického patra

λ = koeficient nerovnoměrného plnění kolony

d_p = velikost částic náplně kolony

γ = korekční faktor charakterizující tvar kanálek v náplni

D_m = difúzní koeficient analytu v mobilní fází

ω = koeficient závislý na distribuci velikosti částic, tvaru částic a distribuci pórů

Rovnice vyjadřuje, jaký má efekt rychlosti průtoku mobilní fáze na separační účinnost systému^{33,40}.

3.4.1 Asymetrie píku

Asymetrie píku je kvalitativní veličina chromatografické separace. Existují dvě metody vyjádření asymetrie. První je faktor chvostování T_f . Vyjadřuje se jako šířka píku v 5% výšky ($W_{0,05}$) k dvojnásobku šířky píku vzestupné části (f).

Vzorec pro faktor chvostování je: $T_f = \frac{W_{0,05}}{2f}$.

A dále jako faktor asymetrie A , který je vyjádřen jako poměr šířky sestupné části píku (t) k vzestupné části píku (f) v 5% výšky píku.

Vzorec pro faktor asymetrie je: $A = \frac{t}{f}$.

Ideální symetrie je získána při hodnotě $A = 1$. Je-li hodnota $A > 1$, znamená to, že dochází k chvostování píku. Naopak při hodnotě $A < 1$ dochází k frostování neboli hrnutí píku⁴¹.

3.4.2 Rozlišení

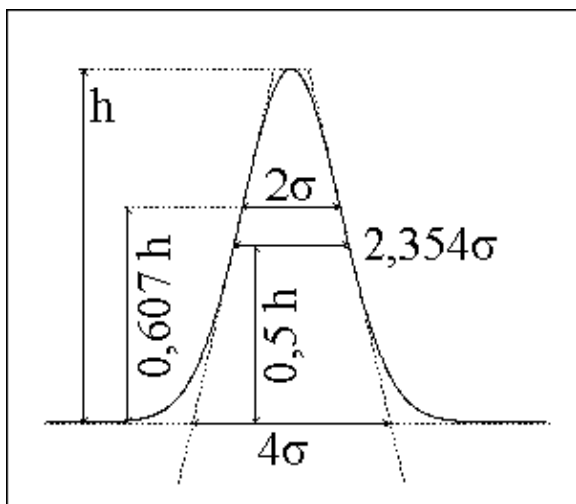
Rozlišení je nejdůležitější výpočet pro zjištění, při jakých podmínkách se nejlépe separují látky. Rozlišení se vypočítá jako rozdíl retenčních časů dvou sousedních píků, který se vynásobí indexem 1,18 a součet šířky píků v polovině výšky a tyto dvě veličiny se mezi sebou podělí.

Matematický výpočet pro rozlišení je: $R_{1,2} = \frac{1,18(tr_1 - tr_2)}{(Wh_1 + Wh_2)}$ ⁴¹.

Když výsledné $R = 1$, pak se látka dostatečně separovala. U $R = 1,5$ se látka téměř dokonale separovala a $R > 2$ se látka nadbytečně separovala⁴².

3.4.3 Vyjádření množství látky

Z chromatogramu se získají kvalitativní a kvantitativní informace. Mezi kvalitativní informace patří poloha píku neboli retenční časy a distribuční konstanta. Mezi kvantitativní informace patří plocha píku, ze které vypočteme množství a koncentraci látky.



Obr. 17 Popis píku pro výpočet plochy píku⁴³.

Výška a šířka píku je ovlivněna pracovními podmínkami, velikostí kapacitních poměrů látek a průtokem mobilní fáze. Změna průtoku mobilní fáze ovlivní více plochu píku než výšku, ale změna kapacitních poměrů má větší vliv na výšku než na plochu. Koncentrace látky je dána také šířkou píku. Čím bude pík širší, tím menší bude koncentrace látky při průchodu maxima eluční zóny detektorem, a tím bude menší citlivost a horší mez detekce^{33,40}.

3.5 Stanovení steroidů a jejich konjugátů pomocí HPLC

Steroidní látky se v klinické praxi rutinně stanovují pomocí imunoafinitních metod, hojně je také používána plynová chromatografie s MS detekcí, při níž se musí steroidy převádět pomocí derivatizace na těkavé sloučeniny. Kapalinová chromatografie není pro stanovení steroidů proti jiným metodám příliš rozšířená. Steroidní látky a jejich konjugáty se separují různými typy kolon ve spojení s různými ionizačními technikami.

Tom Fiers měřil estron (E1) a estradiol (E2) metodou LC-MS/MS s použitím elektrospreje (ESI) bez předešlé derivatizace⁴⁴. Yasuhiro Shibata použil LC-MS/MS na analýzu steroidu dehydroepiandrosteronu (DHEA), který hraje ústřední roli v biosyntéze steroidních hormonů³⁷. Manfred Rauh pomocí LC-MS/MS měřil steroidní látky pro diagnózu kongenitální adrenální hyperplazie (CAH) a pro poruchy sexuality a funkce pohlavních žláz. Zjistil, že metoda kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem s trojitým kvadrupólem dokáže měřit

současně více steroidních hormonů⁴⁵. Steroidní saponiny z čínské rostliny *Dioscorea zingibensis* C.H.Wright, která je nejpoužívanější rostlinou v tradiční čínské medicíně, byla měřena Xinxin Zhangem metodou HPLC spolu s odpařovacím detektorem rozptylu světla (HPLC-ELSD) a jako druhou metodu použil HPLC ve spojení s ionizací elektrosprejem a hmotnostním spektrometrem s kvadrupólovým analyzátozem spojeným s průletovým analyzátozem doby letu (HPLC-ESI-Q/TOF)⁴⁶. Qingqing Wang analyzoval řadu estrogenů a androgenů v postmenopauzním séru a plazmě pomocí kapalinové chromatografie - hmotnostní spektrometrie (LC-MS)²³. Genye He měřil metenolon v lidské moči využitím kapalinové chromatografie spojené s kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem s průletovým analyzátozem doby letu (HPLC-Q/TOF)²⁹. Emmanuel Strahm izoloval a kvantifikoval androgenové sulfáty v lidské moči metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie - hmotnostní spektrometrie s iontovou pastí (HPLC-LTQ-MS/MS)²⁶. Podobně také L. Dehennin měřil androgenové glukuronidy a sulfáty v moči sportovců po výkonu pomocí plynové chromatografie - hmotnostní spektrometrie (GC/MS)²⁴. Sebastien Anizan analyzoval 4- androstendiol ve formě sulfátových a glukuronidových metabolitů, zneužívaný u hospodářských zvířat (skotu), metodou kapalinové chromatografie - hmotnostní spektrometrie³⁰. Larry D. Bowers potvrdil metodou HPLC-MS nezákonné užívání testosteronu u sportovců²⁵. Alain Y. Dury detekoval 5 steroidních hormonů (DHEA, E1-S, A-S, Preg-S, Allopreg-S) v lidském séru pomocí metody LC-MS/MS²⁰. Jana Vítková stanovila bisfenol A (BPA) a estrogeny (E1, E2, E3) v krevní a semenní plazmě metodou LC-MS pro lékařské diagnózy např.: diabetes, kardiovaskulární onemocnění a poruchy reprodukce⁴⁷. Akira Honda pomocí HPLC-ESI-MS/MS měřil steroly (cholesterol a jeho zoxidované formy) v biologických matricích³². Endogenní steroidní hormony ve vlasech detekoval Wei Gao metodou LC-MS²⁸. V poslední řadě Pawel Krzascik zjistil, že steroidní hormon DHEA-S zvyšuje antidepresivní účinek kokainu při zkouškách nuceného plavání - možná role v serotoninovém přenosu nervových vzruchů⁴⁸.

Z těchto literárních zdrojů je zřejmé, že se pro měření steroidů nejčastěji používá spojení kapalinové chromatografie a hmotnostního detektoru s ionizací elektrosprejem. Stejný systém byl použit i v této práci.

4. Cíle práce

1. Zpracovat literární rešerši vlastností hlavních skupin steroidů a forem jejich konjugace.
2. Sepsat literární přehled metod analýzy steroidů a jejich konjugátů zejména technikou LC-MS.
3. Shrnout výskyt vybraných steroidních konjugátů v tělních tekutinách lidského organismu.
4. Nalézt vhodné podmínky pro analýzu vybraného souboru steroidních konjugátů metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na přístroji TSQ QUANTUM ULTRA (Thermo Scientific, Waltham, USA) za účelem dosažení jejich co nejlepší separace a detekce.
5. Popsat chromatografické vlastnosti a hmotnostní spektra měřených konjugátů, vyhodnotit potenciál měření 8 konjugátů pro jejich stanovení.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5. Materiál a metody

5.1 Chemikálie

Pro přípravu mobilních fází jsem použila mravenčan amonný (Sigma Aldrich, CZ), metanol (Fisher Chemical, Fisher Scientific, UK) a deionizovanou vodu (deionizace na Barnstead NANO Pure Thermo Scientific, USA). Byla studována separace následujících osmi steroidních konjugátů-sulfátů: androsteron sulfát (A-S), etiocholanolon sulfát (ETIOCHOL-S), epiandrosteron sulfát (EA-S), testosteron sulfát (T-S), dehydroepiandrosteron sulfát (DHEA-S), 16 α -hydroxydehydroepiandrosteron 3-sulfát (16 α -OH-DHEA-3S), 17 β -estradiol 3-sulfát (17 β -E2-3S) a 17 β -estradiol 17-sulfát (17 β -E2-17S) (všechny Steraloids, Newport, USA).

5.2 Postup přípravy standardů

Pro měření jsem si připravila modelovou směs konjugátů rozpuštěných v metanolu o koncentraci 1 nmol.ml⁻¹ - složení je uvedeno v tabulce I. Na kolony bylo dávkováno 5 μ l této modelové směsi.

Tab. I Systematické a triviální názvy steroidních konjugátů v modelové směsi.

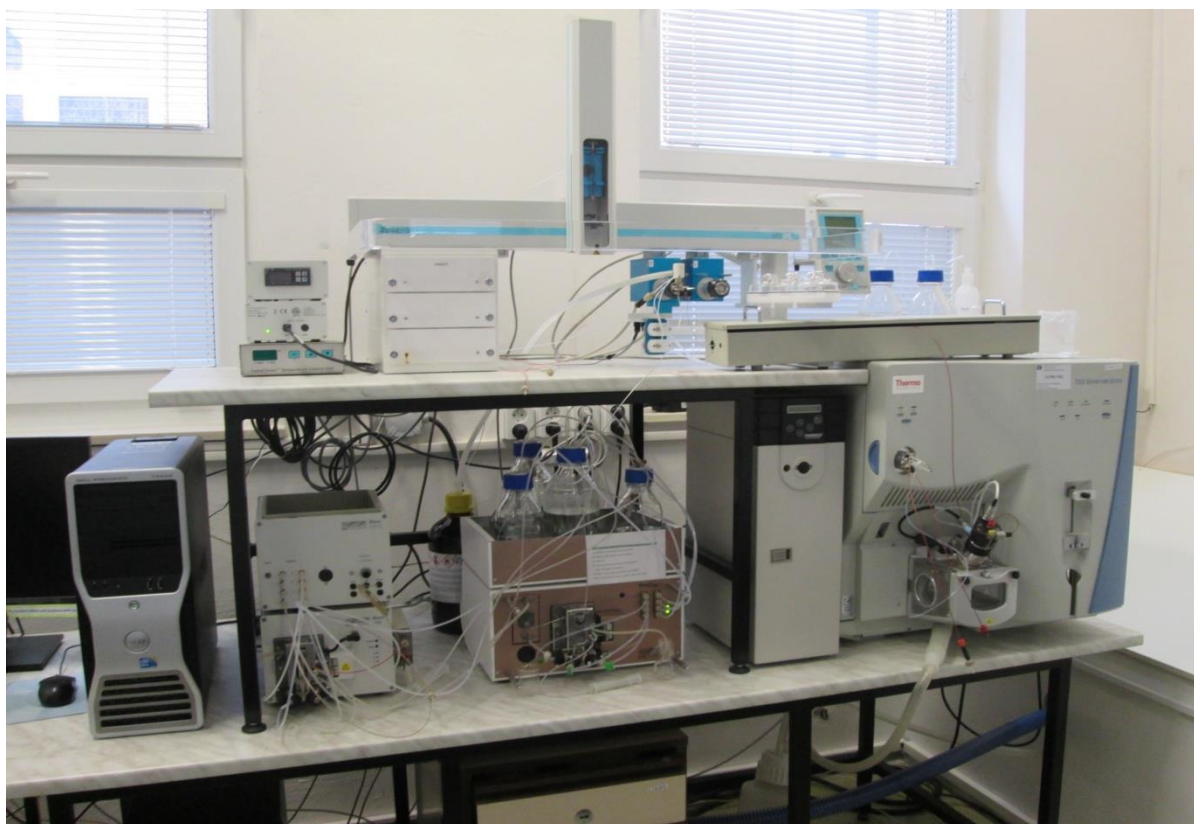
Systematické názvy	Triviální názvy
5 α -androsten-3 α -ol-17-sulfát	androsteron sulfát
5 α -androstan-3 β -ol-17-sulfát	epiandrosteron sulfát
5 β -androstan-3 α -ol-17-sulfát	etiocholanolon sulfát
4-androsten-17 β -ol-3-sulfát, sodná sůl	testosteron sulfát
5-androsten-3 β , 16 α -diol-17-sulfát	16 α - hydroxydehydroepiandrosteron 3-sulfát
5-androsten-3 β -ol-17-sulfát, sodná sůl	dehydroepiandrosteron sulfát
1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol 3-sulfát, sodná sůl	17 β -estradiol 3-sulfát
1,3,5(10)-estratrien-3,17-diol 17 β -sulfát, sodná sůl	17 β - estradiol 17- sulfát

5.3 Přístrojové vybavení a materiál pro HPLC separaci

K dosažení separace steroidních konjugátů bylo třeba optimalizovat HPLC. Mezi nejdůležitější parametry, které ovlivňují separaci, patří typ kolony, doba separace, gradient a průtok mobilních fází. K separaci steroidních konjugátů jsem použila následujících HPLC kolony: Luna 5 μ C5 - 100A, 150 x 1.00 mm, Synergi 4 μ Fusion - RP 80A, 150 x 1.00 mm a Gemini C18 3 μ 110A, 150 x 2 mm (všechny Phenomenex, Torrance, USA), ke kterým jsem na základě literatury a zkušeností kolegů v laboratoři zvolila odpovídající mobilní fáze: 5 mmol.l⁻¹ mravenčan amonný v metanolu (v tabulce označena písmenem B) a 5 mmol.l⁻¹ mravenčan amonný ve vodě (označena písmenem C). Kolony byly vloženy do termostatu o teplotě 35°C. Nastavení sekvence jsem vytvořila v programu Thermo Xcalibur Sequence Setup (Thermo Scientific, USA).

5.4 Hmotnostní spektrometrie

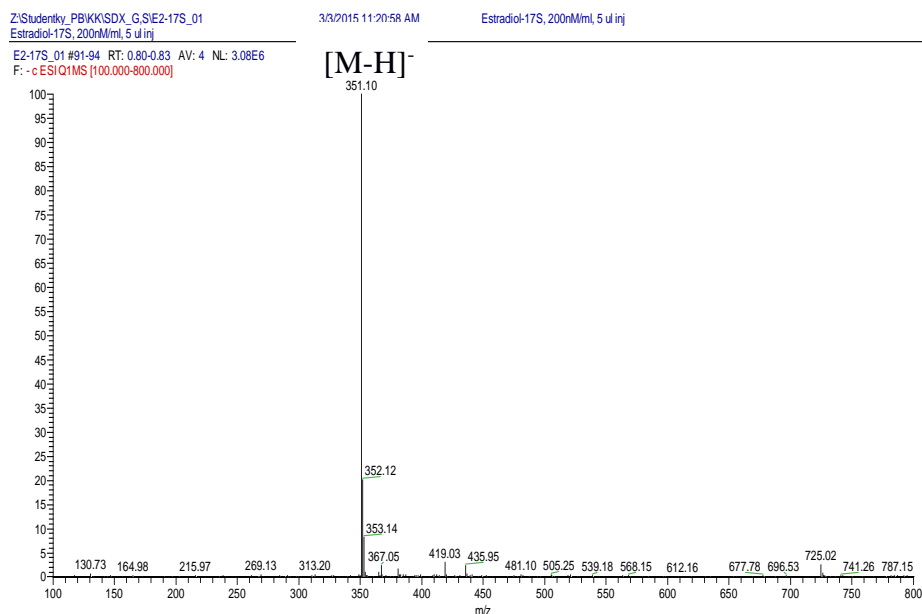
Mezi základní přístrojové vybavení, které jsem použila ke své práci, patří hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem TSQ QUANTUM ULTRA (Thermo Scientific, Waltham, USA), automatický dávkovač vzorků CTC ANALYTICS (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland), pumpa Rheos Allegro (Flux Instruments, Basel, Switzerland) a termostat na kolony DeltaChrom™ Temperature Control Unit.



Obr. 18 HPLC-MS.

6. Výsledky a diskuse

V této práci jsem se snažila najít vhodnou metodu pro separaci steroidních sulfátů. Kvalita separace byla posuzována na základě výpočtu rozlišení jednotlivých chromatografických píků. K detekci steroidů byla použita detekce hmotnostním spektrometrem v negativním modu, neboť sulfáty steroidů se v pozitivním modu velmi špatně ionizují. V negativním spektru poskytují vybrané sulfáty velmi intenzivní ion odpovídající molekule, ze které se odštěpil vodíkový atom $[M-H]^-$. Příklad negativního spektra 17β -estradiol-17-sulfátu je uveden na obrázku 19. K detekci bylo používáno SRM přechodů zvolených sulfátů, tedy byl snímán rozpad hlavního iontu konjugátů na specifické fragmenty za přispění dané kolizní energie (tabulka II.)



Obr. 19 Ukázka negativního spektra 17β -estradiol-17-sulfátu.

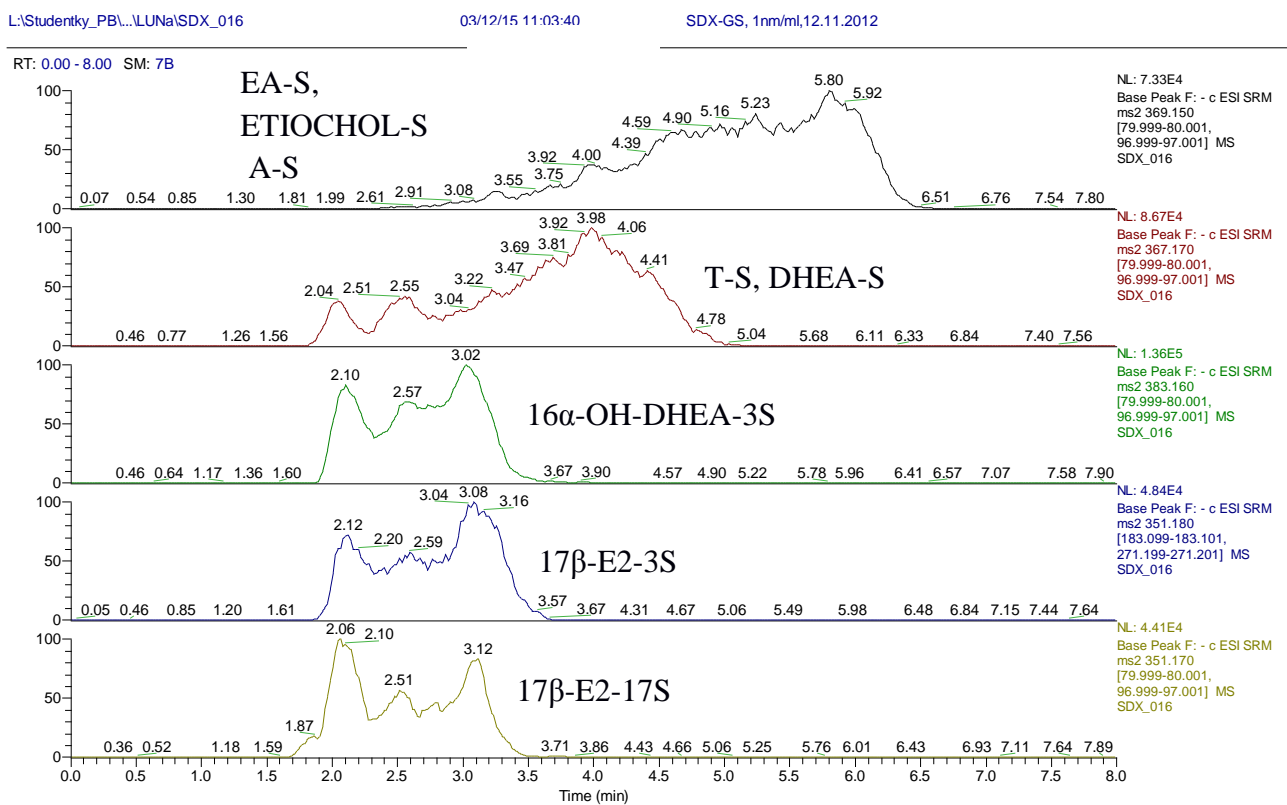
Tab. II Přehled SRM přechodů.

SRM přechody			Analyt
Hlavní ion	Fragment	Kolizní energie [eV]	
369,1	80,0	74	A-S, EA-S, ETIOCHOL-S
	97,0	43	
367,10	80,0	70	DHEA-S, T-S
	97,0	40	
383,10	80,0	74	16α -OH-DHEA-3S
	97,0	40	
351,10	183,1	5735	17β -E2-3S
	271,2		
351,10	80,0	65	17β -E2-17S
	97,0	42	

Nejprve jsem porovnávala dělení konjugátů na 3 typech kolon s reverzní fází. První kolonu jsem použila Lunu 5 μ C5 - 100A , 150 x 1.00 mm. Průtok mobilních fází byl 50 μ l.min⁻¹. Gradient mobilních fází je zobrazen v tabulce III. a chromatogram na obr. 20.

Tab. III Nastavení gradientu na koloně Luna.

	Time	A%	B%	C%	D%	μ l/min	VPos	DigOuts
0	0.00	0.0	55.0	45.0	0.0	50.0		●
1	5.00	0.0	80.0	20.0	0.0	50.0		
2	8.00	0.0	95.0	5.0	0.0	50.0		
3	8.10	0.0	55.0	45.0	0.0	50.0		
4	13.00	0.0	55.0	45.0	0.0	50.0		
5		100.0	0.0	0.0	0.0	50.0		

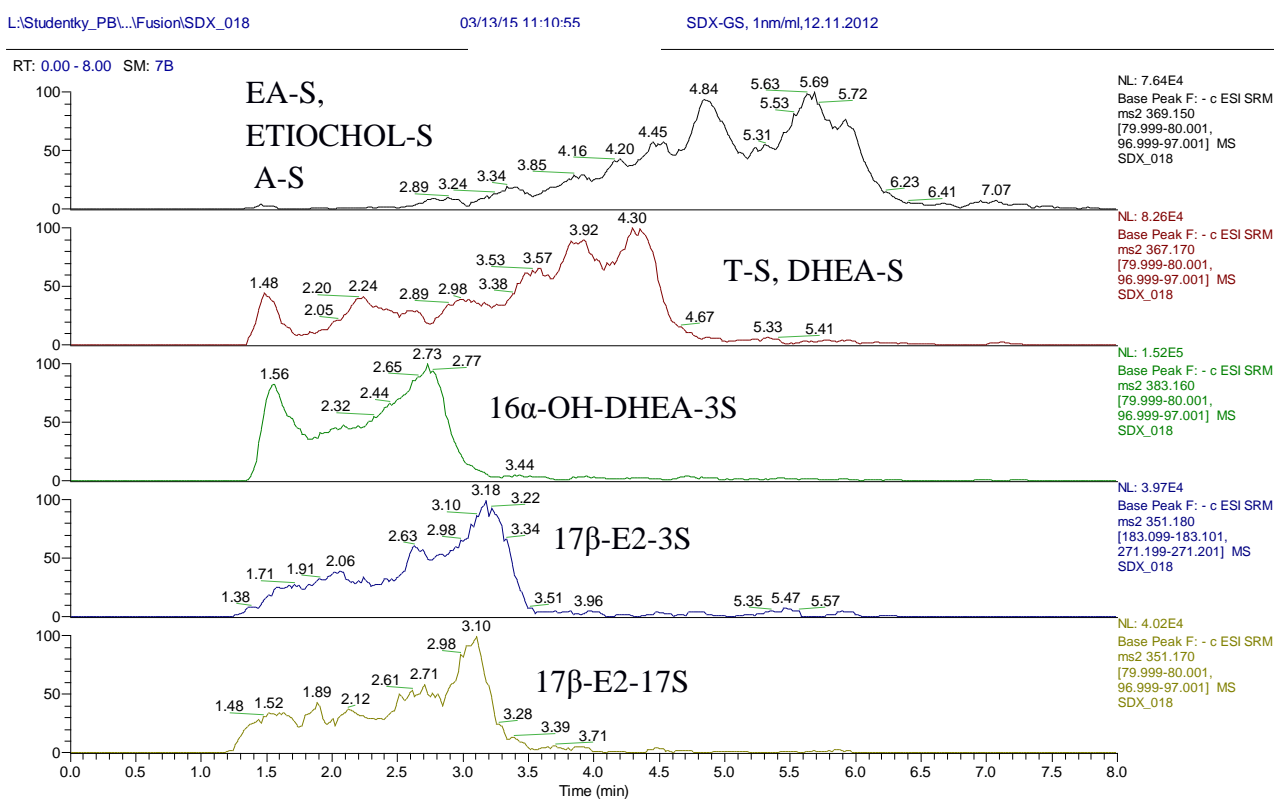


Obr. 20 Chromatogram separovaných látek na koloně Luna.

Jako druhou kolonu jsem použila Synergi 4 μ Fusion - RP 80A, 150 x 1.00 mm. Průtok mobilních fází byl 50 μ l.min⁻¹. Použitý gradient je zobrazen v tabulce IV. a chromatogram na obr. 21.

Tab. IV Nastavení gradientu na koloně Synergi Fusion.

	Time	A%	B%	C%	D%	μ l/min	VPos	DigOuts
0	0.00	0.0	55.0	45.0	0.0	50.0		
1	5.00	0.0	80.0	20.0	0.0	50.0		
2	8.00	0.0	95.0	5.0	0.0	50.0		
3	8.10	0.0	55.0	45.0	0.0	50.0		
4	13.00	0.0	55.0	45.0	0.0	50.0		
5		100.0	0.0	0.0	0.0	50.0		

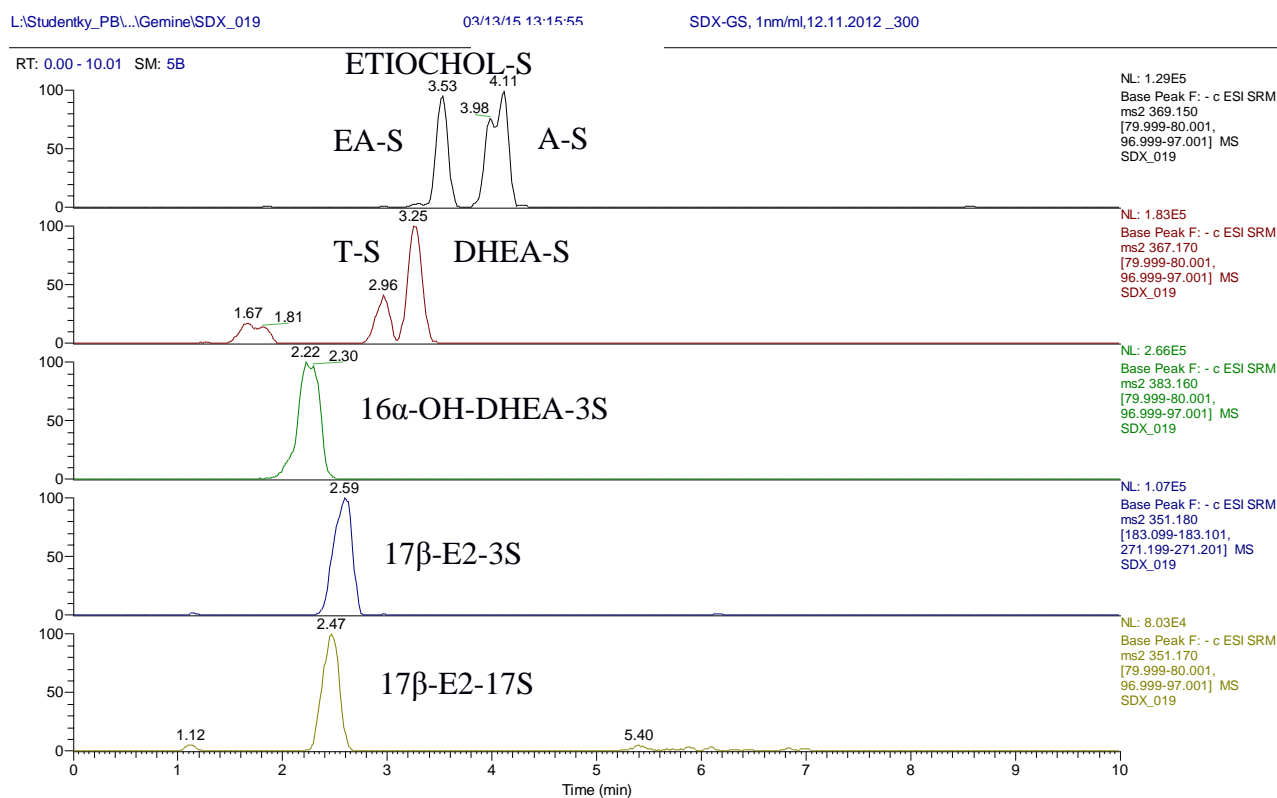


Obr. 21 Chromatogram separovaných látek na koloně Synergi Fusion.

Třetí zkoušenou kolonou byla Gemini C18 3 μ 110A, 150 x 2 mm. Průtok mobilních fází byl 300 μ l.min⁻¹, nastavení gradientu je uvedeno v tabulce V. a chromatogram na obr. 22.

Tab. V Nastavení gradientu A na koloně Gemini.

	Time	A%	B%	C%	D%	μ l/min	VPos	DigOuts
0	0.00	0.0	55.0	45.0	0.0	300.0		
1	5.00	0.0	80.0	20.0	0.0	300.0		
2	10.00	0.0	95.0	5.0	0.0	300.0		
3	10.10	0.0	55.0	45.0	0.0	300.0		
4	15.00	0.0	55.0	45.0	0.0	300.0		
5		100.0	0.0	0.0	0.0	300.0		



Obr. 22 Chromatogram separovaných látek na koloně Gemini při gradientu A.

Tab. VI Výpočet rozlišení A.

A	B	tr1	tr2	wh1	wh2	R
ETIOCHOL-S	A-S	3,98	4,11	0,21	0,22	0,356744
T-S	DHEA-S	2,98	3,25	0,14	0,14	1,137857


Tab. VII Výpočet symetrie A.

A	t	f	A2
EA-S	0,21	0,23	0,913043

Kolony Luna a Synergy Fusion nejsou pro separaci steroidních konjugátů vhodné. Píky jsou rozmyté, nesymetrické a vzájemně splývají. Na koloně Gemini poskytovaly steroidní sulfáty velmi jasné a ostré píky, některé se však částečně překrývaly, proto jsem se dále věnovala optimalizaci podmínek pro vylepšení separace na této koloně. Úpravou gradientu, průtoku mobilních fází a času separace jsem se snažila docílit rozdělení zejména dvou kritických párů v chromatogramu, který tvoří ETIOCHOL-S s A-S a T-S s DHEA-S. Míru rozdělení kritických párů jsem určovala na základě výpočtu rozlišení těchto píků. Podle výsledných chromatogramů a výpočtů rozlišení jsem dále upravovala podmínky, až jsem našla optimální separaci. Chromatogramy A-I jsou k nahlédnutí v příloze.

V chromatogramu A se dvojice ETIOCHOL-S s A-S rozdělila v retenčních časech 3,98 a 4,11 min. Dvojice T-S s DHEA-S se rozdělily v retenčních časech 2,98 a 3,25 min. Píky byly rozmyté, nebyly ve tvaru gaussovského rozdělení - doložila jsem výpočty asymetrie EA-S ve všech gradientech. Protože jsem hledala optimální nastavení separace, kde v závěrečném chromatogramu budou píky symetrické, nepřekrývající se s ostatními píky a rozlišení bude alespoň 1,5, musela jsem změnit podmínky nastavení gradientu. Zkusila jsem snížit průtok mobilních fází a zpomalit vymývání analytů metanolicou fází.

Tab. VIII Nastavení gradientu B.

	Time	A%	B%	C%	D%	µl/min	VPos	DigOuts
0	0.00	0.0	55.0	45.0	0.0	200.0		
1	8.00	0.0	80.0	20.0	0.0	200.0		
2	17.00	0.0	95.0	5.0	0.0	200.0		
3	17.10	0.0	55.0	45.0	0.0	200.0		
4	22.00	0.0	55.0	45.0	0.0	200.0		
5		100.0	0.0	0.0	0.0	200.0		

Tab. IX Výpočet rozlišení B.


A	B	tr1	tr2	wh1	wh2	R
ETIOCHOL-S	A-S	6,04	6,26	0,19	0,18	0,701622
T-S	DHEA-S	4,4	4,89	0,2	0,22	1,376667

Tab. X Výpočet symetrie B.

B	t	f	A
EA-S	0,17	0,18	0,944444

Při gradientu B se analyty eluovaly z kolony v delším retenčním čase než u A. A-S a ETIOCHOL-S se částečně rozdělily, s retenčními časy 6,04 a 6,26 min. Kritické píky T-S s DHEA-S se rozdělily v retenčních časech 4,40 a 4,89 min, ale stále se výrazně překrývaly. Změnou průtoku a gradientu jsem se pokusila dostat podobnou separaci v kratším čase s užšími píky.

Tab. XI Nastavení gradientu C.

	Time	A%	B%	C%	D%	μl/min	VPos	DigOuts
0	0.00	0.0	30.0	70.0	0.0	300.0		
1	6.00	0.0	80.0	20.0	0.0	300.0		
2	10.00	0.0	95.0	5.0	0.0	300.0		
3	15.00	0.0	95.0	5.0	0.0	300.0		
4	15.10	0.0	30.0	70.0	0.0	300.0		
5	20.00	0.0	30.0	70.0	0.0	300.0		
6		100.0	0.0	0.0	0.0	300.0		

Tab. XII Výpočet rozlišení C.


A	B	tr1	tr2	wh1	wh2	R
ETIOCHOL-S	A-S	6,61	6,71	0,16	0,18	0,347059
T-S	DHEA-S	5,79	6,06	0,07	0,11	1,77

Tab. XIII Výpočet symetrie C.

C	t	f	A
EA-S	0,22	0,2	1,1

V chromatogramu C se však analyty vymývaly z kolony v delším retenčním čase, než v předchozím chromatogramu. Dvojice ETIOCHOL-S s A-S se ještě lehce překrývají, ale mohla jsem spočítat rozlišení s retenčními časy 6,61 a 6,71 min. T-S s DHEA-S se rozdělily v retenčních časech 5,79 a 6,06 min. Píky v gradientu C byly úzké, EA-S měl podle výpočtu symetrie ideální tvar. Abych dosáhla lepší separace, zkusila jsem změnit počáteční poměr mobilních fází.

Tab. XIV Nastavení gradientu D.

	Time	A%	B%	C%	D%	μl/min	VPos	DigOuts
0	0.00	0.0	40.0	60.0	0.0	300.0		
1	6.00	0.0	80.0	20.0	0.0	300.0		
2	10.00	0.0	95.0	5.0	0.0	300.0		
3	15.00	0.0	95.0	5.0	0.0	300.0		
4	15.10	0.0	40.0	60.0	0.0	300.0		
5	20.00	0.0	40.0	60.0	0.0	300.0		
6		100.0	0.0	0.0	0.0	300.0		

Tab. XV Výpočet rozlišení D.


A	B	tr1	tr2	wh1	wh2	R
ETIOCHOL-S	A-S	6,01	6,13	0,18	0,2	0,372632
T-S	DHEA-S	4,97	5,32	0,11	0,15	1,588462

Tab. XVI Výpočet symetrie D.

D	t	f	A
EA-S	0,26	0,31	0,83871

V chromatogramu D byly kritické píky ETIOCHOL-S s A-S rozděleny v retenčních časech 6,01 a 6,13 min. - došlo k lepší separaci tohoto kritického páru, ale stále se ETIOCHOL-S zcela neoddělil. Dvojice kritických píků T-S s DHEA-S se rozdělila v retenčních časech 4,97 a 5,32 min. Tvar EA-S měl o něco menší symetrii oproti chromatogramu C. Úpravou počátečního poměru mobilních fází a zpomalením vymývání analytů metanolicou fází jsem se pokusila dosáhnout ještě lepších výsledků.

Tab. XVII Nastavení gradientu E.

	Time	A%	B%	C%	D%	μl/min	VPos	DigOuts	Dig
0	0.00	0.0	55.0	45.0	0.0	300.0			
1	8.00	0.0	80.0	20.0	0.0	300.0			
2	9.00	0.0	95.0	5.0	0.0	300.0			
3	10.00	0.0	95.0	5.0	0.0	300.0			
4	10.10	0.0	55.0	45.0	0.0	300.0			
5	15.00	0.0	55.0	45.0	0.0	300.0			
6		100.0	0.0	0.0	0.0	300.0			

Tab. XVIII Výpočet rozlišení E.

A	B	tr1	tr2	wh1	wh2	R
ETIOCHOL-S	A-S	4,54	4,74	0,16	0,13	0,813793
T-S	DHEA-S	3,19	3,54	0,16	0,2	1,147222

Tab. XIX Výpočet symetrie E.

E	t	f	A
EA-S	0,24	0,38	0,631579

V chromatogramu E se ETIOCHOL-S s A-S rozdělily v retenčních časech 4,54 a 4,74 min. Dvojice T-S s DHEA-S se rozdělily retenční časy 3,19 a 3,54 min. Úpravou gradientu jsem se pokusila zrychlit eluci analytů a zúžit jejich píky, jelikož byly stále lehce rozmyté.

Tab. XX Nastavení gradientu F.

	Time	A%	B%	C%	D%	μl/min	VPos	DigOuts
0	0.00	0.0	60.0	40.0	0.0	300.0		●
1	5.00	0.0	80.0	20.0	0.0	300.0		
2	10.00	0.0	95.0	5.0	0.0	300.0		
3	10.10	0.0	60.0	40.0	0.0	300.0		
4	15.00	0.0	60.0	40.0	0.0	300.0		
5		100.0	0.0	0.0	0.0	300.0		

Tab. XXI Výpočet rozlišení F.

A	B	tr1	tr2	wh1	wh2	R
ETIOCHOL-S	A-S	3,47	3,58	0,14	0,12	0,499231
T-S	DHEA-S	2,52	2,78	0,18	0,15	0,929697

Tab. XXII Výpočet symetrie F.

F	t	f2	A
EA-S	0,18	0,24	0,75

V chromatogramu F se první dvojice kritických píků rozdělila v retenčních časech 3,47 a 3,58 min., ale navzájem se do značné míry překrývají. Druhá dvojice se eluovala z kolony v 2,52 a 2,78 min. Analýza se zrychlila, avšak na úkor separace - rozlišení u obou kritických párů je výrazně horší. Tvar píků byl užší než v předchozím chromatogramu, ale stále měl hodnotu symetrie < 1. Zlepšení separace jsem se pokusila docílit pomalejším přidáváním metanolicke fáze.

Tab. XXIII Nastavení gradientu G.

	Time	A%	B%	C%	D%	μl/min	VPos	DigOuts
0	0.00	0.0	60.0	40.0	0.0	300.0		●
1	8.00	0.0	80.0	20.0	0.0	300.0		
2	9.00	0.0	95.0	5.0	0.0	300.0		
3	10.00	0.0	95.0	5.0	0.0	300.0		
4	10.10	0.0	60.0	40.0	0.0	300.0		
5	15.00	0.0	60.0	40.0	0.0	300.0		
6		100.0	0.0	0.0	0.0	300.0		

Tab. XXIV Výpočet rozlišení G.


A	B	tr1	tr2	wh1	wh2	R
ETIOCHOL-S	A-S	3,71	3,87	0,15	0,17	0,59
T-S	DHEA-S	2,57	2,89	0,2	0,19	0,968205

Tab. XXV Výpočet symetrie G.

G	t	f	A
EA-S	0,18	0,25	0,72

V chromatogramu G došlo ke zlepšení rozlišení u obou kritických párů oproti gradientu F, nedosahovalo však ani úrovně gradientu E. Řešením bylo ještě pomalejší přidávání metanolicke fáze v gradientu.

Tab. XXVI Nastavení gradientu H.

	Time	A%	B%	C%	D%	μl/min	VPos	DigOuts
0	0.00	0.0	55.0	45.0	0.0	300.0		
1	8.00	0.0	75.0	25.0	0.0	300.0		
2	9.00	0.0	95.0	5.0	0.0	300.0		
3	10.00	0.0	95.0	5.0	0.0	300.0		
4	10.10	0.0	55.0	45.0	0.0	300.0		
5	15.00	0.0	55.0	45.0	0.0	300.0		
6		100.0	0.0	0.0	0.0	300.0		

Tab. XXVII Výpočet rozlišení H.

A	B	tr1	tr2	wh1	wh2	R
ETIOCHOL-S	A-S	4,78	5,01	0,14	0,12	1,043846
T-S	DHEA-S	3,27	3,7	0,17	0,21	1,335263

Tab. XXVIII Výpočet symetrie H.

H	t	f	A
EA-S	0,28	0,22	1,272727

V chromatogramu H se ETIOCHOL-S s A-S méně překrývaly, rozdělily se v časech 4,78 a 5,01 min. T-S s DHEA-S se rozdělily v časech 3,27 a 3,70 min. Došlo k výraznému zlepšení rozlišení. U tvaru EA-S došlo k chvostování, jelikož výsledná symetrie byla > 1 . V následujícím kroku jsem se úpravou časového nastavení v gradientu mobilních fází pokusila ještě lépe oddělit první kritickou dvojici analytů.

Tab. XXIX Nastavení gradientu CH.

	Time	A%	B%	C%	D%	μl/min	VPos	DigOuts
0	0.00	0.0	55.0	45.0	0.0	300.0		●
1	10.00	0.0	75.0	25.0	0.0	300.0		
2	11.00	0.0	95.0	5.0	0.0	300.0		
3	12.00	0.0	95.0	5.0	0.0	300.0		
4	12.10	0.0	55.0	45.0	0.0	300.0		
5	17.00	0.0	55.0	45.0	0.0	300.0		
6		100.0	0.0	0.0	0.0	300.0		

Tab. XXX Výpočet rozlišení CH.

A	B	tr1	tr2	wh1	wh2	R
ETIOCHOL-S	A-S	5,07	5,32	0,14	0,13	1,092593
T-S	DHEA-S	3,38	3,85	0,18	0,21	1,422051

Tab. XXXI Výpočet symetrie CH.

CH	t	f	A
EA-S	0,22	0,24	0,916667

Při gradientu CH došlo ke zlepšení separace, kritické píky se navzájem téměř nepřekrýval a zlepšilo se jejich rozlišení. ETIOCHOL-S s A-S se eluovaly z kolony v retenčních časech 5,07 min. a 5,32 min., T-S s DHEA-S v časech 3,38 a 3,85. EA-S měl ideální symetrii.

Při poslední změně jsem se úpravou gradientu mobilních fází pokusila od sebe oddělit kritické píky tak, aby se co nejméně překrývaly.

Tab. XXXII Nastavení gradientu I.

	Time	A%	B%	C%	D%	μl/min	VPos	DigOuts	DigIn
0	0.00	0.0	50.0	50.0	0.0	300.0		●	
1	8.00	0.0	75.0	25.0	0.0	300.0			
2	9.00	0.0	95.0	5.0	0.0	300.0			
3	10.00	0.0	95.0	5.0	0.0	300.0			
4	10.10	0.0	55.0	45.0	0.0	300.0			
5	15.00	0.0	55.0	45.0	0.0	300.0			
6		100.0	0.0	0.0	0.0	300.0			

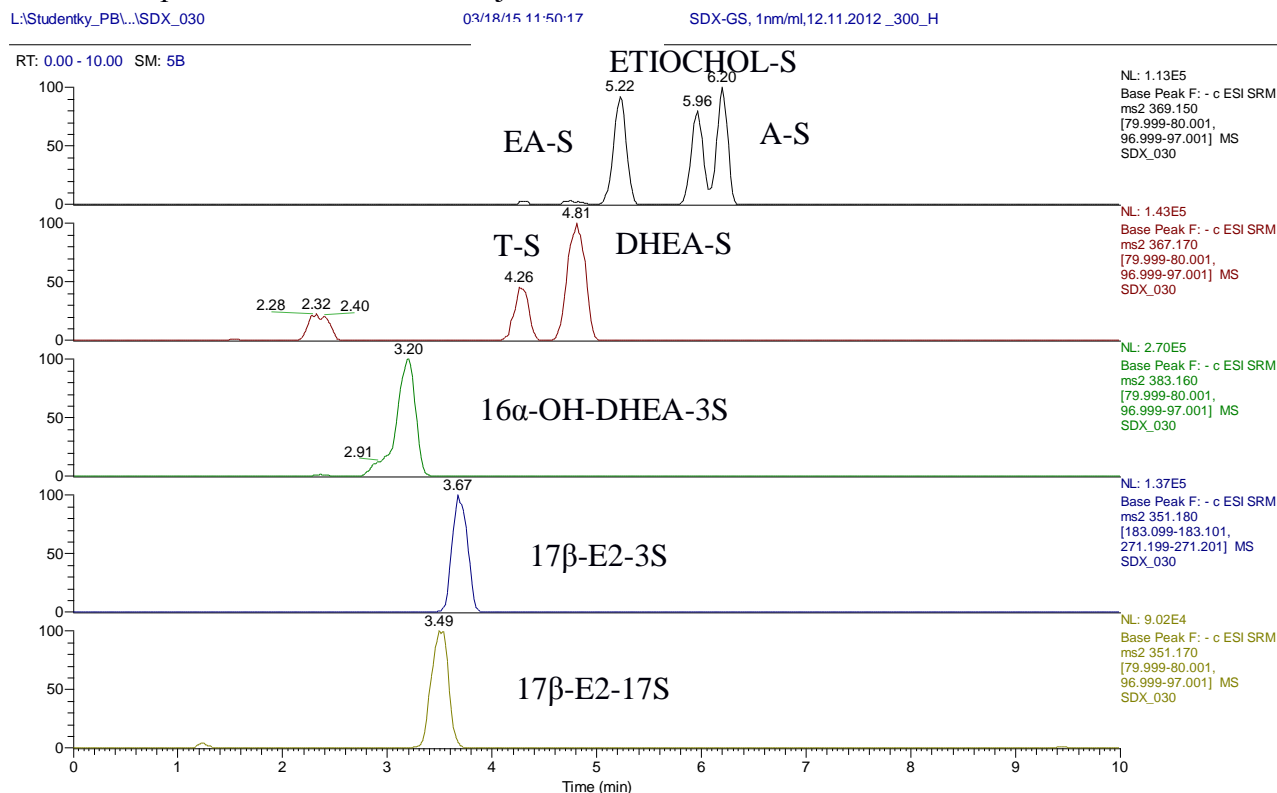
Tab. XXXIII Výpočet rozlišení I.

A	B	tr1	tr2	wh1	wh2	R
ETIOCHOL-S	A-S	5,96	6,2	0,1	0,11	1,348571
T-S	DHEA-S	4,3	4,79	0,16	0,12	2,065

Tab. XXXIV Výpočet symetrie I.

I	t	f	A
EA-S	0,24	0,29	0,82

Při gradientu I se kritické píky navzájem nejméně překrývaly. První dvojice se rozdělila v časech 5,96 a 6,2 min. Druhá dvojice se rozdělila v časech 4,3 a 4,79 min. Píky byly viditelné, EA-S měl skoro pravidelnou symetrii. Rozlišení u prvního kritického páru se blíží 1.5, u druhého je větší než 1.5, píky jsou tedy zcela rozdělené. Podle výpočtů rozlišení kritických párů vyplývá, že k nejlepší separaci dvojice ETIOCHOL-S s A-S docházelo při nastavení gradientu I, kdy bylo dosaženo rozlišení 1,34. Stejně tak u kritického páru T-S, DHEA-S došlo k nejlepšímu rozdělení píků při gradientu I, kdy bylo dosaženo rozlišení 2.06. Pro optimální rozlišení a přijatelnou dobu analýzy by mobilní fáze měly mít zvýšený podíl méně polární složky a snížený podíl vody, jak je vidět u gradientu I. Mobilní fáze byly v poměru B:C 50:50 a v 8. minutě se změnila na poměr 75:25 ve prospěch metanolové fáze. Retenční časy nejlépe separovaných kritických píků ETIOCHOL-S s A-S se pohybovaly kolem 6 minuty, u T-S s DHEA-S kolem 3,5 minuty. Kritérium pro optimální separaci je maximální rozlišení dvou sousedních kritických píků a maximální rozlišení při minimální době analýzy. Obou těchto kritérií jsem ve své práci dosáhla. Chromatogram nejlepší dosažené separace steroidních sulfátů je ukázán na obrázku 23.



Obr. 23 Chromatogram nejlépe separovaných látek Etiochol-S s A-S při nastavení gradientu I.

7. Závěr

Cílem práce bylo popsat výskyt a význam steroidů a jejich konjugovaných forem v tělních tekutinách a navrhnout stanovení 8 steroidních konjugátů: A-S, ETIOCHOL-S, EA-S, T-S, DHEA-S, 16 α -OH-DHEA-3S, 17 β -E2-3S, 17 β -E2-17S. Tyto látky se vyskytují v nízkých hladinách a mají různé funkční skupiny, a proto se obtížně separují. Pro separaci steroidů byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem jako detektorem, který umožnil správně identifikovat analyty na základě molekulové hmotnosti a struktury.

Hlavním cílem v praktické části byla optimalizace podmínek pro separaci steroidních konjugátů vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na přístroji TSQ QUANTUM ULTRA (Thermo Scientific, Waltham, USA). Byly zkoumány tyto faktory: čas separace, průtok a procentuální zastoupení mobilních fází (gradient). Postupnou úpravou gradientu mobilních fází na základě porovnání výpočtů rozlišení a symetrie píků ze získaných chromatogramů byly nalezeny optimální podmínky pro nejlepší separaci vybraných konjugátů, zejména kritických párů konjugátů ETIOCHOL-S a A-S, T-S a DHEA-S. Nalezené podmínky umožňují přesnou a citlivou HPLC-MS analýzu steroidních látek.

1. Byla zpracována literární rešerše vlastností hlavních skupin steroidů a forem jejich konjugace.
2. Byl připraven literární přehled metod analýzy steroidů a jejich konjugátů zejména technikou LC-MS.
3. Byl popsán výskyt osmi vybraných steroidních konjugátů v tělních tekutinách lidského organismu.
4. Byly nalezeny vhodné podmínky pro separaci vybraného souboru steroidních konjugátů metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na přístroji TSQ QUANTUM ULTRA (Thermo Scientific, Waltham, USA) za účelem dosažení jejich co nejlepší separace a detekce.
5. Byly popsány základní chromatografické vlastnosti a ESI hmotnostní spektra vybraných měřených konjugátů, byly vyhodnoceny možnosti měření vybraných 8 konjugátů pro jejich kvantitativní stanovení technikou HPLC-MS/MS na analyzátoru MS trojitý kvadrupól.

Z literární rešerše vyplývá, že pro optimalizaci vysokoúčinné kapalinové chromatografie je důležitý výběr kolony, mobilní fáze i nastavení gradientu. Ve spojení se správným detektorem, nejlépe s hmotnostním detektorem, se stává tato moderní technika velice citlivá pro steroidní látky a jejich konjugáty. Výsledky z experimentální části mi teoretické poznatky potvrdily.

8. Seznam citované literatury

1. Chemické složení živé hmoty [on-line], [cit. 2015-01-25].
Dostupné z: www.sci.muni.cz/ptacek/Chemie-bar.htm
2. Vodrážka Z. 2007: *Biochemie*. Praha: Nakladatelství Akademia, stránky 77-80.
3. Garrett H., Grisham M. Ch. 1995: *Biochemistry*. Sounders college publishing China, stránky 289-291, 505-507.
4. Nelson L. D., Cox M. M. 2008: *Principles of Biochemistry*. Freeman USA, stránky 355-360.
5. SigmaAldrich, [www. sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com), Katalog strukturních vzorců sloučenin [on-line],[cit. 2014-11-29].
Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c8667?lang=en®ion=GB>
6. Fenandes P., Cabral J. M. S. 2007: Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresource Technology*, stránky 98: 2335-2350.
7. SigmaAldrich, [www. sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com), Katalog strukturních vzorců sloučenin [on-line], [cit. 2014-11-29].
Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s2424?lang=en®ion=GB>
8. SigmaAldrich, [www. sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com), Katalog strukturních vzorců sloučenin [on-line], [cit. 2014-11-29].
Dostupné z: [://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/45480?lang=en®ion=GB](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/45480?lang=en®ion=GB)
9. SigmaAldrich, [www. sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com), Katalog strukturních vzorců sloučenin [on-line], [cit. 2014-11-29].
Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c1129?lang=en®ion=GB>
10. Kolektiv autorů 1990: *Lékařská chemie a biochemie*. Avicenum osveta Praha, stránky 164-165.
11. SigmaAldrich, [www. sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com), Katalog strukturních vzorců sloučenin [on-line], [cit. 2014-11-29].
Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e8875?lang=en®ion=GB>
12. Škára B., Ferenčík M. 1987: *Biochémiá*. Bratislava: Vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatury, stránky 472-474.
13. SigmaAldrich, [www. sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com), Katalog strukturních vzorců sloučenin [on-line], [cit. 2015-03-27].
Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t1500?lang=en®ion=GB>
14. SigmaAldrich, [www. sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com), Katalog strukturních vzorců sloučenin [on-line], [cit. 2014-11-29].
Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t1500?lang=en®ion=GB>

15. SigmaAldrich, [www. sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com), Katalog strukturních vzorců sloučenin [on-line], [cit. 2014-11-29].
Dostupné z:<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/cerillian/c106?lang=en®ion=GB>
16. SigmaAldrich, [www. sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com), Katalog strukturních vzorců sloučenin [on-line], [cit. 2014-11-29].
Dostupné z:<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a9477?lang=en®ion=GB>
17. Marshall J. W., Bangert K. S. 2008: *Clinical Chemistry*. Mosby, stránka 374.
18. SigmaAldrich, [www. sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com), Katalog strukturních vzorců sloučenin [on-line], [cit. 2014-11-29].
Dostupné z:<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e1007?lang=en®ion=GB>
19. SigmaAldrich, [www. sigma-aldrich.com](http://www.sigma-aldrich.com), Katalog strukturních vzorců sloučenin [on-line], [cit. 2014-11-29].
Dostupné z:<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9756?lang=en®ion=GB>
20. Alain Y. Dury, Yuyong Ke, Renaud Gonthier, Maxim Isabelle, Jean-Nicolas Simard, Fernand Labrie 2015: Validated LC-MS/MS simultaneous assay of five sex steroid/neurosteroid-related sulfates in human serum. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, stránky 149: 1-10.
21. Martin Hill, Andrea Pašková, Radmila Kančeva, Marta Velíková, Jana Kubátová, Lyudmila Kancheva, Karolína Adamcová, Michaela Mikešová, Zdeňek Žižka, Michal Koucký, Hana Šarapatková, Viktor Kačer, Petr Matucha, Milan Meloun, Antonín Pařízek 2014: Steroid profilig in pregnancy: A focus on the human fetus. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, stránky 139: 201-222.
22. Christian Bjerregaard-Olesen, Mandana Ghisari, Lisbeth S. Kjeldsen, Maria Wielsøe, Eva C. Bonfeld-Jørgensen 2016: Estrone sulfate and dehydroepiandrosterone sulfate: Transactivation of the estrogen and androgen receptor. *Steroids*, stránky 105: 50-58.
23. Qingping Wang, Lisa Bottalico, Clementina Mesaros, Ian A. Blair 2015: Analysis of estrogens and androgens in postmenopausal serum and plasma by liquid chromatography - mass spectrometry. *Steroids*, stránky 99: 76-83.
24. L. Dehennin, P. Lafarge, Ph. Dailly, D. Bailloux, J. - P. Lafarge 1996: Combined profile of androgen glucuro- and sulfoconjugates in postcompetition urine of sportsmen: a simple screening procedure using gas chromatography - mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, stránky 687: 85-91.
25. Larry D. Bowers, Sanaullah 1996: Direct measurement of steroid sulfate and glucuronide conjugates with high - performance liquid chromatography - mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, stránky 687: 61-68.

26. Emmanuel Strahm, Isabelle Kohler, Serge Rudaz, Sophie Martel, Pierre - Alain Carrupt, Jean - Luc Veuthey, Martial Saugy, Christophe Saudan 2008: Isolation and quantification by high - performance liquid chromatography - ion - trap mass spectrometry of androgen sulfoconjugates in human urine. *Journal of Chromatography A*, stránky 1196-1197: 153-160.
27. Yuyong Ke, Jonathan Bertin, Renaud Gonthier, Jean - Nicolas Simard, Fernand Labrie 2014: A sensitive, simple and robust LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of seven androgen- and estrogen- related steroids in postmenopausal serum. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, stránky 144: 523-534.
28. Wei Gao, Clemens Kirschbaum, Juliane Grass, Tobias Stalder 2015: LC-MS based analysis of endogenous steroid hormones in human hair. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, stránky XXX: XXX-XXX.
29. Genye He, Sheng Yang, Jianghai Lu, Youxuan Xu 2016: New long term metabolite in human urine for metenolone misuse by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Steroids*, stránky 105: 1-11.
30. Sebastien Anizan, Emmanuelle Bichon, Domenica Di Nardo, Fabrice Monteau, Nora Cestron, Jean - Philippe Antignac, Bruno Le Bizec 2011: Screening of 4-androstenedione misuse in cattle by LC-MS/MS profilig of glucuronide and sulfatate steroids in urine. *Talanta*, stránky 86: 186-194.
31. Qi Jia, Mei - Feng Hong, Zhao - Xing Pan, Steve Orndorff 2001: Quantification of urine 17-ketosteroid sulfates and glucuronides by high - performance liquid chromatography - ion trap mass spectroscopy. *Journal of Chromatography B*, stránky 750: 81-91.
32. Akira Honda, Teruo Miyazaki, Tadashi Ikegami, Junichi Iwamoto, Kouwa Yamashita, Mitsuteru Numazawa, Yasushi Matsuzaki 2010: Highly sensitive and specific analysis of sterol profiles in biological samples by HPLC-ESI-MS/MS. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, stránky 121: 556-564.
33. Churáček J. a kolektiv 1990: *Analytická separace látek*. Praha, stránky 192-291.
34. Holčapek Michal, Výuka Hmotnostní spektrometrie v organické analýze - Ionizační techniky, Mass Spectrometry Group at University of Pardubice [on-line], Pardubice: 2006-2014 [cit. 2015-9-18]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/02_IonizacniTechniky.pdf
35. Holčapek Michal, Výuka Hmotnostní spektrometrie v organické analýze - Ionizační techniky, Mass Spectrometry Group at University of Pardubice [on-line], Pardubice: 2006-2014 [cit. 2015-9-18]. Dostupné z: http://holcapek.upce.cz/teaching/03_MS_analyzatory.pdf
36. Therese Koal, Diane Schmiederer, Hai Pham - Tuan, Cornelia Röhring, Manfred Rauh 2012: Standardized LC-MS/MS based steroid hormone profile - analysis. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, stránky 129: 129-138.
37. Yasuhiro Shibata, Seiji Arai, Seijiro Honma 2015: Methodological approach to the intracrine study and estimation of DHEA and DHEA-S using liquid chromatography - tandem mass spektrometry

- (LC-MS/MS). *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, stránky 145: 193-199.
38. Nováková L., Douša M. a kolektiv 2013: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Europrint Praha, stránky 32-140.
39. Churáček J., Jandera P. 1984: *Úvod do kapalinové kolonové chromatografie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, stránka 27.
40. Szepesi G. 1992: *How to use reverse phase HPLC*. VCH Publishers, stránky 7-10.
41. Nováková L., Douša M. a kolektiv 2013: *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Europrint Praha, stránky 17-26.
42. VŠCHT Praha - HPLC v analýze potravin a přírodních produktů [on-line], [cit. 2015-10-16]. Dostupné z: web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/1_HPLC_2013_teorie.pdf
43. High Performace Liquid Chromatography, HPLC [on-line], [cit. 2014-12-07]. Dostupné z: www.web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html
44. Tom Fiers, Bruno Casetta, Brigitte Bernaert, Eric Vandersypt, Martine Debock, Jean-Marc Kaufman 2012: Development of a highly sensitive method for the quantification of estrone and estradiol in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivatization. *Journal of Chromatography B*, stránky 893-894: 57-62.
45. Manfred Rauh 2010: Steroid measurement with LC-MS/MS. Application examples in pediatrics. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, stránky 121: 520-527.
46. Xinxin Zhang, Jinru Liang, Jianli Liu, Ye Zhao, Juan Gao, Wenji Sun, Yoichiro Ito 2014: Quality control and identification of steroid saponins from *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright by fingerprint with HPLC-ELSD and HPLC-ESI-Quadrupole/Time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, stránky 91: 46-59.
47. Jana Vitku, Tereza Chlupacova, Lucie Sosvorova, Richard Hampl, Martin Hill, Jiri Heracek, Marie Bicikova, Luboslav Starka 2015: Development and validation of LC-MS/MS method for quantification of bisphenol A and estrogens in human plasma and seminal fluid. *Talanta*, stránky 140: 62-67.
48. Pawel Krzascik, Malgorzata Elzbieta Zajda, Maria Dorota Majewska 2015: The neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate, but not androsterone, enhances the antidepressant effect of cocaine examined in the forced swim test - Possible role of serotonergic neurotransmission. *Hormones and Behavior*, stránky 70: 64-72.
49. Klouda P. 2003: *Moderní analytické metody*. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, stránka 25.

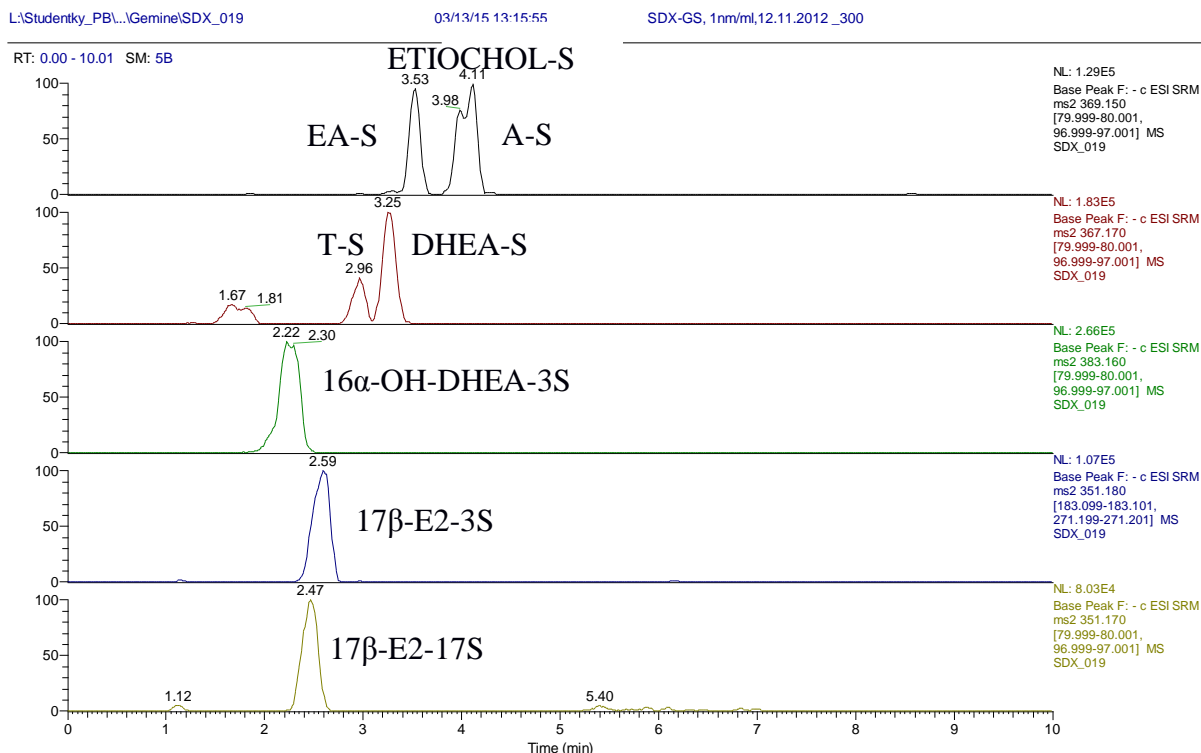
9. Seznam obrázků

Obr. 1	Strukturní vzorec steranu ¹	2
Obr. 2	Strukturní vzorec cholesterolu ⁵	3
Obr. 3	Strukturní vzorec stigmasterolu ⁷	3
Obr. 4	Strukturní vzorec ergosterolu ⁸	4
Obr. 5	Strukturní vzorec kyseliny cholové ⁹	4
Obr. 6	Strukturní vzorec estradiolu ¹¹	5
Obr. 7	Strukturní vzorec progesteronu ¹³	6
Obr. 8	Strukturní vzorec testosteronu ¹⁴	6
Obr. 9	Strukturní vzorec kortizolu ¹⁵	7
Obr. 10	Strukturní vzorec aldosteronu ¹⁶	7
Obr. 11	Strukturní vzorec ergokalciferolu ¹⁸	8
Obr. 12	Strukturní vzorec cholekalciferolu ¹⁹	8
Obr. 13	Zjednodušené schéma metabolismu steroidů ²¹	11
Obr. 14	Znázornění částí kapalinového chromatografu ⁴⁹	12
Obr. 15	Hmotnostní spektrum produktivního iontu sulfátového metabolitu S9 s kolizní energií 60 eV v negativním spektru ²⁹	15
Obr. 16	Chromatografický záznam dvou látek a nesorbujícího se inertu ³⁹	16
Obr. 17	Popis píku pro výpočet plochy píku ⁴³	19
Obr. 18	HPLC-MS.....	23
Obr. 19	Ukázka negativního spektra 17β-estradiol-17-sulfátu.....	24
Obr. 20	Chromatogram separovaných látek na koloně Luna.....	25
Obr. 21	Chromatogram separovaných látek na koloně Synergi Fusion.....	26
Obr. 22	Chromatogram separovaných látek na koloně Gemini při gradientu A.....	27
Obr. 23	Chromatogram nejlépe separovaných látek Etiochol-S s A-S při nastavení gradientu I.....	34

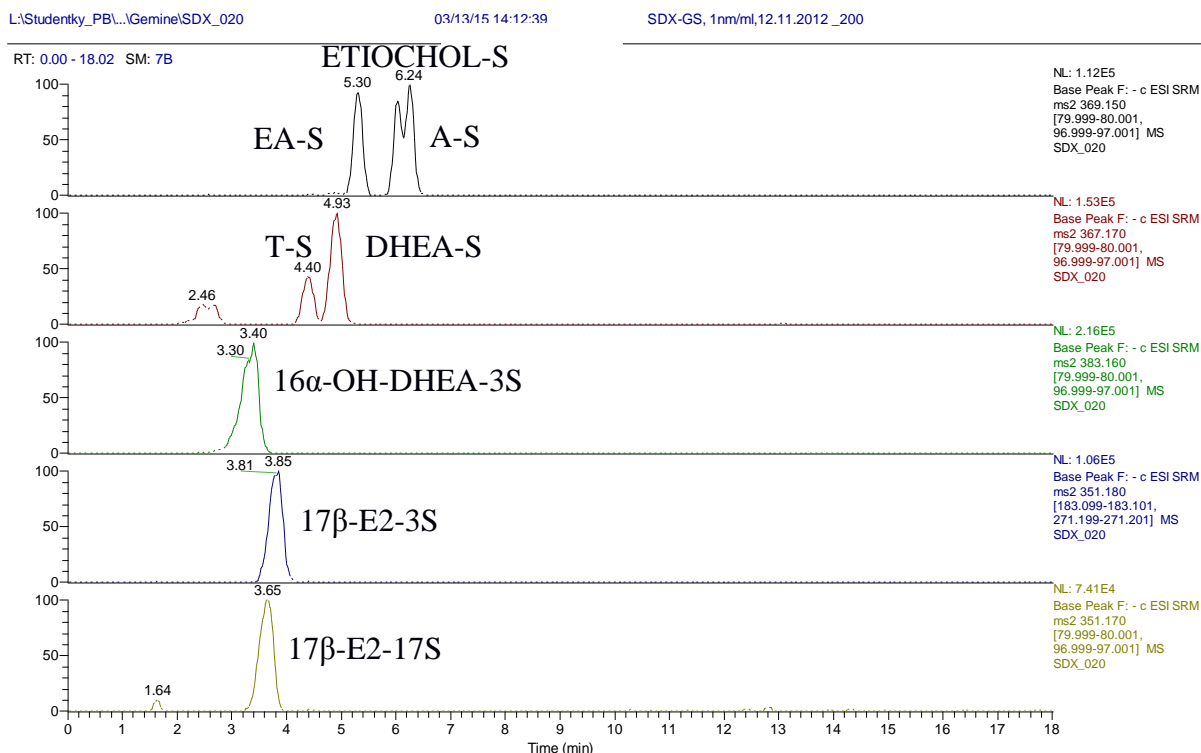
10. Seznam tabulek

Tab. I Systematické a triviální názvy steroidních konjugátů v modelové směsi.	22
Tab. II Přehled SRM přechodů.	24
Tab. III Nastavení gradientu na koloně Luna.	25
Tab. IV Nastavení gradientu na koloně Synergi Fusion.	26
Tab. V Nastavení gradientu A na koloně Gemini.	27
Tab. VI Výpočet rozlišení A.	27
Tab. VII Výpočet symetrie A.	27
Tab. VIII Nastavení gradientu B.	28
Tab. IX Výpočet rozlišení B.	28
Tab. X Výpočet symetrie B.	28
Tab. XI Nastavení gradientu C.	29
Tab. XII Výpočet rozlišení C.	29
Tab. XIII Výpočet symetrie C.	29
Tab. XIV Nastavení gradientu D.	29
Tab. XV Výpočet rozlišení D.	30
Tab. XVI Výpočet symetrie D.	30
Tab. XVII Nastavení gradientu E.	30
Tab. XVIII Výpočet rozlišení E.	30
Tab. XIX Výpočet symetrie E.	30
Tab. XX Nastavení gradientu F.	31
Tab. XXI Výpočet rozlišení F.	31
Tab. XXII Výpočet symetrie F.	31
Tab. XXIII Nastavení gradientu G.	31
Tab. XXIV Výpočet rozlišení G.	32
Tab. XXV Výpočet symetrie G.	32
Tab. XXVI Nastavení gradientu H.	32
Tab. XXVII Výpočet rozlišení H.	32
Tab. XXVIII Výpočet symetrie H.	32
Tab. XXIX Nastavení gradientu CH.	33
Tab. XXX Výpočet rozlišení CH.	33
Tab. XXXI Výpočet symetrie CH.	33
Tab. XXXII Nastavení gradientu I.	33
Tab. XXXIII Výpočet rozlišení I.	34
Tab. XXXIV Výpočet symetrie I.	34

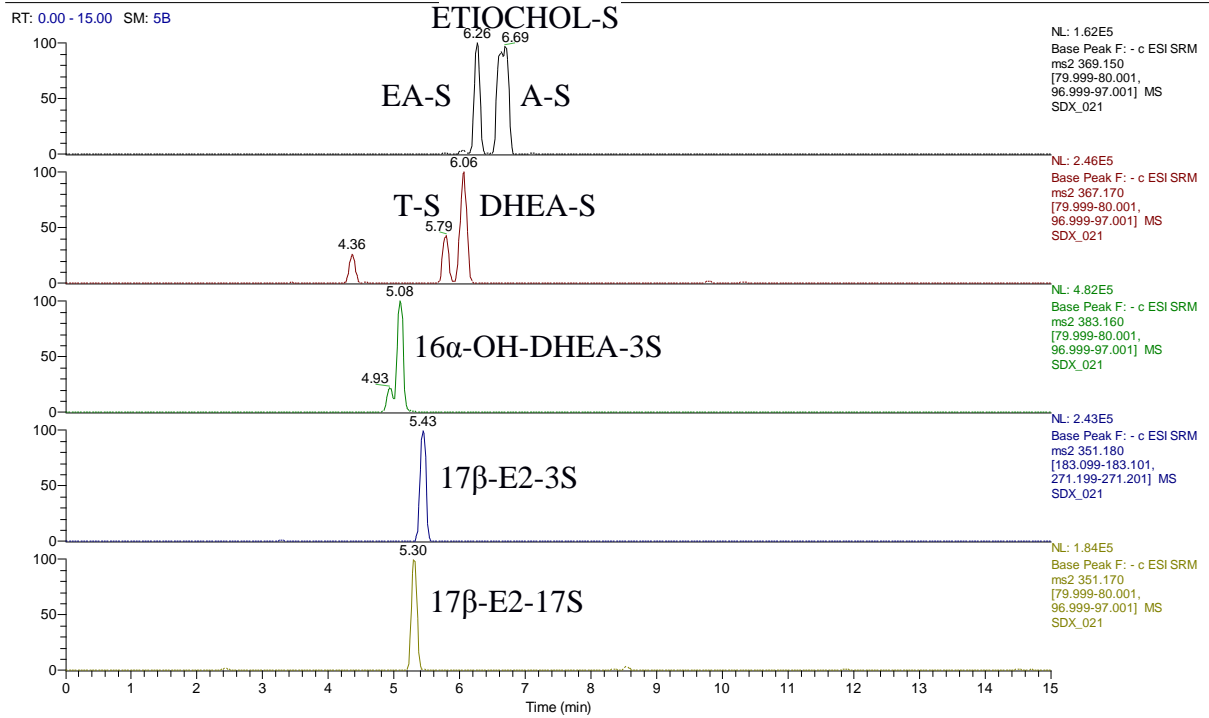
11. Přílohy



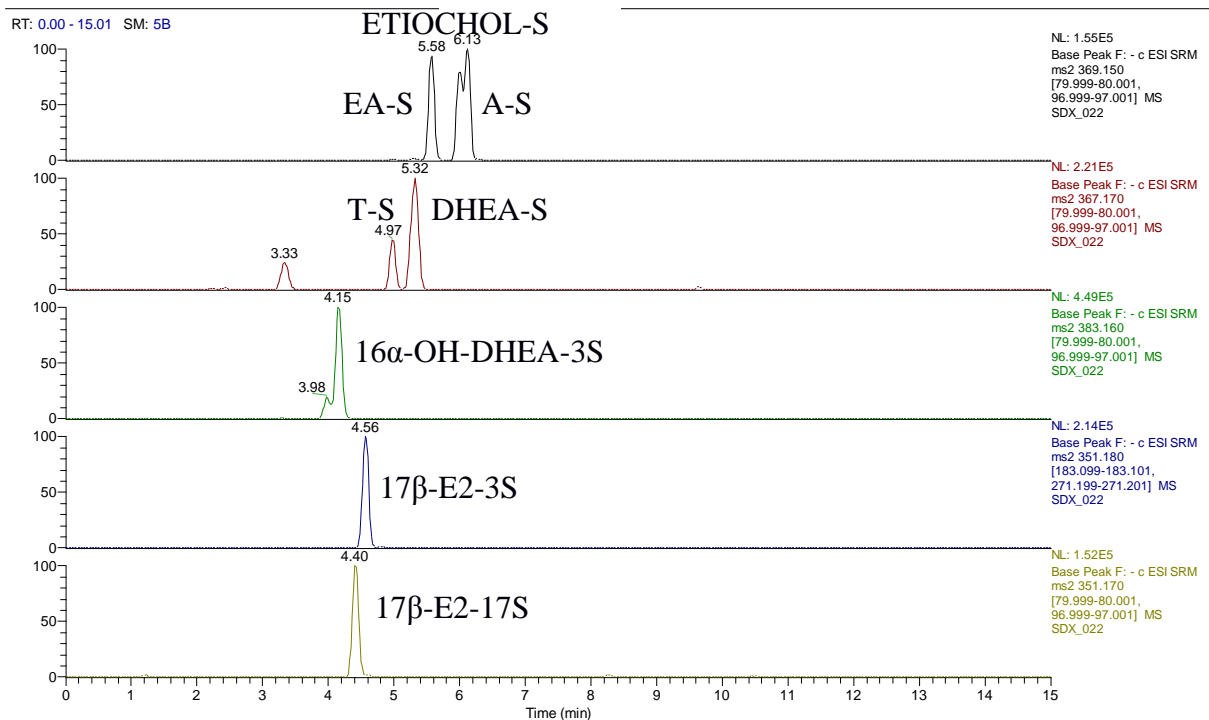
Obr. P 1 Chromatogram A.



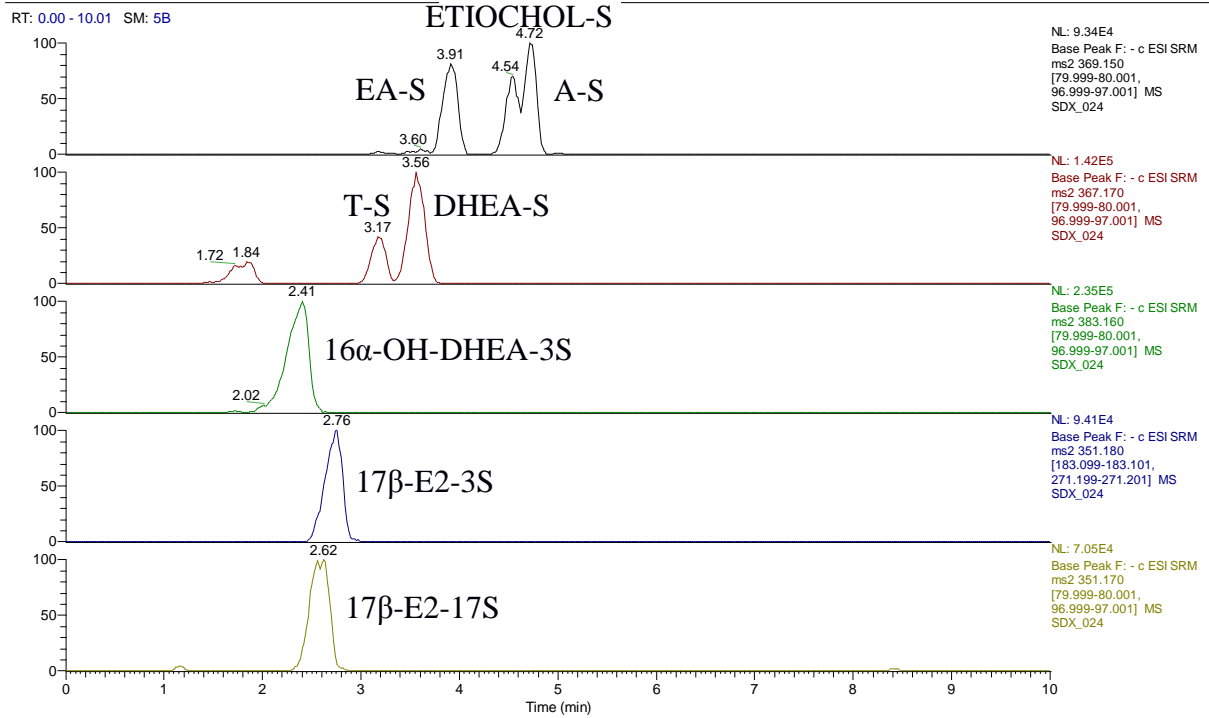
Obr. P 2 Chromatogram B.



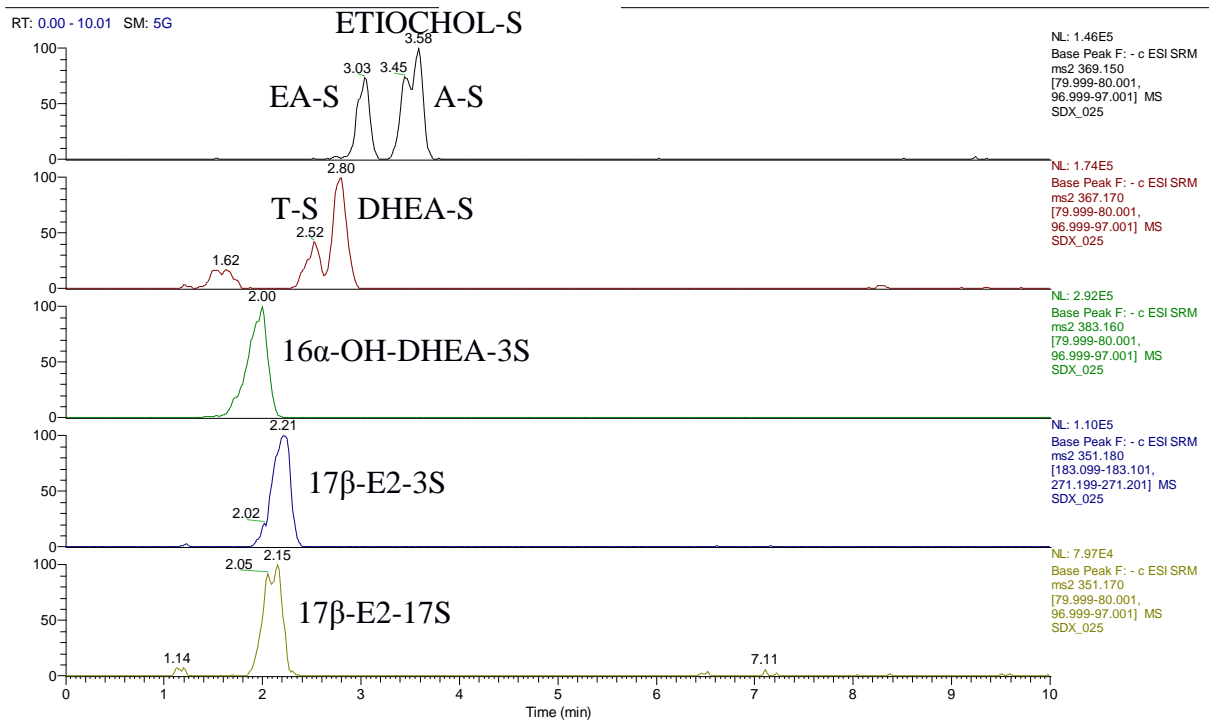
Obr. P 3 Chromatogram C.



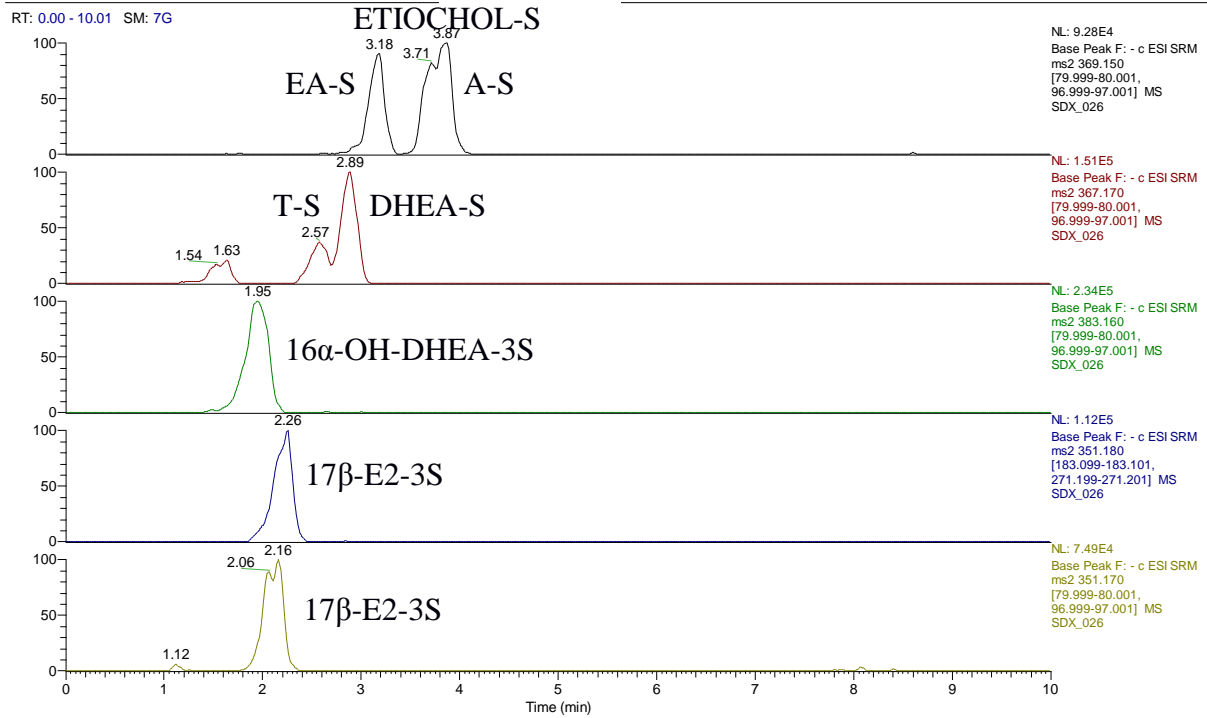
Obr. P 4 Chromatogram D.



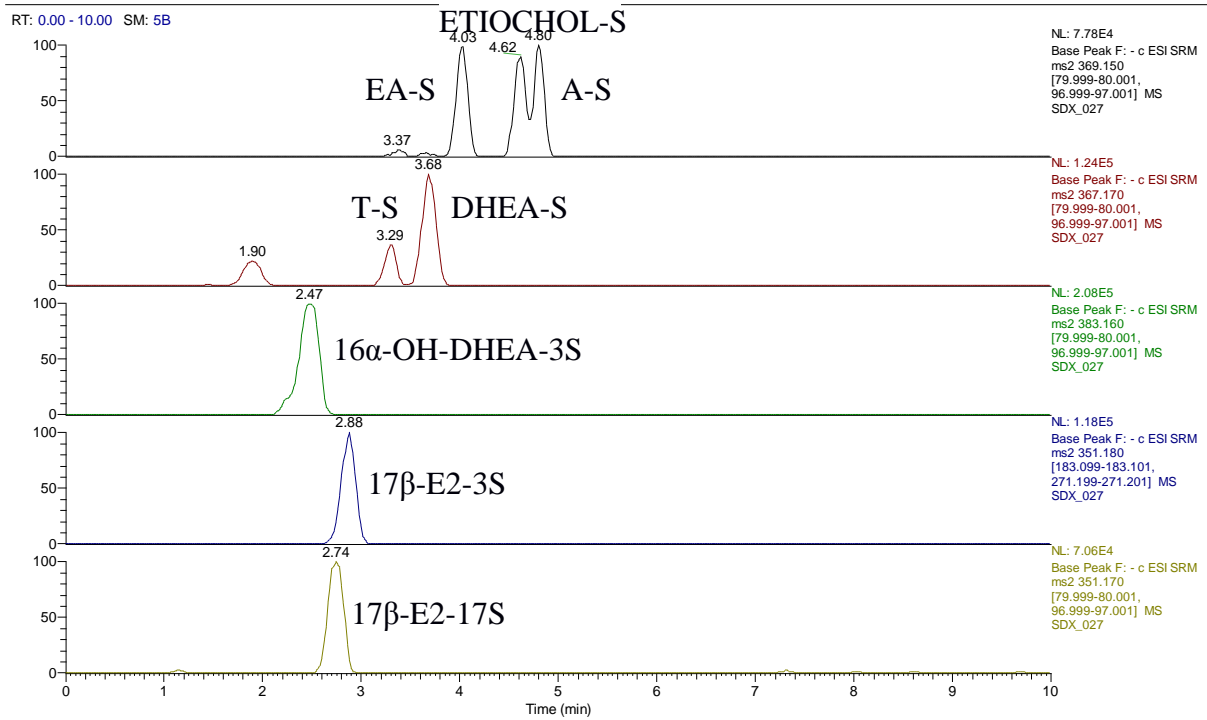
Obr. P 5 Chromatogram E.



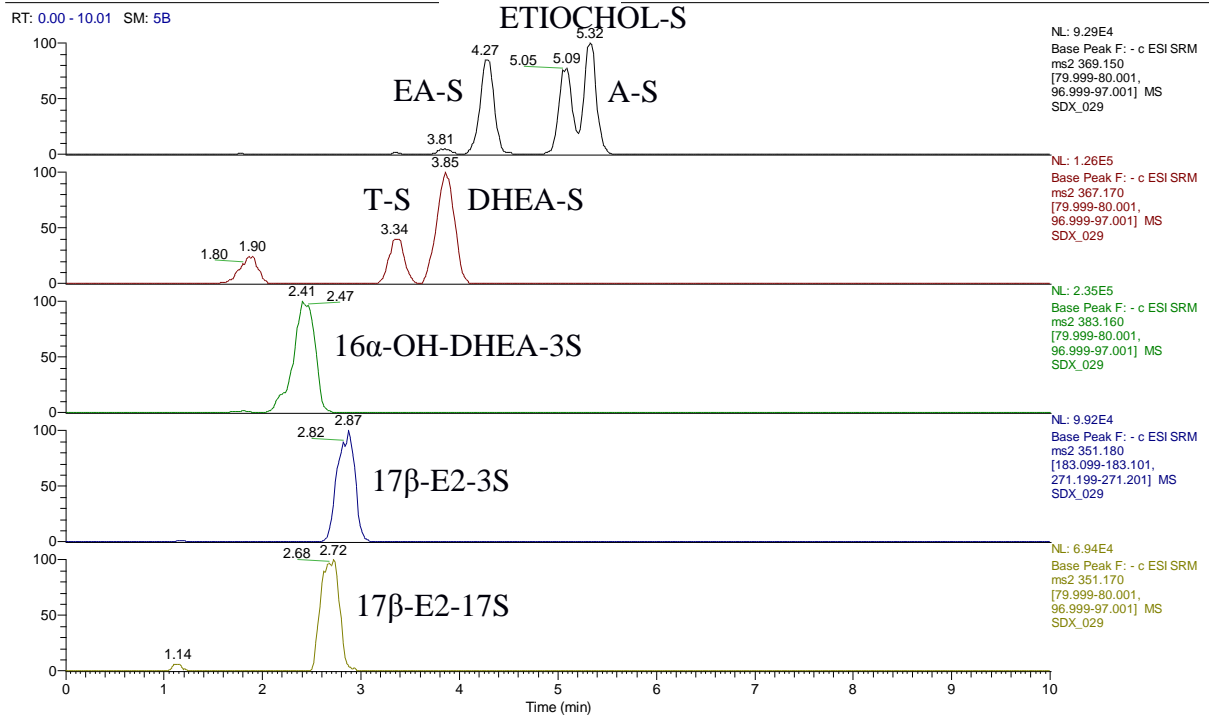
Obr. P 6 Chromatogram F.



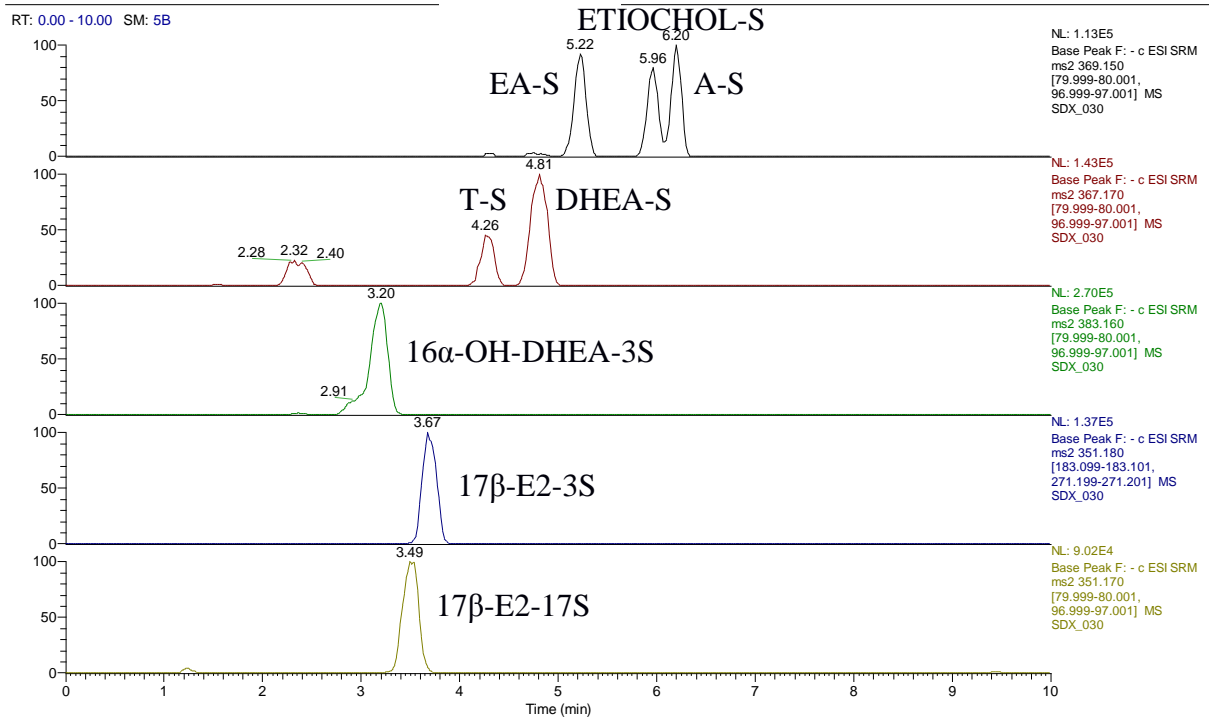
Obr. P 7 Chromatogram G.



Obr. P 8 Chromatogram H.



Obr. P 9 Chromatogram CH.



Obr. P 10 Chromatogram I.