

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Možnosti stanovení vybraných pohlavních
a stresových hormonů savců pomocí APCI-LC/MS**

Bakalářská práce

Klára Švihovcová

Školitel: Ing. David Kahoun, Ph.D.

České Budějovice 2023

Švihovcová, K., 2023: Možnosti stanovení vybraných pohlavních a stresových hormonů savců pomocí APCI-LC/MS. [Possibilities of determination of selected mammalian sex and stress hormones by APCI-LC/MS. Bc. Thesis in Czech.] – 80 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

This bachelor thesis deals with the development and validation of an analytical method for the determination of stress hormones (cortisol, corticosterone, estradiol, estrone, progesterone) in gorilla's faecal samples by high-performance liquid chromatography with mass detection. The theoretical part summarizes fundamental information about steroid hormones, different possibilities of their determination in various sample types and also sample preparation options. The practical part describes the optimization of liquid chromatography parameters and mass detection, the development of optimal sample preparation for analysis and the validation of the analytical method.

Prohlášení

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

V Českých Budějovicích 12. 4. 2023

Klára Švihovcová

Klíčová slova

Steroidní hormony, kortizol, kortikosteron, estron, estradiol, progesteron, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, extrakce na pevné fázi.

Keywords

Steroid hormones, cortisol, corticosterone, estrone, estradiol, progesterone, liquid chromatography, mass spectroscopy, solid phase extraction.

Poděkování

Velké díky patří mému vedoucímu Ing. Davidu Kahounovi, Ph.D. za jeho přátelský přístup, poskytnuté rady a předané zkušenosti nejen v oblasti analytické chemie. Vyzdvihla bych zejména možnost práce pod minimálním dohledem, ale s možností kdykoliv o něj požádat a konzultovat objevený problém. Zároveň si také velice vážím demonstrace řešení různých technických závad přístrojů, nebo ochoty doplnit partu lezců a doporučit optimální trasu v horách.

Ráda bych zde poděkovala také Ing. Pavle Fojtíkové, Ph.D., která, byť nebyla mou vedoucí, nikdy neváhala pomoci nebo poradit, kdykoliv to bylo potřeba.

Za velmi milou spolupráci a poskytnuté vzorky patří díky prof. RNDr. Františku Váchovi, Ph.D., Mgr. Martině Konečné, Ph.D. a zaměstnancům ZOO Praha v čele s MVDr. Romanem Vodičkou, Ph.D., který koordinoval odběr vzorků.

Na závěr bych ráda poděkovala své rodině a přátelům za veškerou podporu, bez které byste tuto práci jistě nečetli.

CÍLE PRÁCE

- Vypracovat literární rešerši na dané téma s důrazem na stanovení stresových hormonů.
- Vypracovat analytickou metodu na stanovení vybraných pohlavních a stresových hormonů savců pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí s chemickou ionizací za atmosférického tlaku (APCI-LC/MS) včetně provedení základní optimalizace této analytické metody, a to vše s preferencí na stanovení stresových hormonů.
- Provést validaci analytické metody pro použití na analýzu modelových vzorků neobsahující přírodní matrici.
- V případě dostupnosti vzorků a dostatečných časových možností vyzkoušet vhodnost analytické metody pro použití na analýzu reálných vzorků obsahující vybranou přírodní matrici (např. trus apod.).
- Provést kritické zhodnocení této metody využívající chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI-LC/MS) s již vyvinutou metodou využívající ionizaci vyhřívaným elektrosprejem (HESI-LC/MS).

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1	Steroidní hormony	2
2.2	Možnosti odběru vzorku	6
2.3	Vliv typu vzorku	6
2.4	Možnosti analýzy steroidních hormonů.....	7
2.5	Příprava vzorku.....	11
3	MATERIÁL A METODY	14
3.1	Instrumentální vybavení	14
3.2	Chemikálie a spotřební materiál	14
3.3	Příprava roztoků.....	16
3.3.1	Příprava roztoků standardů.....	16
3.3.2	Příprava roztoků vnitřních standardů	17
3.3.3	Příprava kalibračních roztoků	18
3.4	Příprava optimální mobilní fáze.....	19
3.5	Příprava elučního činidla pro SPE	19
3.6	Odběr, transport a skladování vzorků trusu	19
4	VÝSLEDKY a DISKUZE.....	20
4.1	Výchozí podmínky vývoje metody	20
4.2	Optimalizace parametrů chromatografické separace	22
4.3	Optimalizace parametrů hmotnostní detekce	30
4.4	Odhad IDL a IQL, hodnocení linearity kalibračních křivek.....	37
4.5	Optimalizace přípravy vzorku k analýze	39
4.5.1	Možnost stanovení přímou analýzou extraktu	39
4.5.2	Možnosti stanovení s využitím SPE extrakce	43
4.6	Kompletní analytická metoda	49
5	ZÁVĚR.....	52

6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	58
8	PŘÍLOHY	60
	Příloha A – Hmotnostní spektra produktových iontů analytů.....	60
	Příloha B – Grafy optimalizace normalizované kolizní energie	63
	Příloha C – Hodnocení linearity kalibračních křivek.....	66
	Příloha D – Instrumentální meze detekce a stanovitelnosti	73
	Příloha E – Přesnost a správnost metody	74
	Příloha F – Výtěžnost extrakce	80

1 ÚVOD

Velkým tématem současnosti je ochrana přírody. Pod tento pojem neodmyslitelně spadá i ochrana ohrožených druhů, ať už v jejich přirozeném prostředí, nebo v rámci chovných a ochranných zařízení, kterými jsou například zoologické zahrady. Snaha zajistit co nejlepší podmínky pro daná zvířata vyvolává poptávku po způsobu investigace jejich kondice, a to nejen fyzické, ale i psychické. Pro objasnění psychického rozpoložení zvířat jsou často užívány behaviorální studie. Rozvoj analytických metod však v současné době přináší možnost je podpořit objektivními číselnými údaji. Jedná se zejména o obsah různých hormonů ve vzorcích pocházejících od studovaných jedinců.

Předmětem studia této práce je skupina goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*) v Zoologické zahradě hl. m. Prahy (ZOO Praha), pro kterou byl 28. září 2022 otevřen nový pavilon, Rezervace Dja. To podnítilo zájem zjistit, jak zvířata reagují na nové prostory a jak stresovou situací byl pro zvířata samotný přesun, což vyústilo ve spolupráci mezi ZOO Praha a Přírodovědeckou fakultou Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (PřF JU). Na katedře zoologie byla zpracována behaviorální studie a úkolem analytické laboratoře katedry chemie bylo stanovení obsahu stresových a pohlavních hormonů ve vzorcích trusu.

Metodami nejčastěji užívanými za tímto účelem jsou kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC/MS) a imunochemické metody. Pro tuto práci byla zvolena právě metoda LC/MS pro svou vysokou selektivitu a schopnost stanovit velké množství látek během jedné analýzy. Trus je hlediska potřeb tohoto výzkumu výhodným typem vzorku, protože jej lze odebrat neinvazivně. Syntéza stresových hormonů je totiž velice rychlá, a tudíž by invazivní odběr vzorku mohl vést ke zkreslení výsledků z důvodu zvýšení hladiny těchto hormonů v organismu vlivem stresu během odběru. Nevýhodou vzorků trusu je však skutečnost, že se v nich tyto analyty vyskytují ve velice nízkých koncentracích (navíc ve velké míře metabolizované) a zároveň je zde velké množství interferujících látek.

Tato bakalářská práce je zaměřena na vývoj a validaci analytické metody pro stanovení vybraných stresových hormonů (kortizol, kortikosteron, estradiol, estron, progesteron) ve vzorcích trusu goril. Pozornost byla zaměřena nejen na chromatografickou separaci a hmotnostní detekci, ale také na extrakci analytů a přečištění vzorku k analýze.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Steroidní hormony

Hormony jsou často popisovány jako chemické přenašeče informací v organismu. Jeden nezřídka ovlivňuje více různých buněk a odpověď na jeho přítomnost se může lišit podle jejího typu. Bývají transportovány krevním řečištěm na místo určení, ale mohou se vázat i na receptory své mateřské buňky nebo buněk v okolí vzniku bez složitějšího transportu, než je běžná difúze. Jejich koncentrace v krevním oběhu je nízká (řádově ng/ml), a přesto fungují velice efektivně. To je možné díky vysoce specifickým receptorům, které jednotlivé hormony váží. (Litwack 2022)

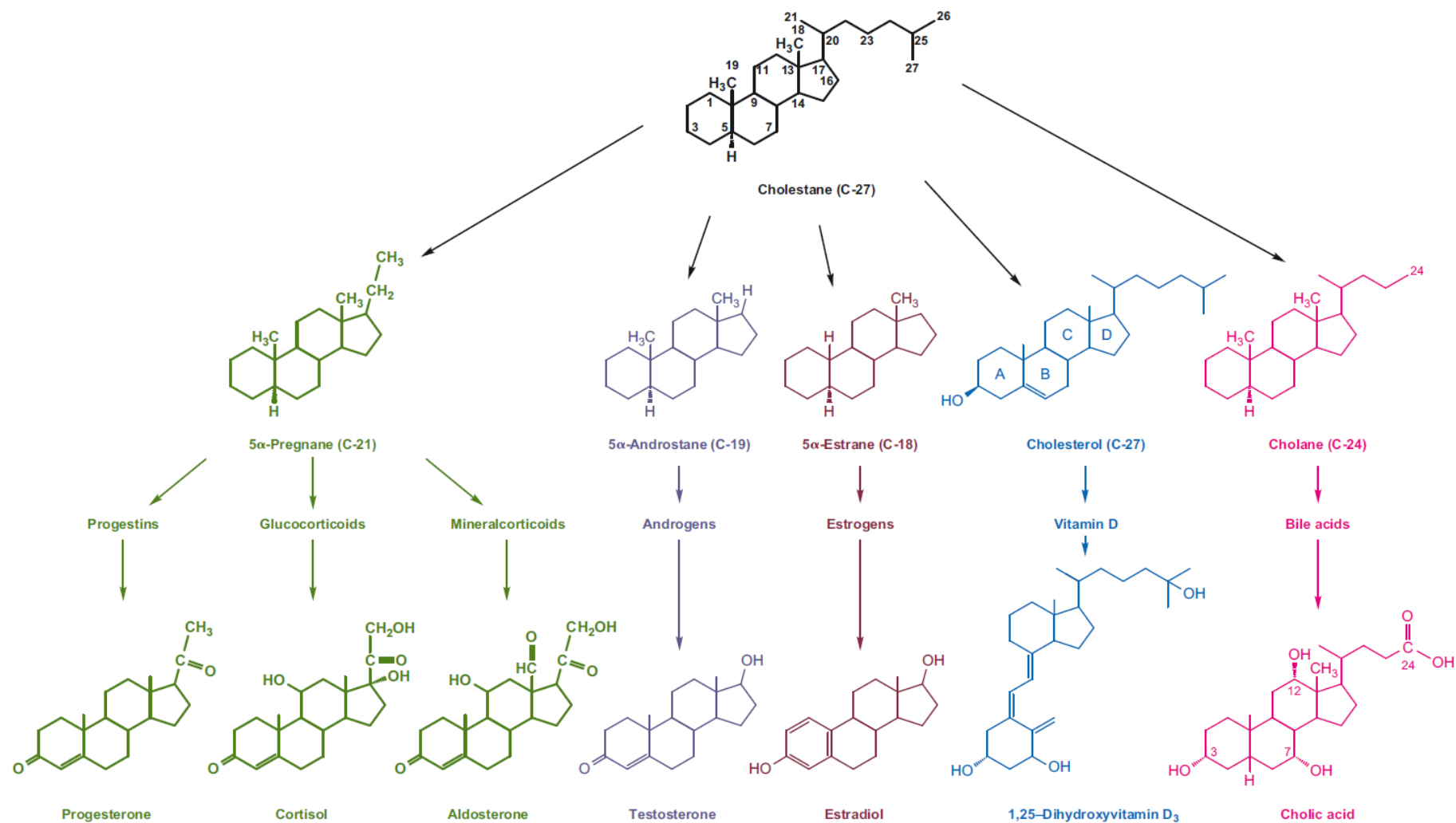
Povaha hormonů je velice různorodá, jednotlivé skupiny se liší původem v organismu, chemickou strukturou, fyzikálními vlastnostmi i biologickými účinky. Namátkou lze jmenovat například thyroidní hormony, hormony slinivky břišní nebo růstové faktory. Právě mezi hormony slinivky břišní patří například inzulin, který je snad nejznámějším příkladem. Jde o peptidický hormon, který se skládá ze dvou řetězců aminokyselin, propojených disulfidickými můstky, které vznikají díky přítomným cysteinům. (Litwack 2022)

Skupina steroidních hormonů, do které patří látky studované v této bakalářské práci, jsou naopak odvozeny od molekuly cholestanu, která disponuje třemi šesti-uhlíkatými cykly a jedním pěti-uhlíkatým, na který je navázán dlouhý uhlovodíkový řetězec. Jednotlivé podskupiny, kterými jsou například glukokortikoidy nebo progestiny, pak vznikají modifikací jednotlivých částí této mateřské molekuly. (Litwack 2022)

Z popisu struktury zástupce peptidických hormonů a mateřské molekuly stresových je patrný značný rozdíl v jejich strukturním uspořádání. Tuto skutečnost reflektují také jejich vlastnosti, steroidní hormony jsou lipofilní, kdežto peptidické se vyznačují svou hydrofilitou. (Hinson a Raven 2019)

V roce 1929 byl jako první steroidní hormon izolován estron. Od té doby se znalost této skupiny látek výrazně rozšířila a dnes víme o více jak 230 jejích zástupcích, které se vyskytují přirozeně, přičemž další je možné syntetizovat. (Litwack 2022)

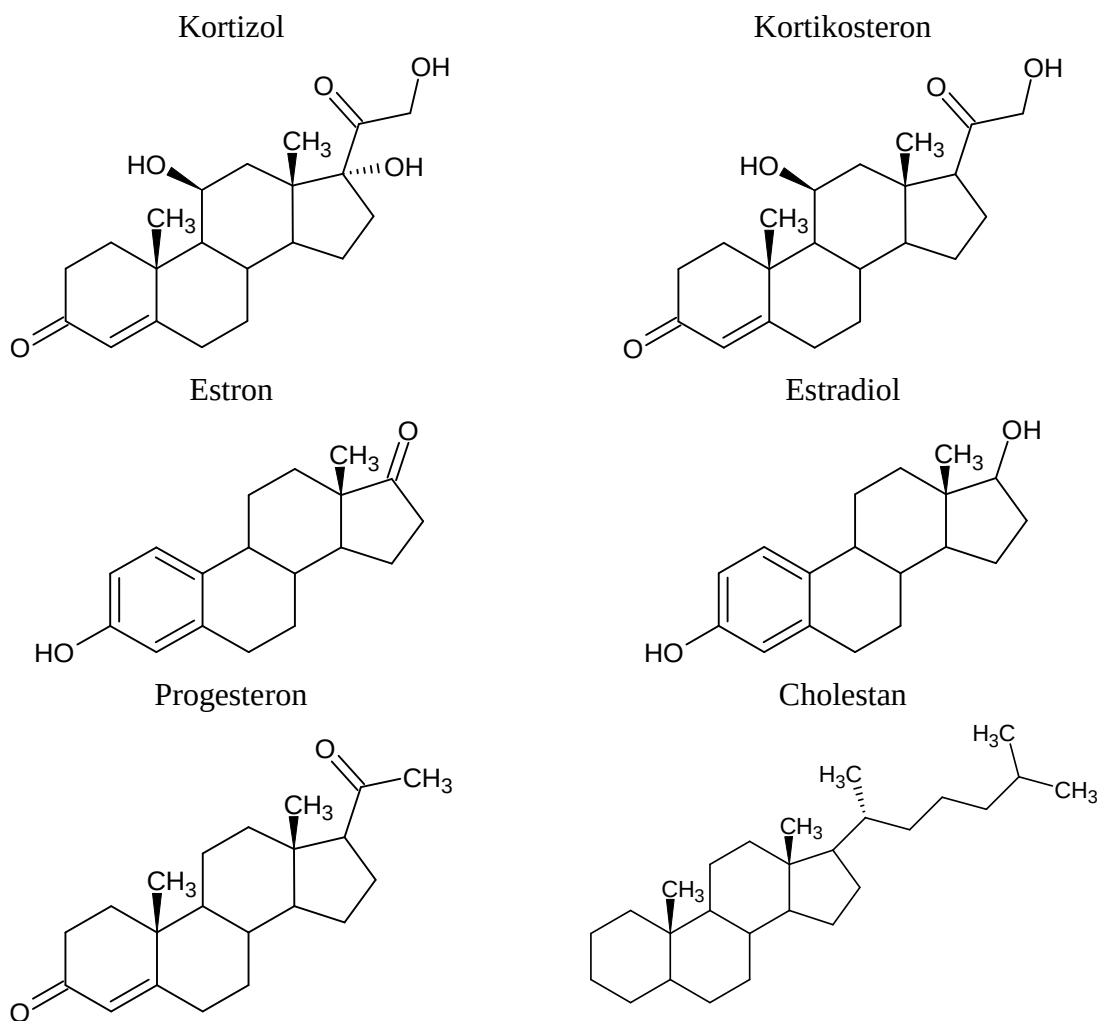
Na následujícím Obr. 1 je pro ilustraci uvedeno šest hlavních podskupin, kterými jsou estrogeny, progestiny, androgeny, glukokortikoidy, mineralokortikoidy, steroidy odvozené od vitamínu D a žlučové kyseliny. (Litwack 2022)



Obr. 1: Schéma rozdělení steroidních hormonů na jednotlivé skupiny – upraveno (Litwack 2022).

Tato práce se zaměřuje na stresové a pohlavní hormony, konkrétně tedy na glukokortikoidy (kortizol, kortikosteron), estrogeny (estradiol, estron) a progestiny (progesteron). Strukturní vzorce jednotlivých látek včetně mateřské molekuly cholesterolu jsou uvedeny v Obr. 2 níže.

Obr. 2: Strukturní vzorce jednotlivých a analytů a molekuly cholestanu.



Za syntézu výše uvedených pěti hormonů zodpovídá kůra nadledvin, vaječníky, placenta a případně žluté tělísko. V buňce dochází k syntéze steroidních hormonů v mitochondrii a hladkém endoplazmatickém retikulu. Tyto hormony nejsou v organismu nikterak uchovávány, ale jsou difúzí uvolňovány do krevního oběhu ve chvíli jejich vzniku. Jejich syntéza je tedy velice rychlá. Podle doc. MUDr. Dany Marešové, Ph.D. (Fyziologický ústav 1. LF UK), která svolila k telefonické konzultaci, se do krevního oběhu uvolňují v řádu jednotek minut od zaznamenání stresového podnětu. K zajištění dostatku cholesterolu je v buňkách, v nichž dochází k steroidogenezi, uloženo více lipidů. (Hinson a Raven 2019)

Jejich snadný přestup přes biologické membrány je zajištěn vezikulárním transportem, tedy váčkem vychlípěným z fosfolipidové dvojvrstvy (endocytóza, exocytóza). Steroidní hormony jsou sice oproti peptidickým relativně malé velikosti a výrazně lipofilnější, ale v organismu se často vyskytují vázané na transportní typ globulinu tzv. transkortin. (Litwack 2022; Švihovec a spol. 2018)

Celý endokrinní systém je velice komplexní a provázaný. Vzhledem k tomu, že se tato práce zaměřuje zejména na stresové hormony, lze tuto skutečnost demonstrovat na reakci organismu na stresový podnět. Ten je zaznamenán mozkovou kůrou odtud informace putuje do hipokampu a přes něj do hypothalamu, kde dochází k uvolnění kortikoliberinu (CRH), který je transportován do hypofýzy, kde stimuluje sekreci adrenokortikotropního hormonu (ACTH). ACTH i CRH jsou peptidickými hormony, je tudíž patrné, že v celém procesu nefigurují pouze ty steroidní. V nadledvinách pak ACTH iniciuje syntézu a exkreci kortizolu (a ostatních glukokortikoidů). Ten pak putuje krevním řečištěm do svalů, jater a tukových buněk. Je zajímavé, že jeho účinek se odvíjí od místa působení. ve svalových buňkách inhibuje proteosyntézu a v tukových buňkách syntézu tuků. V obou těchto případech zastavuje procesy, při kterých dochází ke spotřebě molekul glukosy. V játrech naopak katalyzuje glukoneogenesi, jejímž produktem je glukosa. Z uvedeného je tedy zřejmé, že cílem uvolněného kortizolu je zvýšení hladiny glukosy v krvi. Díky tomu má pak organismus vyšší množství rychle dostupné energie a je schopen na stres reagovat. Zvýšená hladina kortizolu v krvi poskytuje mozku tzv. negativní zpětnou vazbu a má za následek tlumení sekrece ACTH. (Litwack 2022)

K sekreci kortizolu však nedochází pouze v reakci na stres. V krvi člověka se přirozeně vyskytuje v koncentraci 6–20 µg/100 ml a pokud jeho hladina klesne pod tuto mez, dojde k jeho syntéze a uvolnění do oběhu (Litwack 2022).

Studium steroidních hormonů tedy umožňuje prohloubit znalosti o chování a obecné kondici zvířat, ať v přírodě či v zajetí. Vzhledem k rychlému uvolňování těchto látek do organismu je stěžejním cílem vyvinutí takové metody pro jejich identifikaci a kvantifikaci, která pro tyto účely dokáže využít biologický materiál, který je možné od studovaných jedinců získat neinvazivně. Tudíž je také patrná snaha přejít od analýz krevní plazmy ke studiu steroidních hormonů ze vzorků srsti nebo trusu. (Clark a spol. 2012)

2.2 Možnosti odběru vzorku

Odběry vzorků savců můžeme rozdělit do dvou základních kategorií. Jedná se o invazivní odběr, kdy je vzorkem např. krev nebo plazma, a při němž je nezbytný kontakt člověka se zkoumaným jedincem. Druhým typem je odběr neinvazivní a matricemi jsou v tomto případě trus, moč nebo srst. U tohoto způsobu odběru není nezbytný přímý kontakt člověka se zvířetem. (Shutt a spol. 2012)

Jak již bylo v této práci popsáno dříve, stresové hormony se vylučují extrémně rychle. Z tohoto důvodu je při jejich studiu nevýhodné používat vzorky získané invazivně, a to proto, že u nich může docházet k falešné pozitivitě, respektive získaná informace nemusí vypovídat o přirozeném stavu zvířete, ale bude ovlivněna stresem způsobeným samotným odběrem. Kvůli tomu je v současné době čím dál více přistupováno k odběru neinvazivnímu a v důsledku toho také k vývoji metod, kterými je možné stanovit stresové hormony z těchto matric. (Weisser a spol. 2016)

2.3 Vliv typu vzorku

Kortizol je možné stanovit z mnoha typů vzorků, každý však reflektuje jeho produkci v jiném časovém horizontu. Vzorky srsti (resp. vlasů) jsou vhodné pro studium chronického stresu a vypovídají o období přibližně jednoho měsíce. Oproti tomu krev, plazma a sliny jsou matricemi, do kterých se metabolická odpověď na stres propisuje velice rychle, tedy v řádech minut, maximálně několika hodin. Do poslední skupiny můžeme zařadit moč a trus, které podávají informaci většinou za jeden až dva dny. (Gao a spol. 2010)

Zde je důležité uvést, že v důsledku okamžité syntézy stresových hormonů v buňkách je v případě zvířat, ale i lidí, méně vhodné tyto látky stanovovat z krve nebo plasmy, protože v těchto matricích bývá vyšší koncentrace zejména proto, že samotný odběr vzorku je pro jedince stresovým podnětem, na který jeho organismus reaguje. Z tohoto důvodu je kladen důraz na provádění neinvazivních odběrů vzorku (je-li to možné) a pro studium stresových hormonů využívat výsledků získaných ze vzorků trusu, moči či srsti. (Davenport a spol. 2006)

2.4 Možnosti analýzy steroidních hormonů

Stejně jako je velké množství matric, ve kterých je možné tyto analyty stanovovat, je také více metod, které za tímto účelem lze použít. Steroidní hormony byly hojně stanovovány metodou ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay). Jedná se o heterogenní kompetitivní enzymovou imunoanalýzu spadající pod imunochemické metody. Tato metoda má několik modifikací. Celý proces lze provádět v kapalném skupenství a následně využít srážecích reakcí a centrifugace pro separaci vzniklých komplexů nebo je možné užít variantu, při níž je protilátka vázána na pevnou fázi. V případě této metody je imunokomplex značen enzymem a v reakci s vhodnou látkou vzniká barevný produkt, jehož absorbance je následně měřena. Oproti nekompetitivním imunoanalytickým metodám je zde absorbance imunokomplexu nepřímo úměrná k jeho koncentraci. (Schneiderka Petr 2012)

Metodu ELISA lze využít prakticky pro všechny matrice vzorku, tedy trus (Tallo-Parra a spol. 2015), sliny (Simpson a spol. 2008), krev (Dahl a spol. 2018), plazmu (Krasowski a spol. 2014) nebo také moč (Rincon a spol. 2019). Její podstatnou nevýhodou je však křížová reaktivita, a tedy falešná pozitivita, která je způsobena reakcemi ostatních steroidních hormonů, případně jejich metabolitů, s protilátkami pro stanovovaný steroid (Krasowski a spol. 2014). Příkladem mohou být protilátky testosteronu, které se ochotně váží na jiné steroidy, například kortizol (Rincon a spol. 2019). V důsledku toho může následně dojít k nadhodnocení koncentrace stanovovaného steroidu a chybné interpretaci výsledků výzkumu (Gao a spol. 2013).

Byť lze imunochemické metody použít na prakticky všechny dostupné matrice vzorku, je jejich výpovědní hodnota pro každou z nich vždy nějak odlišná. Jsou velmi vhodné pro měření vzorků krve, kde je jen malá část hormonů konjugovaná a většina se vyskytuje volně. V případě trusu a moči je však nutné brát v úvahu, že steroidy byly podrobeny metabolismu v játrech a tenkém střevě, a tak se v těchto vzorcích vyskytují spíše jen jejich metabolity a případně konjugované formy. (Rincon a spol. 2019)

Imunochemické metody konkurují LC/MS svou nízkou cenou a počtem vzorků, které je možné v určitém čase zpracovat (Rincon a spol. 2019).

Zejména kvůli zmíněné křížové reaktivitě je však snaha stanovovat steroidní hormony pomocí jiných než imunochemických metod, například kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí (Gao a spol. 2010) nebo plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí. Obě tyto metody však před samotnou analýzou steroidů vyžadují jejich derivatizaci, což zvyšuje jejich časovou náročnost (Gao a spol. 2013; Vanaelst a spol. 2013). Převážně se však využívá LC/MS. Na metodách s hmotnostní detekcí již bylo provedeno relativně velké množství studií, v nichž byly steroidní hormony stanovovány z různých matric vzorku a byly prováděny na široké škále živočišných druhů, od člověka (Vanaelst a spol. 2013) po měkkýše (Dévier a spol. 2010).

Kortizol a progesteron spolu s endokanabinoidy studovali ve své práci Ney a spol. 2021. Následkem legalizace kanabinoidních výrobků v některých státech se zvýšil zájem o pochopení jejich účinku na ostatní systémy v těle, to bylo také předmětem této studie, která měla za cíl objasnit vliv endokanabinoidů na glukokortikoidy a pohlavní hormony. Pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí tedy byly analyzovány tři různé kanabinoidy, kortizol a progesteron ze vzorků vlasů. Podmínky analýzy jsou uvedeny v Tab. 1 níže. (Ney a spol. 2021)

Tab. 1: Parametry analytické metody pro stanovení kortizolu, progesteronu a kanabinoidů (Ney a spol. 2021).

Kapalinový chromatograf	Waters Acquity UPLC
Chromatografická kolona	Waters Acquity BEH C18 (2,1 × 100 mm; 1,7 μm)
Teplota kolonového prostoru	45 °C
Mobilní fáze	A: 2mM Octan amonný (pH = 4,5) B: Acetonitril
Gradientový program	0–0,5 min (30 % MFB); 0,5–1 min (50 % MFB); 1–4 min (70 % MFB); 4–8,5 min (90 % MFB)
Průtok MF	0,35 ml/min
Hmotnostní spektrometr	Trojité kvadrupól – Waters Xevo
Způsob ionizace	+ESI

Porovnání metody LC/MS a ELISA přináší studie Rincon a spol. 2019. Porovnávány byly imunochemická metoda pro kortizol a dvě imunochemické metody pro testosteron. Za matrici vzorku byl zvolen trus a sledovaným živočichem byl magot bezocasý (*Macaca sylvanus*). Tato studie zároveň popisuje důležitost dekonjugace některých steroidů před analýzou, tomu se však více věnuje kapitola 2.5 Příprava vzorku. Specifikace analytické metody pomocí LC/MS jsou uvedeny v Tab. 2 níže.

Tab.2: Parametry analytické metody pro stanovení kortizolu a testosteronu (Rincon a spol. 2019).

Kapalinový chromatograf	Waters Acquity UPLC
Chromatografická kolona	Waters Acquity BEH C18 (2,1 × 100 mm; 1,7 µm)
Mobilní fáze	A: 0,1% Kyselina mravenčí B: Acetonitril
Hmotnostní spektrometr	Trojitý kvadrupól – Waters Xevo
Způsob ionizace	+ESI

Weisser a spol. 2016 ve své studii stanovovali stresové hormony (aldosteron, kortizol a kortikosteron) ze srsti medvědů ledních (*Ursus maritimus*). Jako jedna z mála prací využívá chemickou ionizaci za atmosférického tlaku stejně jako tato bakalářská práce. Další podrobná specifika analytické metody jsou uvedena níže v Tab. 3.

Tab. 3: Parametry analytické metody pro stanovení aldosteronu, kortizolu a kortikosteronu ze vzorků srsti (Weisser a spol. 2016).

Kapalinový chromatograf	Agilent 1100 HPLC
Chromatografická kolona	Phenomenex Kinetex C18 (75 × 2,1 mm; 2,6 µm)
Teplota kolonového prostoru	40 °C
Mobilní fáze	A: 0,1% Kyselina mravenčí B: Methanol
Gradientový program	0–2 min (10 % MFB), 2,2 min (30 % MFB), 8 min (60 % MFB), 10–13 min (99,5 % MFB)
Hmotnostní spektrometr	Trojitý kvadrupól typu QTRAP - AB Sciex API 4400
Způsob ionizace	+APCI

Studie nejbližší tématu této bakalářské práce byla provedena na malpách kapucínských (*Cebus capucinus*). Z trusu těchto opic bylo stanovováno třicet steroidních hormonů a jejich metabolitů, od stresových po pohlavní. Použitou instrumentací byla právě kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí. Detaily v tomto případě použité analytické metody jsou uvedeny níže v Tab. 4. (Weltring a spol. 2012)

Tab. 4: Parametry analytické metody užívané při analýzách vzorků trusu malp kapucínských (*Cebus capucinus*) (Weltring a spol. 2012)

Kapalinový chromatograf	Waters Alliance 2695 separation module	
Chromatografická kolona	Phenomenex Gemini C18 (150 mm × 2 mm; 3 μm)	
Teplota kolonového prostoru	50 °C	
Mobilní fáze	A: 95:5 (H ₂ O:ACN) + 1% kyselina mravenčí B: 5:95 (H ₂ O:ACN) + 1% kyselina mravenčí	
Gradientový program	0 min (30 % MFB); 20 min (45 % MFB); 32 min (78 MFB); 32–37 min (100 % MFB); 37–42 min (30 % MFB)	
Hmotnostní spektrometr	Trojitý kvadrupól - Waters Micromass Quattro Premier XE	
Způsob ionizace	+ESI	
Ion prekurzoru → produktové ionty	kortizol	363 → 121; 97
	kortikosteron	347 → 121; 91
	estradiol	255 → 159; 133
	estron	271 → 159; 157
	progesteron	315 → 97; 109

Jak je v Tab. 4 patrné, tak v této studii byl estradiol kvantifikován na jiném iontu prekurzoru (255) než v ostatních studiích, bohužel však zde není uvedeno, z jakého důvodu. (Weltring a spol. 2012)

Obecně lze o LC/MS metodách pro stanovení steroidních hormonů konstatovat, že pro chromatografickou separaci se využívá stacionárních fází separujících na principu obrácených fází (modifikované zejména C18 alkyly), pro ionizaci se téměř výhradně volí pozitivní polarita a hmotnostní detekce bývá řešena tandemovým detektorem nejčastěji typu trojitého kvadrupólu. Zároveň se často za účelem podpory ionizace používají mobilní fáze s přidavkem organických kyselin. Toto jsou zásadní informace pro vývoj nové analytické metody. Parametrům hmotnostního detektoru není v řešerši věnována taková pozornost,

protože je nezbytné tyto parametry optimalizovat pro konkrétní přístroj a jsou tedy v podstatě nepřenositelné. Důležité je také poznamenat, že je nezbytné validovat analytickou metodu s ohledem na typ matrice, ale i s ohledem na daný živočišný druh. Jako dobrý příklad slouží například právě trus zmíněných malp kapucínských (*Cebus capucinus*) v porovnání s trusem goril nížinných, kterým se zabývá tato práce. Podle práce Weltring a spol. 2012 je koncentrace kortizolu v trusu malp kapucínských v řádu stovek ng/g, naopak u goril nížinných se pohybuje v řádu jednotek až desítek ng/g (Clark a spol. 2012). Tento výrazný rozdíl v koncentračních úrovních tedy klade jiné nároky na každou z metod. Důležité je také brát v potaz vliv složení potravy na matici trusu, která může být zdrojem odlišných interferujících látek.

V rámci porovnání LC/MS a imunochemických metod je možné shrnout, že hmotnostní detekce by měla ze své podstaty poskytovat výrazně vyšší selektivitu, než které lze dosáhnout imunochemickými metodami. Je tomu tak proto, že měřený signál závisí na konkrétní specifické hmotnosti iontu prekursoru či produktového iontu daného analytu a není tedy možná záměna jednoho hormonu za jiný čistě z důvodů jeho strukturní podobnosti (Rincon a spol. 2019). Metoda LC/MS také umožňuje stanovovat několik různých steroidů v rámci jedné analýzy a není potřeba několika imunochemických metod s různými specifickými protilátkami (Dévier a spol. 2010; Šimková a spol. 2022). Jak však bylo již výše zmíněno, imunochemické metody jsou stále konkurenceschopné zejména díky svým nižším finančním nákladům.

2.5 Příprava vzorku

Práce se vzorkem, která předchází samotným analýzám, je velice důležitá část celého procesu, která může zásadně ovlivnit výsledky měření. Tuto skutečnost dobře ilustruje porovnání, které použil Rincon a spol. 2019. ve svém článku hovoří o dvou nezávislých studiích (Muller a Wrangham 2004; Sobolewski a spol. 2013) na šimpanzech (*Pan troglodytes*), v nichž byly studovány hladiny testosteronu samců v závislosti na jejich dominanci. Tyto studie se však rozcházejí ve výsledcích – v první byla zjištěna jasná závislost, kdy dominantnější samci disponují vyšší hladinou testosteronu (Muller a Wrangham 2004), nicméně ve druhé studii tento závěr prokázán nebyl (Sobolewski a spol. 2013). Je samozřejmě možné, že rozdíl mohl být způsoben využitím jiného souboru zvířat. Avšak studie se také liší právě i ve způsobu přípravy vzorku před analýzou pomocí imunochemické metody pro testosteron. Muller a Wrangham 2004 provedli před vlastní analýzou dekonjugaci analytu, ale Sobolewski a spol. 2013 jej stanovovali bez této předchozí úpravy.

Míra afinity konjugovaného testosteronu k protilátkám testosteronu však není známá, tudíž je otázkou, zda výsledky druhé studie (Sobolewski a spol. 2013) reflektují skutečný stav, či jsou nějak zkreslené (Rincon a spol. 2019).

(Weisser a spol. 2016) prováděli analýzy kortikosteroidů ze vzorků srsti medvědů ledních (*Ursus maritimus*). Vzorky byly nejprve třikrát promyty isopropanolem a následně deionizovanou vodou. Po několikadenním sušení v exikátoru byly homogenizovány a byla provedena extrakce za zvýšeného tlaku. Extrakt byl zakoncentrován odpařením na objem asi 1 ml, poté k němu byly přidány 4 ml deionizované vody a roztok byl kvantitativně převeden na SPE kolonku (10 ml, 500 mg, Bond elut C18; Agilent). Po prokapání vzorku byly kolonky promyty vodou a následně 25% methanolem při použití vakua. Analyty byly eluovány 80% methanolem a eluát byl zakoncentrován odpařením do sucha pod proudem dusíku při 60°C. k odparku bylo přidáno 200 µl 80% methanolu a vzorek byl tak připraven k analýze.

Weltring a spol. 2012 extrahovali 100 mg vzorku trusu do 80% methanolu. Vzorek byl přečištěn pomocí SPE extrakce přes kolonku Chromabond HR-X (30 mg, Macherey-Nagel), jako eluční činidlo byl použit methanol a ethylacetát. Následně byla provedena extrakce z kapaliny do kapaliny (voda a tertc-butyl methyl ether), aby byly rozděleny konjugované a nekonjugované steroidy. Konjugované steroidy, které zůstaly ve vodné fázi, byly solvolyzovány směsí ethylacetátu a kyseliny sírové. Poté byla opakována extrakce z kapaliny do kapaliny a obě frakce steroidů (jak dekonjugované, tak volné) byly smíchány a analyzovány. Mezi nejvíce konjugované steroidy zde patřil hlavně testosteron, kortizol se naopak vyskytoval zejména ve volné podobě. (Weltring a spol. 2012)

SPE využívá také studie Bílkové a spol. 2019, která se zaměřuje na stanovení testosteronu a kortikosteronu ze vzorků peří metodou LC/MS. Zde byly porovnávány tři typy sorbentů SPE kolonek (Bond Elut C18, Oasis HLB, Strata X), z nichž byla nakonec vybrána kolonka se stacionární fází C18, rozdíly ve výsledcích však nebyly shledány nikterak významnými. Zajímavé na této studii je, že nestanovuje přímo molekuly testosteronu a kortikosteronu, ale využívá deriváty těchto látek, které poskytuje reakce jejich keto skupin s derivatizačním činidlem (Amplifex Ketoreagent, AB SCIEX) použitým během přípravy vzorku. Zároveň byla v této studii testována vhodnost různých organických rozpouštědel (methanol, acetonitril, aceton, dichlormethan a diethyl ether) pro extrakci těchto steroidních hormonů ze vzorků peří. Nejlepší z těchto možností byl dle této studie methanol.

Studie Bílkové a spol. 2019 však není zdaleka jedinou, která využívá derivatizaci této skupiny látek pro jejich analýzu. Dalším příkladem může být studie Gao a spol. 2010. V této studii jsou steroidní hormony stanovovány metodou LC/FLU (fluorescenční detekce). V rámci přípravy vzorku je zde extrakt kortizolu derivatizován pomocí kyseliny sírové a roztoku fluoresceinu. Další práce zaměřující se na stanovování derivátů steroidů, tentokrát pomocí LC/MS, je například Chen a spol. 2006. Ta využívá 1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-ethoxy-carbonylhadrázine (BCEC) a kyselinu trichloroctovou jako derivatizační činidla.

Jak derivatizaci steroidů, tak jejich přečištění přes SPE kolonky využívá studie Dévier a spol. 2010 s GC/MS instrumentací. SPE kolonky jsou v této práci použity hned dvě, a to Supelco EnviChrom-P (PS-DVB, 500 mg) a Supelco Supelclean (LC-NH₂, 500 mg). Derivatizační reakce je zde poměrně složitá a vznikají zde ethery steroidů.

Obecně lze říci, že příprava vzorku k analýze je velice individuální a odvíjí se zejména od matrice vzorku a dále pak konkrétních stanovovaných látek. SPE je pro přečištění extraktů hojně užíváno, ale nelze vybrat sorbent, který by extrakcím této skupiny látek dominoval. Zároveň se hojně užívají i různé metody derivatizace steroidních hormonů, není zde však nějaký ustálený a obecně užívaný postup.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Instrumentální vybavení

- Kapalinový chromatograf UltiMate 3000 (Thermo) s hmotnostním detektorem Velos Pro (Thermo) vybaveným chemickou ionizací za atmosférického tlaku nebo vyhřívaným elektrosprejem
- Chromatografická kolona Kinetex EVO C18 (150 x 3.0 mm; 2,6 μ m) s plně kompatibilní předkolonou (Phenomenex)
- Analytické váhy MS105DU (Mettler Toledo) - maximální váživost: 120 g s odečitatelností 0,1 mg (42 g s odečitatelností 0,01 mg)
- Výrobník deionizované vody Water purification system Smart2Pure (Thermo)
- Generátor dusíku Genius 1022 (Peak Scientific)
- Termoblok SBH130D/3 (Stuart) s koncentrátorem vzorků SBHCONC/1 (Stuart)
- Centrifuga 3–30 k (Sigma)
- Sada automatických pipet v rozsahu 10–100 μ l, 100–1000 μ l a 1–10 ml (Eppendorf)
- Aparatura pro SPE
- Software Thermo Scientific Xcalibur (Thermo)
- Software LTQ Tune Plus (Thermo)

3.2 Chemikálie a spotřební materiál

Chemikálie

- Standardy analytů [označení]
 - Hydrocortisone (VETRANAL, analytical standard) [F]
(M = 362,46 g/mol; čistota: $\geq 98,0$ %; CAS: 50-23-7)
 - Corticosterone (VETRANAL, analytical standard) [B]
(M = 346,46 g/mol; čistota: $\geq 98,0$ %; CAS: 50-22-6)
 - Estradiol (Pharmaceutical Secondary Standard; Certified Reference Material) [E2]
(M = 272,38 g/mol; čistota: 96,5 %; CAS: 50-28-2)
 - Estrone (VETRANAL, analytical standard) [E1]
(M = 270,37 g/mol; čistota: $\geq 98,0$ %; CAS: 53-16-7)
 - Progesterone (VETRANAL, analytical standard) [P4]
(M = 314,46 g/mol; čistota: $\geq 98,0$ %; CAS: 57-83-0)

- Vnitřní standardy analytů [označení]
 - Hydrocortisone-9,11,12,12-d₄ (Sigma Aldrich) [IS-F]
(M = 366,48 g/mol; čistota ≥ 98 %; CAS: 73565-87-4)
 - Corticosterone-9,11,12,12-d₄ (Sigma Aldrich) [IS-B]
(M = 350,49 g/mol; čistota ≥ 97 %; CAS: neuvedeno)
 - 17β-Estradiol-2,3,4-¹³C₃ (Sigma Aldrich) [IS-E2]
(M = 275,33 g/mol; čistota ≥ 98 %; CAS: 1261254-48-1)
 - Estrone-2,3,4-¹³C₃ (Sigma Aldrich) [IS-E1]
(M = 273,34; čistota ≥ 98,0 %; koncentrace = 90,0–110,0 µg/ml;
CAS: 1241684-29-6)
 - Progesterone-2,3,4,20,21-¹³C₅ (Sigma Aldrich) [IS-P4]
(M = 319,42 g/mol)
- Rozpouštědla
 - Acetonitril – čistota LC/MS > 100 % (VWR Chemicals)
 - Methanol – čistota LC/MS > 99,95 % (Biosolve Chimie SARL)
 - Methanol – čistota LC > 99,9 % (Lab-Scan analytical sciences)
- Kyselina octová – čistota LC/MS (Sigma Aldrich)
- Octan amonný – čistota LC/MS > 99,0 % (Sigma Aldrich)
- Kyselina mravenčí – čistota LC/MS (Fisher chemical)
- Mravenčan amonný – čistota LC/MS > 99,0 % (Fluka Analytical)
- Fluorid amonný – čistota LC/MS > 99,99 % (Sigma Aldrich)
- Kyselina mravenčí – čistota = 98–100 % (EMSURE; Merck KGaA)

Spotřební materiál

- Stříkačkový filtr – Titan3, 30 mm filter green, 2,0 µm, PTFE hydrophilic (Thermo)
- Centrifugační zkumavky – 50 ml, max. 12,5 k × g (VWR Chemicals)
- Centrifugační zkumavky – 15 ml, max. 12,0 k × g (Jet Biofil)
- Chromatografické krimpovací vialky – 2 ml (Aligent Technologies)
- Krimpovací víčka – 11 mm, PTFE/silikon (Aligent Technologies)
- Parafilm
- Špičky pro pipety 10–100 µl, 100–1000 µl a 1–10 ml
- SPE kolonky
 - Spe-ed C18/18 – 3 ml/500 mg; 40 µm (Applied Separations)
 - Strata C18-E – 3 ml/500 mg; 55 µm (Phenomenex)

3.3 Příprava roztoků

3.3.1 Příprava roztoků standardů

Pro přípravu zásobního roztoku kortizolu bylo do odměrné baňky (5 ml) naváženo 5,10 mg standardu a navážka byla rozpuštěna v methanolu (MS čistota). Získaný roztok o koncentraci 1020,0 mg/l byl rozdělen po 500 µl do chromatografických vialek označených písmenem F a vialky byly uloženy do mrazicího boxu při teplotě –20 °C.

Pro přípravu zásobního roztoku kortikosteronu bylo do odměrné baňky (5 ml) naváženo 5,01 mg standardu a navážka byla rozpuštěna v methanolu (MS čistota). Získaný roztok o koncentraci 1002,0 mg/l byl rozdělen po 500 µl do chromatografických vialek označených písmenem B a vialky byly uloženy do mrazicího boxu při teplotě –20 °C.

Pro přípravu zásobního roztoku estradiolu bylo do odměrné baňky (10 ml) naváženo 10,14 mg standardu a navážka byla rozpuštěna v acetonitrilu (MS čistota). Získaný roztok o koncentraci 1014,0 mg/l byl rozdělen po 500 µl do chromatografických vialek označených písmenem E2 a vialky byly uloženy do mrazicího boxu při teplotě –20 °C.

Pro přípravu zásobního roztoku estronu bylo do odměrné baňky (10 ml) naváženo 10,05 mg standardu a navážka byla rozpuštěna v methanolu (MS čistota). Získaný roztok o koncentraci 1004,9 mg/l byl rozdělen po 500 µl do chromatografických vialek označených písmenem E1 a vialky byly uloženy do mrazicího boxu při teplotě –20 °C.

Pro přípravu zásobního roztoku progesteronu bylo do odměrné baňky (10 ml) naváženo 10,38 mg standardu a navážka byla rozpuštěna v acetonitrilu (MS čistota). Získaný roztok o koncentraci 1038,0 mg/l byl rozdělen po 500 µl do chromatografických vialek označených písmenem P4 a vialky byly uloženy do mrazicího boxu při teplotě –20 °C.

Z takto připravených zásobních roztoků standardů byly dále připraveny směsné pracovní roztoky standardů. Nejprve byl připraven pracovní roztok s označením HORM-ST-B podle níže uvedené Tab. 5. Koncentrace každého analytu v tomto roztoku je 10 mg/l.

Tab. 5: Příprava směsného pracovního roztoku standardů HORM-ST-B.

Roztok	F	B	E2	E1	P4
Objem zás. roztoku [μ l]	98,0	99,8	98,6	99,5	96,3
Objem rozpouštědla [μ l]			9508		
Celk. objem roztoku [μ l]			10000		
Rozpouštědlo			ACN		
Koncentrace [μ g/l]	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00

Z pracovního roztoku HORM-ST-B byl následně připraven směsný pracovní roztok standardů s označením HORM-ST-C, v němž je koncentrace každého analytu 100 μ g/l. Tento roztok byl připraven odpipetováním 100 μ l roztoku HORM-ST-B do 10 ml odměrné baňky, která byla následně doplněna po rysku 20% acetonitrilem.

Dále byl připraven roztok HORM-ST-D, a to odpipetováním 2 ml roztoku HORM-ST-C do 10 ml odměrné baňky, která byla následně doplněna po rysku 20% acetonitrilem. Tento roztok měl koncentraci 20 μ g/l.

3.3.2 Příprava roztoků vnitřních standardů

Vnitřní standard estronu byl jako jediný zakoupen již ve formě roztoku, a to o objemu 1 ml a koncentraci 100 μ g/ml, jako rozpouštědlo byl použit methanol. Ostatní vnitřní standardy byly zakoupeny v krystalické podobě, z nichž byly následně připraveny roztoky. Od každého ze zbylých čtyř vnitřních standardů byl navážen 1 mg a ten následně rozpuštěn v 1 ml rozpouštědla. Pro kortizol a kortikosteron byl použit methanol (MS grade) a pro estradiol a progesteron acetonitril (MS grade). Každý roztok vnitřního standardu byl rozdělen po 100 μ l do chromatografických vialek označených příslušnou zkratkou vnitřního standardu.

Následně byl připraven směsný pracovní roztok vnitřních standardů s označením HORM-IS-B o objemu 20 ml a koncentraci jednotlivých analytů 500 μ g/l podle údajů v Tab. 6.

Tab. 6: Příprava směsného pracovního roztoku vnitřních standardů HORM-IS-B.

Označení	HORM-IS-B				
	IS-F	IS-B	IS-E2	IS-E1	IS-P4
HORM-IS-A [μ l]	10	100	10	10	10
Objem rozp. [μ l]	19860				
Celk. objem rozt. [μ l]	20000				
Rozpouštědlo	ACN				
Koncentrace [μ g/l]	500	500	500	500	500

Směsný pracovní roztok vnitřních standardů HORM-IS-C byl připraven odpipetováním 2000 μ l roztoku HORM-IS-B do 10 ml odměrné baňky a jejím doplněním po rysku 20% acetonitrilem (MS grade).

3.3.3 Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační roztoky byly připravovány přímo do chromatografických vialek tak, že byl do vialky nejprve odpipetován 20% acetonitril (MS grade), následně roztok HORM-ST-D a na závěr roztok HORM-IS-C. Objemy jednotlivých složek kalibračních roztoků jsou uvedeny v Tab. 7 níže.

Tab. 7: Příprava kalibračních roztoků.

Označení	Objem [μ l]			Koncentrace analytu [μ g/l]
	HORM-ST-D	HORM-IS-C	20% ACN	
KK 1	5	100	895	0,100
KK 2	10	100	890	0,200
KK 3	25	100	875	0,500
KK 4	37,5	100	863	0,750
KK 5	50	100	850	1,000
KK 6	75	100	825	1,500
KK 7	100	100	800	2,000
KK 8	250	100	650	5,000
KK 9	375	100	525	7,500
KK 10	500	100	400	10,000

Objemy standardů a vnitřních standardů byly pipetovány skleněnými stříkačkami firmy Hamilton.

Pro ověření, zda nedošlo v průběhu přípravy ke kontaminaci, byly připraveny tři kontrolní vialky. Do jedné byl napipetován 1 ml 20% acetonitrilu, do druhé 900 µl 20% acetonitrilu a 100 µl roztoku HORM-ST-D a do třetí 900 µl 20% acetonitrilu a 100 µl roztoku HORM-IS-C.

3.4 Příprava optimální mobilní fáze

Optimálními mobilními fázemi, které byly zvoleny na základě kap. 4.2, byly jako MFA 0,025% kyselina octová s 5mM octanem amonným a jako MFB 100% acetonitril.

MFA byla připravována většinou v 200ml skleněné odměrné baňce. Do 20ml kádinky bylo naváženo 77 mg octanu amonného. Tato navážka byla rozpuštěna deionizovanou vodou a kvantitativně převedena do odměrné baňky. Do odměrné baňky bylo dále přidáno 50 µl kyseliny octové a baňka byla doplněna deionizovanou vodou po rysku. Takto připravená MFA byla přelita do suché zásobní lahve pro MF.

3.5 Příprava elučního činidla pro SPE

Jako eluční činidlo pro SPE byla na základě doporučení výrobce Phenomenex zvolena 2% kyselina mravenčí v acetonitrilu. Pro jeho přípravu byla využita kyselina mravenčí o čistotě 98–100 %. Na základě požadovaného objemu elučního činidla byla odpipetována do odměrné baňky a ta byla následně doplněna acetonitrem (MS grade) po rysku.

3.6 Odběr, transport a skladování vzorků trusu

Vzorky trusu pocházely od sedmi jedinců goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*). Jde o skupinu tří samic a čtyř samců, která je chována v ZOO Praha. Sběr trusu byl proveden ošetřovatelem zvířat v období od března roku 2022 do června roku 2022. Souběžně s kolekcí vzorků trusu probíhalo shromažďování dat pro behaviorální studii této skupiny goril pod vedením Mgr. Martiny Konečné, Ph.D., pro kterou by měly být výsledky chemických analýz jedním z podkladů.

Sběr vzorků byl proveden průměrně jednou za čtyři dny. Vzorek trusu byl odebrán do igelitového sáčku, označen štítkem (druh, jméno jedince, datum sběru) a uložen v prostorách ZOO Praha do mrazicího boxu při teplotě -18°C . Pro převoz na PřFHPL JU byly použity termoboxy s ledem. Po doručení do laboratoře byly vzorky opět uloženy do mrazicího boxu při teplotě -18°C .

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Výchozí podmínky vývoje metody

Výchozím bodem byly podmínky analytické metody, kterou vyvinul a validoval Filip Štrach v rámci své dosud nepublikované bakalářské práce na téma stanovení steroidních hormonů metodou LC/MS s ionizací vyhřívaným elektrosprejem.

Kapalinová chromatografie

- Chromatografická kolona: Phenomenex Kinetex EVO C18 (150 x 3,0 mm; 2,6 µm)
- Objem nástřiku: 25 µl
- Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min
- Teplota kolonového prostoru: 35 °C
- Mobilní fáze: MFA: 0,025% octová kyselina s 5mM octanem amonným ve vodě
MFB: 100% acetonitril
- Doba analýzy: 12 min
- Gradient: 0 min (30 % MFB); 7 min (80 % MFB); 7,5–2 min (30 % MFB)

Hmotnostní detekce

- Hmotnostní detektor: Velos Pro – Thermo (lineární iontová past)
- Iontový zdroj: ESI
- Teplota iontového zdroje: 300 °C
- Průtok hlavního zmlžovacího plynu: 35 arb
- Průtok pomocného zmlžovacího plynu: 10 arb
- Proud na výbojové elektrodě: 4 µA
- Teplota vstupní kapiláry: 300 °C
- Úroveň RF S-čoček: 60 %
- Napětí na F-čočkách: -9 V
- Analyt, prekurzorový ion → produktový ion [m/z], polarita a normalizovaná kolizní energie [%]:

○ kortizol	363 → 327	+	25
○ kortikosteron	345 → 327	-	25
○ estradiol	271 → 145	-	33
○ estron	269 → 145	-	34
○ progesteron	315 → 297	+	33

Při přechodu od ionizace vyhřívaným elektrosprejem (HESI) k chemické ionizaci za atmosférického tlaku (APCI) byla na základě literární rešerše zachována chromatografická kolona z výchozí metody, protože stacionární fáze typu C18 je pro stanovení steroidních hormonů vzhledem k jejich chemické podstatě vhodná a stále široce používaná (Weltring a spol. 2012; Rincon a spol. 2019) a dané chromatografické podmínky jsou plně kompatibilní s oběma technikami ionizace.

Během prvních testovacích analýz roztoku standardů o koncentraci 1 mg/l se ukázalo, že oproti HESI je nutné všechny analyty při použití APCI sledovat v pozitivním módu ionizace. Zároveň je vhodné zmínit, že v případě APCI ionizace je třeba molekulu estradiolu sledovat při jiné specifické hmotnosti než při použití HESI, a to při 255. Stejný prekurzorový iont byl použit i během studie na malpách kapucínských (*Cebus capucinus*), kde byl estradiol také sledován v pozitivní ionizaci, byť za použití ionizace elektrosprejem (ESI) (Weltring a spol. 2012). Důvod této odlišnosti však nebyl zjištěn a neuvádí jej ani zmíněná studie. Prekurzorové ionty pro jednotlivé analyty i jejich vnitřní standardy jsou uvedeny v Tab. 8 níže. Za těchto podmínek bylo přistoupeno k optimalizaci analytické metody.

Tab. 8: Prekurzorové ionty analytů a jejich vnitřních standardů při APCI.

Analyt (vnitřní standard)	Ion prekurzoru [m/z]
Kortizol (IS)	363 (367)
Kortikosteron (IS)	347 (351)
Estradiol (IS)	255 (258)
Estron (IS)	271 (274)
Progesteron (IS)	315 (320)

4.2 Optimalizace parametrů chromatografické separace

Prvním bodem optimalizace chromatografických podmínek byla volba složení mobilních fází a typu eluce. Cílem optimalizace bylo v ideálním případě dosažení úplného chromatografického rozdělení analytů, aby bylo následně možné každý analyt měřit v hmotnostním detektoru v individuálním časovém okně. Pro hodnocení míry separace a objektivní porovnání různých MF byl využit kapacitní poměr, jehož výpočet byl prováděn podle rovnice 1.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

V rovnici k reprezentuje retenční faktor (bezrozměrná veličina), t_M je retenční čas nezadržované složky (mrtvý čas) v minutách a t_R je retenční čas analytu v minutách (Nováková a Douša 2013).

Dále byla také sledována míra separace dvou sousedních píků, která se dá objektivně charakterizovat parametrem rozlišení, které by mělo nabývat hodnot 1,5–2,0. K výpočtu rozlišení byla využita rovnice 2.

$$R_{1,2} = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_2 + w_1} \quad (2)$$

V rovnici $R_{1,2}$ charakterizuje rozlišení, t_R značí retenční čas analytů v minutách a w je šířka píku na základní linii v minutách. Samotné rozlišení je bezrozměrná veličina (Nováková a Douša 2013).

Symetrie píku, která je také nedílnou součástí hodnocení chromatografické separace, se vyjadřuje pomocí faktoru asymetrie a byla počítána podle rovnice 3.

$$A = \frac{t}{f} \quad (3)$$

V rovnici A značí faktor asymetrie, který je bezrozměrnou veličinou, t je šířka sestupné části píku v 1/20 jeho výšky [min] a f je šířka vzestupné části píku v 1/20 jeho výšky [min] (Nováková a Douša 2013). Optimální rozmezí pro tento parametr je 0,8 až 1,5 (Nováková a Douša 2013).

Hmotnostní detekce pro účely této části optimalizace byla provedena vždy v módu měření plného skenu (Full scan) v rozsahu 50–400 m/z a prezentována v módu zobrazení chromatogramů extrahovaných iontů prekursorů testovaných analytů (viz Tab. 8).

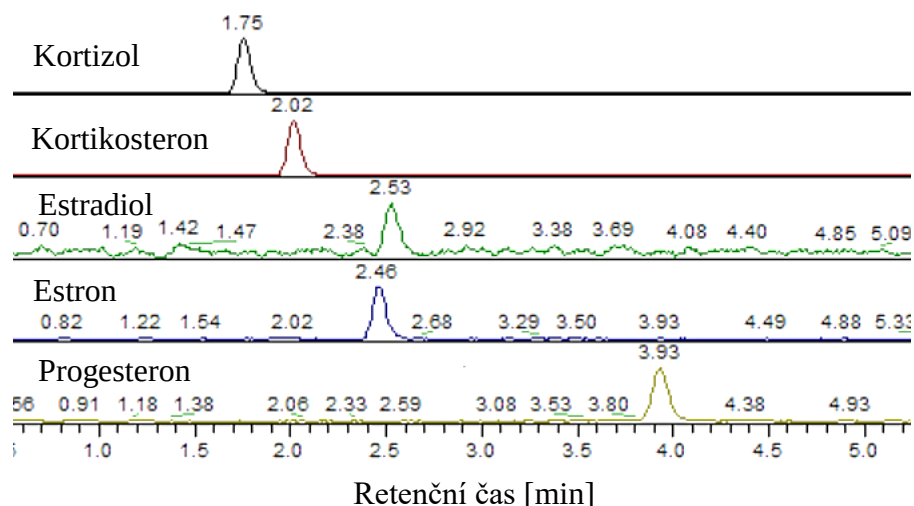
V rámci této části optimalizace bylo vyzkoušeno několik kombinací MFA a MFB a několik různých gradientových i izokratických elucí. Nejprve bylo provedeno hodnocení, zda jako MFB zvolit methanol nebo acetonitril a počáteční obsah MFB. Byly vyzkoušeny varianty uvedené v Tab. 9 níže.

Tab. 9: Hodnocené podmínky chromatografické separace.

MFA	MFB	Typ eluce	Složení MF (% MFB)
1mM fluorid amonný	acetonitril	gradientová	1 min (30 %), 7 min (80 %), 7,5 min (30 %), 12 min (30 %)
2mM octan amonný pH 4,5 (k. octová)	acetonitril	gradientová	1 min (30 %), 7 min (80 %), 7,5 min (30 %), 12 min (30 %)
voda	acetonitril	gradientová	1 min (30 %), 7 min (80 %), 7,5 min (30 %), 12 min (30 %)
2mM octan amonný pH 4,5 (k. octová)	methanol	gradientová	1 min (30 %), 7 min (80 %), 7,5 min (30 %), 12 min (30 %)
2mM octan amonný pH 4,5 (k. octová)	methanol	izokratická	90 %
2mM octan amonný pH 4,5 (k. octová)	methanol	izokratická	50 %
2mM octan amonný pH 4,5 (k. octová)	methanol	izokratická	70 %

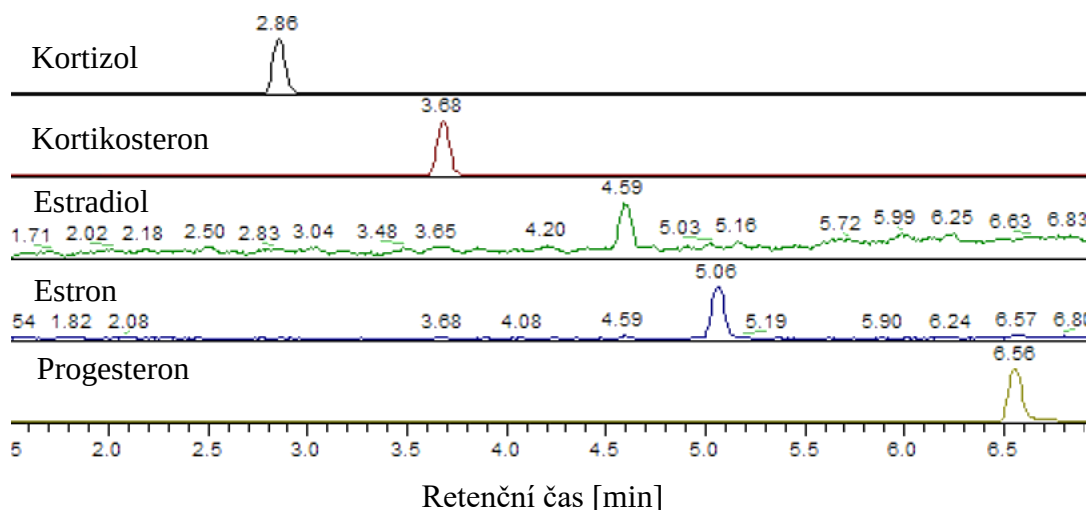
Analýzy provedené za výše uvedených podmínek měly za cíl zejména zjistit jakou MFB zvolit a v jakém poměru k MFA. Volbou vhodných aditiv se zabývaly další pokusy popsané dále v práci.

Při použití gradientové eluce s methanolem jako MFB došlo ke koeluci estradiolu a progesteronu. Izokratická eluce s obsahem methanolu 90 % byla zcela nepřijatelná, protože došlo k eluci všech analytů v mrtvém objemu 1,4 min. Když byl obsah methanolu v MF snížen na 50 %, kortizol byl eluován v čase 4,2 min, což by bylo z hlediska separace tohoto analytu optimální, avšak progesteron nebyl eluován ani do 24 min, proto byla tato varianta zavržena. Jako poslední varianta izokratické eluce bylo vyzkoušeno nastavení obsahu methanolu na 70 %. Za těchto podmínek byl však retenční faktor všech analytů příliš nízký ($k < 2$) a navíc docházelo ke koeluci estradiolu a estronu, jak je vidět na Obr. 3. S ohledem na neuspokojivé výsledky separací pomocí izokratické eluce a zamýšlené použití metody na analýzu vzorků trusu, byla další pozornost věnována gradientové eluci.



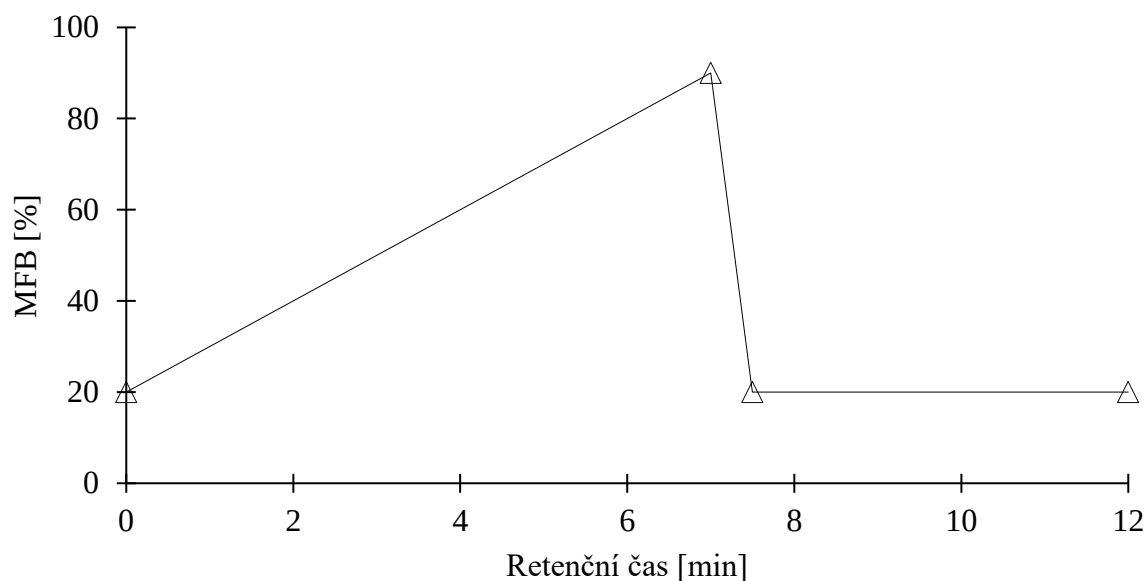
Obr. 3: Extrahované iontové chromatogramy prekurzorových iontů analytů. Izokratická eluce (70 % MFB) za použití 2mM octanu amonného (MFA) a methanolu (MFB) při nástřiku 1 μ l směsného standardu o koncentraci 1 mg/l.

V Tab. 9 uvedené gradientové eluce s acetonitrilem poskytovaly téměř totožné výsledky bez toho, aby byl patrný vliv aditiva v MFA. Oproti všem elucím s methanolem však byly všechny analyty zcela chromatograficky oddělené. Byť by koeluce s ohledem na obecný princip hmotnostního detektoru neměla být zásadním problémem, je pro tuto práci využívající detektor pracující na principu lineární iontové pasti velice vhodné, když píky analytů chromatograficky oddělené jsou. Očekávaná koncentrace analytů v extraktu vzorku se totiž pohybuje v jednotkách až nižších desítkách ng/l, tudíž je třeba dosáhnout co nejnižších mezí stanovitelnosti. Tomu napomáhá právě úplná chromatografická separace analytů, protože takto lze v daný retenční čas měřit vždy jen jeden analyt a využít celý čas doby plnění pasti, bez nutnosti jeho rozdělení mezi více analytů. Vlivu aditiv do MF se věnuje další část této kapitoly. Níže na Obr. 4 je uveden chromatogram při použití 70 % 2mM octanu amonného (MFA) a 30 % acetonitrilu (MFB) při nástřiku 1 μ l.



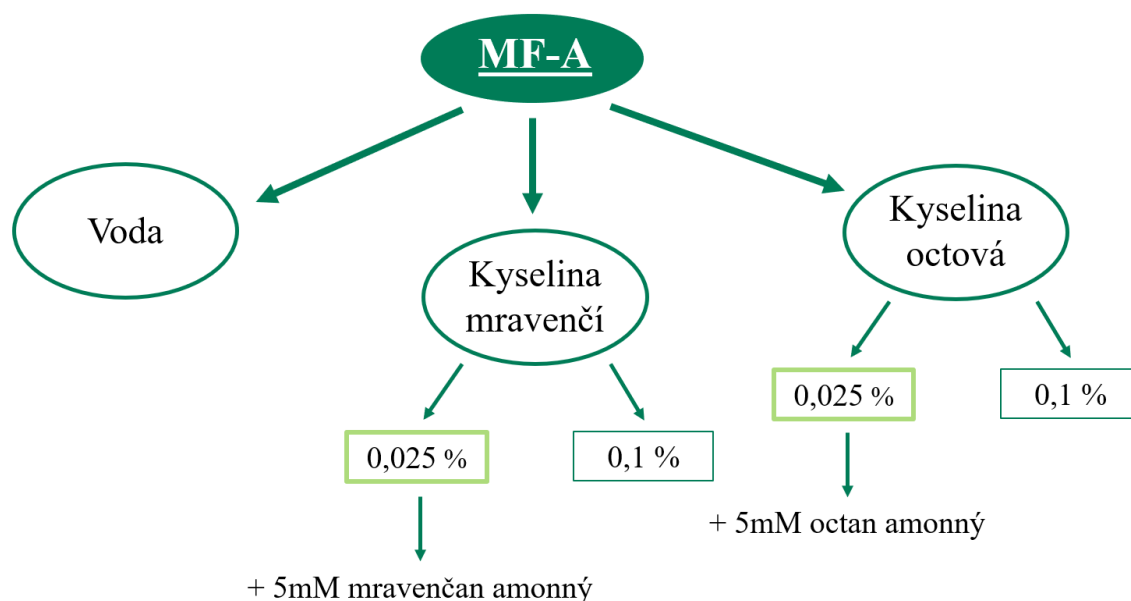
Obr. 4: Extrahované iontové chromatogramy prekurzorových iontů analytů. Gradientová eluce za použití 70 % 2mM octanu amonného (MFA) a 30 % acetonitrilu (MFB) při nástřiku 1 µl směsného standardu o koncentraci 1 mg/l.

Na základě výše uvedených výsledků byl jako MFB zvolen acetonitril. Dále byly provedeny analýzy po snížení obsahu MFB z výchozích 30 % na 20 %. Tato změna byla podnícena nízkým retenčním časem kortizolu, který je analytem eluujícím se z kolony jako první a je tedy nejbližší oblasti mrtvého času. Při použití 30% acetonitrilu byl retenční čas kortizolu 2,9 min a při použití 20% acetonitrilu byl retenční čas kortizolu 3,8 min. Pro obě varianty byla vypočtena hodnota retenčního faktoru podle rovnice 1 uvedené na začátku této kapitoly. Pro gradient začínající na 30 % MFB nabýval hodnoty 1,1 a pro gradient začínající na 20 % MFB měl hodnotu 1,7. Chromatografická separace tedy tomuto doporučení nevyhovuje zcela úplně, ale hodnota 1,7 je již velice blízká požadované minimální hodnotě 2 a tvar základní linie v chromatogramu reálného vzorku nenaznačuje vysokou přítomnost interferujících látek v oblasti mezi mrtvým časem a retenčním časem kortizolu, takže tyto chromatografické podmínky byly v této fázi shledány jako vyhovující. Na Obr. 5 je uveden graf zvoleného gradientového programu.



Obr. 5: Gradientový program zvolený pro další kroky optimalizace.

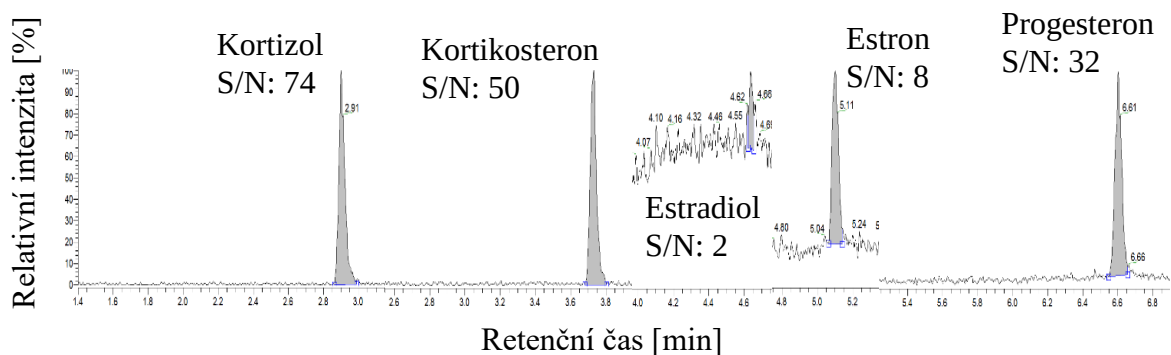
Byť byla aditiva zahrnuta již ve výběru MFB, pro úplnost bylo provedeno hodnocení vlivu přidavku různých aditiv do MFA na poměr signálu analytu ku šumu základní linie. Byly testovány kyselina mravenčí a kyselina octová, a to vždy ve dvou koncentracích (0,025 % a 0,1 %). Následně byla MFA poskytující lepší výsledky vyzkoušena s amonnou solí příslušné kyseliny. Schéma postupu při testování vlivu aditiv do MFA je uvedeno na Obr. 6.

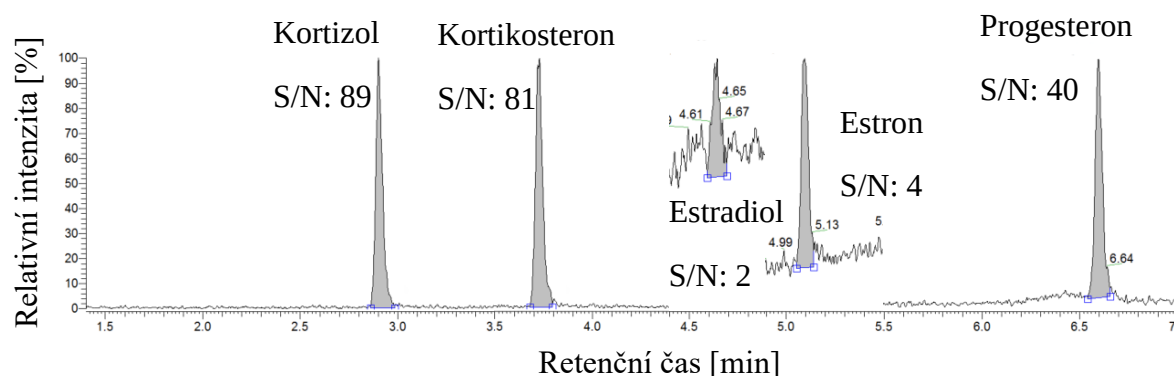


Obr. 6: Schéma testování vlivu přidavku aditiv do MFA.

Všechny pokusy byly prováděny při nástřiku směšného standardu o koncentraci 10 µg/l. Fluorid amonný, který bývá přidáván pro podporu negativní ionizace, byl jakožto aditivum do MF po prvních analýzách vyrazen, protože bylo dle očekávání zjištěno, že všechny analyty je v případě použití APCI měřit při pozitivní ionizaci.

Na obrazcích Obr. 7–9 níže jsou uvedeny chromatogramy při použití vody a obou kyselin s příslušnými solemi jako MFA.





Obr. 9: Extrahované iontové chromatogramy prekursorových iontů analytů získané při použití MFA obsahující 0,025% kyseliny mravenčí a 5mM mravenčan amonný.

Hlavním parametrem, podle kterého byla hodnocena vhodnost zkoušených aditiv, byl poměr signálu k šumu (S/N). Varianta vody jakožto MFA byla v tomto bodě vyřazena, protože vykazovala nejnižší poměr S/N. Dále byla testována varianta 0,025% kyseliny octové s 5mM octanem amonným a varianta 0,025% kyseliny mravenčí s 5mM mravenčanem amonným.

Následně byly pro závěrečné ověření vhodnosti MF provedeny analýzy kalibračních roztoků na všech koncentračních úrovních za použití obou MFA. Tyto analýzy byly pro každý analyt provedeny již v režimu MRM (monitorování více reakcí) a vizualizovány jako extrahovaný iontový chromatogram produktového iontu.

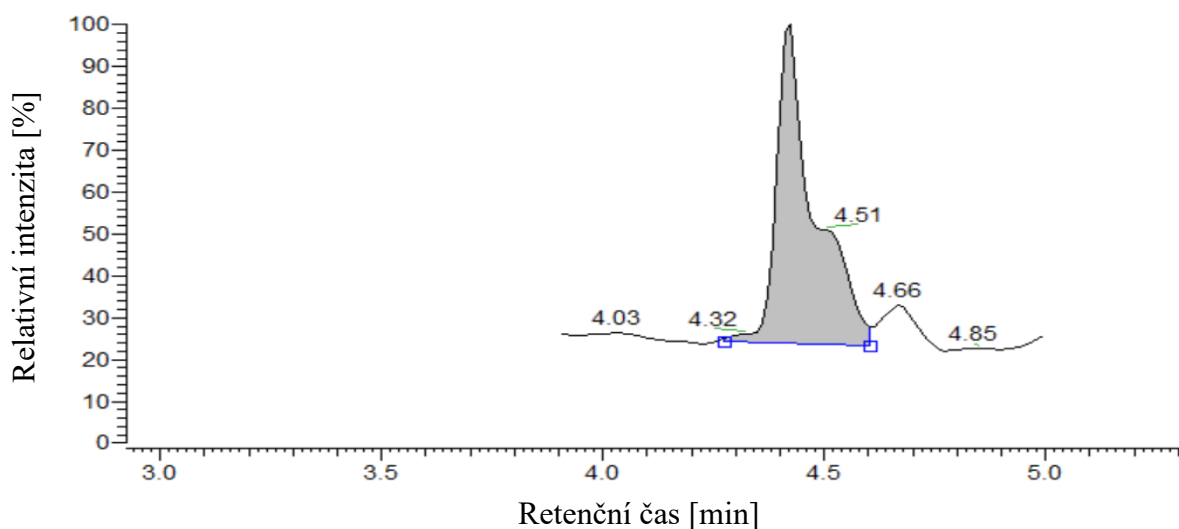
V Tab. 10 níže je uvedeno porovnání S/N na nejnižší koncentraci kalibračních roztoků (0,100 µg/l).

Tab. 10: Porovnání S/N pro jednotlivé analyty za použití 0,025% kyseliny mravenčí (FormA) s 5mM mravenčanem amonným (AmForm) a 0,025% kyseliny octové (AcA) s 5mM octanem amonným (AmAc) jako MFA na nejnižší koncentrační úrovni (0,100 µg/l).

Analyt	S/N				
	Kortizol	Kortikosteron	Estradiol	Estron	Progesteron
0,025% FormA + 5mM AmForm	10	7	3	3	7
0,025% AcA + 5mM AmAc	13	7	3	2	7

Výše uvedené výsledky S/N ukazují, že hodnoty jsou srovnatelné, a tak na nízkých koncentracích těchto analytů je vliv přídavku testovaných aditiv mobilní fáze na odezvu detektoru víceméně bezvýznamný. Z detailnějšího studia chromatogramů však vyplynulo,

že použití 0,025% kyseliny mravenčí s 5mM mravenčanem amonným je nevhodné, protože na nižších kalibračních úrovních (0,1–1,0 µg/l) je patrná značná interference nečistoty z MF v oblasti retenčního času kortikosteronu. Chromatogram kalibračního roztoku o koncentraci 0,200 µg/l při použití této MFA je uveden na Obr. 10 níže.



Obr. 10: Extrahovaný iontový chromatogram vybraného produktového iontu kortikosteronu – kalibrační roztok o koncentraci 0,200 µg/l. V oblasti retenčního času 4,51 min je zjevná koeluce interferentu s analytem.

Na základě výsledků optimalizace složení MFA byla tedy zvolena 0,025% kyselina octová s 5mM octanem amonným.

Teplota kolonového prostoru a objem nástřiku vzorku byly převzaty z výchozí metody a zachovány na 35 °C a 25 µl.

Rozlišení píků estradiolu a estronu, který byl pro tuto metodu kritickým párem, bylo vypočteno podle rovnice 2, která je uvedena na začátku této kapitoly. K výpočtu byly použity výsledky analýz čtyřech nezávislých opakování kalibračního roztoku o koncentraci 0,200 µg/l. Výsledná průměrná hodnota činila 2,7, což je dostatečné pro možnost aplikace individuálních MS/MS skenů pro každý analyt.

Pro estron (vizuálně nejméně symetrický pík analytu) byl dále s pomocí rovnice 3 vypočten faktor asymetrie, který měl hodnotu 1,4, a tedy splňoval kritérium uvedené na začátku této kapitoly (rozmezí 0,8–1,5).

4.3 Optimalizace parametrů hmotnostní detekce

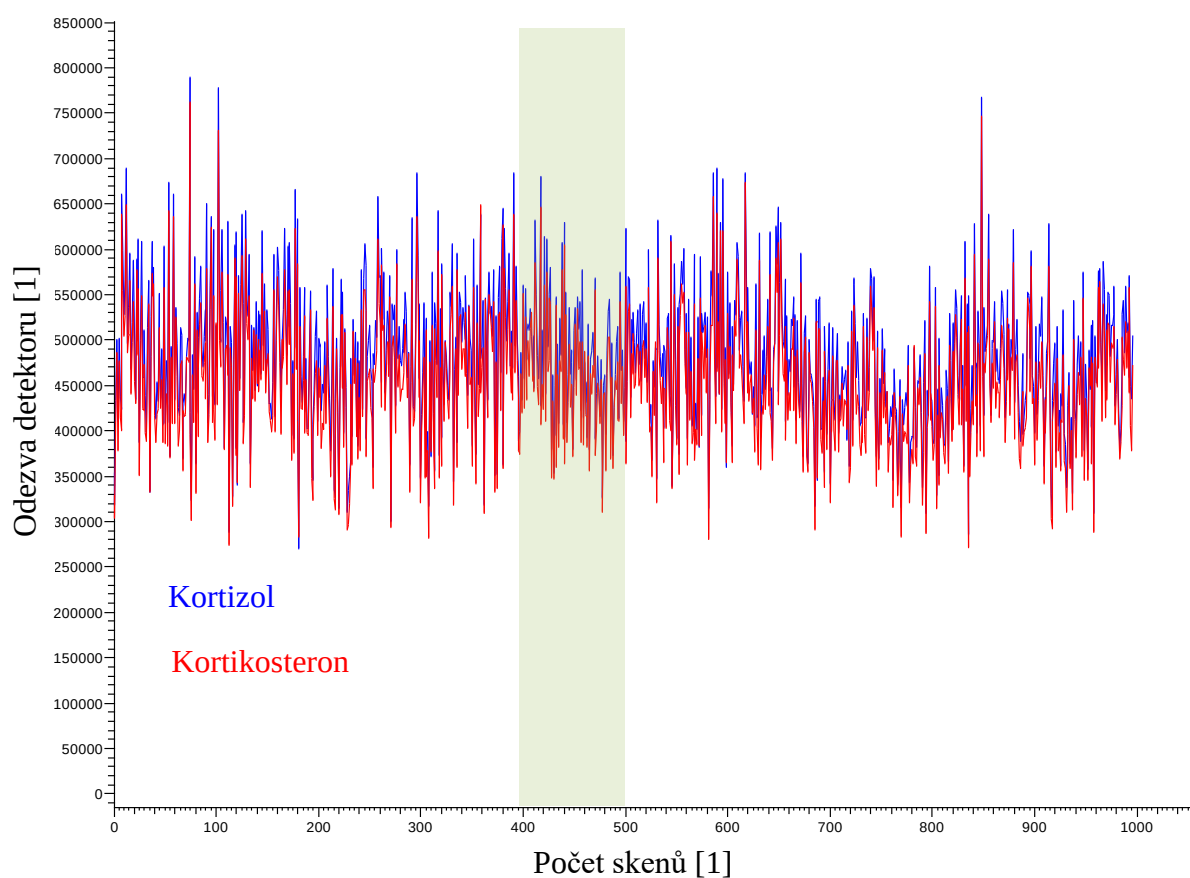
Podmínky hmotnostní detekce při APCI ionizaci byly optimalizovány za účelem získání co nejlepší odezvy, zejména u analytů ze skupiny stresových hormonů – kortizolu a kortikosteronu. Každý analyt byl v této úvodní části měřen za použití pozitivní polarizace ionizace v režimu MRM, kdy byl ve hmotnostním spektru produktových iontů příslušného prekurzorového iontu vždy vybrán ten, který vykazoval maximální relativní intenzitu při normalizované kolizní energii 35 % (standardní výchozí hodnota). Pro optimalizaci parametrů MS detektoru byl použit roztok směsného standardu o koncentraci 10 mg/l. Údaje týkající se zvolených MRM přechodů pro všechny analyty jsou uvedeny v Tab. 11 níže.

Tab. 11: Prekurzorové a produktové ionty pro jednotlivé analyty.

Retenční čas [min]	Analyt	Prekurzorový ion [m/z]	Produktový ion [m/z]
3,75	Kortizol	363	327
4,42	Kortikosteron	347	329
5,12	Estradiol	255	159
5,47	Estron	271	253
6,62	Progesteron	315	297

Optimalizace parametrů hmotnostního detektoru byla provedena tak, aby bylo dosaženo co nejlepší odezvy pro ionty stresových hormonů, tedy kortizolu a kortikosteronu. V grafech průběhu optimalizace jednotlivých parametrů je vždy zeleně vyznačena oblast testování zvolené hodnoty parametru a oranžově oblast testování ostatních hodnot.

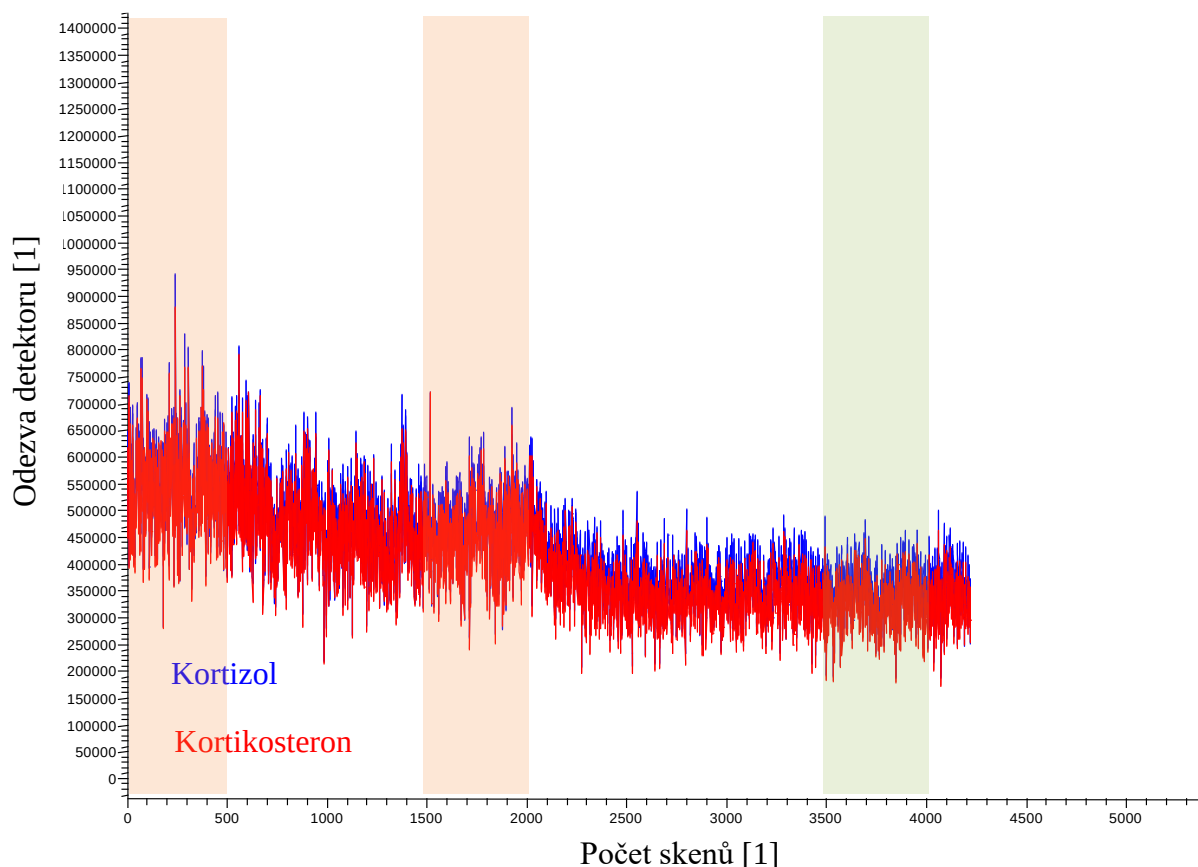
Nejprve byla optimalizována hodnota proudu na výbojové elektrodě v rozsahu od 1 μA do 10 μA postupně po 1 μA . Závislost odezvy detektoru na proudu je znázorněna na Obr. 11 níže.



Obr. 11: Graf závislosti odezvy detektoru na proudu na výbojové elektrodě; testované hodnoty 1–10 μA ; po každých 100 skenech byl proud zvýšen o 1 μA .

Protože nebylo v tomto případě nutné vyčkávat na stabilizaci přístroje, je v grafu na Obr. 11 vyznačena pouze oblast zvolené hodnoty proudu na výbojové elektrodě. Jak je na tomto záznamu zřejmé, tak vliv tohoto parametru nebyl nijak významný, a proto byla vybrána hodnota uprostřed testovaného intervalu (5 μA).

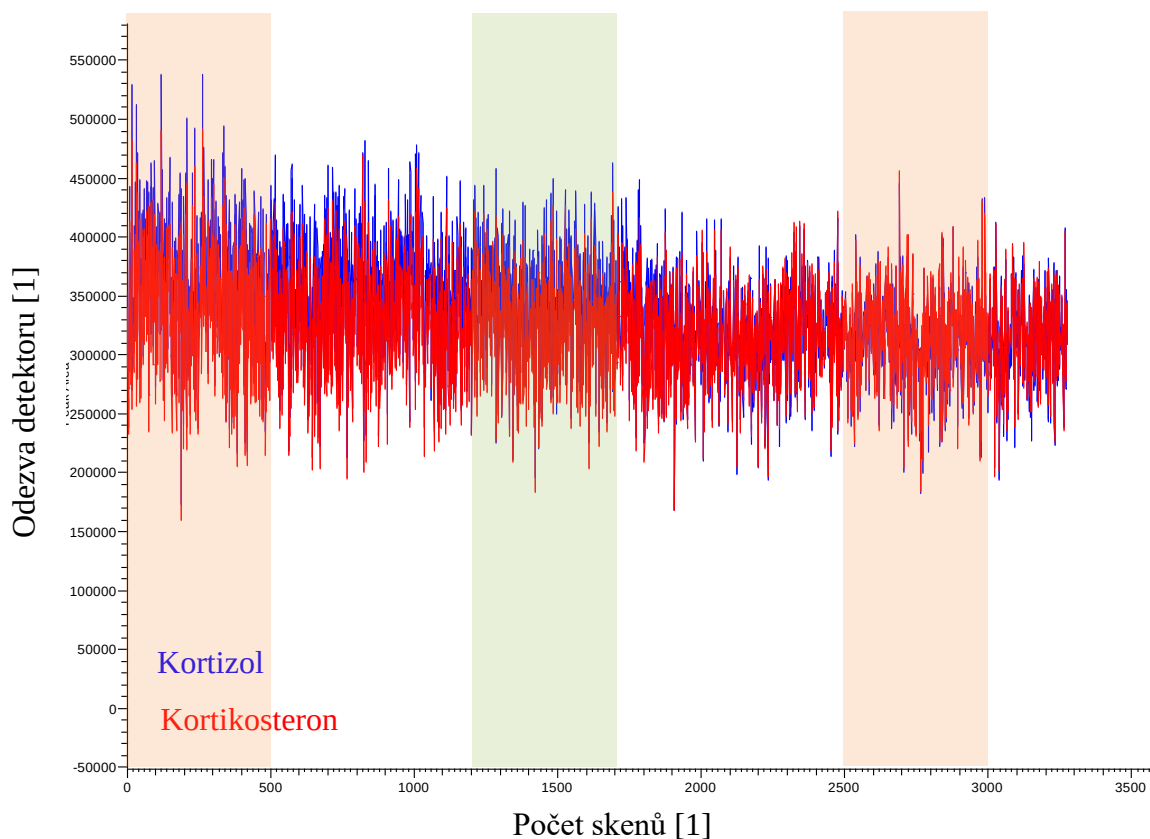
Dále byly testovány různé teploty vstupní kapiláry, která vede ionty z prostoru APCI do iontové optiky, a to 250 °C, 300 °C a 350 °C. Naměřené hodnoty získané v rámci této optimalizace jsou znázorněny na Obr. 12. Vzhledem ke skutečnosti, že změna teploty a následná stabilizace trvá určitý čas (řádově minuty), bylo vždy po změně nastavení nutné vyčkat na stabilizaci přístroje.



Obr. 12: Graf závislosti odezvy detektoru na teplotě vstupní kapiláry; testované hodnoty: 250 °C (skeny 0–500), 300 °C (skeny 1500–2000), 350 °C (skeny 3500–4000).

Z Obr. 12 je již patrné, že tento parametr vliv na odezvu detektoru měl. S rostoucí teplotou odezva detektoru sice mírně klesala, ale na druhou stranu byl signál stabilnější, a tak byla jako optimální zvolena teplota 350 °C.

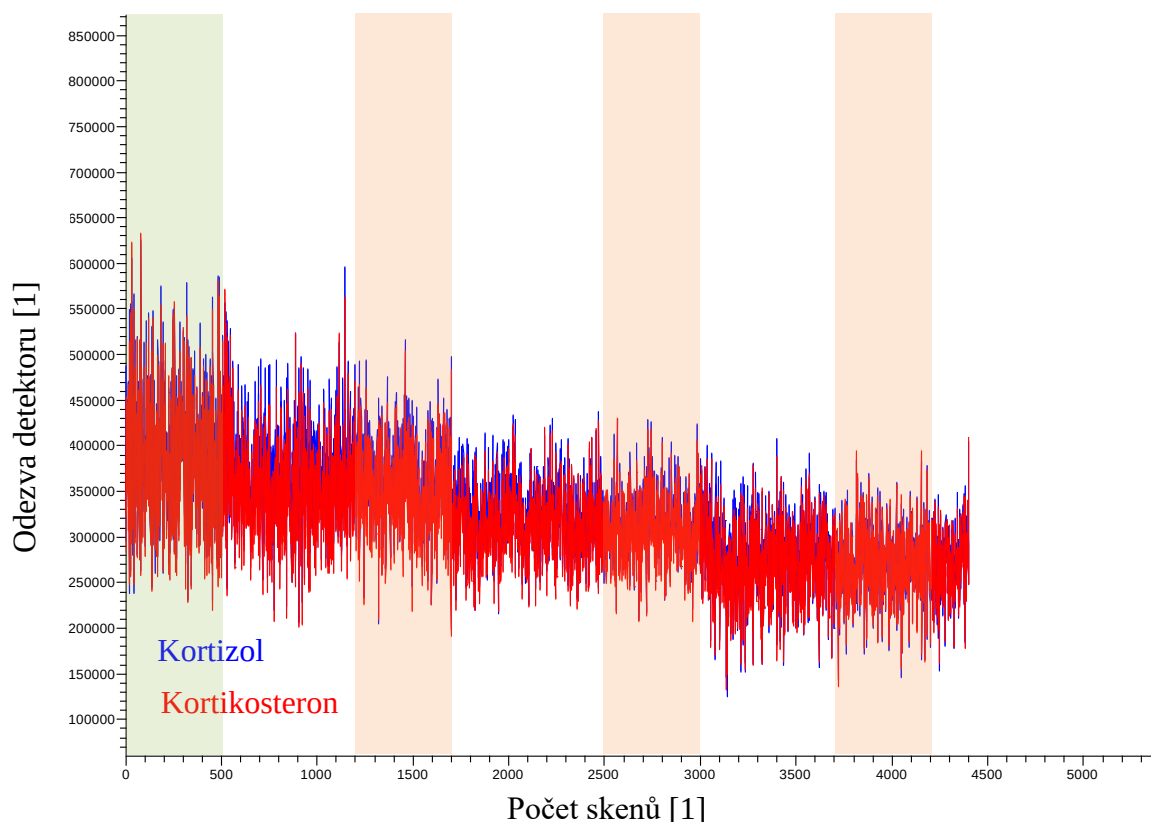
Poté bylo provedeno testování vlivu teploty sušících plynů v APCI o teplotách 350 °C, 400 °C a 450 °C na odezvu detektoru, jehož výsledky jsou uvedeny na Obr. 13. I v tomto případě změna teploty a následná stabilizace trvá určitý čas (řádově minuty), a proto bylo vždy po změně nastavení opět nutné vyčkat na stabilizaci přístroje.



Obr. 13: Graf závislosti odezvy detektoru na teplotě iontového zdroje; testované hodnoty: 350 °C (skeny 0–500), 400 °C (skeny 1200–1700) a 450 °C (skeny 2500–3000).

V tomto případě se odezva detektoru s rostoucí teplotou sušících plynů neměnila, ale signál se stával mírně stabilnějším. Vzhledem k nepatrnému vlivu tohoto parametru byla jako optimální zvolena prostřední teplota 400 °C.

Poslední optimalizovaným parametrem APCI byl poměr hlavního ku vedlejšímu zmlžovacímu plynu. Testovány byly poměry 30/5, 40/10, 50/15 a 60/20 a výsledky jsou uvedeny na Obr. 14 níže.



Obr. 14: Graf závislosti odezvy detektoru na poměru hlavního a pomocného zmlžovacího plynu; testované hodnoty: 30/5 (skeny 0–500), 40/10 (skeny 1200–1700), 50/15 (skeny 2500–3000) a 60/20 (skeny 3700–4200).

Na základě výsledků uvedených na Obr. 14 se jako nejvhodnějším z testovaných poměrů jeví poměr 50/15. V rámci ukončování optimalizace podmínek APCI ionizace však bylo ještě provedeno závěrečné experimentální hodnocení vlivu poměru zmlžovacích plynů na stabilitu signálu, a to na základě opakovatelnosti ploch chromatografických píků vnitřních standardů kortizolu a kortikosteronu získaných z analýz deseti nezávisle připravených roztoků o koncentraci 10 µg/l. Pro tyto účely byl vybrán poměr plynů poskytující největší odezvu detektoru (30/5) a poměr plynů poskytující nejstabilnější odezvu detektoru (50/15). Výsledky ukázaly, že při poměru 50/15 činilo RSD ploch IS kortizolu 7,7 % a IS kortikosteronu 8,1 %. Poměr 30/5 však poskytoval výrazně nižší hodnoty, a to 5,1 % pro kortizol a 2,9 % pro kortikosteron, a proto byl vybrán.

Nastavení S-čoček bylo optimalizováno pro ionty obou stresových hormonů. Pro kortizol bylo nalezeno optimum na úrovni 60 % a pro kortikosteron na úrovni 64 %. Rozdíl

byl tedy velmi malý, navíc charakter této závislosti v dané oblasti 50–70 % vykazoval formu plata, a tak byly S-čočky nastaveny na hodnotu 60 %.

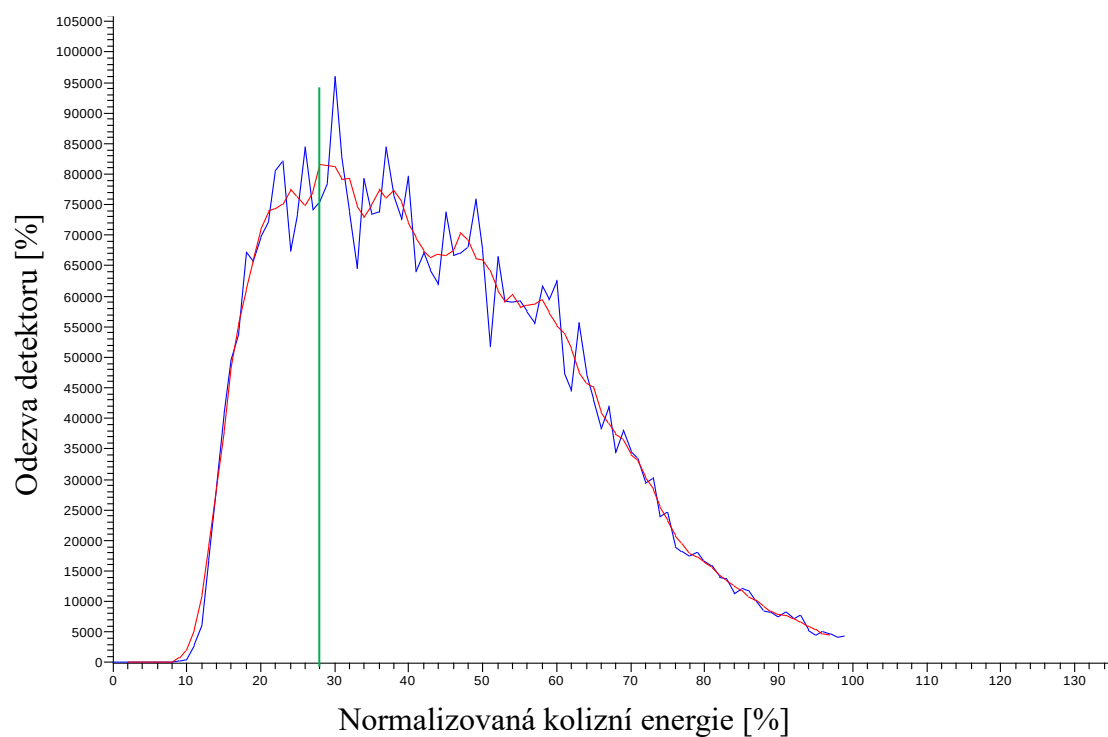
F-čočky byly na základě výsledků optimalizace pro kortizol a kortikosteron nastaveny na hodnotu -7 V, což byla optimální hodnota totožná pro oba stresové hormony.

Souhrn optimalizovaných parametrů a hodnot vybraných pro další užívání je uveden v Tab. 12 níže.

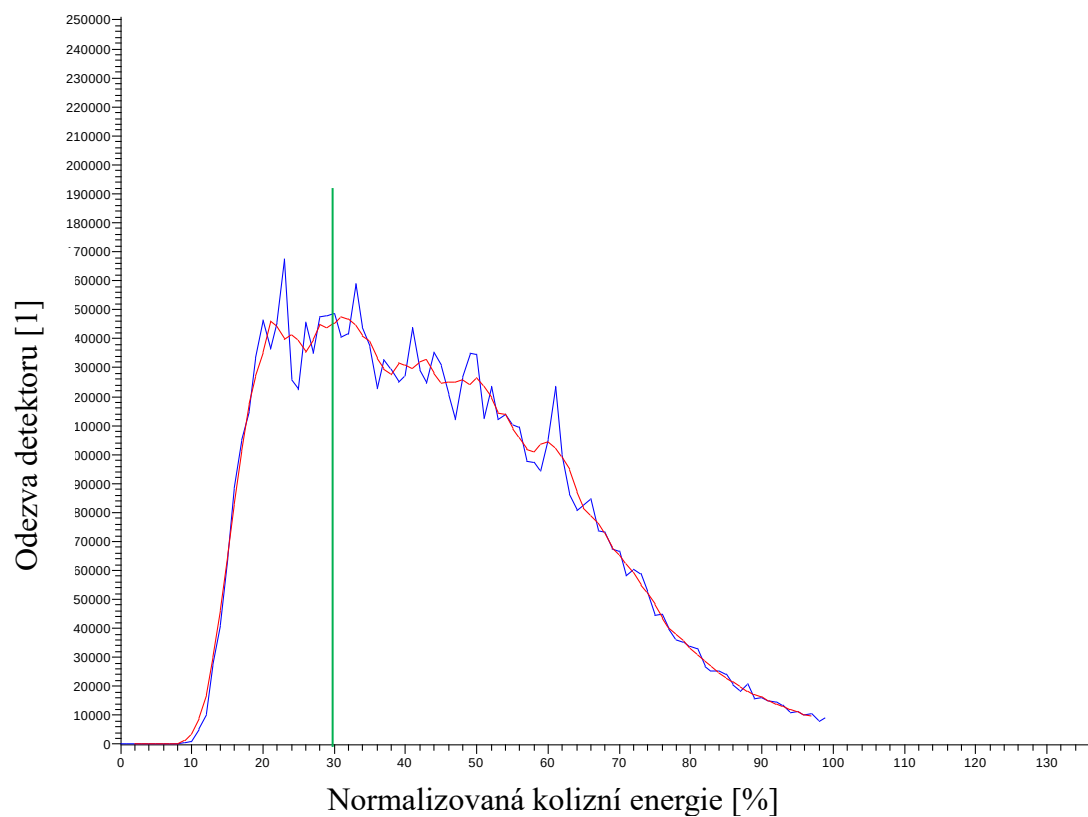
Tab. 12: Vybrané parametry hmotnostního detektoru po provedení optimalizace.

Optimalizované parametry	Nastavená hodnota
Teplota iontového zdroje [°C]	400
Průtok hlavního zmlžovacího plynu [arb]	35
Průtok pomocného zmlžovacího plynu [arb]	5
Proud na výbojové elektrodě [μA]	5
Teplota vstupní kapiláry do iontové optiky [°C]	350
Úroveň RF S-čoček [%]	65
Napětí na F-čočkách [V]	-7

Po provedení optimalizace podmínek APCI ionizace a iontové optiky byla následně provedena optimalizace normalizované kolizní energie (NCE). Závislosti intenzity odezvy vybraného produktového iontu při různých hodnotách NCE pro kortizol a kortikosteron jsou uvedeny níže na Obr. 15 a 16.



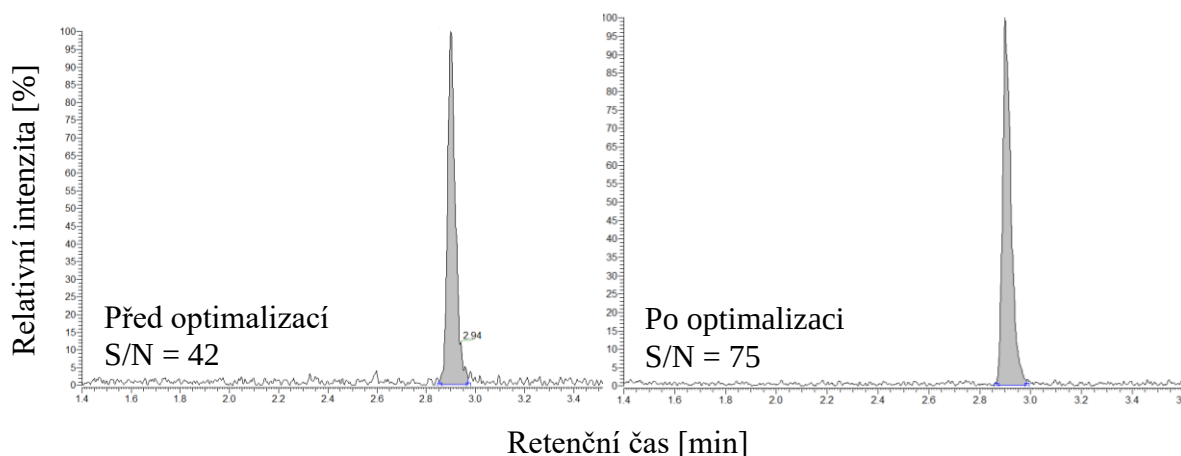
Obr. 15: Závislost odezvy detektoru na normalizované kolizní energii – kortizol;
MRM přechod 363 → 327; optimum při 28 % NCE.



Obr. 16: Závislost odezvy detektoru na normalizované kolizní energii – kortikosteron;
MRM přechod 347 → a 329; optimum při 31 % NCE.

Pro sledované pohlavní hormony se optimální hodnota NCE také vždy pohybovala od 28 % do 35 %. Pro všech pět analytů byla s ohledem na průběh této závislosti nastavena jednotná hodnota NCE, a to 30 %.

V průběhu optimalizace nebylo nejprve pozorováno výrazné zlepšení odezvy pro jednotlivé analyty. Po jejím dokončení však byla provedena analýza roztoku směsného standardu pomocí původní neoptimalizované metody a následně pomocí metody optimalizované. Porovnání těchto chromatogramů kortizolu je uvedeno na Obr. 17.



Obr. 17: Porovnání S/N kortizolu před a po optimalizaci podmínek hmotnostní detekce.

Z výše uvedeného Obr. 17 je patrné, jak významný pozitivní vliv může proces optimalizace mít. Zlepšení S/N u kortikosteronu a estradiolu bylo téměř dvojnásobné, u progesteronu byl nárůst 58 %, jediný estron nevykazoval po optimalizaci MS parametrů zlepšení. Ilustrace na příkladu kortizolu byla zvolena z toho důvodu, že jde o jeden z prioritních analytů této práce. Toto nastavení hmotnostního detektoru bylo využito pro validaci kalibrační křivky a následně dále užíváno k dalším analýzám.

4.4 Odhad IDL a IQL, hodnocení linearity kalibračních křivek

Za účelem provedení základní validace byly nejprve pro každý analyt vyhodnoceny instrumentální meze detekce (IDL) a instrumentální meze stanovitelnosti (IQL) a na základě výsledků těchto odhadů byla připravena řada kalibračních roztoků, jejichž změřením byly získány podklady pro hodnocení linearity kalibračních křivek.

Instrumentální mez detekce byla hodnocena na základě výšky šumu a byla stanovena jako taková koncentrace analytu, která poskytuje pík o výšce trojnásobku výšky šumu základní linie. Mez stanovitelnosti byla stanovena analogicky jen s tím rozdílem, že výška píku analytu musela být desetinásobná oproti výšce šumu základní linie. Hodnoty IDL a IQL

byly hodnoceny na adekvátních (přiměřeně nízkých) koncentračních úrovních 0,1 a 0,2 µg/l. Výsledky jsou uvedeny níže v Tab. 13 a detailní údaje k výpočtu jsou k nalezení v příloze D.

Tab. 13: Instrumentální meze detekce a instrumentální meze kvantifikace.

Analyt	IDL [µg/l]	IQL [µg/l]
Kortizol	0,02	0,07
Kortikosteron	0,02	0,07
Estradiol	0,06	0,2
Estron	0,06	0,2
Progesteron	0,04	0,1

S ohledem na výsledky IQL byly připraveny kalibrační křivky, a to od koncentrací shodných s IQL (nebo vhodně zvolených nepatrně vyšších koncentrací) až po koncentraci 10 µg/l. Každá kalibrační křivka byla připravena ve čtyřech nezávislých opakováních dle postupu uvedeném v kap. 3.4.3 a byla změřena za podmínek po provedení optimalizace analytické metody.

Jako kritérium přijatelnosti pro prokázání linearit kalibrační křivky byly zvoleny požadavky vycházející z doporučení FDA pro validaci bioanalytických metod – relativní difference experimentálně zjištěné koncentrace analytu od teoretické (nominální) koncentrace analytu na úrovni nejnižšího kalibračního bodu musí být nižší než 20 % a na všech ostatních (vyšších) koncentračních úrovních musí být nižší než 15 %. Tato podmínka linearit byla splněna v rozsahu 0,100–10,000 µg/l pro kortizol, kortikosteron a progesteron, v rozsahu 0,200–10,000 µg/l byla splněna pro estradiol a estron. Detailní výsledky validace kalibračních křivek jsou uvedeny v příloze C.

4.5 Optimalizace přípravy vzorku k analýze

Vzhledem k nepolární povaze studovaných látek a na základě informací získaných z literární rešerše byl jako extrakční činidlo v prvním kroku zvolen 80% methanol o čistotě pro gradientovou eluci (GG). Toto extrakční činidlo bylo i stále je pro steroidní hormony široce rozšířené (Weltring a spol. 2012; Hein a spol. 2021; Chu a spol. 2020; Caruso a spol. 2010; Shutt a spol. 2012). Extrakce byla prováděna v 50ml centrifugační zkumavce, do které bylo naváženo přesně asi 5 g trusu, na každých 5 g navážky bylo přidáno přesně 40 ml extrakčního činidla a skleněné homogenizační kuličky. Zkumavkou bylo 10 minut třepáno na orbitální třepačce a následně byla centrifugována 30 minut při RCF 10 000 × g. Po optické kontrole čistoty supernatantu však byla registrována přítomnost drobných pevných částic, a proto byl supernatant následně přefiltrován přes stříkačkový filtr Titan3, aby bylo eliminováno riziko případného ucpání nástřikového systému nebo chromatografické kolony, do nové 50ml centrifugační zkumavky.

4.5.1 Možnost stanovení přímou analýzou extraktu

Nejprve byla s ohledem na zájem o minimalizaci časových i finančních nároků na analýzu hodnocena možnost nástřiku extraktu bez dalšího přečištění. Byla provedena extrakce vzorku trusu dle postupu uvedeného výše a připraveno šest nezávislých opakování vzorku a vzorku obohaceného přídatkem známého objemu směsného standardu o známé koncentraci.

Vzorek byl připraven odpipetováním 800 µl 20% acetonitrilu (MS grade) do chromatografické vialky, dále bylo přidáno 100 µl roztoku HORM-IS-C a 100 µl extraktu trusu. Při přípravě obohaceného vzorku bylo pipetováno 750 µl 20% acetonitrilu, 50 µl roztoku HORM-ST-D (obohacení o 1 µg/l), 100 µl roztoku HORM-IS-C a 100 µl extraktu trusu.

Na základě provedených analýz byla pro každý analyt vypočtena správnost vyjádřená jako výtěžnost (%) a přesnost vyjádřená jako opakovatelnost (%), jejichž výsledky jsou uvedeny níže v Tab. 14. V zájmu porovnání obou v laboratoři dostupných iontových zdrojů byly tyto vzorky změřeny jak s APCI ionizací, tak s ESI ionizací.

Tab. 14: Výsledky validace při přímé analýze extraktu goríliho trusu při použití APCI a ESI.

Iontový zdroj	APCI		ESI	
Analyt	Správnost [%]	Přesnost [%]	Správnost [%]	Přesnost [%]
Kortizol	105	9,7	96	14
Kortikosteron	97	9,8	98	3,4
Estradiol	94	13	87	32
Estron	132	12	99	13
Progesteron	110	11	86	3,7

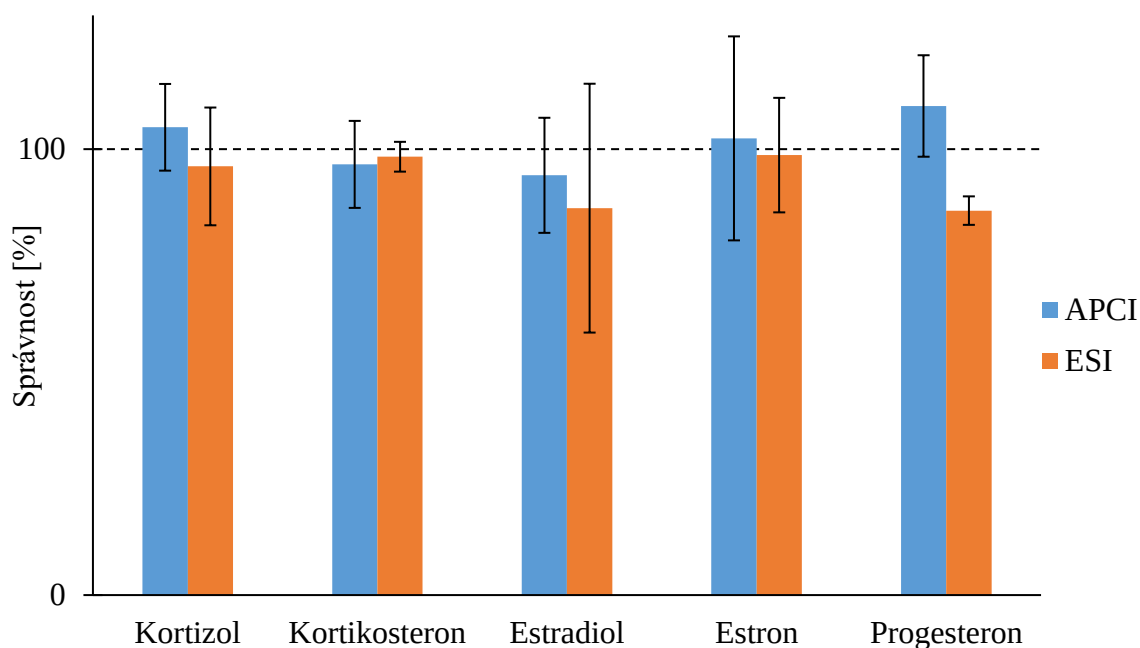
Dle požadavků AOAC je na koncentrační úrovni jednotek $\mu\text{g/l}$ vyžadovaná správnost v rozmezí 40–120 % a přesnost ≤ 30 %.

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že požadované validační parametry pro estron nebyly splněny (správnost překračuje maximální povolenou hodnotu 120 %). To podnítilo vyzkoušení jiného MRM přechodu, a to konkrétně $271 \rightarrow 157$. Při tomto přechodu byla správnost pro estron 102 % a přesnost 23 %, takže oba parametry již splňovaly požadovaná kritéria. Na základě toho byl za kvantifikační MRM přechod pro estron zvolen právě zmíněný $271 \rightarrow 157$. Záměna za tento přechod však vedla k přibližně dvojnásobnému zvýšení instrumentálních mezí detekce a kvantifikace. Porovnání parametrů metody pro přechod $271 \rightarrow 253$ a $271 \rightarrow 157$ je uvedeno v Tab. 15.

Tab. 15: Porovnání validačních parametrů obou MRM přechodů pro estron při použití APCI.

MRM přechod	IDL [$\mu\text{g/l}$]	IQL [$\mu\text{g/l}$]	Přesnost [%]	Správnost [%]
$271 \rightarrow 253$	0,07	0,2	12	132
$271 \rightarrow 157$	0,2	0,5	23	102

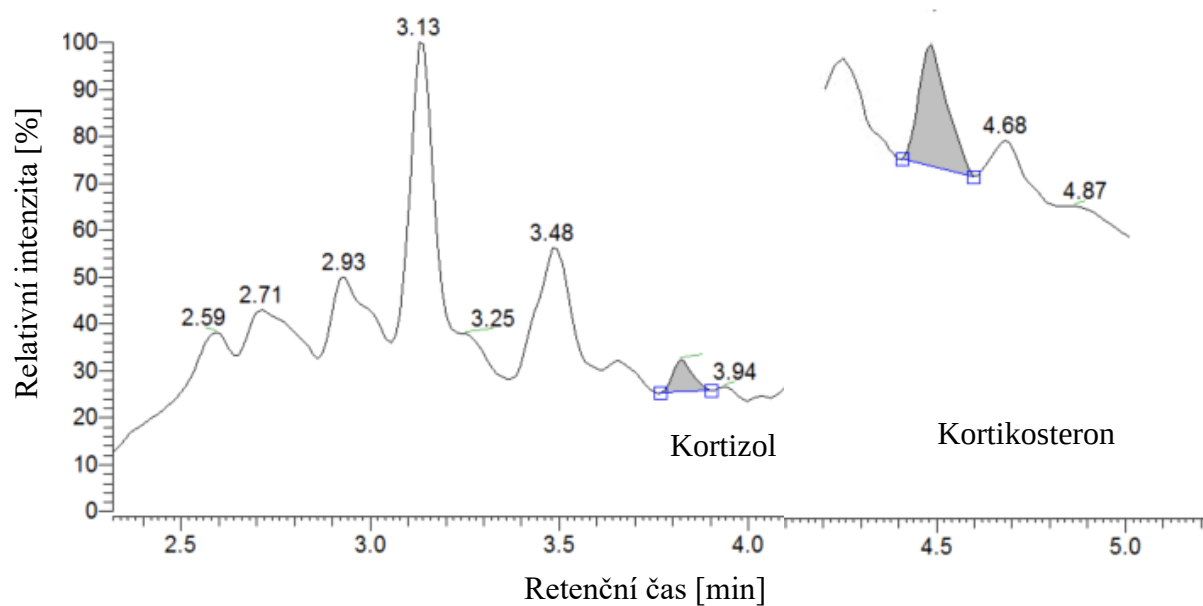
Z výše uvedených výsledků byl pro vizualizaci správnosti při použití různých iontových zdrojů sestaven graf uvedený na Obr. 18 níže. Pro vizualizaci estronu byl využit MRM přechod splňující požadavky pro validaci, tedy 271 → 157.



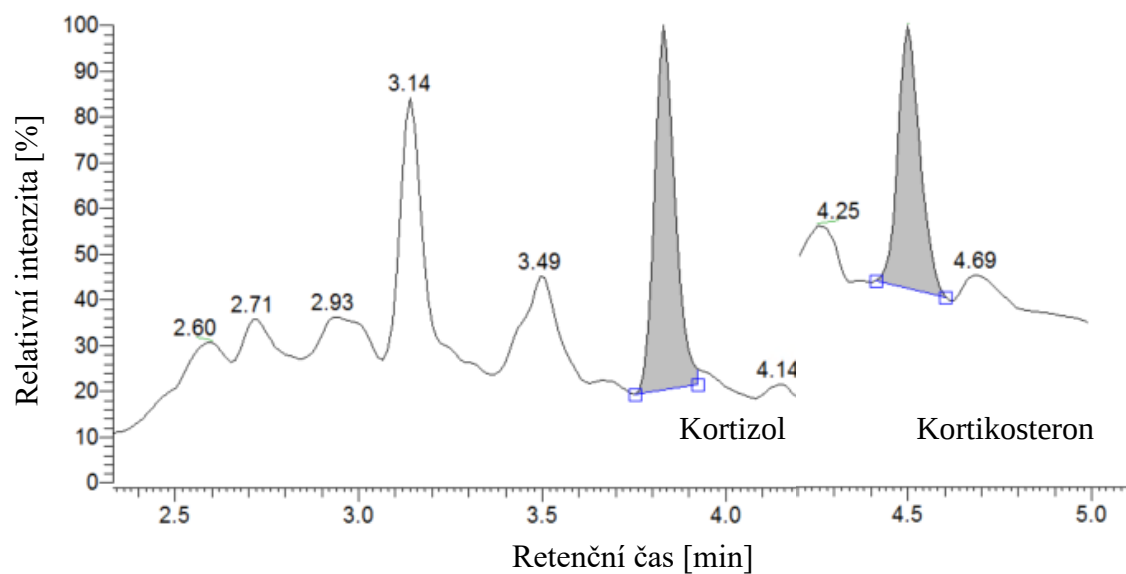
Obr. 18: Graf porovnání správnosti při použití APCI a ESI iontového zdroje pro přímou analýzu extraktu steroidních hormonů.

Z vizualizace na Obr. 18 je zřejmé, že vhodnost iontového zdroje je v tomto případě různá a může být posouzena nejlépe pro každý analyt samostatně, spíše než pro celý soubor. Při užití ESI však v případě estradiolu nebyly splněny požadavky na přesnost, která měla hodnotu 32 %. Při použití APCI byly splněny požadavky na přesnost a správnost pro všechny analyty.

V chromatogramech vzorků extraktů byl však zřetelný velký vliv matrice. V neobohaceném vzorku byly obsahy kortizolu a kortikosteronu pod mezí detekce (Obr. 19) a v případě obohacení těchto vzorků o 1 µg/l (Obr. 20) byly píky analytů již kvantifikovatelné, kritéria přijatelnosti pro přesnost i správnost sice byla splněna, ale s ohledem na výsledky i charakter chromatogramů bylo zřejmé, že na této nízké koncentrační úrovni by byla metoda na samé hranici použitelnosti. Vzhledem ke skutečnosti, že očekávaná koncentrace analytů ve vzorku extraktu je právě v řádu jednotek až nižších desítek µg/l, bylo přistoupeno k testování dodatečného přečištění extraktu pomocí extrakce na pevné fázi (SPE).



Obr. 19: Extrahovaný iontový chromatogram vybraného produktového iontu kortizolu a kortikosteronu – přímá analýza extraktu vzorku bez obohacení.



Obr. 20: Extrahovaný iontový chromatogram vybraného produktového iontu kortizolu a kortikosteronu – přímá analýza extraktu vzorku obohaceném o 1 µg/l.

4.5.2 Možnosti stanovení s využitím SPE extrakce

Vzhledem k velice komplikované matici reálných vzorků trusu a negativnímu vlivu interferujících látek bylo provedeno hodnocení vlivu SPE extrakce za účelem přečištění vzorku. Pro základní přehled byly testovány dva typy SPE kolonek aktuálně dostupných v laboratoři, které obsahovaly univerzální C18 a C18-E sorbenty, jejichž parametry a užití označení jsou uvedeny v Tab. 16 níže.

Tab. 16: Testované SPE kolonky.

Název kolonky	Výrobce	Označení	Objem [ml]	Množství sorbentu [mg]	Typ sorbentu
Spe-ed C18/18	Applied Separations	C18	3	500	Silikagel modif. C18 (40 µm)
Strata C18-E	Phenomenex	C18-E	3	500	Silikagel modif. C18; Endcapped (55 µm)

Kolonky byly před použitím kondicionovány 3 ml methanolu (MS grade) a 3 ml deionizované vody. Následně bylo na kolonky nanесeno 2,5 ml deionizované vody, 100 µl směšného vnitřního standardu HORM-IS-C, v případě obohacených vzorků 50 µl směšného standardu HORM-ST-D a nakonec 100 µl extraktu vzorku. Takto připravená SPE kolonka se nechala prokapat a následně byla promyta 3 ml deionizované vody. Voda byla po prokapání odsáta a poté bylo na kolonku aplikováno eluční činidlo (2% mravenčí kyselina v acetonitrilu – MS grade). Eluát byl jímán až do naplnění chromatografické vialky, který byl následně proudem dusíku při 40 °C odfoukán do sucha a získaný odparek byl nakonec rozpuštěn v 1 ml výchozí mobilní fáze, tedy ve 20% acetonitrilu (MS grade). Vialkou bylo třepáno do úplného rozpuštění povlaku odparku na stěnách a poté byl vzorek analyzován.

Pro jednotlivé analyty byla porovnána správnost metody za použití obou kolonek. Pro tuto práci byly stěžejní hodnoty pro stresové hormony, které v případě kolonky C18 činily pro kortizol 103 % a pro kortikosteron 87 %. V případě použití kolonky C18-E však bylo dosaženo lepších hodnot, a to 96 % pro kortizol a 101 % pro kortikosteron. Tento pozitivní efekt mohl být způsoben právě metylací volných částí silikagelu (Endcapping). Výsledky ostatních analytů také vyhovovaly požadavkům AOAC (správnost v rozmezí 40–120 %) pro

oba typy kolonek. Pro další důkladnější testování ve více opakováních byla na základě těchto výsledků zvolena kolonka C18-E.

V rámci snahy o dosažení co nejnižších mezí stanovitelnosti metody byly na vybrané kolonce (C18-E) vyzkoušeny různé objemy extraktu. Bylo tedy kondicionováno šest C18-E kolonek. Na ty byl následně nanesen vzorek podle níže uvedené Tab. 17.

Tab. 17: Objemy jednotlivých roztoků nanášených na SPE při testování vhodnosti různých objemů extraktu (ST = HORM-ST-D; IS = HORM-IS-C).

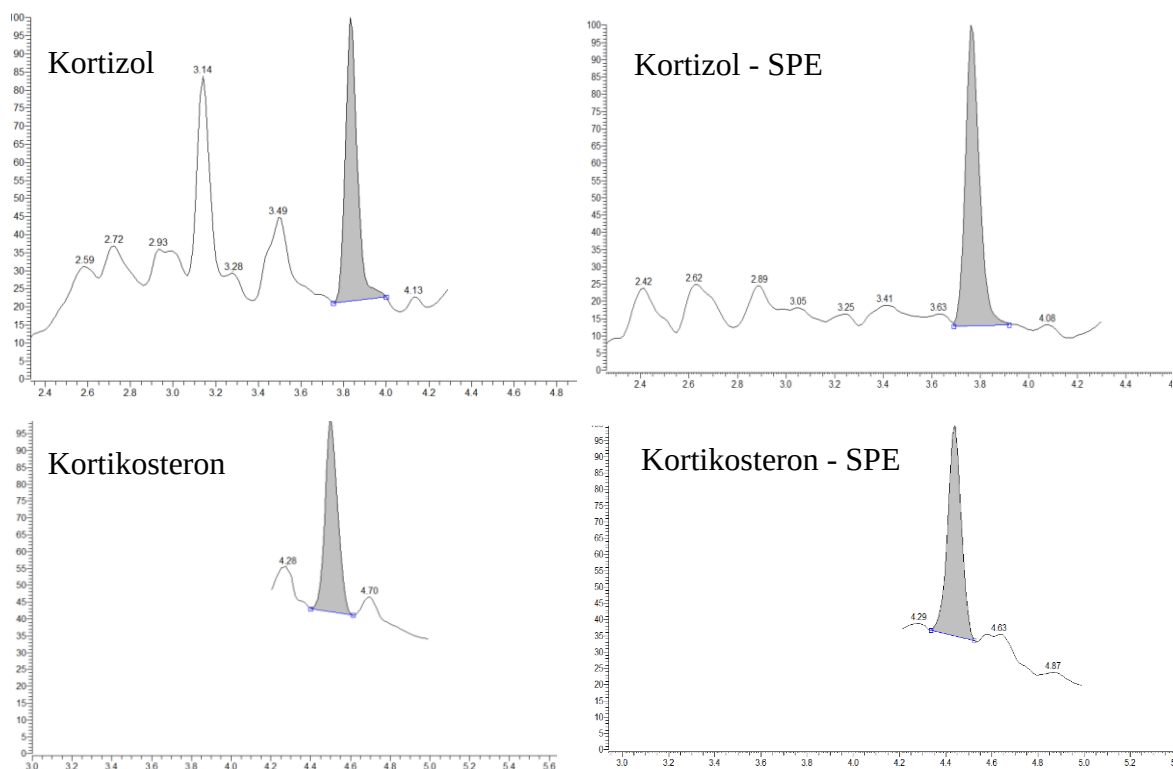
Název	Objem extraktu [ml]	Objem vody [ml]	Objem IS [μl]	Objem ST [μl]
C18-E 0,5 ml	0,5	2	100	0
C18-E 0,5 ml S				50
C18-E 1 ml	1,0	1		0
C18-E 1 ml S				50
C18-E 1,5 ml	1,5	0,5		0
C18-E 1,5 ml S				50

Od každé kolonky byly do vialek odebrány 3 frakce. Nejprve byla do jedné vialky jímána první frakce při prokapávání vzorku, poté byla jímána druhá frakce při prokapávání vzorku a do třetí vialky byla jímána frakce po aplikaci elučního činidla. Všechny vialky byly od foukány do sucha, získaný odparek byl rozpuštěn ve 20% acetonitrilu (MS grade), a následně byly vzorky analyzovány. Cílem analýz bylo zjistit, zda je možné při použití většího množství extraktu dosáhnout větší odezvy detektoru a zda analyty nejsou z SPE kolonky eluovány dříve než po aplikaci elučního činidla, k čemuž by mohlo dojít vzhledem k vysoké koncentraci methanolu (80 %) v původním extraktu.

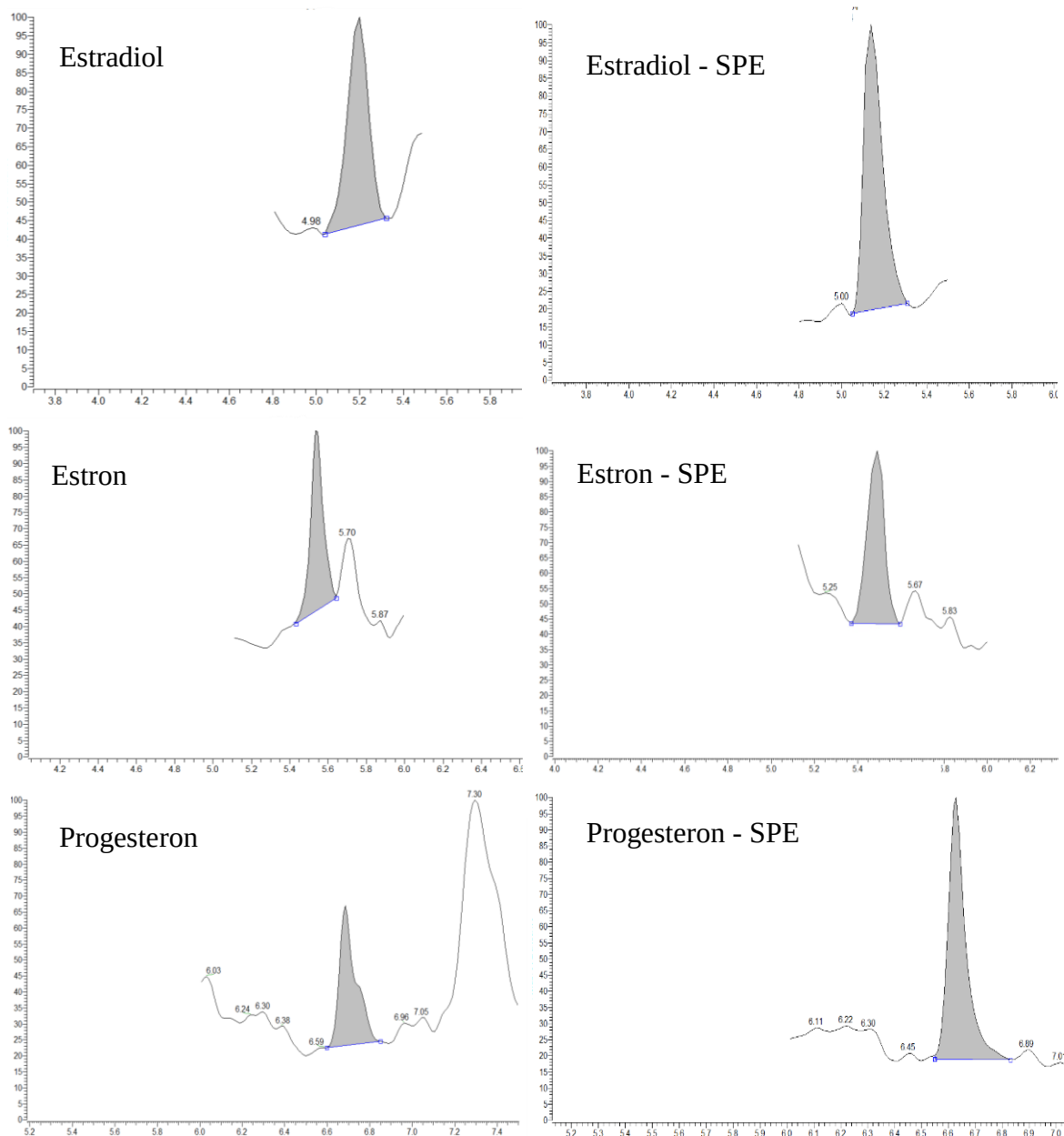
Výsledky analýz těchto vzorků potvrdily, že nejvhodnějším objemem extraktu je původních 100 μl, při tomto objemu extraktu se poměr S/N u obohacených vzorků o 1 ug/l pohyboval u všech analytů v rozmezí 10–20. Při vyšších objemech extraktu došlo ke snížení poměru S/N tak, že píky analytů nebylo téměř možné integrovat s dostatečnou spolehlivostí (S/N nabývalo hodnot 1–5). Koncentrace methanolu v extraktu však na SPE extrakci neměla negativní vliv a analyty se eluovaly až po aplikaci elučního činidla.

Vzhledem k přistoupení k SPE byla snížena doba centrifugace na 15 minut a vzhledem k finanční náročnosti bylo upuštěno od použití stříkačkových filtrů, protože mechanické nečistoty z extraktu budou odstraněny částečně centrifugací a následně zcela pomocí SPE.

Pro ilustraci je níže na Obr. 21 a 22 uvedeno porovnání chromatogramů analytů s využitím extrakce na pevné fázi a bez ní v případě vzorků obohacených o 1 µg/l.



Obr. 21: Porovnání extrahovaných iontových chromatogramů vybraného produktového iontu stresových hormonů s využitím SPE a bez něj – vzorek obohacený o 1 µg/l. Na ose y je vynesena relativní intenzita [%] a na ose x je zaznamenán retenční čas [min].



Obr. 22: Porovnání extrahovaných iontových chromatogramů vybraného produktového iontu pohlavních hormonů s využitím SPE a bez něj – vzorek obohacený o 1 $\mu\text{g/l}$. Na ose y je vynesena relativní intenzita [%] a na ose x je zaznamenán retenční čas [min].

Je zřejmé, že využití SPE přineslo jisté očekávané zvýšení S/N, čímž byl částečně snížen negativní vliv interferujících látek z matrice. Zároveň došlo i k viditelnému zlepšení symetrie píků (viz estron).

Pro důkladnější objektivní zhodnocení účinnosti extrakce za použití zvolené SPE kolonky byl proveden experiment v širším rozsahu. Do tří 15ml centrifugačních zkumavek byly k navážkám (0,5203 g, 0,5083 g, 0,5276 g) vzorku gorilího trusu přidán 1 ml směsného vnitřního standardu o koncentraci 500 $\mu\text{g/l}$, následně byly přidány 4 ml 80% methanolu

(GG) a skleněné homogenizační kuličky. Centrifugačními zkumavkami bylo 10 minut třepáno a následně byly umístěny na 15 minut do centrifugy při 10 000 RCF. Byl odebrán supernatant a napipetován do tří 8ml skleněných nádobek s uzávěrem. Souběžně byly připraveny tři totožné centrifugační zkumavky slepého vzorku, tedy se shodovaly s výše popsanými zkumavkami vzorku, až na absentující navážku vzorku trusu. S těmito zkumavkami bylo zacházeno zcela totožně jako se zkumavkami vzorku. Po centrifugaci byla provedena extrakce pomocí SPE a eluční frakce byla dusíkem odfoukána do sucha. Odparek byl následně rozpuštěn v 1 ml 20% acetonitrilu (MS grade).

Dále pak byly připraveny tři chromatografické vialky míchaného roztoku vnitřního standardu. Bylo odpipetováno 900 µl 20% acetonitrilu (MS grade) do chromatografické vialky a přidáno 100 µl roztoku HORM-IS-C.

Z hodnot ploch píků jednotlivých vnitřních standardů analytů byla vypočtena výtěžnost extrakce. Plochy píků i výtěžnosti pro každý z analytů jsou uvedeny v příloze F. Výtěžnost extrakce vzorku trusu byla v průměru 76 % a slepého vzorku činila průměrně 95 %.

Pro vybranou SPE kolonku byla validována analytická metoda jako celek včetně SPE extrakce. Hodnocenými parametry byla správnost, přesnost a mez stanovitelnosti metody (MQL). Analýzy vzorku trusu byly provedeny vždy ve čtyřech opakováních, a to jak pro neobohacený vzorek, tak pro vzorek obohacený o 1 µg/l a pro vzorek obohacený o 10 µg/l. Pro tyto účely byl připraven jeden společný extrakt gorilího trusu dle postupu popsaného výše v kap. 4.6. Následné dávkování roztoků na kolonku je popsáno v Tab. 18 níže.

Tab. 18: Příprava vzorků pro validaci kompletní analytické metody.

Roztok	Jednotky	Vzorek	Vzorek obohacený o 1 µg/l	Vzorek obohacený o 10 µg/l
Deionizovaná voda		2500	2500	2500
HORM-IS-C	µl	100	100	100
HORM-ST-D		0	50	500
Extrakt		100	100	100

Odlišný výsledný objem vzorku je korigován vnitřním standardem, výsledky jsou proto srovnatelné.

V Tab. 19 níže jsou uvedeny výsledky validace kompletní analytické metody, detailní data jsou k nalezení v příloze E. Na koncentrační úrovni 1 µg/l se musela správnost pohybovat v rozmezí 40–120 % a přesnost musela nabývat hodnotu nižší než 30 %. Na koncentrační úrovni 10 µg/l se musela správnost pohybovat v rozmezí 60–115 % a přesnost musela nabývat hodnoty nižší než 21 %.

Tab. 19: Výsledky správnosti a přesnosti analytické metody.

Analyt	Správnost [%]		Přesnost [%]	
	1 µg/l	10 µg/l	1 µg/l	10 µg/l
Kortizol	102	102	7,5	3,9
Kortikosteron	112	104	6,5	3,2
Estradiol	110	109	4,5	6,5
Estron	119	96	12	9,6
Progesteron	94	97	6,2	3,2

Z výsledků uvedených v Tab. 19 je patrné, že analytická metoda splňuje na obou koncentračních úrovních pro všechny analyty veškeré požadavky na přesnost a správnost.

Výsledky těchto analýz byly dále využity k odhadu mezí stanovitelnosti metody, která s ohledem na navážku vzorku k analýze (5 g), proces přípravy vzorku postupem s využitím SPE extrakce, výsledkům správnosti a přesnosti při obohacení vzorku o 1 µg/l i charakteru jejich chromatogramů (Obr. 22 a 23) na této koncentrační úrovni, činí v případě všech analytů shodně 8 ng analytu na 1 gram gorilího trusu, což by mělo být s ohledem na některé dosud publikované výsledky (kortizol 10–20 ng na 1 g suchého vzorku) vyhovující (Tallo-Parra a spol. 2015).

4.6 Kompletní analytická metoda

Pro přehlednost je zde uveden souhrn veškerých parametrů úspěšně vyvinuté a validované analytické metody.

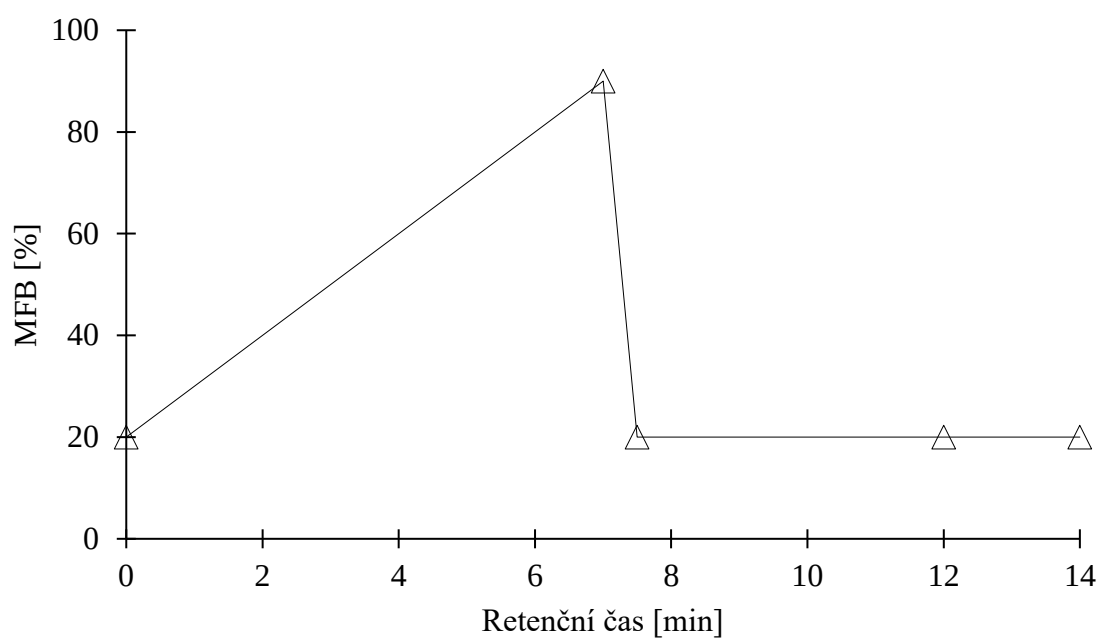
Extrakce vzorku

- Extrakční činidlo: 80% methanol (GG)
- Navážka/objem extrakčního činidla: 5/40 [g/ml]
- Doba extrakce: 15 min
- Doba centrifugace: 10 min
- RCF: $10\,000 \times g$
- SPE: Strata C18-E 500 mg/3 ml; Phenomenex
 - Kondicionace: 3 ml methanol (GG), 3 ml voda
 - Vzorek: 2,5 ml voda, 100 μ l HORM-IS-C, 100 μ l extrakt, (50 μ l HORM-ST-D v případě obohacených vzorků)
 - Promytí: 3 ml voda
 - Eluce: 2% mravenčí kyselina (GG) v acetonitrilu (MS grade)
- Sušení: 40 °C; dusík; do sucha
- Rozpuštění: 1 ml 20% acetonitrilu (MS grade); třepání

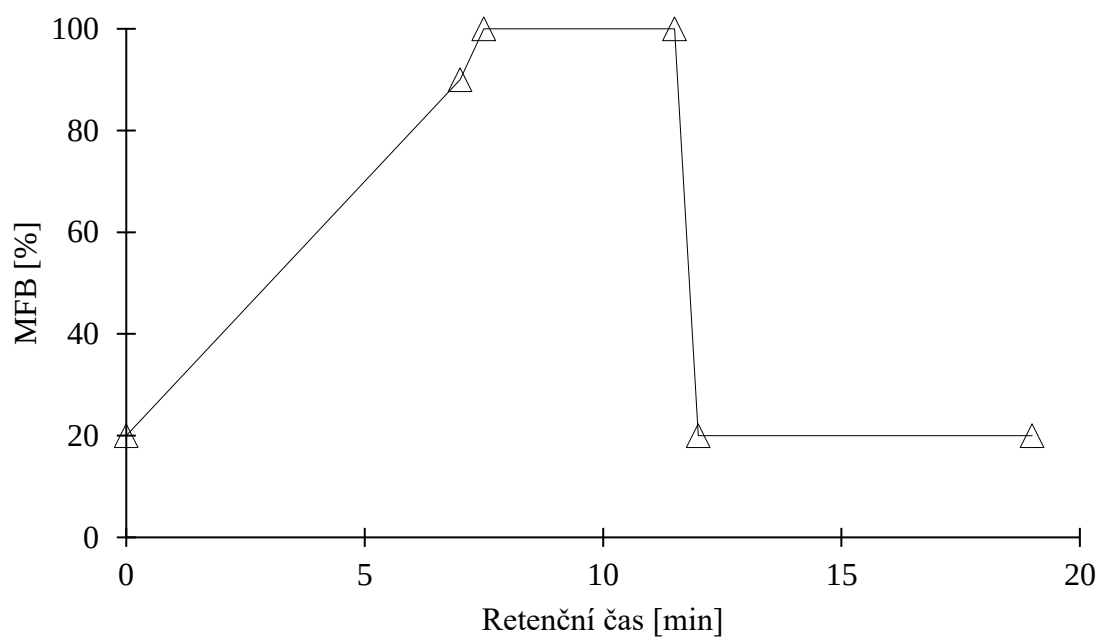
Kapalinová chromatografie

- Kapalinový chromatograf: Thermo UltiMate 3000
- Chromatografická kolona: Phenomenex Kinetex EVO C18 (150 x 3,0 mm; 2,6 μ m) s plně kompatibilní předkolonou
- Objem nástřiku: 25 μ l
- Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min
- Teplota kolonového prostoru: 35 °C
- Mobilní fáze:
 - MFA: 0,025% octová kyselina s 5mM octanem amonným ve vodě
 - MFB: 100% acetonitril
- Doba analýzy (včetně nástřiku a proplachu nástřikového systému):
 - Standardy: 14 min
 - Reálné vzorky: 19 min

- Gradient:



Obr. 23: Gradientový program pro analýzy vzorků standardů.



Obr. 24: Gradientový program pro analýzy reálných vzorků trusu.

Hmotnostní detekce

- Hmotnostní detektor: Velos Pro – Thermo (lineární iontová past)
- Iontový zdroj: APCI
- Polarita ionizace: pozitivní
- Teplota iontového zdroje: 400 °C
- Průtok hlavního zmlžovacího plynu: 35 arb
- Průtok pomocného zmlžovacího plynu: 5 arb
- Proud na výbojové elektrodě: 5 µA
- Teplota vstupní kapiláry: 350 °C
- Úroveň RF na S-čočkách: 65 %
- Napětí na F-čočkách: -7 V
- Analyt, prekurzorový ion → produktový ion [m/z], polarita a normalizovaná kolizní energie [%]:
 - kortizol 363 → 327 + 30
 - kortikosteron 347 → 329 + 30
 - estradiol 255 → 159 + 30
 - estron 271 → 157 + 30
 - progesteron 315 → 297 + 30
- Typ skenu: Hmotnostní spektrum produktových iontů z daného prekurzorového iontu (Full Scan MS/MS)
- Maximální doba plnění iontové pasti: 200 ms
- Počet mikroskenů: 1

5 ZÁVĚR

V rámci teoretické části této bakalářské práce zaměřené na stanovení stresových (kortizol, kortikosteron) a pohlavních (estradiol, estron, progesteron) hormonů byla vypracována literární rešerše. V první řadě byl poskytnut úvod do problematiky steroidních hormonů a jejich funkce v organismu. Dále byly rozebrány možnosti jejich stanovení z různých matric vzorku, zejména trusu, s důrazem na kvantifikaci pomocí LC/MS. Pozornost byla soustředěna zejména na podmínky chromatografické separace, tedy typy použitých chromatografických kolon a složení mobilní fáze. Nebyly však opomenuty ani různé postupy přípravy vzorků k analýze, zejména s využitím SPE.

V experimentální části této práce je popsán vývoj a validace analytické metody pro stanovení výše uvedených pěti analytů ze skupiny steroidních hormonů. Použitým instrumentálním vybavením byl vysokoúčinný kapalinový chromatograf s hmotnostním detektorem typu lineární iontové pasti a chemickou ionizací za atmosférického tlaku. Oproti dosud nepublikované práci kolegy Filipa Štracha, která využívala ionizaci vyhřívaným elektrosprejem, vykazoval pro tuto práci zvolený způsob ionizace dle očekávání lepší výsledky. Během vývoje analytické metody se postupovalo od volby vhodných mobilních fází (včetně volby aditiv a gradientového programu) po optimalizaci parametrů hmotnostního detektoru.

V další fázi byla provedena validace rozsahu kalibrační křivky pro kortizol, kortikosteron a progesteron (0,1–10 µg/l) a pro estron a estradiol (0,2–10 µg/l). Poté byla upřena pozornost na postup přípravy reálného vzorku trusu k analýze. Možnost analýzy zředěného neupraveného extraktu trusu byla zavržena kvůli vysokým matričním vlivům. Bylo tedy přistoupeno k jejich potlačení pomocí SPE. Pro účely této metody byly testovány dva typy univerzálních sorbentů (C18 a C18-E), přičemž nejlepší výsledky poskytovala SPE kolonka Strata C18-E (Phenomenex), na které byl následně validován postup přípravy vzorku. Na závěr byl proveden odhad meze stanovitelnosti metody, který pro každý analyt činil 8 ng na 1 g vzorku, což by mělo být s ohledem na dosud publikované výsledky vyhovující.

Tato metoda bude v budoucnu využita pro analýzu série vzorků trusu goril nížinných (*Gorilla gorilla gorilla*) ze ZOO Praha a výsledky budou předány skupině zoologů Mgr. Martiny Konečné, Ph.D., jako podklady pro behaviorální studii.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

BÍLKOVÁ, Zuzana, Marie ADÁMKOVÁ, Tomáš ALBRECHT a Zdeněk ŠIMEK, 2019. Determination of testosterone and corticosterone in feathers using liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. **1590**, [vid. 2023-03-29]. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016/J.CHROMA.2018.12.069

CARUSO, D., M. PESARESI, O. MASCHI, S. GIATTI, L. M. GARCIA-SEGURA a R. C. MELCANGI, 2010. Effect of short-and long-term gonadectomy on neuroactive steroid levels in the central and peripheral nervous system of male and female rats. *Journal of Neuroendocrinology* [online]. **22**(11), [vid. 2022-09-23]. ISSN 09538194. Dostupné z: doi:10.1111/J.1365-2826.2010.02064.X

CLARK, Fay E., Malcolm FITZPATRICK, Andy HARTLEY, Andrew J. KING, Tracey LEE, Andrew ROUTH, Susan L. WALKER a Katherine GEORGE, 2012. Relationship between behavior, adrenal activity, and environment in zoo-housed western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). *Zoo Biology* [online]. **31**(3), [vid. 2022-10-22]. ISSN 07333188. Dostupné z: doi:10.1002/ZOO.20396

DAHL, Sandra R., Ingrid NERMOEN, Ingeborg BRØNSTAD, Eystein S. HUSEBYE, Kristian LØVÅS a Per M. THORSBY, 2018. Assay of steroids by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in monitoring 21-hydroxylase deficiency. *Endocrine Connections* [online]. **7**(12), [vid. 2022-11-25]. ISSN 2049-3614. Dostupné z: doi:10.1530/EC-18-0453

DAVENPORT, Matthew D., Stefan TIEFENBACHER, Corrine K. LUTZ, Melinda A. NOVAK a Jerrold S. MEYER, 2006. Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *General and Comparative Endocrinology* [online]. **147**(3), [vid. 2023-03-06]. ISSN 10956840. Dostupné z: doi:10.1016/J.YGCEN.2006.01.005

DÉVIER, Marie Hélène, Pierre LABADIE, Anne TOGOLA a Hélène BUDZINSKI, 2010. Simple methodology coupling microwave-assisted extraction to SPE/GC/MS for the analysis of natural steroids in biological tissues: Application to the monitoring of endogenous steroids in marine mussels *Mytilus* sp. *Analytica Chimica Acta* [online]. **657**(1), [vid. 2022-09-23]. ISSN 18734324. Dostupné z: doi:10.1016/J.ACA.2009.10.023

GAO, Wei, Tobias STALDER, Paul FOLEY, Manfred RAUH, Huihua DENG a Clemens KIRSCHBAUM, 2013. Quantitative analysis of steroid hormones in human hair using a column-switching LC–APCI–MS/MS assay. *Journal of Chromatography B* [online]. **928**, [vid. 2022-04-18]. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/J.JCHROMB.2013.03.008

GAO, Wei, Qiaozhen XIE, Jing JIN, Ting QIAO, Haiyang WANG, Liqin CHEN, H. DENG HUIHUA a Zuhong LU, 2010. HPLC-FLU detection of cortisol distribution in human hair. *Clinical Biochemistry* [online]. **43**(7–8), [vid. 2023-03-04]. ISSN 00099120. Dostupné z: doi:10.1016/J.CLINBIOCHEM.2010.01.014

HEIN, Anna, Katrin BAUMGARTNER, Lorenzo VON FERSEN, Thea BECHSHOFT, Benno WOELFING, Clemens KIRSCHBAUM, Gabriela MASTROMONACO, Alex D. GREENWOOD a Ursula SIEBERT, 2021. Analysis of hair steroid hormones in polar bears (*Ursus maritimus*) via liquid chromatography–tandem mass spectrometry: comparison with two immunoassays and application for longitudinal monitoring in zoos. *General and Comparative Endocrinology* [online]. **310**, [vid. 2022-04-18]. ISSN 10956840. Dostupné z: doi:10.1016/J.YGCEN.2021.113837

HINSON, Joy a Peter RAVEN, 2019. *Hormones*. B.m.: Oxford University Press. ISBN 978-0-19-883282-9.

CHEN, Wandong, Haifeng ZHANG, Qingjun GUO, Xianfeng WANG, Yourui SUO, Guichen CHEN, Honghai ZHANG a Jinmao YOU, 2006. Determination of Steroids from Rat Feces by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Derivatization and Identification by On-line Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* [online]. **34**(10), [vid. 2022-04-15]. ISSN 1872-2040. Dostupné z: doi:10.1016/S1872-2040(07)60012-7

CHU, Liuxi, Na LI, Jia DENG, Yan WU, Haoran YANG, Wei WANG, Dongrui ZHOU a Huihua DENG, 2020. LC-APCI+–MS/MS method for the analysis of ten hormones and two endocannabinoids in plasma and hair from the mice with different gut microbiota. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. **185**, [vid. 2022-04-26]. ISSN 0731-7085. Dostupné z: doi:10.1016/J.JPBA.2020.113223

KRASOWSKI, Matthew D, Denny DREES, Cory S MORRIS, Jon MAAKESTAD, John L BLAU a Sean EKINS, 2014. Cross-reactivity of steroid hormone immunoassays: clinical significance and two-dimensional molecular similarity prediction. *BCM Clinical Pathology* [online]. Dostupné z: doi:10.1186/1472-6890-14-33

LITWACK, Gerald, 2022. *Hormones*. 4th vyd. Academic Press. ISBN 979-0-323-90262-5.

MAREŠOVÁ, Dana – ústní sdělení (docentka Fyziologického ústavu 1. LF UK) dne 29.3.2023

MULLER, Martin N. a Richard W. WRANGHAM, 2004. Dominance, aggression and testosterone in wild chimpanzees: a test of the ‘challenge hypothesis’. *Animal Behaviour* [online]. **67**(1), [vid. 2023-03-08]. ISSN 0003-3472. Dostupné z: doi:10.1016/J.ANBEHAV.2003.03.013

NEY, Luke J., Kim L. FELMINGHAM, Raimondo BRUNO, Allison MATTHEWS a David S. NICHOLS, 2021. Chloroform-based liquid-liquid extraction and LC–MS/MS quantification of endocannabinoids, cortisol and progesterone in human hair. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. **8** [vid. 2022-03-24]. ISSN 1873264X. Dostupné z: doi:10.1016/J.JPBA.2021.114103

NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA, 2013. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. ISBN 978-80-260-4243-3.

RINCON, Alan V., Julia OSTNER, Michael HEISTERMANN a Tobias DESCHNER, 2019. Measuring urinary cortisol and testosterone levels in male Barbary macaques: A comparison of EIA and LC–MS. *General and Comparative Endocrinology* [online]. **281**, [vid. 2022-04-11]. ISSN 10956840. Dostupné z: doi:10.1016/J.YGCEN.2019.05.017

SHUTT, Kathryn, Joanna M. SETCHELL a Michael HEISTERMANN, 2012. Non-invasive monitoring of physiological stress in the western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*): Validation of a fecal glucocorticoid assay and methods for practical application in the field. *General and Comparative Endocrinology* [online]. **179**(2), [vid. 2022-10-21]. ISSN 10956840. Dostupné z: doi:10.1016/J.YGCEN.2012.08.008

SCHNEIDERKA PETR, 2012. *Imunochemie* [online]. 2012. B.m.: Univerzita Palackého v Olomouci. [vid. 2023-03-07]. Dostupné z: <http://pfyziolklin.upol.cz/wp-content/uploads/2012/04/Imuno.pdf>

SIMPSON, Ellen E.A., Chris MCCONVILLE, Gordon RAE, Jacqueline M. O'CONNOR, Barbara J. STEWART-KNOX, Charles COUDRAY a J. J. STRAIN, 2008. Salivary cortisol, stress and mood in healthy older adults: The Zenith study. *Biological Psychology* [online]. **78**(1), [vid. 2023-03-06]. ISSN 0301-0511. Dostupné z: doi:10.1016/J.BIOPSYCHO.2007.12.001

SOBOLEWSKI, Marissa E., Janine L. BROWN a John C. MITANI, 2013. Female parity, male aggression, and the Challenge Hypothesis in wild chimpanzees. *Primates* [online]. **54**(1), [vid. 2023-03-08]. ISSN 00328332. Dostupné z: doi:10.1007/S10329-012-0332-4/FIGURES/3

ŠIMKOVÁ, Markéta, Lucie KOLÁTOROVÁ, Pavel DRAŠAR a Jana VÍTKŮ, 2022. An LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 32 steroids in human plasma. *Journal of Chromatography B* [online]. **1201–1202**, [vid. 2023-03-29]. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/J.JCHROMB.2022.123294

ŠVIHOVEC, Jan, Jan BULTAS, Pavel ANZENBACHER, Jaroslav CHLÁDEK, Jan PŘÍBORSKÝ, Jiří SLÍVA, Martin VOTAVA a Miroslav BARTÁK, 2018. *Farmakologie*. Grada Publishing. ISBN 9788024755588.

TALLO-PARRA, Oriol, Elena ALBANELL, Annais CARBAJAL, Laura MONCLÚS, Maria SABÉS-ALSINA, Carles RIBA, Mireia MARTIN, Teresa ABELLÓ a Manel LOPEZ-BEJAR, 2015. *Prediction of faecal cortisol metabolites from western lowland gorilla (Gorilla gorilla gorilla) by near infrared reflectance spectroscopy (NIRS)* [online] [vid. 2022-10-22]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/304246775_Prediction_of_faecal_cortisol_metabolites_from_western_lowland_gorilla_Gorilla_gorilla_gorilla_by_near_infrared_reflectance_spectroscopy_NIRS

VANAELST, Barbara, ab NOËLLIE RIVET, Inge HUYBRECHTS, ad BERTRAND LUDES, Stefaan DE HENAUW AE a Jean SÉBASTIEN RAUL, 2013. Measurement of cortisol and cortisone in children's hair using ultra performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analytical Methods* [online]. **8**, [vid. 2023-03-04]. Dostupné z: doi:10.1039/c3ay26570f

WEISSER, Johan J., Martin HANSEN, Erland BJÖRKLUND, Christian SONNE, Rune DIETZ a Bjarne STYRISHAVE, 2016. A novel method for analysing key corticosteroids in polar bear (*Ursus maritimus*) hair using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* [online]. **1017–1018**, [vid. 2022-03-24]. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/J.JCHROMB.2016.02.029

WELTRING, Anja, Franka S. SCHAEBS, Susan E. PERRY a Tobias DESCHNER, 2012. Simultaneous measurement of endogenous steroid hormones and their metabolites with LC–MS/MS in faeces of a New World primate species, *Cebus capucinus*. *Physiology & Behavior* [online]. **105(2)**, [vid. 2022-03-24]. ISSN 0031-9384. Dostupné z: doi:10.1016/J.PHYSBEH.2011.09.004

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AcA – octová kyselina

ACN – acetonitril

ACTH – adrenokortikotropní hormon

AmAc – octan amonný

AmForm – mravenčan amonný

AOAC – Mezinárodní asociace oficiální analytické spolupráce

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

BCEC - 1,2-benzo-3,4-dihydrocarbazole-9-ethoxy-carbonylhadraine

BEH – technologie ethylenových přemostěných hybridních částic

C18 – oktadecylsilikagel

C18-E – oktadecylsilikagel s dodatečně pokrytými volnými silanolovými skupinami

CRH – kortikoliberinu

ELISA – enzymová imunosorbční analýza

ESI – ionizace elektrosprejem

FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv

FLU – fluorescenční detekce

FormA – mravenčí kyselina

GC – plynová chromatografie

GG – látka o čistotě pro podmínky gradientové eluce

HESI – ionizace vyhříváním elektrosprejem

HLB – hydrofilně-lipofilní vyvážený N-vinylpyrolidon-divinylbenzen kopolymery

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HR-X – hydrofobní polystyren-divinylbenzenová pryskyřice

IDL – instrumentální mez detekce

IQL – instrumentální mez kvantifikace

IS – vnitřní standard

LC – kapalinová chromatografie

LC/MS – kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

1. LF UK – 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy

MF – mobilní fáze

MFA – mobilní fáze A

MFB – mobilní fáze B

MQL – mez stanovitelnosti metody

MRM – monitorování více reakcí

MS – hmotnostní detekce

MS grade – látka o čistotě pro užití v hmotnostní spektrometrii

MS/MS – hmotnostní spektrum získané pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie

NCE – normalizovaná kolizní energie

PřF JU – Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích

PS-DVB – polystyren divinylbenzen

PTFE – polytetrafluorethylen

QTRAP – Hmotnostní detektor skládající se ze sériově zapojených tří kvadrupólů s možností využití posledního z nich jako lineární iontová past

RCF – relativní centrifugační síla

RSD – relativní směrodatná odchylka

S/N – poměr signálu (výšky píku) analytu k šumu základní linie

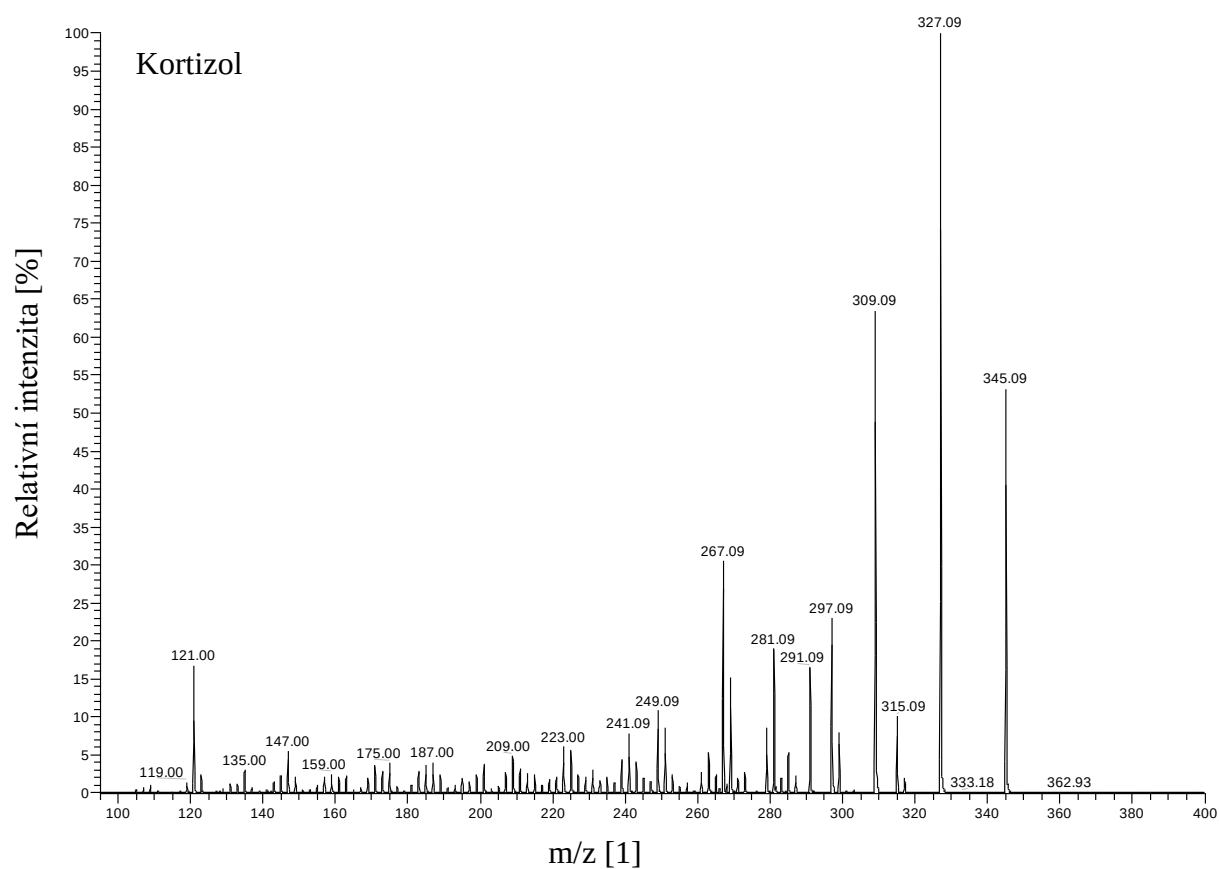
SD – směrodatná odchylka

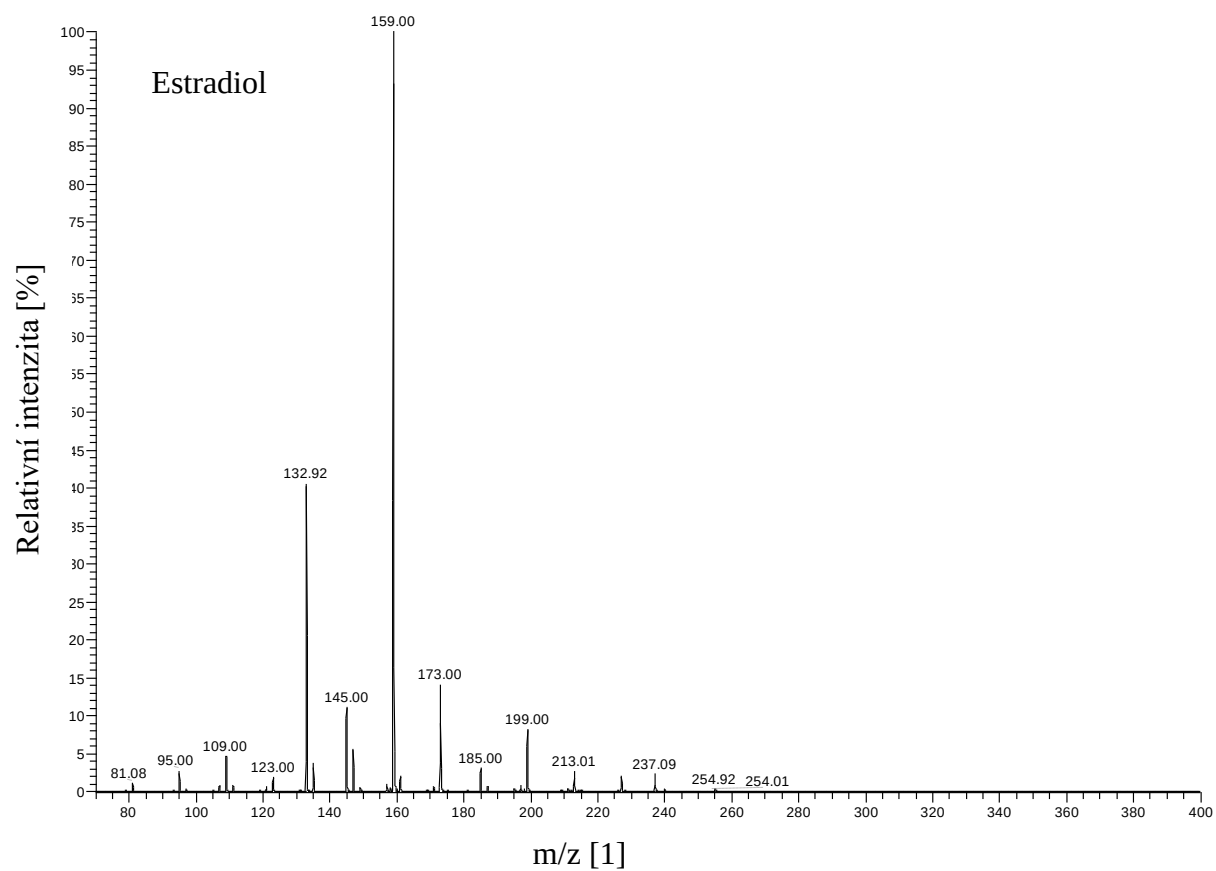
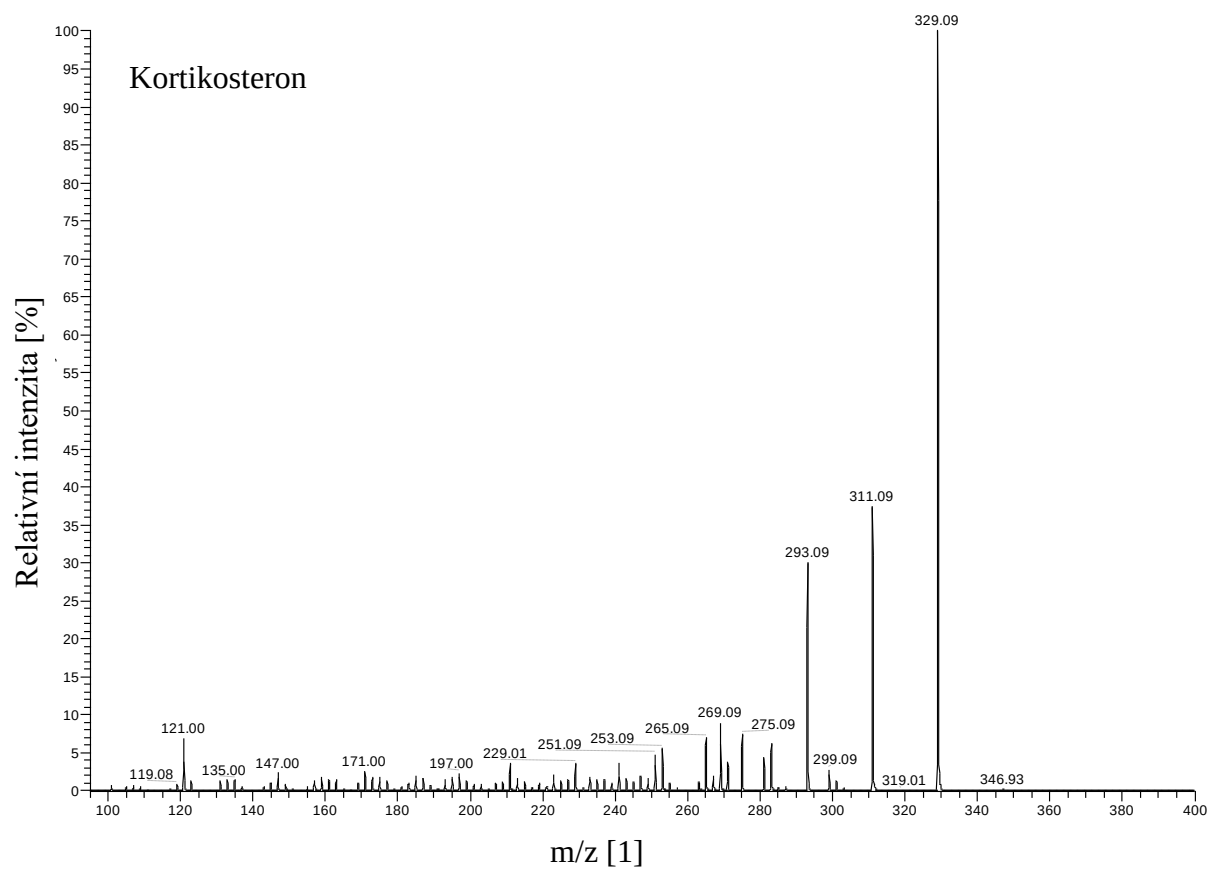
SPE – extrakce na pevné fázi

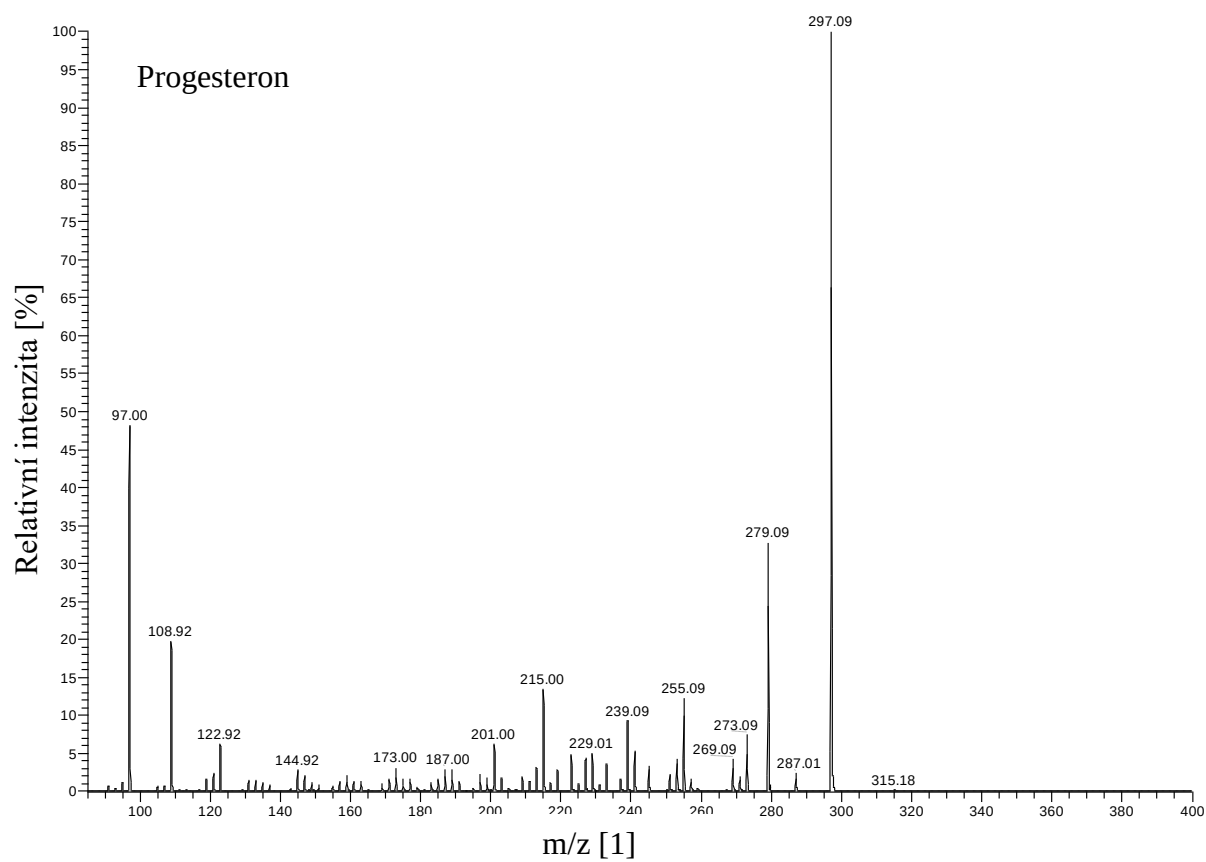
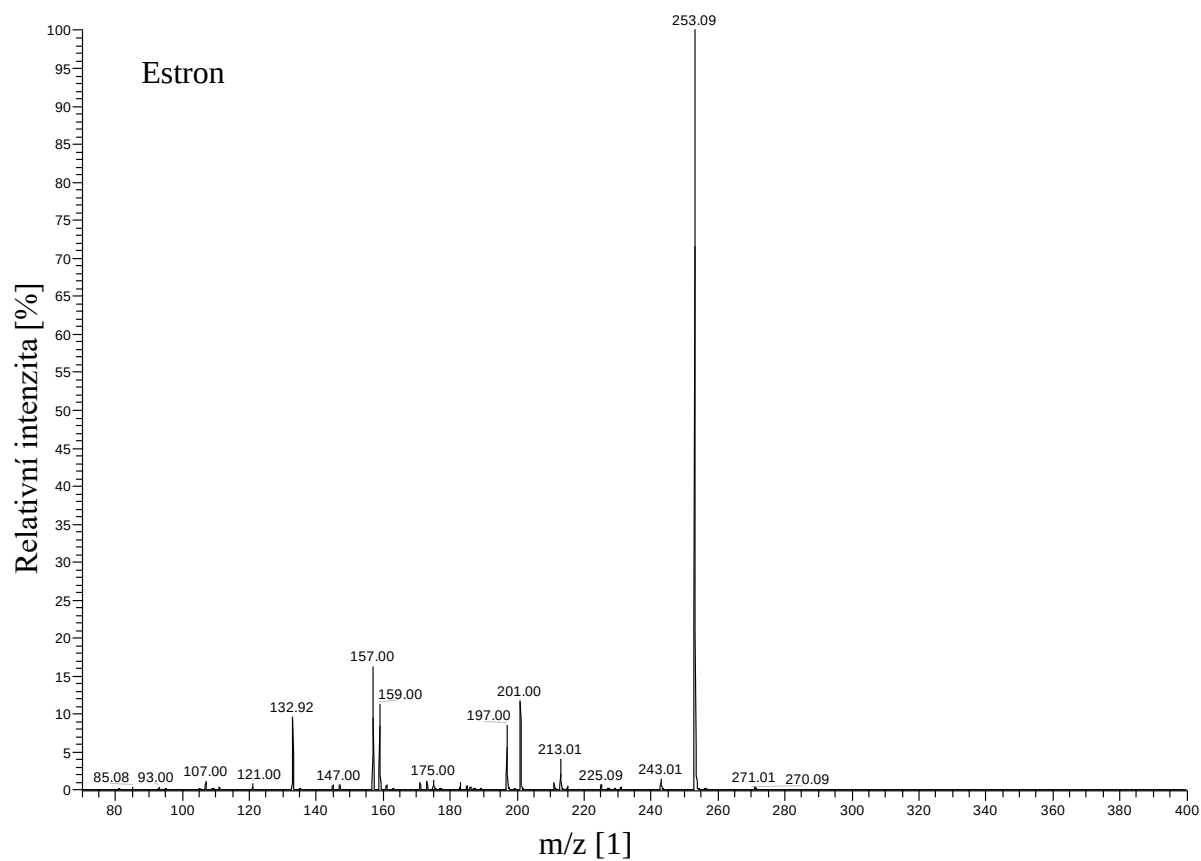
ST – standard

8 PŘÍLOHY

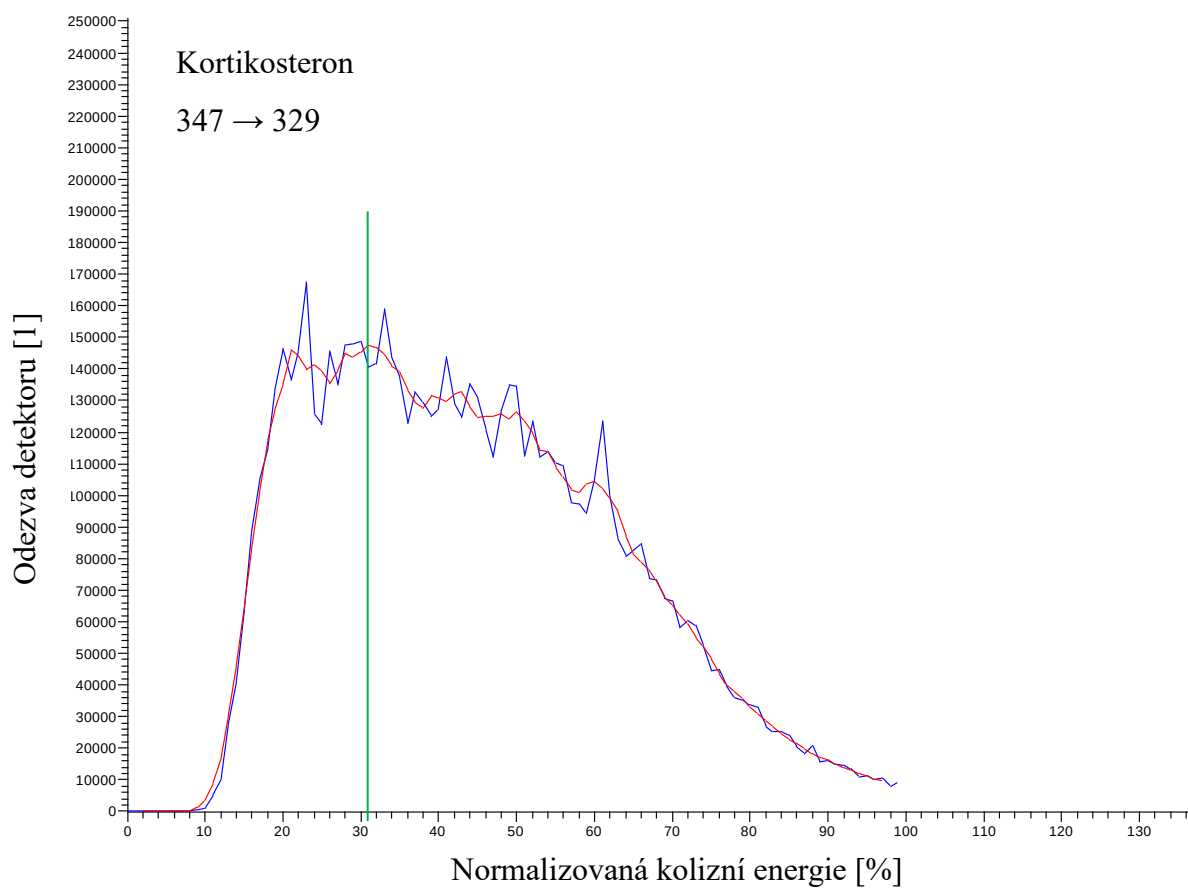
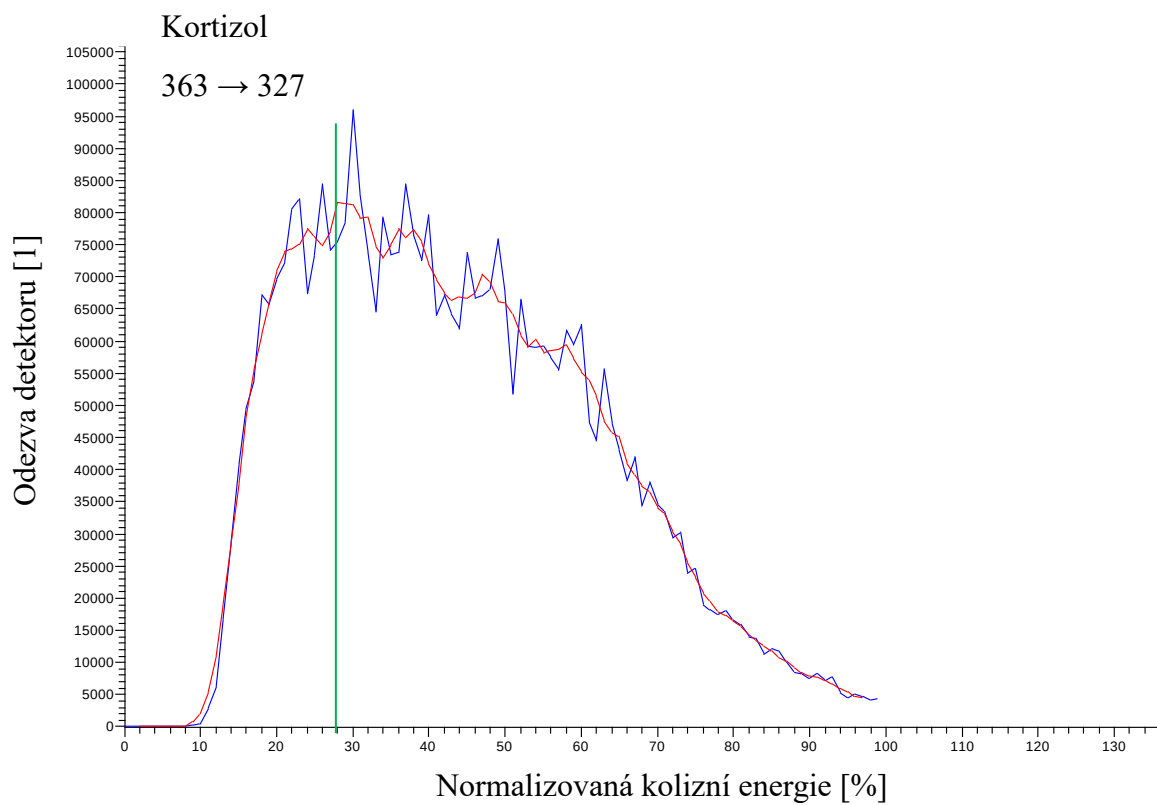
Příloha A – Hmotnostní spektra produktových iontů analytů

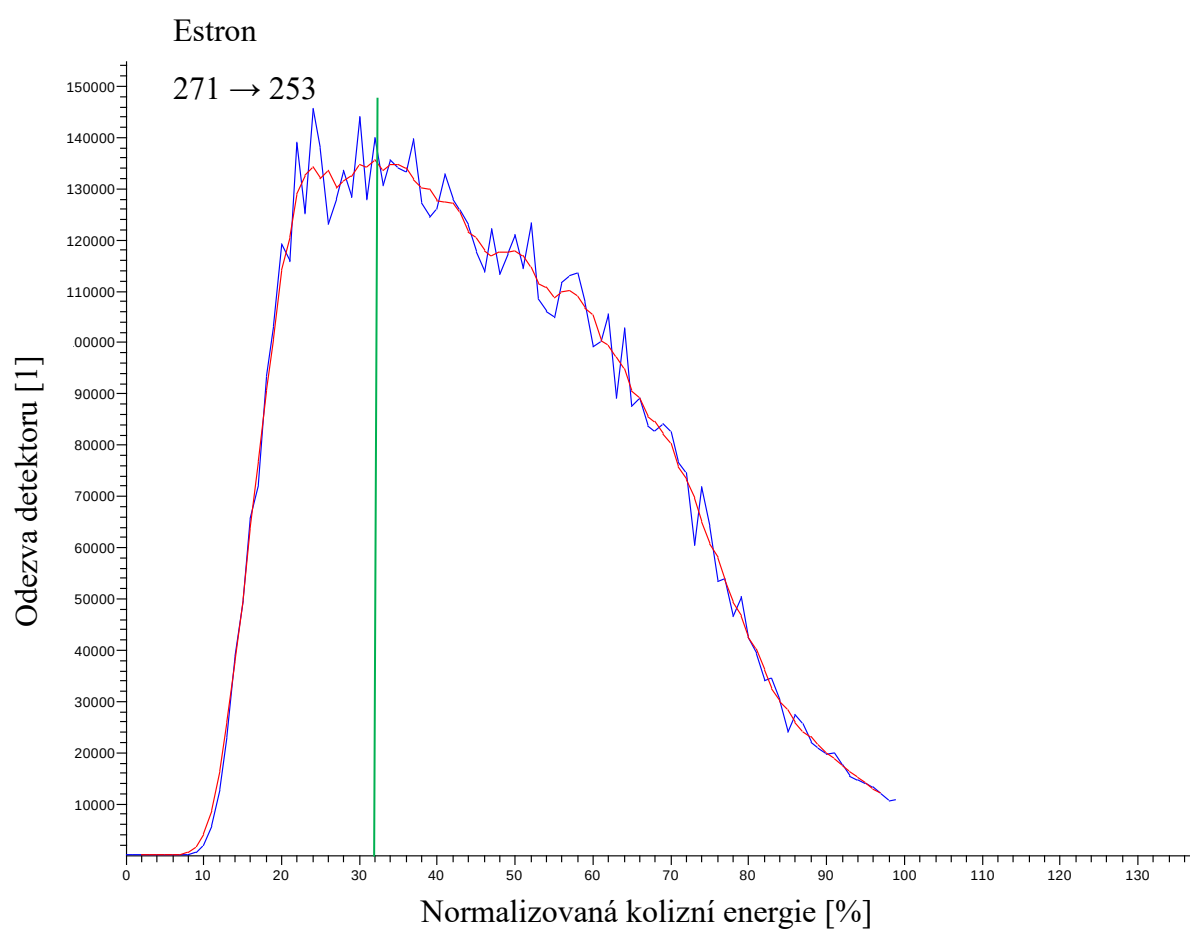
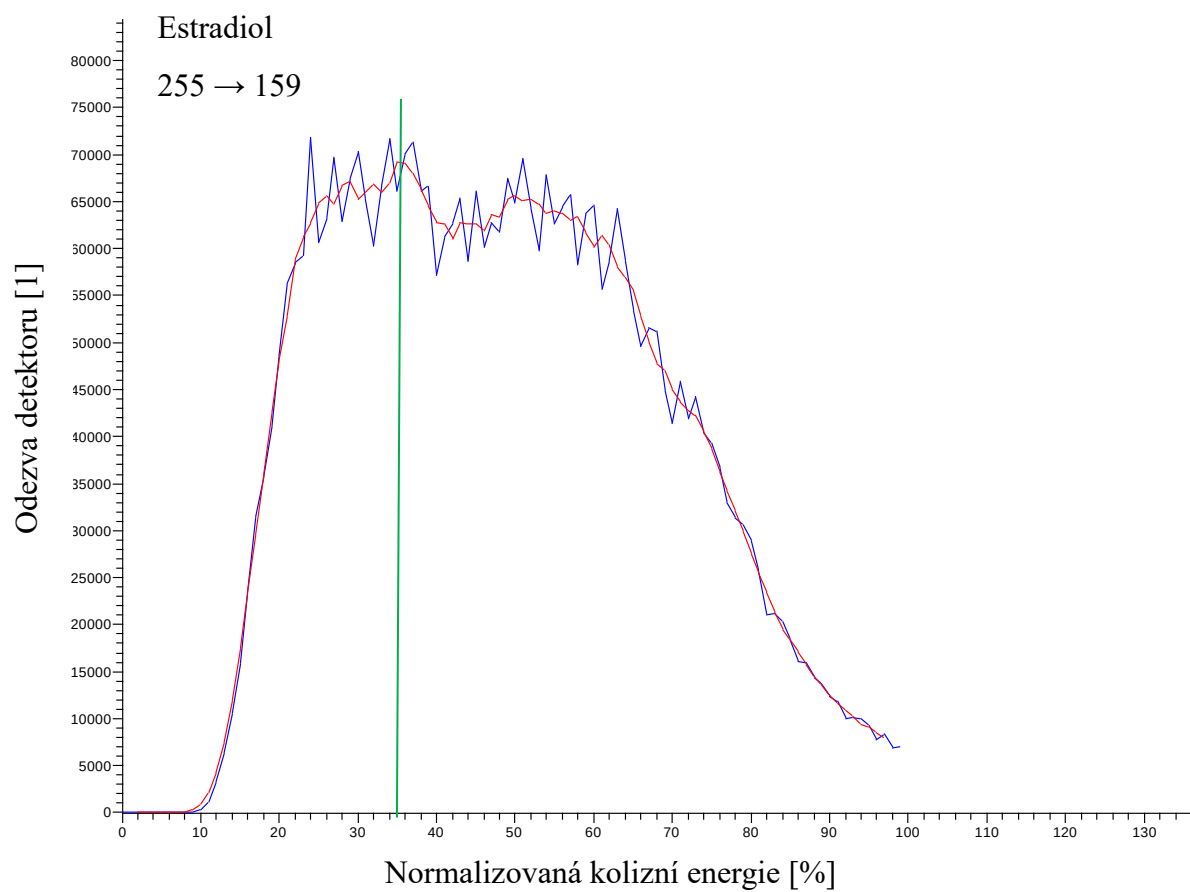


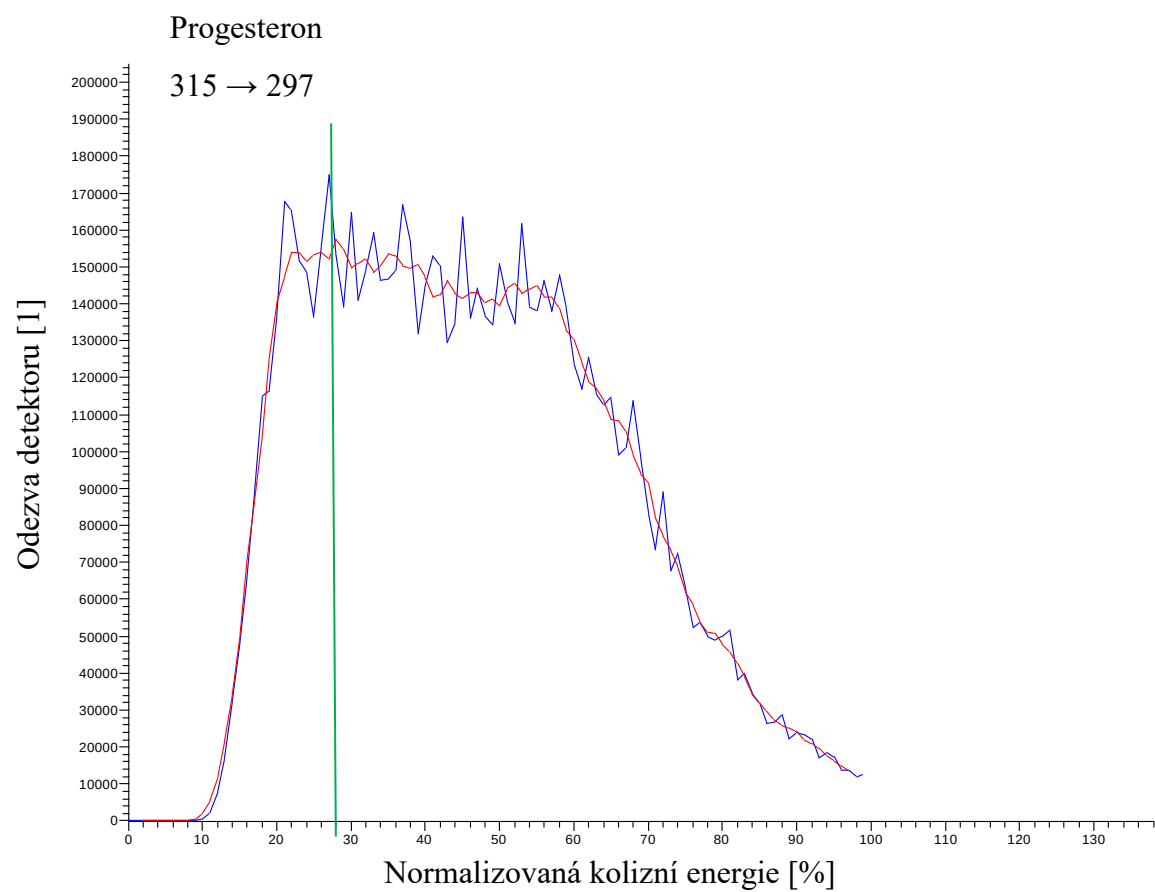




Příloha B – Grafy optimalizace normalizované kolizní energie







Příloha C – Hodnocení linearity kalibračních křivek

Analyt	Označení analytu	MRM přechod	Rovnice kalibrační křivky	Koeficient determinace
Kortizol	F	363 → 327	$y = -0,00077 + 0,152134x$	$R^2 = 0,9972$
Kortikosteron	B	347 → 329	$y = 0,01215 + 0,10558x$	$R^2 = 0,9936$
Estradiol	E2	255 → 159	$y = 0,00154 + 0,0788905x$	$R^2 = 0,9981$
Estron	E1	271 → 253	$y = 0,00814 + 0,0839074x$	$R^2 = 0,9983$
Estron	E1	271 → 157	$y = -0,00471 + 0,105848x$	$R^2 = 0,9948$
Progesteron	P4	315 → 297	$y = 0,003432 + 0,0746791x$	$R^2 = 0,9988$

Kortizol 363 → 327			
Kalibrační roztok	Teoretická (nominální) koncentrace [µg/l]	Experimentálně zjištěná koncentrace [µg/l]	Relativní diference [%]
KK1A	0,100	0,105	5
KK1B		0,113	13
KK1C		0,117	17
KK1D		0,118	18
KK2A	0,200	0,194	-3
KK2B		0,228	14
KK2C		0,213	6
KK2D		0,212	6
KK3A	0,500	0,460	-8
KK3B		0,519	4
KK3C		0,488	-2
KK3D		0,447	-11
KK4A	0,750	0,771	3
KK4B		0,775	3
KK4C		0,731	-3
KK4D		0,731	-3
KK5A	1,000	0,998	0
KK5B		0,968	-3
KK5C		0,996	0
KK5D		1,002	0
KK6A	1,500	1,457	-3
KK6B		1,436	-4
KK6C		1,424	-5
KK6D		1,453	-3
KK7A	2,000	1,927	-4
KK7B		2,095	5
KK7C		2,111	6
KK7D		1,987	-1
KK8A	5,000	4,772	-5
KK8B		5,122	2
KK8C		4,981	0
KK8D		5,174	3
KK9A	7,500	7,911	5
KK9B		7,311	-3
KK9C		7,460	-1
KK9D		7,645	2
KK10A	10,000	9,482	-5
KK10B		9,479	-5
KK10C		10,361	4
KK10D		10,424	4

Kortikosteron 347 → 329			
Kalibrační roztok	Teoretická (nominální) koncentrace [µg/l]	Experimentálně zjištěná koncentrace [µg/l]	Relativní diference [%]
KK1A	0,100	0,117	17
KK1B		0,106	6
KK1C		0,102	2
KK1D		0,112	12
KK2A	0,200	0,205	3
KK2B		0,228	14
KK2C		0,220	10
KK2D		0,227	14
KK3A	0,500	0,525	5
KK3B		0,503	1
KK3C		0,500	0
KK3D		0,507	1
KK4A	0,750	0,751	0
KK4B		0,761	1
KK4C		0,732	-2
KK4D		0,730	-3
KK5A	1,000	0,988	-1
KK5B		0,946	-5
KK5C		1,016	2
KK5D		0,951	-5
KK6A	1,500	1,539	3
KK6B		1,576	5
KK6C		1,516	1
KK6D		1,573	5
KK7A	2,000	2,052	3
KK7B		1,896	-5
KK7C		1,917	-4
KK7D		1,968	-2
KK8A	5,000	4,616	-8
KK8B		4,944	-1
KK8C		5,445	9
KK8D		4,930	-1
KK9A	7,500	7,227	-4
KK9B		7,401	-1
KK9C		7,595	1
KK9D		7,596	1
KK10A	10,000	8,853	-11
KK10B		10,316	3
KK10C		10,099	1
KK10D		10,911	9

Estradiol 255 → 159			
Kalibrační roztok	Teoretická (nominální) koncentrace [µg/l]	Experimentálně zjištěná koncentrace [µg/l]	Relativní diference [%]
KK2A	0,200	0,210	5
KK2B		0,204	2
KK2C		0,170	-15
KK2D		0,205	2
KK3A	0,500	0,514	3
KK3B		0,428	-14
KK3C		0,529	6
KK3D		0,502	0
KK4A	0,750	0,739	-1
KK4B		0,725	-3
KK4C		0,740	-1
KK4D		0,740	-1
KK5A	1,000	1,040	4
KK5B		0,932	-7
KK5C		0,922	-8
KK5D		0,982	-2
KK6A	1,500	1,467	-2
KK6B		1,523	2
KK6C		1,550	3
KK6D		1,585	6
KK7A	2,000	1,879	-6
KK7B		1,948	-3
KK7C		2,017	1
KK7D		2,063	3
KK8A	5,000	5,072	1
KK8B		4,975	0
KK8C		4,973	-1
KK8D		5,044	1
KK9A	7,500	7,571	1
KK9B		7,733	3
KK9C		7,545	1
KK9D		7,695	3
KK10A	10,000	9,682	-3
KK10B		10,519	5
KK10C		9,604	-4
KK10D		9,775	-2

Estron 271 → 253			
Kalibrační roztok	Teoretická (nominální) koncentrace [µg/l]	Experimentálně zjištěná koncentrace [µg/l]	Relativní diference [%]
KK2A	0,200	0,197	-2
KK2B		0,187	-6
KK2C		0,182	-9
KK2D		0,201	0
KK3A	0,500	0,542	8
KK3B		0,486	-3
KK3C		0,491	-2
KK3D		0,496	-1
KK4A	0,750	0,715	-5
KK4B		0,764	2
KK4C		0,779	4
KK4D		0,741	-1
KK5A	1,000	1,021	2
KK5B		1,025	2
KK5C		0,981	-2
KK5D		1,024	2
KK6A	1,500	1,460	-3
KK6B		1,578	5
KK6C		1,454	-3
KK6D		1,453	-3
KK7A	2,000	2,123	6
KK7B		2,051	3
KK7C		2,083	4
KK7D		1,866	-7
KK8A	5,000	4,864	-3
KK8B		5,146	3
KK8C		4,863	-3
KK8D		5,034	1
KK9A	7,500	7,227	-4
KK9B		7,610	1
KK9C		7,319	-2
KK9D		7,725	3
KK10A	10,000	9,922	-1
KK10B		9,584	-4
KK10C		10,432	4
KK10D		10,178	2

Estron 271 → 157			
Kalibrační roztok	Teoretická (nominální) koncentrace [µg/l]	Experimentálně zjištěná koncentrace [µg/l]	Relativní diference [%]
KK2A	0,200	0,230	15
KK2B		0,224	12
KK2C		0,218	9
KK2D		0,236	18
KK3A	0,500	0,506	1
KK3B		0,509	2
KK3C		0,560	12
KK3D		0,498	0
KK4A	0,750	0,753	0
KK4B		0,731	-3
KK4C		0,781	4
KK4D		0,739	-2
KK5A	1,000	1,051	5
KK5B		0,968	-3
KK5C		0,930	-7
KK5D		1,023	2
KK6A	1,500	1,437	-4
KK6B		1,631	9
KK6C		1,454	-3
KK6D		1,563	4
KK7A	2,000	2,141	7
KK7B		2,068	3
KK7C		1,906	-5
KK7D		1,983	-1
KK8A	5,000	4,690	-6
KK8B		5,076	2
KK8C		5,301	6
KK8D		4,694	-6
KK9A	7,500	6,987	-7
KK9B		7,401	-1
KK9C		7,246	-3
KK9D		7,631	2
KK10A	10,000	9,944	-1
KK10B		9,442	-6
KK10C		10,268	3
KK10D		10,981	10

Progesteron 315 → 297			
Kalibrační roztok	Teoretická (nominální) koncentrace [µg/l]	Experimentálně zjištěná koncentrace [µg/l]	Relativní diference [%]
KK1A	0,100	0,097	-3
KK1B		0,095	-5
KK1C		0,084	-16
KK1D		0,083	-17
KK2A	0,200	0,189	-6
KK2B		0,212	6
KK2C		0,174	-13
KK2D		0,203	2
KK3A	0,500	0,528	6
KK3B		0,480	-4
KK3C		0,471	-6
KK3D		0,533	7
KK4A	0,750	0,696	-7
KK4B		0,749	0
KK4C		0,740	-1
KK4D		0,745	-1
KK5A	1,000	0,910	-9
KK5B		1,100	10
KK5C		1,018	2
KK5D		0,973	-3
KK6A	1,500	1,560	4
KK6B		1,513	1
KK6C		1,514	1
KK6D		1,515	1
KK7A	2,000	2,007	0
KK7B		1,992	0
KK7C		2,025	1
KK7D		1,997	0
KK8A	5,000	4,989	0
KK8B		5,253	5
KK8C		4,788	-4
KK8D		5,066	1
KK9A	7,500	7,282	-3
KK9B		7,601	1
KK9C		7,632	2
KK9D		7,337	-2
KK10A	10,000	9,930	-1
KK10B		9,615	-4
KK10C		10,214	2
KK10D		10,291	3

Příloha D – Instrumentální meze detekce a stanovitelnosti

Analyt	Vzorek	Koncentrace [µg/l]	Výška šumu	Výška píku	S/N	Průměr S/N	IDL [µg/l]	Průměrná IDL [µg/l]	IQL [µg/l]	Průměrná IQL [µg/l]
Kortizol 363 → 327	KK1A	0,100	5	95	19	16	0,016	0,020	0,053	0,068
	KK1B		5	95	19		0,016		0,053	
	KK1C		5	90	18		0,017		0,056	
	KK1D		10	90	9		0,033		0,111	
Kortikosteron 347 → 329	KK1A	0,100	7	85	12	16	0,025	0,019	0,082	0,064
	KK1B		6	85	14		0,021		0,071	
	KK1C		4	85	21		0,014		0,047	
	KK1D		5	88	18		0,017		0,057	
Estradiol 255 → 159	KK2A	0,200	4	88	22	12	0,027	0,056	0,091	0,188
	KK2B		9	86	10		0,063		0,209	
	KK2C		10	88	9		0,068		0,227	
	KK2D		10	89	9		0,067		0,225	
Estron 271 → 253	KK2A	0,200	10	70	7	10	0,086	0,063	0,286	0,210
	KK2B		7	66	9		0,064		0,212	
	KK2C		5	70	14		0,043		0,143	
	KK2D		7	70	10		0,060		0,200	
Estron 271 → 157	KK2A	0,200	30	80	3	5	0,225	0,138	0,750	0,460
	KK2B		15	85	6		0,106		0,353	
	KK2C		20	80	4		0,150		0,500	
	KK2D		10	85	9		0,071		0,235	
Progesteron 315 → 297	KK1A	0,100	8	75	9	10	0,032	0,033	0,107	0,108
	KK1B		10	72	7		0,042		0,139	
	KK1C		8	74	9		0,032		0,108	
	KK1D		6	75	13		0,024		0,080	

Příloha E – Přesnost a správnost metody

Kortizol 363 → 327						
Vzorek	Opakování	Množství [μg/l]		Relativní množství [%]	Správnost [%]	SD [%]
		Očekávané	Zjištěné			
Vzorek obohacený o 1 μg/l	1	1,00	0,92	92	102	7,7
	2		1,03	103		
	3		1,11	111		
	4		1,01	101		
Vzorek obohacený o 10 μg/l	1	10,00	10,3	103	102	4,0
	2		10,3	103		
	3		10,4	104		
	4		9,57	96		

Kortikosteron						
347 → 329						
Vzorek	Opakování	Množství [µg/l]		Relativní množství [%]	Správnost [%]	SD [%]
		Očekávané	Zjištěné			
Vzorek obohacený o 1 µg/l	1	1,00	1,04	104	112	7,3
	2		1,16	116		
	3		1,20	120		
	4		1,08	108		
Vzorek obohacený o 10 µg/l	1	10,00	10,2	103	104	3,3
	2		10,2	103		
	3		10,8	108		
	4		10,0	101		

Estradiol 255 → 159						
Vzorek	Opakování	Množství [µg/l]		Relativní množství [%]	Správnost [%]	SD [%]
		Očekávané	Zjištěné			
Vzorek obohacený o 1 µg/l	1	1,00	1,06	106	110	5,0
	2		1,07	107		
	3		1,12	112		
	4		1,17	117		
Vzorek obohacený o 10 µg/l	1	10,00	10,1	101	109	7,1
	2		10,8	108		
	3		11,8	118		
	4		10,7	107		

Estron						
271 → 253						
Vzorek	Opakování	Množství [µg/l]		Relativní množství [%]	Správnost [%]	SD [%]
		Očekávané	Zjištěné			
Vzorek obohacený o 1 µg/l	1	1,00	0,36	36	69	44,5
	2		0,97	97		
	3		1,17	117		
	4		0,27	27		
Vzorek obohacený o 10 µg/l	1	10,00	4,35	44	57	38,1
	2		0,88	9		
	3		8,13	81		
	4		9,25	92		

Estron						
271 → 157						
Vzorek	Opakování	Množství [μg/l]		Relativní množství [%]	Správnost [%]	SD [%]
		Očekávané	Zjištěné			
Vzorek obohacený o 1 μg/l	1	1,00	1,22	122	119	14,3
	2		1,01	101		
	3		1,35	135		
	4		1,19	119		
Vzorek obohacený o 10 μg/l	1	10,00	10,0	101	96	9,2
	2		9,37	94		
	3		8,49	85		
	4		10,6	106		

Progesteron 315 → 297						
Vzorek	Opakování	Množství [μg/l]		Relativní množství [%]	Správnost [%]	SD [%]
		Očekávané	Zjištěné			
Vzorek obohacený o 1 μg/l	1	1,00	0,86	86	94	5,8
	2		0,98	98		
	3		0,98	98		
	4		0,95	95		
Vzorek obohacený o 10 μg/l	1	10,00	9,58	96	97	3,1
	2		9,56	96		
	3		10,1	101		
	4		9,45	94		

Příloha F – Výtěžnost extrakce

Analyt	Plocha píku IS [1]			Výtěžnost – slepý vzorek		Výtěžnost – vzorek trusu	
	MF	Slepý vzorek	Vzorek trusu	Opak. [%]	Průměr [%]	Opak. [%]	Průměr [%]
Kortizol 363 → 327	31 333	25 780	24 292	82		78	
	30 397	25 332	17 943	83	83	59	75
	30 490	25 172	26 642	83		87	
Kortikosteron 347 → 329	74 094	70 569	57 112	95		77	
	74 366	70 679	51 855	95	96	70	77
	73 247	72 509	61 813	99		84	
Estradiol 255 → 159	16 821	18 925	13 816	113		82	
	17 712	18 476	13 294	104	108	75	79
	17 891	19 178	14 091	107		79	
Estron 271 → 157	4 129	3 686	3 071	89		74	
	3 634	3 793	3 026	104	96	83	80
	3 863	3 682	3 218	95		83	
Progesteron 315 → 297	123 408	106 748	77 691	86		63	
	120 055	111 172	85 213	93	91	71	69
	119 496	111 232	85 692	93		72	