

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Taťána Gazárková

Školitel: prof. PharmDr. Lucie Nováková, Ph.D.

Název diplomové práce: Analýza steroidů ze skupiny androgenů a glukokortikoidů pomocí UHPSFC-MS/MS

Cílem této práce bylo vyvinout a optimalizovat metodu pro separaci směsi 37 steroidů pomocí ultra-vysokoučinné superkritické fluidní chromatografie s hmotnostní detekcí (UHPSFC–MS/MS). Analýzy probíhaly s využitím systému Acquity UPC² s hmotnostním detektorem typu trojitého kvadrupólu Xevo TQ-XS firmy Waters.

V prvním kroku byla nezbytná důsledná charakterizace prekurzorů jednotlivých analyzovaných látek s následným provedením Skenu produktových iontů a výběru vhodných SRM přechodů. Steroidy jsou izomerní a vzájemně izobarické látky poskytující často stejné prekurzorové ionty ($[M+H]^+$, $[M+H-H_2O]^+$, případně $[M+H-2H_2O]^+$) nebo obdobná fragmentační spektra. To je komplikováno skutečností, že ne vždy je nejintenzivnějším iontem spektra právě $[M+H]^+$, ale třeba i $[M+H-H_2O]^+$ iont, který je zároveň izobarickou m/z pro úplně jinou látku. Po pečlivém výběru SRM přechodů byla dále provedena optimalizace podmínek iontového zdroje pro pozitivní i negativní mód.

V dalším kroku byl proveden screening 18 stacionárních fází. Gradientová eluce využívala CO₂ (složka A) s 5 – 40 % MeOH + 0,1% NH₄OH (složka B) v průběhu 5 minut s následným izokratickým krokem při 40 % složky B po dobu 1 minuty. Podmínky separace byly nastaveny následovně: teplota 40 °C, průtok 1,5 ml/min, tlak 150 bar. V rámci screeningu bylo nejlepší separace dosaženo na kolonách Torus 1-AA a GreenSep Naphthyl HC, jejichž podmínky separace byly dále optimalizovány. Bylo testováno 5 mobilních fází s odlišnou eluční silou (MeOH, MeOH:ACN 1:1, EtOH, IPA, IPA:ACN 1:1) za různých podmínek gradientové eluce s variovanou délkou analýzy. Dále byla optimalizována teplota kolony v rozmezí 22 – 50 °C a testován vliv gradientových křivek 2, 4, 6, 8 a 10. Nejlepší selektivity separace bylo dosaženo na koloně Torus 1-AA (100 x 3,0 mm, 1,7 μm) při použití MeOH (složka B) v lineárním gradientu 1 až 20 % složky B, v délce analýzy 13 minut a následnou 2minutovou ekvilibrací kolony, při teplotě 22 °C.

Klíčová slova: androgeny; glukokortikoidy; steroidy; UHPSFC-MS/MS; vývoj metody; optimalizace

Poděkování: Tato práce vznikla za podpory projektu STARSS reg. č.: CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465 spolufinancovaného z EFRR.