

Quantitative Bestimmung eines Panels endogener Steroide in Humanserum mittels LC/MS/MS

Unter Verwendung von Agilent Chem Elut S-Platten für die unterstützte Flüssigextraktion (SLE)

Autor

Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

Zusammenfassung

Die mit Agilent Chem Elut S unterstützte Flüssigextraktion verwendet ein synthetisches Medium, um eine bessere Konsistenz und höhere Wasseradsorptionskapazitäten als mit herkömmlicher Diatomeenerde (DE) zu bieten. Die Studie zeigt die Anwendung der Chem Elut S 2 ml 96-Wellplates für die quantitative Bestimmung eines Panels von 15 endogenen Steroiden aus Humanserum mittels LC/MS/MS. Die Serumproben werden mittels unterstützter Flüssigextraktion (SLE) vorbereitet, um die Zielanalyten zu extrahieren und Matrixinterferenzen wie Salze, Proteine und teilweise Phospholipide zu beseitigen. Die gesamte Probenbehandlung wurde in einem Batch-Verfahren in einer 96-Wellplate durchgeführt. Dazu wurde das SLE-Sorbens zunächst mit der wässrigen Probe beladen. Danach erfolgte die Elution mittels Schwerkraft mit einem nicht mit Wasser mischbaren Lösemittel. Der Arbeitsablauf mit Chem Elut S in einer Mikrotiterplatte bietet im Vergleich zur herkömmlichen Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) erhebliche Einsparungen an Zeit und Arbeitsaufwand. Die etablierte SLE-Methode wurde für den weiten Kalibrierungsbereich von 5 bis 10 000 pg/ml der Zielsteroiden in Serum verifiziert, mit der Ausnahme von 10 bis 10 000 pg/ml für Estradiol und Testosteron sowie von 20 bis 10 000 pg/ml für Hydrocortison, 17-Hydroxypregnenolon und Progesteron. Die Methode erzielte für die Analyten eine hervorragende Präzision (80 bis 120 %) und Reproduzierbarkeit (RSD < 15 %). Darüber hinaus wurden die Selektivität der Methode und die Verschleppung untersucht. Die erhöhte Quantifizierungsgrenze (LOQ) für fünf Analyten lag an der Selektivität der Serummatrix. Darüber hinaus bietet das synthetische SLE-Sorbens im Vergleich zur SLE auf DE-Basis und der herkömmlichen LLE für das für die Extraktion verwendete Lösemittel eine bessere Entfernung von Phospholipiden aus flüssigen biologischen Matrices.

Einführung

Bisher wurde die herkömmliche LLE häufig für die Extraktion endogener Steroide aus biologischen Probenmatrices wie Serum und Plasma zur Analyse der Steroide mit oder ohne Derivatisierung verwendet.¹⁻³ In diesen Protokollen wurden biologische Proben wie Serum oder Plasma gewöhnlich in individuelle Mikrozentrifugenröhrchen aliquotiert, danach wurde das Extraktionslösemittel zugegeben. Nach dem Mischen und Zentrifugieren der Probe wurde die obere organische Phase zur nachfolgenden Probenbehandlung in einen weiteren Satz Röhrchen oder eine 96-Wellplate überführt. In der Praxis umfasst dieses Verfahren arbeitsintensive und zeitaufwändige Schritte wie das Beschriften der Röhrchen, das Mischen der Proben, die Trennung der Phasen und die Überführung der organischen Phase, die hier als geschwindigkeitsbegrenzende Schritte für die Probenvorbereitung mit hohem Durchsatz zu nennen sind.

Diese Nachteile sind bei der SLE als Alternative zur LLE nicht gegeben. Das Sorbens der SLE-Kartuschen bietet eine chemisch inerte Oberfläche für die wässrigen Proben, die sich in einer Schicht auf das Material legen. Nach der Äquilibrierung werden die Zielanalyten mit einem mit Wasser nicht mischbaren Lösemittel mittels Schwerkraft, leichtem Vakuum oder Druck eluiert, wobei die wässrige Phase in der Kartusche verbleibt. Aufgrund der großen Fläche der wässrigen Schicht, die das SLE-Sorbens bietet, werden die Zielanalyten effizient in das organische Lösemittel extrahiert, während dieses durch das Sorbens fließt. Abbildung 1 zeigt das Extraktionsverfahren. Mit der SLE sind Mischungsschritte nicht erforderlich und Emulsionen können effizient vermieden werden.

Darüber hinaus ermöglicht der enge Kontakt zwischen der wässrigen und organischen Phase eine effiziente Verteilung, was zu hohen Wiederfindungsraten der Analyten führt. Aufgrund der Arbeitsabläufe beim Beladen und Eluieren ist der SLE-Arbeitsablauf einfach und erfordert deutlich weniger Zeit und Aufwand. Schließlich eignet sich die SLE im 96-Wellplate-Format besonders gut für die Automatisierung, was den Durchsatz der Probenvorbereitung erhöht.

Das üblicherweise für die SLE verwendete Sorbens ist hochreine Diatomeenerde. Bei Diatomeenerde handelt es sich jedoch um ein natürliches Material, das aus unregelmäßig geformten, versteinerten Mikroorganismen besteht. Daher ist es schwierig, die Konsistenz der Sorbenspartikel von Charge zu Charge

zu steuern. Die Sorbensvariabilität macht die Produktherstellung und die Qualitätskontrolle jedoch schwierig und führt zu einer inkonsistenten Produktleistung. Außerdem kann bei Diatomeenerde im Vergleich zu einem synthetischen Medium eine geringere und nicht konsistente Wasseradsorptionskapazität auftreten.

Das synthetische Sorbens Chem Elut S verbessert die Wasseradsorptionskapazität, die Konsistenz von Charge zu Charge und die Leistungskonsistenz erheblich. Diese Application Note zeigt die Anwendung der Chem Elut S 96-Wellplates für die quantitative Bestimmung eines Panels von 15 endogenen Steroiden (Tabelle 1) in Humanserum.

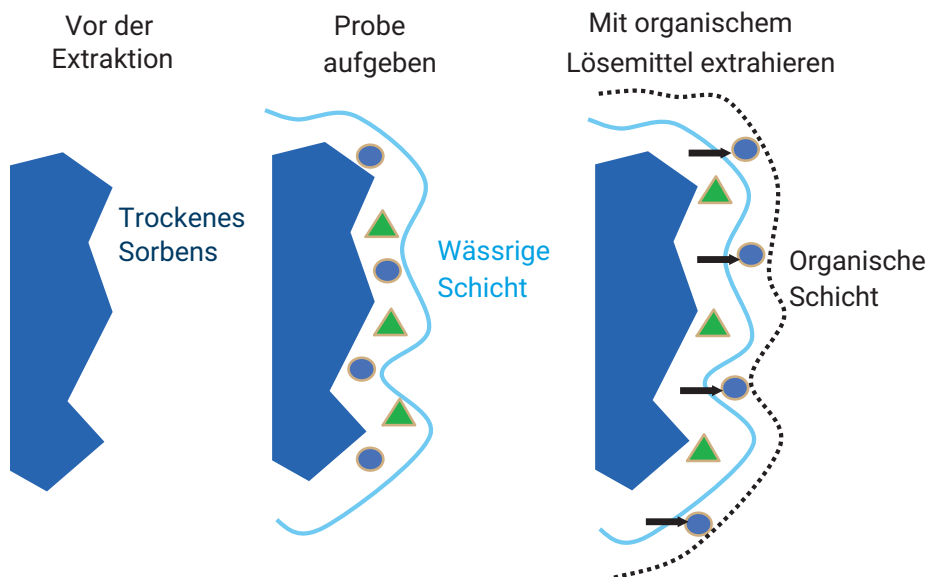
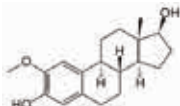
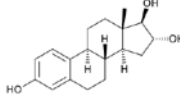
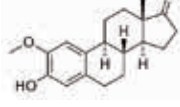
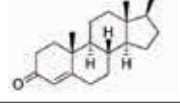
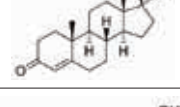
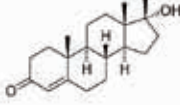
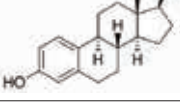
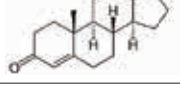
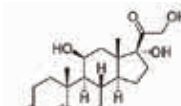
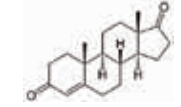
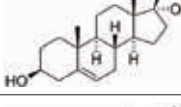
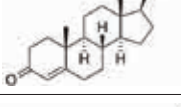
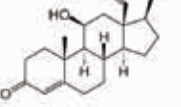
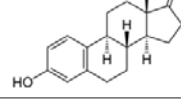
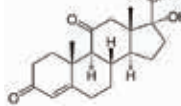


Abbildung 1: Verfahren und Analytextraktionsmechanismus der SLE.

Tabelle 1: Molekularformeln und Strukturen für 15 Zielsteroidoide.

Bezeichnung	Log P	Molekularformel	Struktur
2-Methoxyestradiol (2-MeE1)	4	$C_{19}H_{26}O_3$	
Estriol (E2)	2,5	$C_{18}H_{24}O_3$	
2-Methoxyestron (2-MeE1)	3,1	$C_{19}H_{24}O_3$	
Progesteron (PGT)	3,9	$C_{21}H_{30}O_2$	
17-Hydroxyprogesteron (17-OH PGT)	3,2	$C_{21}H_{30}O_3$	
11-Desoxycortisol (11-DCTS)	2,5	$C_{21}H_{30}O_4$	
Estradiol (E2)	4	$C_{18}H_{24}O_2$	
Testosteron (TTS)	3,4	$C_{19}H_{26}O_2$	

Bezeichnung	Log P	Molekularformel	Struktur
Hydrocortison (HCTS)	1,6	$C_{21}H_{30}O_5$	
Androstendion (ASD)	2,7	$C_{19}H_{26}O_2$	
17-α-Hydroxypregnenolon (17-OH PGN)	3,1	$C_{21}H_{32}O_3$	
11-Desoxycorticosteron (11-DCCS)	2,9	$C_{21}H_{30}O_3$	
Aldosteron	1,1	$C_{21}H_{28}O_5$	
Estron (E1)	3,1	$C_{18}H_{22}O_2$	
Cortison (CTS)	1,5	$C_{21}H_{28}O_5$	

Experimentelles

Reagenzien und Chemikalien

Alle Reagenzien und Lösemittel waren von HPLC- oder Analysenqualität. Methanol (MeOH) wurde von Honeywell (Muskegon, MI, USA), Methyl-tert.-butylether (MTBE) von VWR-BDH Chemicals (Radnor, PA, USA) und Ethylacetat (EtOAc) von J.T. Baker (Center Valley, PA, USA) bezogen. Ammoniumfluorid, alle Steroidstandards und internen Standard-Stammlösungen, entweder 1 mg/ml in MeOH oder

100 µg/ml in MeOH, wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) bezogen. Humanserum (DC Mass Spect Gold, MSG4000) wurde von Golden West Biologicals, Inc. (Temecula, CA, USA) erworben. Das Serum wurde bis zur Verwendung bei -70 °C aufbewahrt.

Standards und Lösungen

Die Standardlösung für eine definierte Zugabe wurde mit einer Konzentration von 500 ng/ml in MeOH:Wasser=1:1 hergestellt, die Lösung des internen Standards zur

definierten Zugabe mit einer Konzentration von 50 ng/ml in MeOH:Wasser=1:1. Steroidverbindungen reagieren - insbesondere in geringen Konzentrationen - empfindlich auf Glasoberflächen. Daher ist es wichtig, zur Herstellung und Aufbewahrung aller Lösungen für definierte Zugaben Kunststoffröhrchen zu verwenden. Alle Lösungen für definierte Zugaben wurden bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Zur Herstellung der 1 mM Ammoniumfluoridlösung (NH_4F) in Wasser und MeOH wurden 37,04 mg NH_4F in 1 l Milli-Q-Wasser und MeOH aufgelöst. Die 0,2 mM NH_4F -Lösung in Wasser (mobile Phase A) und die 0,2 mM NH_4F -Lösung in MeOH (mobile Phase B) wurden durch Verdünnung der 1 mM Lösungen mit Milli-Q-Wasser bzw. MeOH hergestellt.

Das Extraktionslösungsmittel, MTBE/EtOAc=1:1, wurde durch Mischen von jeweils 100 ml MTBE und EtOAc täglich frisch hergestellt. Zur Aufnahme der trockenen Proben nach der SLE wurde eine Lösung von MeOH:Wasser=1:1 verwendet.

Ausrüstung und Material

Für die Probenvorbereitung eingesetzte Geräte :

- Centra CL3R-Zentrifuge (Thermo IEC, MA, USA)
- Multiröhrchen-Vortexer (VWR, PA, USA)
- Eppendorf-Pipetten und Mehrkanalpipette
- SPE Dry 96 Verdampfer
- Agilent Überdruckverteiler-Prozessor 96 (PPM-96, Bestellnummer 5191-4116)
- Pipettiergerät ViaFlo 96 (Integra, Hudson, NH, USA)
- Agilent Chem Elut S 2 ml 96-Wellplate, 200 μl (Bestellnummer 5610-2003)
- Agilent 2-ml-Sammelplatte für Platten mit 96 viereckigen Wells (Best.-Nr. 5133009)
- Agilent Dichtungsdeckel für Platten mit 96 viereckigen Wells (Best.-Nr. 5133005)

Gerätebedingungen

Die Proben wurden auf einem Agilent 1290 Infinity LC-System analysiert, das aus folgenden Komponenten bestand: einer Agilent 1290 Infinity binären Pumpe (G4220A), einem automatischen Agilent 1290 Infinity Hochleistungs-Probengeber (G4226A) und einem Agilent 1290 Infinity Säulenthermostat (G131C). Das UHPLC-System wurde mit

einem Agilent G6490 Triple Quadrupol LC/MS-System gekoppelt, ausgestattet mit einer Agilent Jet Stream iFunnel-Elektrospray-Ionenquelle. Die Agilent MassHunter Workstation-Software wurde für die Datenakquisition und die Analyse eingesetzt.

Analytparameter sind in Tabelle 2 aufgeführt; Abbildung 2 zeigt das LC/MS/MS-Chromatogramm für 1 ng/ml Steroide in Serum.

HPLC-Bedingungen			
Säule	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 100 × 2,1 mm, 1,8 µm (Best.-Nr. 959758-902) Agilent ZORBAX RRHD C18 Vorsäule, 5 × 2,1 mm, 1,8 µm (Best.-Nr. 821725-901)		
Flussrate	0,4 ml/min		
Säulentemperatur	40 °C		
Injektionsvolumen	20 µl		
Mobile Phase	A) 0,2 mM Ammoniumfluorid in Wasser B) 0,2 mM Ammoniumfluorid in MeOH		
Nadelspülung	1:1:1:1 ACN:MeOH/IPA/H ₂ O mit 0,2 % Ameisensäure		
Gradient	Zeit (min)	% B	Flussrate (ml/min)
	0	50	0,4
	3,0	60	0,4
	8,0	90	0,4
	8,5	100	0,4
Stoppzeit	8,5 Minuten		
Nachlaufzeit	2,5 Minuten		
MS-Bedingungen			
Gastemperatur	180 °C		
Gasfluss	11 l/min		
Zerstäuber	20 psi		
Sheathgas-Heizung	400 °C		
Sheathgas-Fluss	10 l/min		
Kapillare	3500 V (positiv) 3000 V (negativ)		
iFunnel-Parameter	Hochdruck RF: 150 V (positiv und negativ) Tiefdruck RF: 100 V (positiv und negativ)		
Datenerfassung	dMRM		

Tabelle 2: Steroidanalyten, verwendeter IS, Retentionszeiten und MRM-Bedingungen.

Analyt	Verwendeter Interner Standard	Retentionszeit (min)	Polarität	Vorläufer-Ion (m/z)	Produkt-Ion (m/z)			
					Quantifizierung	CE (V)	Qualifizierung	CE (V)
Estriol	IS 1	2,04	NEG	287,2	171,0	45	143,1	73
Aldosteron-D ₄ (IS1)		2,31	POS	365,2	347,1	17	319,2	21
Aldosteron	IS 1	2,32	POS	361,2	343,2	17	91,1	80
Cortison-D ₈ (IS2)		2,71	POS	369,2	169,2	21	125,1	49
Cortison	IS 2	2,75	POS	361,2	163,2	25	91,0	73
Hydrocortison	IS 2	3,24	POS	363,2	121,1	25	91,1	73
17-Hydroxypregnenolon	IS 2	3,24	NEG	331,2	313,2	21	--	
11-Desoxycortisol-D ₅ (IS3)		4,53	POS	352,3	100,0	37	113,0	45
11-Desoxycortisol	IS 3	4,58	POS	347,2	109,0	41	97,0	41
Androstendion	IS 3	5,31	POS	287,2	97,0	25	109,0	29
Estradiol-D ₅ (IS4)		5,39	NEG	276,2	147,0	45	187,0	49
Estron- ¹³ C ₃ (IS5)		5,43	NEG	272,3	148,0	41	146,0	61
Estron	IS 5	5,42	NEG	269,1	145,0	49	143,1	73
Estradiol	IS 4	5,45	NEG	271,2	145,1	49	183,0	49
11-Desoxycorticosteron	IS 3	5,72	POS	331,0	97,1	25	109,1	33
2-Methoxyestron	IS 5	5,85	NEG	299,2	284,1	25	--	--
Testosteron	IS 6	5,86	POS	289,3	97,1	23	109,1	25
2-Methoxyestradiol	IS 4	6,01	NEG	301,2	286,2	25	--	--
17-Hydroxyprogesteron-D ₈ (IS6)		6,21	POS	339,3	100,1	45	113,2	37
17-Hydroxyprogesteron	IS 6	6,26	POS	331,2	109,1	33	97,1	29
Progesteron-D ₉ (IS7)		7,39	POS	324,3	100,1	29	113,0	25
Progesteron	IS 7	7,44	POS	315,2	97,1	25	108,9	37

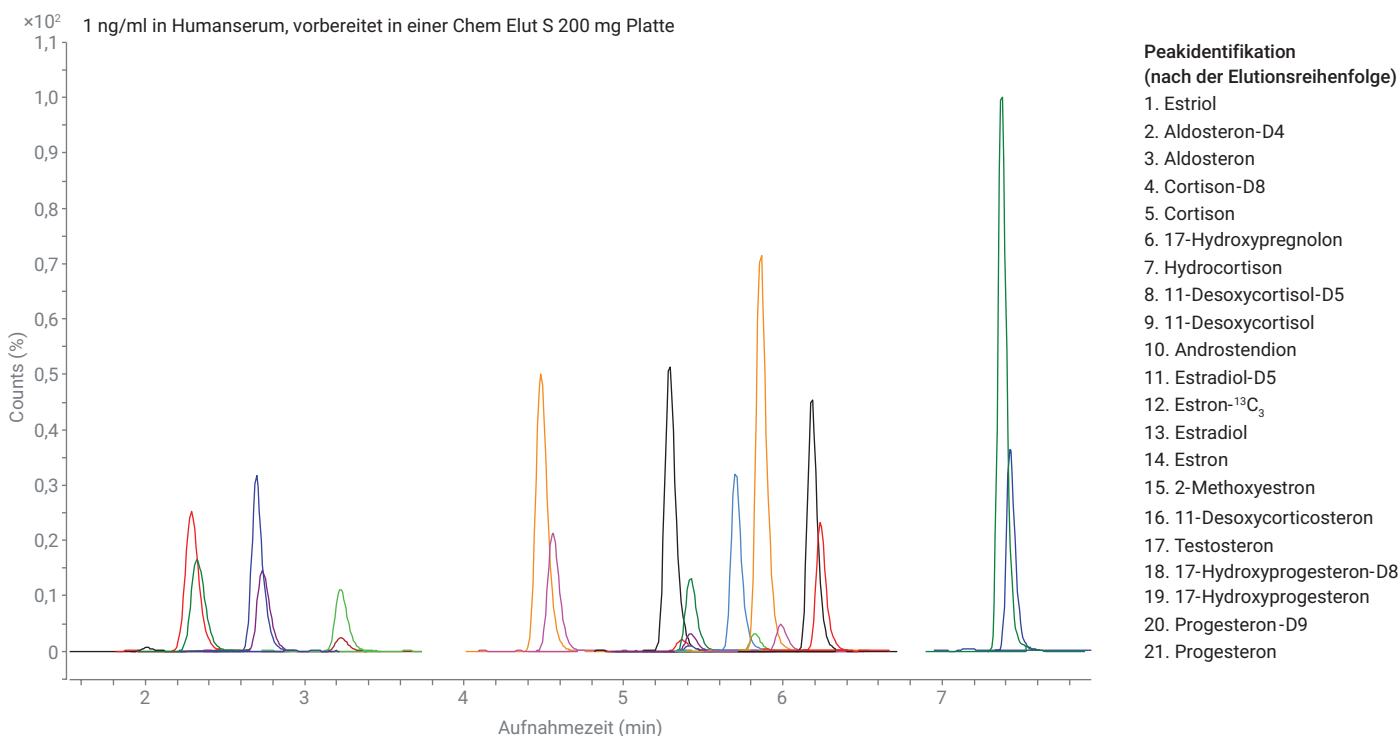


Abbildung 2: LC/MS/MS-Chromatogramm von 1 ng/ml Steroiden in Serum, vorbereitet mit der Methode der unterstützten Flüssigextraktion mit Agilent Chem Elut S.

Kalibrierungsstandards und QC-Probenvorbereitung

Aus einer Standardlösung für die definierte Zugabe mit 500 ng/ml (in MeOH:Wasser=1:1) wurde eine intermediäre Standardlösung mit 50 ng/ml als Spike hergestellt. Diese intermediäre Standard-Spiking-Lösung wurde dann verwendet, um Standards für die Kalibrierungskurve in Humanserum herzustellen. Die Kalibrierungsstandards, 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1000, 5000 und 10 000 pg/ml in Serum, wurden hergestellt, indem eine Serum-Blindprobe mit den entsprechenden Volumen der intermediären Standardlösung versetzt wurde. i Qualitätskontrollproben (QC-Proben) mit vier unterschiedlichen Konzentrationen wurden für Tests zur Verifizierung der Methode auf Präzision und Genauigkeit hin untersucht. Die verwendeten Konzentrationen waren die niedrigste Quantifizierungsgrenze (LLOQ) mit 5 (10/20) pg/ml, die mittlere QC-Probe mit 100 pg/ml, die hohe QC-Probe mit 1000 pg/ml und die höchste Quantifizierungsgrenze (HLOQ) mit 10 000 pg/ml. Diese QC-Proben wurden ebenfalls durch die definierte Zugabe des entsprechenden Volumens einer intermediären Serumprobe hergestellt. Alle Kalibrierungsstandards und QC-Proben wurden in 2-ml-Röhrchen mit Schnapdeckel oder 5-ml-Kunststoffröhrchen vorbereitet. Sie wurden dann zur Extraktion in die 96-Wellplate aliquotiert.

Probenextraktion

Die Optimierung der unterstützten Flüssigextraktion wurde im Hinblick auf Analytwiederfindung und Matrixaufreinigung sowie Elutionsvolumina und Elutionszeiten und zur Auswahl des Lösemittels durchgeführt. Abbildung 3 beschreibt das optimale Probenvorbereitungsverfahren im Detail. Das Protokoll umfasst vier Hauptteile: Aliquotierung der Probe auf der Platte, Mischung mit einem internem Standard und Überführung auf die SLE-Platte, Probenextraktion auf der SLE-Platte

und Nachbehandlung der Probe auf der Sammelplatte. Serumproben wurden in eine 1-ml-Sammelplatte aliquotiert. Danach erfolgte die Zugabe der IS-Lösung für die definierte Zugabe. Nach dem Vortexen wurde die gesamte Probenmischung auf eine Chem Elut S 2-ml-Platte mit einer viereckigen 2-ml-Sammelplatte darunter überführt. Das Extraktionslösungsmittel muss vorsichtig

in die SLE-Platte zugegeben werden, um zu vermeiden, dass etwaige Spritzer zu Kreuzkontaminationen führen. Die Elution erfolgte mittels Schwerkraft, bis im letzten Trocknungsschritt langsam Druck bzw. Vakuum angelegt wurde. Aufgrund der Flüchtigkeit der für die Extraktion verwendeten Lösemittel MTBE und EtOAc ist es wichtig, die Extraktionsschritte in einem Abzug durchzuführen.

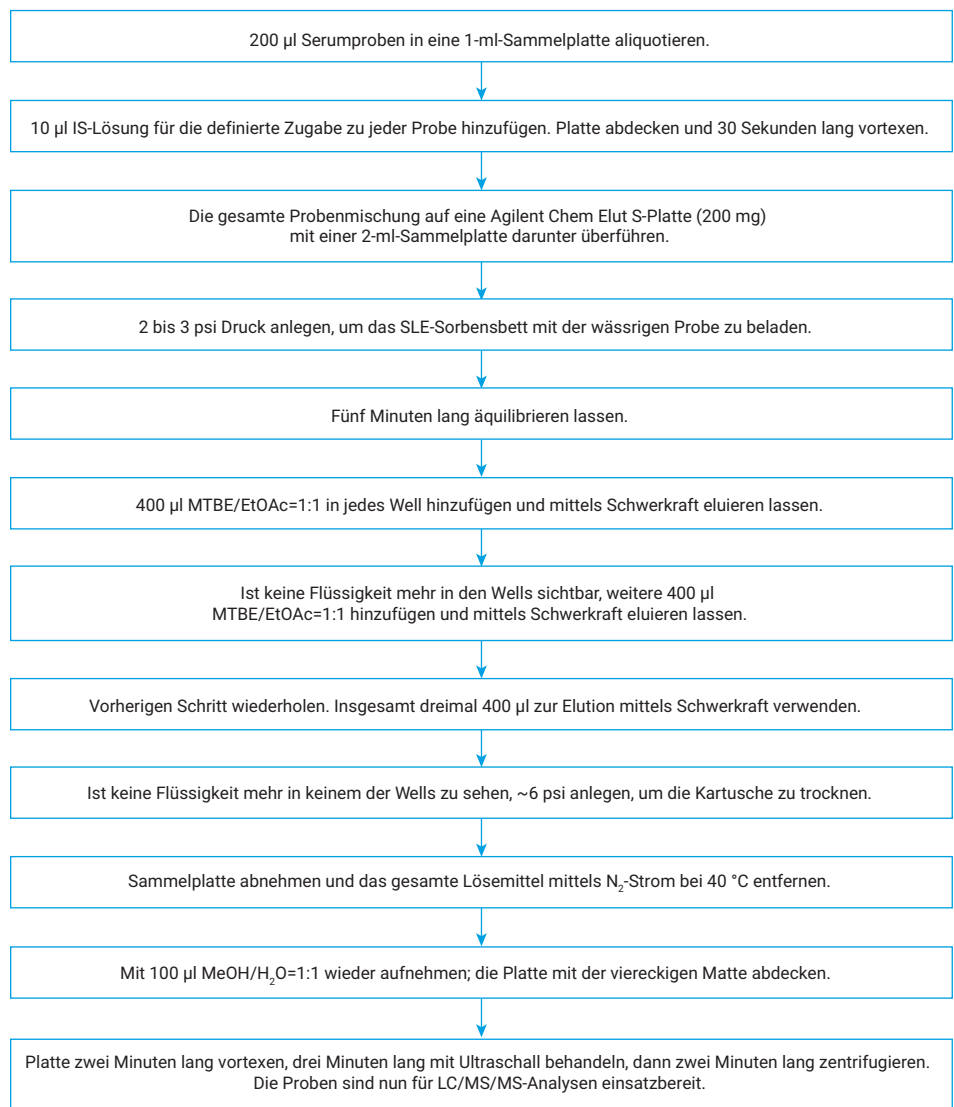


Abbildung 3: Schema des Arbeitsablaufs zur Probenvorbereitung für die Analyse von Steroiden in Serum mit der Agilent Chem Elut S 2 ml Platte, 200 µl.

Verifizierung der Methode

Die Verifizierung der Methode umfasste einen dreitägigen Test auf Präzision und Genauigkeit. Da für den Test auf Präzision und Genauigkeit an jedem Tag SLE-Platten aus drei verschiedenen Chargen verwendet wurden, wurde der dreitägige Test zur Verifizierung der Methode auch als Test auf Reproduzierbarkeit der SLE-Platten von Charge zu Charge verwendet. Das Spiking der Kalibrierungsstandards als auch der QC-Proben wurde vor der Extraktion durchgeführt. Die Proben wurden in folgender Sequenz in eine Sammelplatte aliquotiert: Matrix-Doppelblindprobe, Matrix-Blindprobe (mit definierter Zugabe des internen Standards), erster Satz Kalibrierungsstandards, zwei bis drei Matrix-Blindproben, LLOQ-Proben (n = 6), mittlere QC-Proben (n = 6), hohe QC-Proben (n = 6) und HLOQ-Proben (n = 6), zwei bis drei Verschleppungs-Matrix-Blindproben, Matrix-Doppelblindprobe, Matrix-Blindprobe, ein zweiter Satz Kalibrierungsstandards, zwei bis drei Matrix-Blindproben.

Methoden- und Produktvergleich

Die verifizierte SLE-Methode wurde außerdem mit der LLE und der SLE auf DE-Basis in Bezug auf Analytwiederfindung, Reproduzierbarkeit (relative Standardabweichungen), Matrixeffekte und Linearität der Kalibrierungskurve verglichen.

Die absolute Analytwiederfindung wurde durch den Vergleich der Geräteresponse (Peakflächen) der Analyten zwischen QC-Proben mit definierter Zugabe vor und nach der Extraktion (1 ng/ml in Serum) untersucht. Die definierte Zugabe zu QC-Proben vor der Extraktion erfolgte direkt ins Serum, die Proben wurden dann mit der entwickelten Methode vorbereitet. Die definierte Zugabe zu QC-Proben nach der Extraktion erfolgte nach der Extraktion in die Matrix-Blindproben. Im Detail erfolgte die definierte Zugabe nach der Extraktion während der Wiederaufnahme der Probe, indem die entsprechende reine Standardlösung verwendet wurde, um die getrockneten Matrix-Blindproben wieder aufzunehmen. Matrixeffekte wurden untersucht, indem die Geräteresponse (Peakflächen) der Analyten von QC-Proben mit definierter Zugabe nach der Extraktion mit den entsprechenden reinen Standards in Lösemittel-Blindproben verglichen wurden.

Entfernung von Phospholipiden aus der Matrix

Die Aufreinigung der Matrix wurde durch Überwachung des Phospholipidprofils untersucht. Die Extraktion der Serumproben mittels Chem Elut S-Platten ergab eine teilweise Entfernung der Phospholipide. Die Phospholipidprofile der Matrix-Blindproben wurden sowohl für Serumproben, aus denen die Hormone entfernt wurden, als auch für andere Plasmaarten verglichen. Der Effekt unterschiedlicher Extraktionslösungsmittel auf die Entfernung der Phospholipide wurde weiterhin mit Chem Elut S-Platten und entsprechenden SLE-Platten auf DE-Basis eines anderen Herstellers verglichen.

Ergebnisse und Diskussion

Diese Studie fokussierte sich darauf die Anwendung von Chem Elut S-Platten zur quantitativen Bestimmung von Steroiden in Serum für Applikationen in der klinischen Forschung zu demonstrieren.

Methodenentwicklung und -optimierung

Gerätemethoden und besondere Maßnahmen:

Die Ionisierung von fünf Steroiden, Estriol, Östrogen, Estradiol, 2-Methoxyöstrogen und 2-Methoxyestradiol, mit einer ESI- oder APCI-Ionenquelle ist äußerst schwierig. Unter normalen Bedingungen ist es schwierig, Signale für diese Verbindungen, selbst in hohen Konzentrationen, zu erhalten. Die Derivatisierung ist für diese Verbindungen eine Möglichkeit, aber sie erfordert zusätzliche Schritte bei der Probenvorbereitung. Darüber hinaus ist es schwierig, eine kombinierte Methode zur Probenvorbereitung für die Steroidanalyse mit und ohne Derivatisierung durchzuführen. In der Literatur wurde berichtet, dass die Verwendung von Ammoniumfluoridpuffer die Ionisierung im negativen Ionenmodus unterstützt⁴ und die Empfindlichkeit der Steroidanalytik drastisch verbessert.⁵ Daher wurde ein 1 mM Ammoniumfluoridpuffer als mobile Phase für diese schwierigen Steroidverbindungen verwendet; diese Maßnahme ergab eine erhebliche Verbesserung der analytischen Empfindlichkeit des Geräts. Weitergehende Untersuchungen bezüglich der Pufferkonzentration ergaben, dass eine geringere Ammoniumfluoridkonzentration (0,2 mM) eine bessere analytische Empfindlichkeit lieferte. Außerdem ergaben ähnliche Salzkonzentrationen sowohl in der mobilen Phase A als auch in B konsistentere Ergebnisse. Die optimalen Bedingungen waren 0,2 mM Ammoniumfluorid in Wasser als mobile Phase A und 0,2 mM Ammoniumfluorid in MeOH als mobile Phase B.

Die Verwendung des Ammoniumfluoridpuffers erhöhte nicht nur die Ionisierung dieser schwierigen Steroidverbindungen im negativen Modus, wie bereits erwähnt⁵, sondern erhöhte auch die Ionisierung anderer Verbindungen im positiven Modus. Basierend auf diesen Bedingungen wurde eine Gerätemethode für das gesamte Panel der 15 Steroidanalyten erstellt. Abbildung 4

zeigt die Chromatogramme für E1 und E2 bei einer Konzentration von 5 pg/ml in Serum, der Quantifizierungsgrenze (LOQ), als Nachweis der verbesserten analytischen Empfindlichkeit der Methode. Eine wichtige Erkenntnis ist, dass Steroidverbindungen sehr empfindlich gegenüber Glasoberflächen reagieren, insbesondere in geringen Konzentrationen. Die Verwendung von Probenflaschen aus

Glas kann zu erheblichen Variationen und dem Verlust der Steroidverbindungen führen, insbesondere in Probenmedien mit hohem Wassergehalt. Daher sollten Probenflaschen und Röhrchen aus Glas bei der Herstellung und Handhabung der Proben vermieden werden.

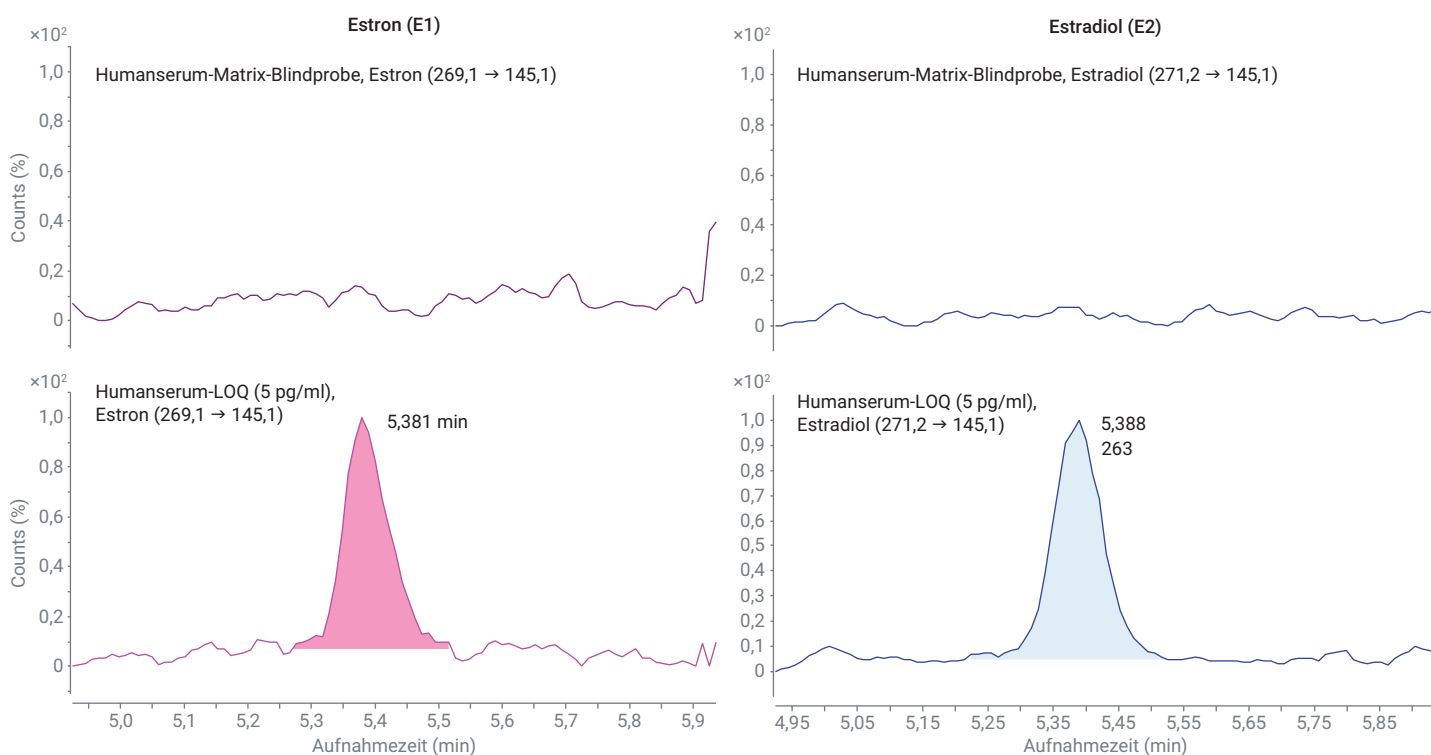


Abbildung 4: Chromatogramm von Östrogen (E1) und Estradiol (E2) für Serum-Blindprobe und LOQ-Probe mit 5 pg/ml in Serum.

SLE-Methodenoptimierung: Die SLE-Methode kann auf der Basis einer vorhandenen LLE-Methode oder direkt mit SLE-Kartuschen oder -Platten entwickelt werden. In dieser Studie wurde die SLE-Methode direkt auf SLE-Platten mit aus der Literatur zu LLE-Methoden stammenden Daten optimiert. Die SLE-Methodenoptimierung umfasste die Optimierung des Lösemittels, der Lösemittelmischung sowie der Probenelution. Die Optimierung wurde auf der Basis der kombinierten Bewertung von durchschnittlicher Analytwiederfindung, relativer Standardabweichung und Matrixeffekten durchgeführt (Abbildung 5). Zunächst wurde das Extraktionslösungsmittel untersucht; es wurden vier häufig verwendete LLE-Lösemittel/Lösemittelmischungen ausgewertet: MTBE, Diethylether (DEE), EtOAc und DCM/MTBE (1:4). Wie im ersten Gruppenvergleich in Abbildung 5

(links) für die Lösemittelauswahl gezeigt, liefert die Extraktion mit MTBE den besten durchschnittlichen Matrixeffekt, was auf die reinste Matrix hinweist, aber die durchschnittliche Wiederfindung ist geringer. Die Extraktion mit EtOAc liefert die beste Extraktionseffizienz, führt aber auch zu einer größeren Matrix-Ionensuppression. Sowohl DEE als auch die Mischung DCM/MTBE liefern geringere Analytwiederfindungsraten und die Extraktion mit DCM/MTBE führt außerdem zu einer schlechteren Reproduzierbarkeit. Als Folge dieser Erkenntnis wurde die Mischung aus MTBE und EtOAc eingehender untersucht, um die beste Balance für die Analytwiederfindung und Matrixeffekte zu finden.

Im zweiten Gruppenvergleich in Abbildung 5 (Mitte) für die Optimierung der Lösemittelmischung wurden MTBE und EtOAc in den Verhältnissen 1:1, 2:1 und 1:2 gemischt und zur Extraktion der

Proben verwendet. Abbildung 5 zeigt, dass die Extraktionsmischung MTBE/EtOAc=1:1 das beste Gleichgewicht zwischen Analytwiederfindung und Matrixeffekten lieferte. Sie wurde daher als optimale Lösemittelmischung für die Extraktion ausgewählt. Diese Untersuchungen basierten auf einer zweifachen Extraktion mit jeweils 500 µl Lösemittel. Darüber hinaus wurde die dreifache Probenextraktion unter Verwendung von jeweils 400 µl des optimalen Lösemittels untersucht. Die Ergebnisse des Vergleichs sind als dritter Gruppenvergleich in Abbildung 5 (rechts) dargestellt. Mit der dreifachen Extraktion mit jeweils 400 µl zur Elution wurde die durchschnittliche Analytwiederfindung weiter verbessert, ohne dabei Matrixeffekte zu erhöhen. Als Ergebnis der Untersuchung wurde die SLE-Methode dahingehend optimiert, dass eine dreifache Extraktion mit jeweils 400 µl MTBE/EtOAc=1:1 durchgeführt wurde.

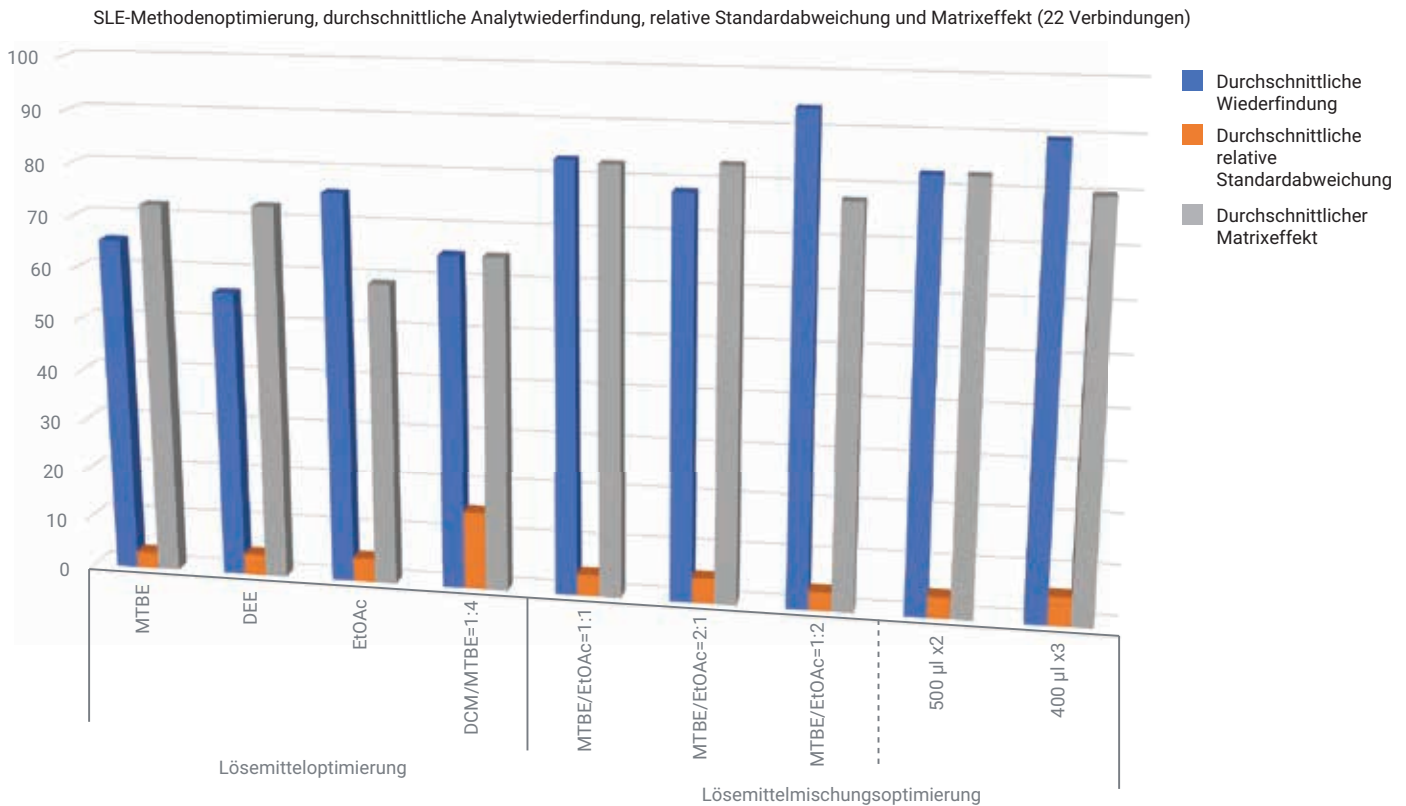


Abbildung 5: SLE-Methodenoptimierung zur Lösemittelauswahl und Probenelution. Die Optimierung wurde auf der Basis der kombinierten Bewertung von durchschnittlicher Analytwiederfindung, relativer Standardabweichung und Matrixeffekten durchgeführt.

Verifizierung der Methode

Die optimierte Methode wurde mit einem dreitägigen Test auf Präzision und Genauigkeit verifiziert, um die vollständigen quantitativen Ergebnisse zu erhalten. Die in Tabelle 3 zusammengefassten Ergebnisse zeigen die Daten der Kalibrierungskurve sowie die Daten der Batchpräzision und der Genauigkeit im dreitägigen Test. Kalibrierungskurven wurden unter Verwendung einer linearen

Regression mit einer Gewichtung von $1/x^2$ für alle Analyten erstellt; sie ergaben R^2 -Werte $> 0,99$. Für die meisten Analyten wurde eine Quantifizierungsgrenze von 5 pg/ml erreicht, mit Ausnahme von 10 pg/ml für Estradiol und Testosteron sowie 20 pg/ml für Progesteron, 17-Hydroxypregnenolon und Hydrocortison aufgrund von Matrixinterferenzen oder Analyten, die in der Matrix-Blindprobe auftauchten. Der dreitägige Test auf

Präzision und Genauigkeit zeigt nicht nur die Verifizierung der Methode für eine zuverlässige Quantifizierung, sondern auch die Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge für die Chem Elut S-Platten, da SLE-Platten aus drei Herstellungschargen verwendet wurden. Abbildung 6 zeigt die Zusammenfassung der chargenübergreifenden Reproduzierbarkeit für die SLE-Platten in Bezug auf Analytpräzision und -genauigkeit.

Tabelle 3: Ergebnisse der Verifizierung der Methode für die quantitative Bestimmung von 15 Steroidverbindungen in Humanserum.

Analyt	LOQ (pg/ml)	Kalibrierungsbereich (pg/ml)	Def. Zugabe zu QC Konzentration (pg/ml)	Präzision und Genauigkeit						
				Tag 1 (SLE-Batch 1)		Tag 2 (SLE-Batch 2)		Tag 3 (SLE-Batch 3)		Inter-Tag/-Batch % RSD (n = 18)
				Präzision in % (n = 6)	% relative Standardabweichung (n = 6)	Präzision in % (n = 6)	% relative Standardabweichung (n = 6)	Präzision in % (n = 6)	% relative Standardabweichung (n = 6)	
Estriol	5	5-10 000	5	95	18,0	97	6,9	103	11,6	12,8
			100	102	6,5	97	8,3	107	5,2	6,4
			1.000	98	2,8	92	1,2	92	4,6	3,1
			10 000	107	5,9	92	5,6	101	4,2	5,0
Aldosteron	5	5-10 000	5	106	4,7	103	12,4	100	9,4	9,2
			100	96	9,3	101	12,8	97	3,0	8,1
			1.000	111	2,5	103	4,2	98	1,9	3,3
			10 000	113	2,4	95	7,5	107	4,2	4,2
Cortison	5	5-10 000	5	104	9,8	92	10,1	99	7,6	9,5
			100	93	7,0	93	9,2	97	7,6	7,6
			1.000	104	3,5	94	3,7	100	2,4	3,3
			10 000	106	5,6	95	7,8	106	5,5	6,2
Hydrocortison	20	20-10 000	20	89	6,5	97	13,6	86	12,6	11,1
			100	96	18,2	90	6,7	96	9,5	11,3
			1.000	96	4,4	93	2,4	93	4,1	3,8
			10 000	95	6,3	92	4,1	97	6,8	5,6
17-Hydroxypregnenolon	20	20-10 000	20	109	1,8	99	18,9	91	8,1	9,8
			100	94	19,2	91	8,2	103	15,4	14,0
			1.000	94	6,0	91	2,1	100	5,2	4,6
			10 000	93	3,6	97	3,8	106	9,3	5,3
11-Desoxycortisol	5	5-10 000	5	99	8,3	95	10,7	95	16,2	11,9
			100	94	6,5	89	10,4	97	9,1	8,5
			1.000	105	1,5	87	3,8	99	1,7	2,5
			10 000	110	2,7	92	7,2	104	4,5	4,6
Androstendion	5	5-10 000	5	99	11,4	102	9,5	110	11,2	10,9
			100	88	8,2	89	8,8	106	10,7	9,0
			1.000	104	2,1	90	3,7	91	1,6	2,7
			10 000	109	5,5	101	5,7	108	7,6	6,0
Estron	5	5-10 000	5	95	8,7	92	11,3	102	8,9	9,8
			100	98	10,1	95	7,5	99	4,3	7,1
			1.000	104	2,8	95	2,8	96	3,0	3,1
			10 000	105	6,2	94	3,3	98	4,3	4,4
Estradiol	10	10-10 000	10	105	10,2	101	19,3	100	9,7	13,2
			100	97	11,4	96	10,2	102	10,2	10,4
			1.000	99	3,0	102	5,1	95	2,4	3,7
			10 000	101	2,9	102	2,1	100	4,3	2,9

Analyt	LOQ (pg/ml)	Kalibrierungs- bereich (pg/ml)	Def. Zugabe zu QC Konzentration (pg/ml)	Präzision und Genauigkeit						
				Tag 1 (SLE-Batch 1)		Tag 2 (SLE-Batch 2)		Tag 3 (SLE-Batch 3)		Inter-Tag/- Batch % RSD (n = 18)
				Präzision in % (n = 6)	% relative Standardabweichung (n = 6)	Präzision in % (n = 6)	% relative Standardabweichung (n = 6)	Präzision in % (n = 6)	% relative Standardabweichung (n = 6)	
11-Desoxycorticosteron	5	5-10 000	5	108	12,3	101	13,5	113	6,5	11,0
			100	94	7,6	94	9,8	104	13,3	10,4
			1.000	108	4,8	105	5,2	103	4,7	4,7
			10 000	109	5,8	108	5,7	115	5,3	5,4
2-Methoxyestron	5	5-10 000	5	109	9,0	111	4,8	100	7,8	7,4
			100	93	3,7	94	7,7	95	7,2	6,0
			1.000	106	2,9	93	4,1	91	4,7	4,1
			10 000	111	3,2	101	7,2	104	2,6	4,3
Testosteron	10	10-10 000	10	100	9,0	95	8,9	94	10,9	8,2
			100	94	3,7	91	6,6	100	8,5	8,2
			1.000	102	2,9	89	4,7	97	6,2	5,6
			10 000	104	3,2	106	6,3	102	5,0	5,7
2-Methoxyestradiol	5	5-10 000	5	92	9,1	109	7,4	94	10,1	9,1
			100	96	6,2	103	7,9	98	7,2	6,9
			1.000	99	1,9	94	1,9	93	4,5	2,9
			10 000	106	3,1	99	2,5	105	2,9	2,6
17-Hydroxyprogesteron	5	5-10 000	5	98	14,9	103	9,1	95	10,8	11,8
			100	89	5,2	93	9,2	98	7,2	7,0
			1.000	105	4,8	89	4,2	100	3,3	4,3
			10 000	106	4,5	103	4,9	100	2,2	3,7
Progesteron	20	20-10 000	20	108	4,8	97	11,0	89	4,0	6,8
			100	97	6,7	91	12,1	101	5,2	7,8
			1.000	119	6,7	91	3,3	95	2,5	4,3
			10 000	112	6,8	99	7,3	104	4,2	5,9



Abbildung 6: Zusammenfassung der Verifizierung der Reproduzierbarkeit der Leistung der Methode mit Agilent Chem Elut S von Tag zu Tag und von Charge zu Charge basierend auf Präzision und Genauigkeit.

Methoden- und Produktvergleich

Die für Chem Elut S entwickelte Methode wurde mit der herkömmlichen LLE und einer SLE-Methode auf DE-Basis eines anderen Herstellers in Bezug auf die Leistung der Methode hin verglichen. Als Kriterien wurden die Analytwiederfindung, Reproduzierbarkeit, Matrixeffekte und Linearität der Kalibrierungskurve herangezogen.

Beim Vergleich von SLE und LLE sind die Einsparungen von Zeit und Arbeitsaufwand offensichtlich. Der SLE-Arbeitsablauf verbessert die Effizienz der Probenvorbereitung erheblich durch die Einsparung von Zeit und Arbeitsaufwand für kritische Arbeitsschritte wie Probenmischung, Phasentrennung und Überführung des organischen Überstands. Da diese Schritte überflüssig werden, kann das SLE-Protokoll auf einfache Weise 50 %

der benötigten Zeit oder mehr einsparen - je nach Anzahl der Proben. Außer den Einsparungen bei Zeit und Arbeitsaufwand vermeidet das SLE-Verfahren, dass Emulsionen auftreten und es verbessert die Zuverlässigkeit der Methode.

Abbildung 7 zeigt den Vergleich der jeweiligen Methodenleistung in Bezug auf Analytwiederfindung (7A) und Reproduzierbarkeit (7B). Das SLE-Protokoll bietet einen engen Kontakt zwischen der wässrigen und organischen Phase und ermöglicht dadurch eine effiziente Verteilung, was die Wiederfindungsraten der Analyten verbessern kann. Durch die Verwendung der SLE-Methoden konnten die Wiederfindungsraten der Analyten um 10 bis 20 % im Vergleich zur Wiederfindung mit der LLE-Methode gesteigert werden. Eine höhere Analytwiederfindung verbessert die Response der Analyten, was

wiederum zu einer besseren analytischen Empfindlichkeit der Methode führt.

Ähnliche oder leicht höhere Wiederfindungsraten wurden bei der Verwendung der SLE auf der Basis von Diatomeenerde erzielt. Es traten dabei jedoch erhebliche Variationen zwischen den Wells auf, insbesondere für polare Analyten. Ein Grund hierfür liegt möglicherweise an der Inkonsistenz des Sorbens Diatomeenerde und dessen Wasseradsorptionskapazität. Aufgrund der verbesserten Reproduzierbarkeit von Well zu Well und der verbesserten analytischen Empfindlichkeit der Methode erzielten die Chem Elut S-Platten auch eine bessere Linearität der Kalibrierungskurve. Insgesamt machten diese Verbesserungen die Quantifizierungsmethode zuverlässiger und konsistenter.

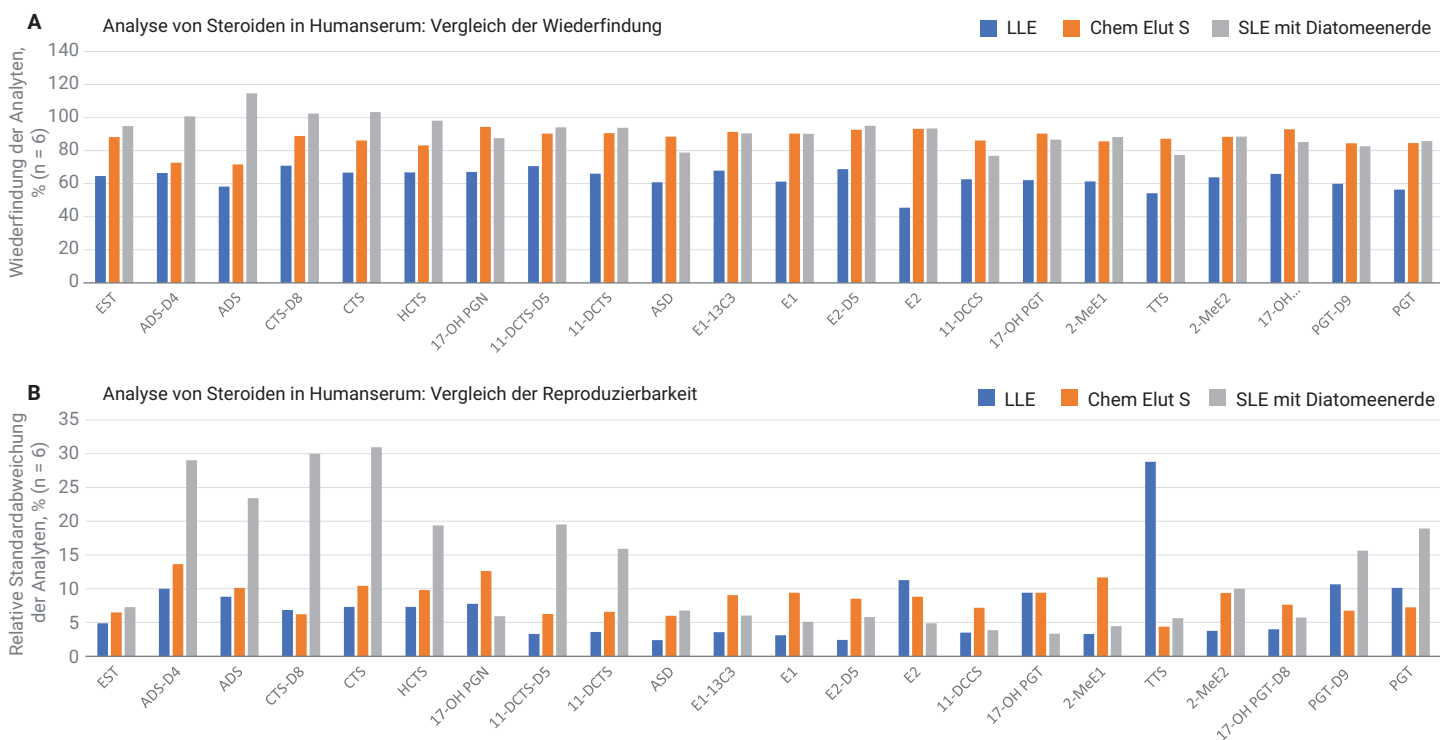


Abbildung 7: Methoden- und Produktleistungsvergleich der LLE-Methode im Vergleich mit Agilent Chem Elut S und der SLE mit Diatomeenerde.

Entfernung von Phospholipiden aus der Matrix

Die Verwendung der Chem Elut S-Platten für die Vorbereitung biologischer Flüssigkeiten bietet ebenfalls eine teilweise Entfernung von Phospholipiden aus den Proben.

In dieser Studie wurden Serumproben eingesetzt, aus denen die Hormone entfernt worden waren, um gute Matrixselektivitäten für extrem niedrige Quantifizierungsgrenzen für die Zielsteroidoide zu erzielen. Aus dem Serum ohne Hormone waren jedoch auch die Phospholipide entfernt worden; diese Proben werden für weitere Applikationstests nicht benötigt. Um die Entfernung von Phospholipiden zu untersuchen, wurden Plasmaproben verwendet, aus denen die Hormone nicht entfernt worden waren. Es wurden die Phospholipidprofile in der Matrix mit der Standard-LLE-Methode, mit Chem Elut S und mit einer SLE-Methode auf der Basis von Diatomeenerde eines anderen Herstellers untersucht. Der Vergleich der Profile in Abbildung 8A zeigt, dass die Verwendung der Methode mit Chem Elut S und mit MTBE als Lösemittel eine um 99 % bessere Entfernung der Phospholipide erzielte als die SLE-Methode auf DE-Basis eines anderen Herstellers und eine um 30 % bessere Entfernung der Phospholipide als die LLE-Methode mit MTBE.

Es wurden weitere Vergleichsstudien zwischen Chem Elut S und der SLE-Methode auf der Basis von Diatomeenerde durchgeführt, bei denen unterschiedliche Extraktionslösungsmittel und unterschiedliche Plasmatypes verwendet wurden; die Ergebnisse sind in Abbildung 8B dargestellt. Die Gesamtresponse der Phospholipide wurde auf der Basis der Abundanz normalisiert. Ergebnisse:

- In unterschiedlichen Plasmatypes kann es Variationen der Phospholipid-Abundanz geben, wobei lipämisches Plasma die größte Menge an Phospholipiden enthält.
- Unterschiedliche Lösemittel extrahieren unterschiedlich viel Phospholipide, wobei EtOAc und DCM mehr Phospholipide extrahieren als MTBE und DEE.
- Chem Elut S kann Phospholipid effizienter entfernen als die SLE-Methode auf DE-Basis eines anderen Herstellers.

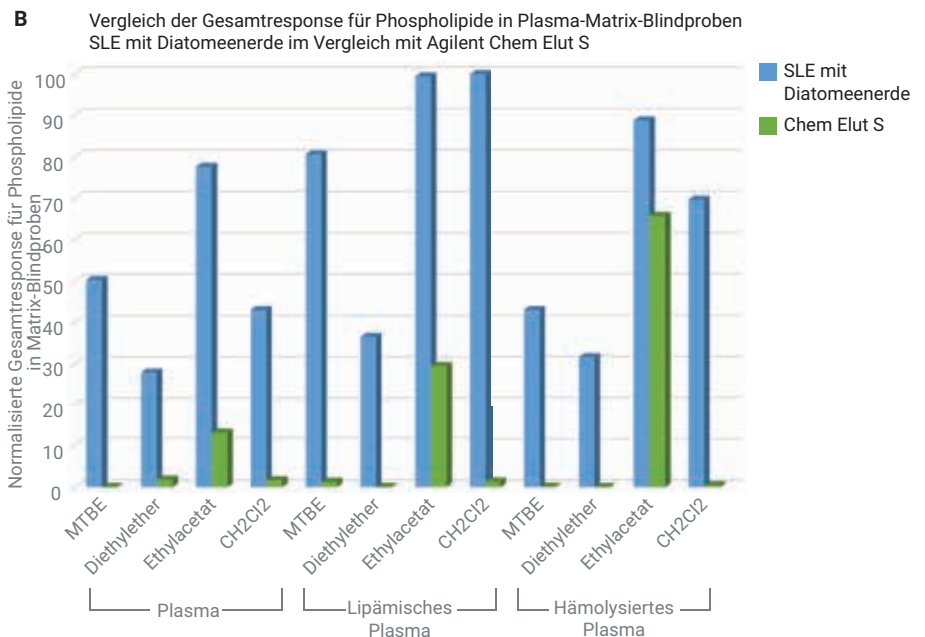
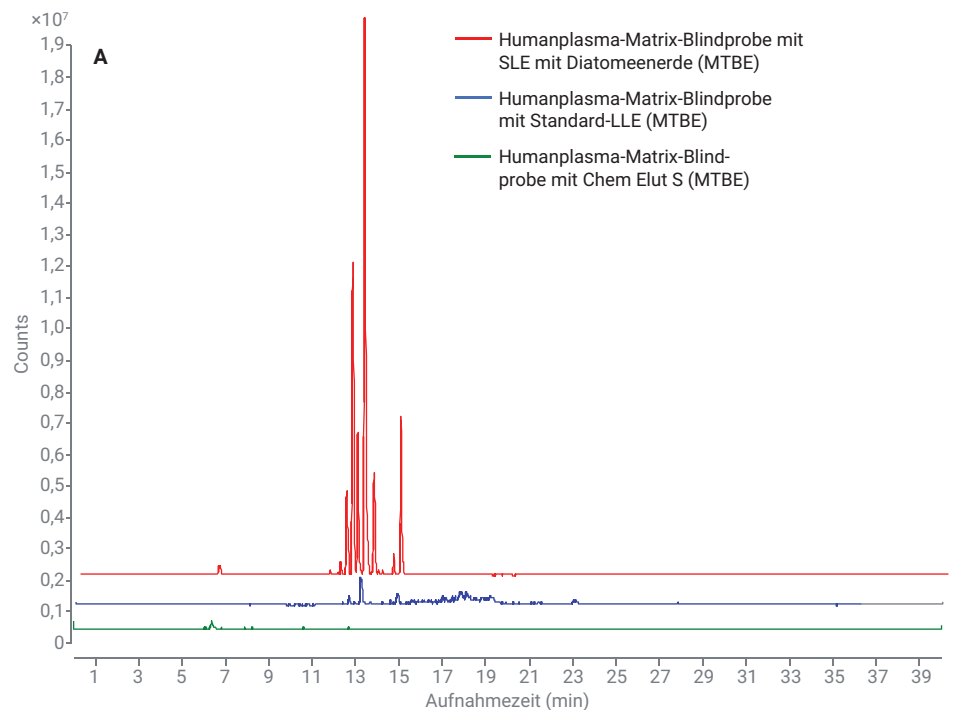


Abbildung 8: Vergleich der Entfernung von Phospholipiden aus Plasma mit Agilent Chem Elut S im Vergleich mit SLE mit Diatomeenerde und LLE unter Verwendung unterschiedlicher Lösemittel.

Abschließende Bemerkungen

Es wurde eine Probenvorbereitungsmethode mittels Agilent Chem Elut S 2-ml-Platten für die quantitative Bestimmung eines Panels von 15 Steroidverbindungen in Humanserum entwickelt und verifiziert. Basierend auf der Analytwiederfindung, der Reproduzierbarkeit der Methode und auf Matrixeffekten wurde das für die SLE-Methode verwendete Lösemittel und die Probenelution optimiert. Mit einem dreitägigen Test auf Präzision und Genauigkeit wurde bestätigt, dass diese Methode eine akzeptable Linearität der Kalibrierungskurve, eine außergewöhnliche Präzision und Genauigkeit der Ergebnisse innerhalb eines Tages und im Vergleich der aufeinander folgenden Tage, eine hervorragende Analytwiederfindung und eine exzellente Reproduzierbarkeit liefert. Im Vergleich zur Standard-LLE-Methode und zur SLE-Methode auf DE-Basis lieferte die Methode mit Chem Elut S insgesamt höhere Analytwiederfindungsraten als die Standard-LLE-Methode und eine bessere Sorbenskonsistenz sowie eine bessere Reproduzierbarkeit der Kartuschen von Well zu Well als die SLE-Methode auf DE-Basis. Die Methode bietet außerdem eine effiziente Entfernung von Phospholipiden aus flüssigen biologischen Matrices wie Plasma und Serum. Das entwickelte Protokoll im 96-Wellplate-Format eignet sich gut für die Anforderungen an eine schnelle und automatisierbare Probenvorbereitung in Labors mit hohem Durchsatz. Das praktische Beladungs- und Elutionsverfahren vereinfacht darüber hinaus den Arbeitsablauf der Flüssigextraktion mit deutlichen Einsparungen in Bezug auf Zeit und Arbeitsaufwand. Chem Elut S hat eine höhere Probenadsorptionskapazität als Sorbenzien auf der Basis von Diatomeenerde und liefert daher eine effiziente Adsorption der Probe mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit eines Probendurchbruchs. Das neue Plattendesign bietet:

- Großen Headspace für Proben und Lösemittel
- Eine viereckige obere Fritte, die die Probe hält, bis Druck oder Vakuum angelegt wird
- Einen umlaufenden Rahmen für Hardwarekompatibilität
- Schnelle, konsistente Elution

Literatur

1. Anari, M. R.; *et al.* Derivatization of Ethinylestradiol with Dansyl Chloride to Enhance Electrospray Ionization: Application in Trace Analysis of Ethinylestradiol in Rhesus Monkey Plasma. *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 4136–4144.
2. Lee, J. S.; *et al.* Comparison of methods to measure low serum estradiol levels in postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **2006**, *91*, 3791–3797.
3. Kushnir, M. M.; *et al.* High-Sensitivity Tandem Mass Spectrometry Assay for Serum Estrone and Estradiol. *Clinical Chemistry* **2008**, *129*, 530–539.
4. Wang, W.; Cole, R. B.; Enhanced Collision-Induced Decomposition Efficiency and Unraveling of Fragmentation Pathways for Anionic Adducts of Brevetoxins in Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2009**, *81*, 8826–8838.
5. Hindle, R. Improved Analysis of Trace Hormones in Drinking Water by LC/MS/MS (EPA 539) using the Agilent 6460 Triple Quadrupole LC/MS, *Agilent Technologies Application Note*, Publikationsnummer 5991-2473EN, **2013**.

www.agilent.com/chem

Ausschließlich zu Forschungszwecken. Nicht für Diagnoseverfahren geeignet.

Änderungen vorbehalten.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Gedruckt in den USA, 15. Mai 2019
5994-0949DEE

