

Determinación cuantitativa de un perfil de esteroides endógenos en suero humano por LC/MS/MS

Usando la placa Agilent Chem Elut S para extracción de líquidos con soporte (SLE)

Autor

Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

Resumen

Los productos Agilent Chem Elut S de extracción de líquidos con soporte (o simplemente Chem Elut S) incorporan medios sintéticos que mejoran la uniformidad y la capacidad de retención de agua en comparación con la tierra de diatomeas convencional. Este estudio se llevó a cabo para evaluar la aplicación de las placas de 96 pocillos de 2 ml Chem Elut S para la determinación cuantitativa de un perfil de 15 esteroides endógenos en muestras de suero humano por LC/MS/MS. Las muestras de suero se prepararon por extracción de líquidos con soporte (SLE) para extraer los analitos de interés y eliminar las interferencias de la matriz, como sales, proteínas y fosfolípidos parciales. El tratamiento completo de las muestras se realizó en las placas de 96 pocillos; en concreto, fue un proceso por lotes en los que las muestras acuosas se cargaron en primer lugar en el absorbente de SLE para, a continuación, eluir las por gravedad con un disolvente inmiscible con agua. El flujo de trabajo con placas Chem Elut S permite ahorrar una importante cantidad de dinero y tiempo de mano de obra en comparación con la extracción líquido-líquido (LLE) convencional. Los excelentes valores de precisión (80-120 %) y reproducibilidad ($DER < 15\%$) del método para los analitos permitieron verificar el método establecido de SLE para un amplio rango de calibración de 5 a 10.000 pg/ml en suero para los esteroides de interés, salvo en los casos del estradiol y la testosterona (de 10 a 10.000 pg/ml) y de la hidrocortisona, la 17-hidroxipregnenolona y la progesterona (de 20 a 10.000 pg/ml). También se evaluaron la selectividad y el efecto memoria del método. Por otra parte, el límite de cuantificación (LOQ) más elevado para los cinco analitos mencionados se debió a la selectividad asociada a la matriz de suero. Además, el absorbente sintético para SLE también mejoró la eliminación de fosfolípidos de las matrices de fluidos biológicos en comparación con la SLE con tierra de diatomeas y la LLE convencional para el disolvente empleado para la extracción de las muestras.

Introducción

La LLE convencional es un método ampliamente utilizado para la extracción de esteroides endógenos de matrices de muestras biológicas (por ejemplo, de suero o plasma) de cara a su posterior análisis con o sin ¹⁻³. En este tipo de protocolos, las muestras biológicas, como las de suero o plasma, normalmente se dividen en alícuotas que se depositan en tubos individuales de microcentrífuga y a las que después se les añade un disolvente de extracción. Tras la mezcla y la centrifugación de las muestras, la capa orgánica superior se transfiere a otro conjunto de tubos o a una placa de 96 pocillos para llevar a cabo el tratamiento posterior de las muestras. En la práctica, este procedimiento incluye etapas laboriosas que requieren una gran cantidad de tiempo de mano de obra, como el etiquetado de tubos, la mezcla de muestras, la separación de fases y la transferencia de la fase orgánica, que limitan la velocidad de procesamiento e impiden realizar la preparación de muestras con una alta productividad.

La SLE es una técnica alternativa a la LLE que permite eliminar esas desventajas. El absorbente de los cartuchos de la SLE proporciona una superficie químicamente inerte que las muestras acuosas pueden recubrir. Una vez alcanzado el equilibrio, los analitos de interés se eluyen con un disolvente inmiscible con agua por gravedad o aplicando un vacío o una presión suave; por su parte, la fase acuosa permanece en el cartucho. Debido al gran área superficial de soporte que proporciona el absorbente de SLE para las muestras acuosas, el disolvente orgánico puede extraer los analitos de interés de forma eficiente a medida que atraviesa el medio. En la Figura 1 se muestra el proceso de extracción. La SLE evita tener que realizar etapas de mezcla e impide de manera eficiente la formación de emulsiones. Además,

el estrecho contacto entre las fases acuosa y orgánica consigue un reparto eficiente y posibilita obtener unas altas recuperaciones de analitos. El flujo de trabajo de carga y elución hace que el proceso de SLE resulte sencillo y reduce sensiblemente las necesidades de tiempo y mano de obra. Por último, el formato de placa de 96 pocillos para SLE facilita en gran medida la automatización y, de esta forma, el aumento de la productividad del proceso de preparación de muestras.

Tradicionalmente, el absorbente utilizado para la SLE era tierra de diatomeas de alta pureza. Sin embargo, la tierra de diatomeas es un material natural, formado por microorganismos fosilizados y de tamaño irregular, lo que dificulta el control de la uniformidad de

las partículas de absorbente entre lotes. Esta variabilidad del material absorbente complica los procesos de fabricación y control de calidad de los productos, y hace que el rendimiento de estos sea poco uniforme. Además, la capacidad de retención de agua de la tierra de diatomeas puede ser peor y menos uniforme que la de los medios sintéticos.

El absorbente sintético de los productos Chem Elut S mejora notablemente la capacidad de retención de agua, la uniformidad entre lotes y la uniformidad del rendimiento. En esta nota de aplicación se expone cómo se aplicaron las placas de 96 pocillos Chem Elut S para la determinación cuantitativa de un perfil de 15 esteroides endógenos (Tabla 1) en suero humano.

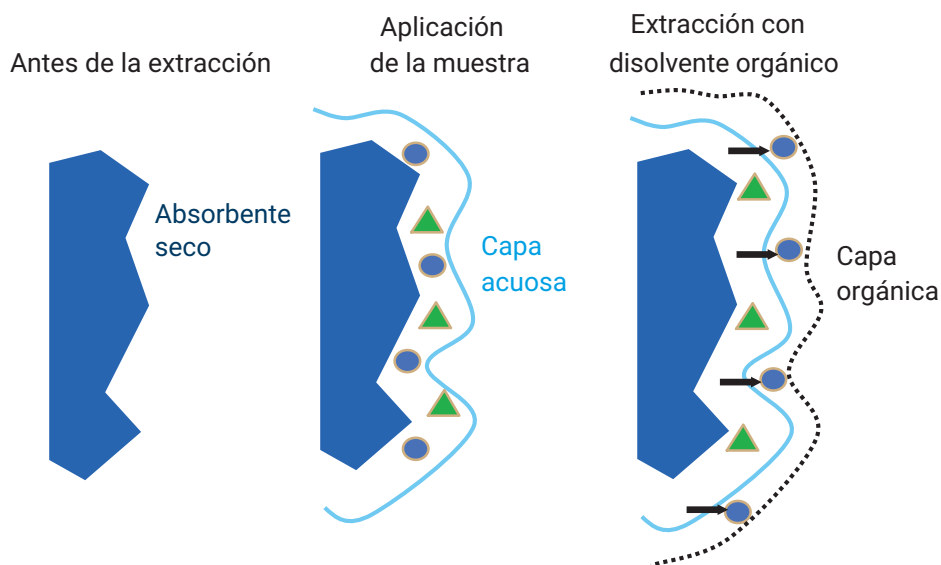


Figura 1. Proceso y mecanismo de extracción de analitos de la SLE.

Tabla 1. Fórmulas moleculares y estructuras de los 15 esteroides de interés.

Nombre	Log P	Fórmula molecular	Estructura
2-metoxiestradiol (2-MeE1)	4	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	
Estriol (E2)	2,5	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	
2-metoxiestrona (2-MeE1)	3,1	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	
Progesterona (PGT)	3,9	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	
17-hidroxiprogesterona (17-OH PGT)	3,2	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	
11-desoxicortisol (11-DCTS)	2,5	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	
Estradiol (E2)	4	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	
Testosterona (TTS)	3,4	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	

Nombre	Log P	Fórmula molecular	Estructura
Hidrocortisona (HCTS)	1,6	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	
Androstenediona (ASD)	2,7	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	
17-α-hidroxipregnenolona (17-OH PGN)	3,1	C ₂₁ H ₃₂ O ₃	
11-desoxicorticosterona (11-DCCS)	2,9	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	
Aldosterona	1,1	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	
Estrona (E1)	3,1	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	
Cortisona (CTS)	1,5	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	

Experimento

Reactivos y productos químicos

Todos los reactivos y disolventes fueron de calidad HPLC o calidad analítica. El metanol (MeOH) se adquirió a Honeywell (Muskegon, MI, EE. UU.); el metil terc-butil éter (MTBE), a VWR-BDH Chemicals (Radnor, PA, EE. UU.); y el acetato de etilo (EtOAc), a J. T. Baker (Center Valley, PA, EE. UU.). El fluoruro de amonio, todos los patrones de esteroides

y las soluciones madre de patrones internos (de 1 mg/ml o 100 µg/ml, todas ellas en metanol) se adquirieron a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). El suero humano (DC Mass Spect Gold, ref. MSG 4000) se adquirió a Golden West Biologicals, Inc. (Temecula, CA, EE. UU.). El suero se conservó a -70 °C hasta su uso.

Patrones y soluciones

Se utilizaron una solución de enriquecimiento de patrón con una

concentración de 500 ng/ml y una solución de enriquecimiento de patrón interno con una concentración de 50 ng/ml, ambas preparadas en metanol/agua (1:1). Los esteroides son sensibles a las superficies de vidrio, sobre todo cuando presentan niveles de concentración bajos. Por lo tanto, es importante usar viales de plástico para preparar y conservar todas las soluciones de enriquecimiento. Todas las soluciones de enriquecimiento se conservaron a -20 °C hasta su uso.

Las soluciones de fluoruro de amonio (NH_4F) 1 mM en agua y metanol se prepararon disolviendo 37,04 mg de NH_4F en 1 l de agua Milli-Q y metanol. Las soluciones de NH_4F 0,2 mM en agua (fase móvil A) y de NH_4F 0,2 mM en metanol (fase móvil B) se prepararon diluyendo soluciones 1 mM con agua Milli-Q y metanol, respectivamente.

El disolvente de extracción (MTBE/acetato de etilo 1:1) se preparó mezclando 100 ml de MTBE y acetato de etilo, y se utilizó solamente durante ese día. Para reconstituir las muestras secas después de la SLE se empleó una solución de metanol/agua (1:1).

Equipos y materiales

Entre los equipos utilizados para la preparación de muestras se incluyen los siguientes:

- Centrífuga Centra CL3R (Thermo IEC, MA, EE. UU.)
- Vortizador multitubo (VWR, PA, EE. UU.)
- Pipetas y repetidor Eppendorf
- Evaporador SPE Dry 96
- Procesador 96 para colector de presión positiva de Agilent (PPM-96, ref. 5191-4116)
- Procesador de líquidos ViaFlo 96 (Integra, Hudson, NH, EE. UU.)
- Placa de 96 pocillos de 2 ml Agilent Chem Elut S (200 μl) (ref. 5610-2003)
- Placa de recogida de 96 pocillos cuadrados de 2 ml de Agilent (ref. 5133009)
- Tapas de sellado para placas de 96 pocillos cuadrados de Agilent (ref. 5133005)

Condiciones de los instrumentos

Las muestras se analizaron en un sistema LC Agilent 1290 Infinity compuesto por una bomba binaria Agilent 1290 Infinity (G4220A), un muestreador automático de alto rendimiento Agilent 1290 Infinity (G4226A) y un compartimento termostático de columna Agilent 1290 Infinity (G131C). El sistema UHPLC se acopló a un sistema LC/MS de triple

cuadrupolo Agilent 6490 provisto de una fuente de ionización por electrospray Agilent Jet Stream iFunnel. Se utilizó el software de la estación de trabajo MassHunter de Agilent para la adquisición y el análisis de los datos.

En la Tabla 2 se recopilan los parámetros de los analitos, y en la Figura 2 se muestra el cromatograma LC/MS/MS obtenido para una concentración de esteroides de 1 ng/ml en suero.

Condiciones del sistema HPLC			
Columna	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 100 × 2,1 mm, 1,8 μm (ref. 959758-902) Precolumna Agilent ZORBAX RRHD C18, 5 × 2,1 mm, 1,8 μm (ref. 821725-902)		
Flujo	0,4 ml/min		
Temperatura de la columna	40 °C		
Volumen de inyección	20 μl		
Fase móvil	A) Fluoruro de amonio 0,2 mM en agua B) Fluoruro de amonio 0,2 mM en metanol		
Lavado de la aguja	Acetonitrilo/metanol/isopropanol/ H_2O 1:1:1:1 con ácido fórmico al 0,2 %		
Gradiente	Tiempo (min)	% B	Flujo (ml/min)
	0	50	0,4
	3,0	60	0,4
	8,0	90	0,4
	8,5	100	0,4
Tiempo de parada	8,5 minutos		
Tiempo posterior	2,5 minutos		
Condiciones del sistema MS			
Temperatura del gas	180 °C		
Flujo de gas	11 l/min		
Nebulizador	20 psi		
Calentador del gas de impulsión	400 °C		
Flujo de gas de impulsión	10 l/min		
Capilar	3.500 V (pos.)/3.000 V (neg.)		
Parámetros de iFunnel	RF de alta presión: 150 V (positiva y negativa) RF de baja presión: 100 V (positiva y negativa)		
Adquisición de datos	MRM dinámica		

Tabla 2. Analitos (esteroides), patrones internos utilizados, tiempos de retención y condiciones de monitorización de reacciones múltiples (MRM).

Analito	Patrón interno utilizado	Tiempo de retención (min)	Polaridad	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z)			
					Ion cuant.	CE (V)	Ion cual.	CE (V)
Estriol	PI 1	2,04	NEG	287,2	171,0	45	143,1	73
Aldosterona-d ₄ (PI 1)		2,31	POS	365,2	347,1	17	319,2	21
Aldosterona	PI 1	2,32	POS	361,2	343,2	17	91,1	80
Cortisona-d ₈ (PI 2)		2,71	POS	369,2	169,2	21	125,1	49
Cortisona	PI 2	2,75	POS	361,2	163,2	25	91,0	73
Hidro cortisona	PI 2	3,24	POS	363,2	121,1	25	91,1	73
17-hidroxipregnenolona	PI 2	3,24	NEG	331,2	313,2	21	--	
11-desoxicortisol-d ₅ (PI 3)		4,53	POS	352,3	100,0	37	113,0	45
11-desoxicortisol	PI 3	4,58	POS	347,2	109,0	41	97,0	41
Androstenediona	PI 3	5,31	POS	287,2	97,0	25	109,0	29
Estradiol-d ₅ (PI 4)		5,39	NEG	276,2	147,0	45	187,0	49
Estrona- ¹³ C ₃ (PI 5)		5,43	NEG	272,3	148,0	41	146,0	61
Estrona	PI 5	5,42	NEG	269,1	145,0	49	143,1	73
Estradiol	PI 4	5,45	NEG	271,2	145,1	49	183,0	49
11-desoxicorticosterona	PI 3	5,72	POS	331,0	97,1	25	109,1	33
2-metoxiestrona	PI 5	5,85	NEG	299,2	284,1	25	--	--
Testosterona	PI 6	5,86	POS	289,3	97,1	23	109,1	25
2-metoxiestradiol	PI 4	6,01	NEG	301,2	286,2	25	--	--
17-hidroxiprogesterona-d ₈ (PI 6)		6,21	POS	339,3	100,1	45	113,2	37
17-hidroxiprogesterona	PI 6	6,26	POS	331,2	109,1	33	97,1	29
Progesterona-d ₉ (PI 7)		7,39	POS	324,3	100,1	29	113,0	25
Progesterona	PI 7	7,44	POS	315,2	97,1	25	108,9	37

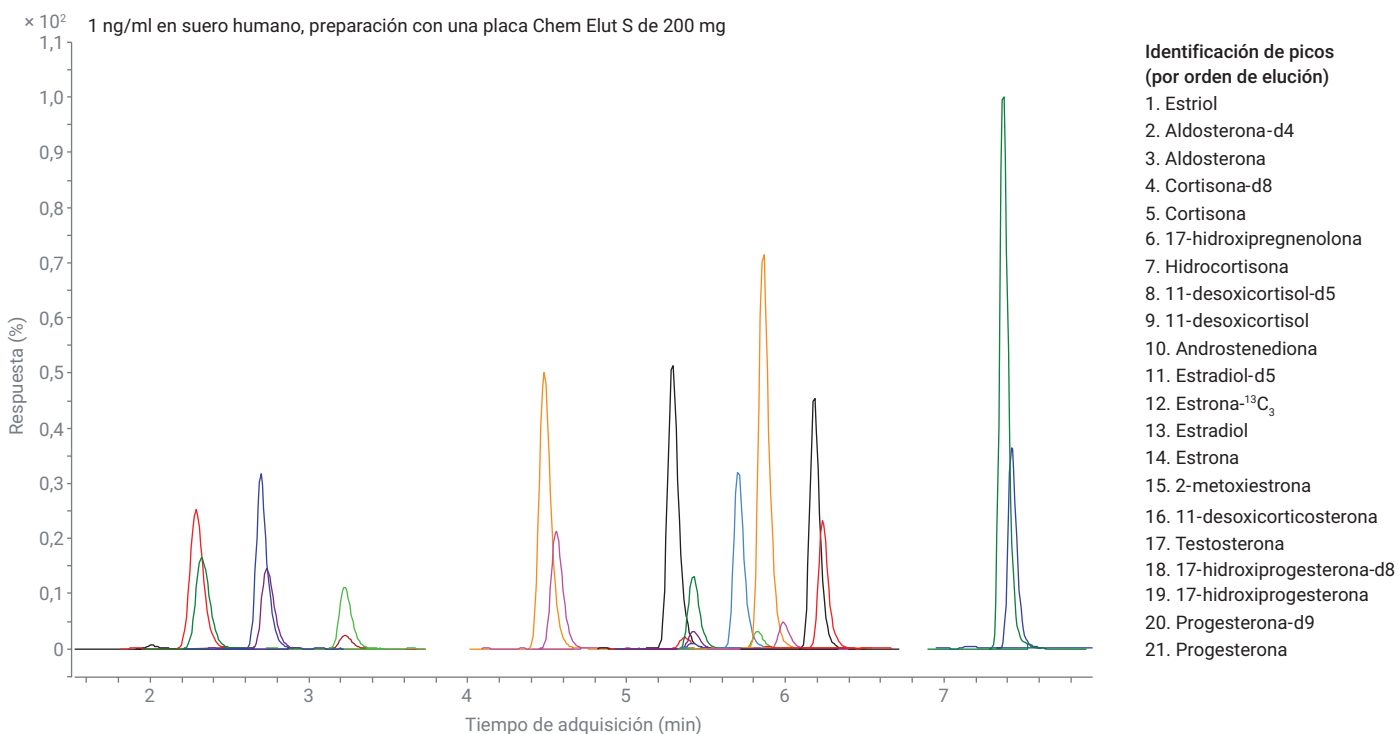


Figura 2. Cromatograma de esteroides con una concentración de 1 ng/ml en suero obtenido por LC/MS/MS usando el método de extracción de líquidos con soporte Agilent Chem Elut S.

Preparación de patrones de calibración y muestras de control de calidad

Se preparó una solución de enriquecimiento de patrón intermedio de 50 ng/ml en suero a partir de la solución de enriquecimiento de patrón de 500 ng/ml en metanol/agua (1:1). Después, esta solución de enriquecimiento de patrón intermedio se usó para preparar patrones en suero humano para la curva de calibración. Los patrones de calibración (de 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1.000, 5.000 y 10.000 pg/ml en suero) se prepararon añadiendo el volumen apropiado de la solución de enriquecimiento de patrón intermedio a un blanco de suero. En las pruebas de verificación de la exactitud y la precisión del método se analizaron muestras de control de calidad con cuatro concentraciones distintas: 5 (10/20) pg/ml, 100 pg/ml, 1.000 pg/ml y 10.000 pg/ml, correspondientes al límite inferior de cuantificación (LLOQ), el control de calidad medio, el control de calidad alto y el límite superior de cuantificación (HLOQ), respectivamente. Estas muestras de control de calidad también se prepararon añadiendo el volumen apropiado de muestra de suero intermedia. Todos los patrones de calibración y las muestras de control de calidad se prepararon en tubos con tapón de presión de 2 ml o tubos de plástico de 5 ml. Después, se depositaron alícuotas en la placa de 96 pocillos para proceder con la extracción.

Extracción de las muestras

La optimización de la extracción por SLE estuvo basada en la recuperación de analitos y la limpieza de la matriz, incluida la selección del disolvente y de los volúmenes y tiempos de elución. En la Figura 3 se describe de forma detallada el procedimiento óptimo de preparación de muestras. El protocolo completo incluyó cuatro secciones principales: agregación de una alícuota de muestra en la placa; mezcla con el patrón interno y transferencia a la placa de SLE; extracción de la muestra en la placa de SLE; y tratamiento posterior de la muestra

en la placa de recogida. Se depositaron alícuotas de las muestras de suero en una placa de recogida de 1 ml; después, se añadió la solución de enriquecimiento de patrón interno. Tras agitar las muestras en un vórtex, las muestras mezcladas se transfirieron íntegramente a una placa Chem Elut S de 2 ml con una placa de recogida de pocillos cuadrados de 2 ml situada debajo de ella. Se extremaron las precauciones a la hora de añadir el disolvente de extracción a la placa

de SLE para evitar que se produjeran salpicaduras de disolvente, ya que eso podría haber provocado contaminación cruzada. La elución por gravedad se empleó hasta el paso de secado final del absorbente, en el que se aplicaron poco a poco una presión o un vacío iniciadores. Debido al uso de disolventes volátiles (MTBE y acetato de etilo) durante los pasos de extracción, fue importante llevar a cabo esta en una campana de extracción.

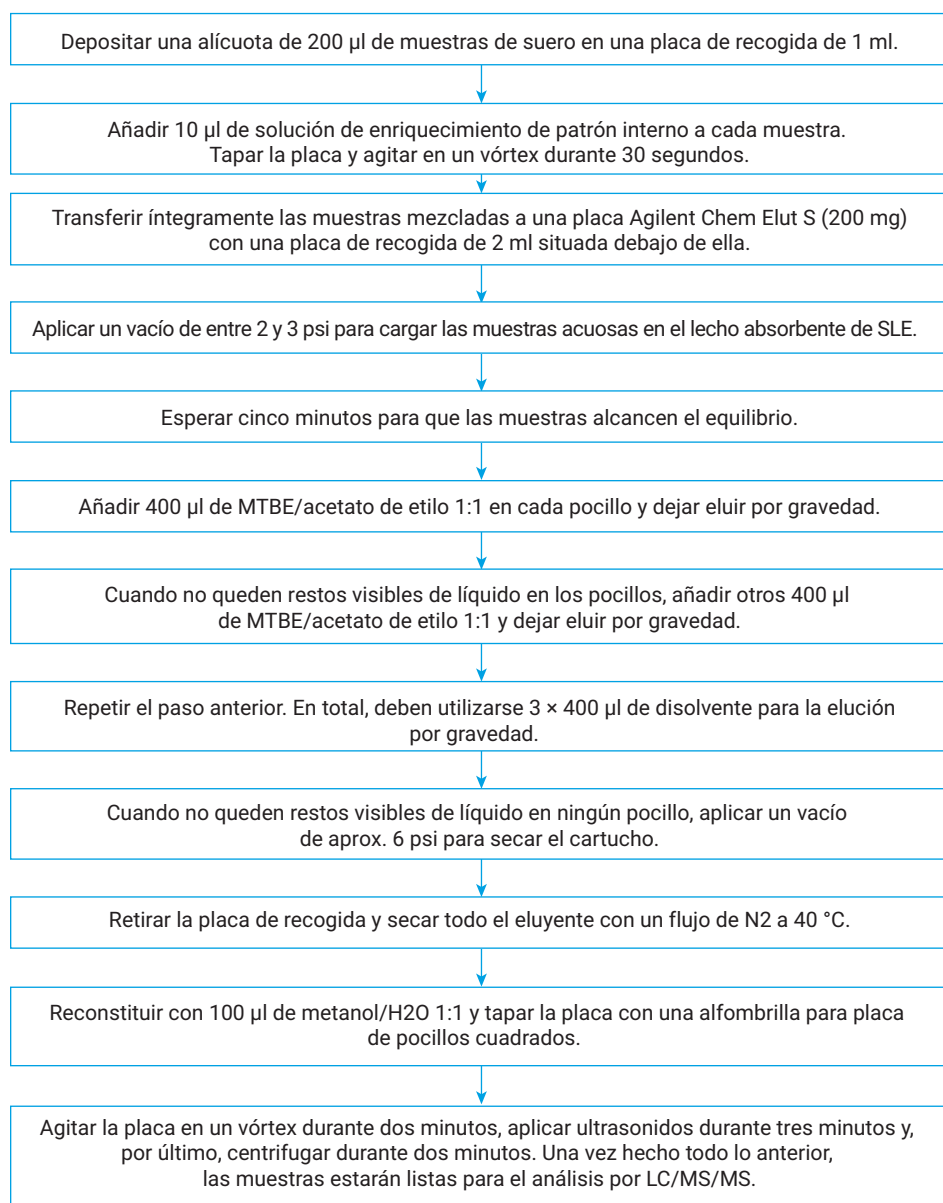


Figura 3. Esquema de preparación de muestras para el análisis de esteroides en suero con una placa Agilent Chem Elut S de 2 ml (200 µl).

Verificación del método

Para verificar el método se llevó a cabo un ensayo de exactitud y precisión (E y P) de tres días de duración. Dado que para los análisis de E y P se usaron tres lotes diferentes de placas de SLE cada día, el ensayo de verificación E y P del método, de tres días de duración, también sirvió para realizar pruebas de reproducibilidad entre lotes de las placas de SLE. Tanto los patrones de calibración como las muestras de control de calidad se enriquecieron previamente de forma correcta. Se depositaron alícuotas de las muestras en una placa de recogida siguiendo la secuencia indicada a continuación: doble blanco de matriz; blanco de matriz (enriquecido con patrón interno); primer conjunto de patrones de calibración; dos o tres blancos de matriz; muestras de LLOQ (n = 6); muestras de control de calidad medio (n = 6); muestras de control de calidad alto (n = 6); muestras de HLOQ (n = 6); dos o tres blancos de matriz de efecto memoria; doble blanco de matriz; blanco de matriz; un segundo conjunto de patrones de calibración; y dos o tres blancos de matriz.

Comparación de métodos y productos

Los valores de recuperación de analitos, reproducibilidad (DER), efectos de la matriz y linealidad de la curva de calibración del método verificado de SLE también se compararon con los de los métodos de LLE y SLE con un producto con tierra de diatomeas.

Los valores absolutos de recuperación de analitos se estudiaron mediante la comparación de las respuestas del instrumento a los analitos (áreas de los picos) para las muestras de control de calidad enriquecidas previa y posteriormente con una concentración de 1 ng/ml en suero. En las muestras de control de calidad enriquecidas previamente, la adición se llevó a cabo de forma directa y correcta en suero, y las muestras se prepararon conforme al método desarrollado. Las muestras de control de calidad enriquecidas posteriormente se prepararon en los blancos de matriz tras la extracción. En concreto, el enriquecimiento posterior se produjo durante la etapa de reconstitución de las muestras, usando para ello la solución patrón pura apropiada para reconstituir las muestras secas de blanco de matriz. Los efectos de la matriz se estudiaron mediante la comparación de las respuestas del instrumento a los analitos (áreas de los picos) para las muestras de control de calidad enriquecidas posteriormente y los patrones puros correspondientes elaborados con blancos de disolvente (sin reactivos).

Eliminación de fosfolípidos de la matriz

La limpieza de la matriz se analizó mediante la monitorización del perfil de fosfolípidos. La extracción de muestras de suero con la placa Chem Elut S sirvió para eliminar fosfolípidos parciales. Se compararon los perfiles de fosfolípidos de los blancos de matriz con los del suero puro y los de otros tipos de plasma. Asimismo, también se comparó el uso de diferentes disolventes de extracción para la eliminación de fosfolípidos con la placa Chem Elut S y una placa de SLE con tierra de diatomeas producida por otro fabricante.

Resultados y comentarios

Este estudio se centró en demostrar el uso de las placas Chem Elut S para la determinación cuantitativa de esteroides en suero para aplicaciones de investigación clínica.

Desarrollo y optimización de métodos

Método instrumental y precauciones especiales:

La ionización de cinco esteroides considerados como analitos (estriol, estrógeno, estradiol, 2-metoxiestrógeno y 2-metoxiestradiol) con una fuente de ionización por electrospray (ESI) o ionización química a presión atmosférica (APCI) resulta muy difícil. En condiciones normales, cuesta poder detectar señales para estos compuestos incluso con altas concentraciones. Una opción es la derivatización de estos compuestos, pero exige llevar a cabo etapas adicionales durante la preparación de muestras. Aplicar un método combinado de preparación de muestras con y sin derivatización para esteroides plantea dificultades. Se ha constatado que el uso de un tampón de fluoruro de amonio favorece la ionización en el modo de iones negativos⁴ y mejora notablemente la sensibilidad analítica para los esteroides⁵. Tomando esto en consideración, se usó un tampón de fluoruro de amonio 1 mM como fase móvil para los esteroides más problemáticos, lo que consiguió mejorar de forma significativa la sensibilidad analítica de los instrumentos. En los estudios adicionales de la concentración del tampón, se comprobó que una concentración menor de fluoruro de amonio (0,2 mM) ofrecía una mayor sensibilidad analítica. Asimismo, el uso de la misma concentración salina en las fases móviles A y B permitía obtener resultados más uniformes. Por ello, se determinó que la condición óptima era usar fluoruro de amonio 0,2 mM en agua y metanol, utilizados como fases móviles A y B, respectivamente.

Tal como se indicó anteriormente⁵, el uso del tampón de fluoruro de amonio mejoró la ionización de estos esteroides complejos en el modo de iones negativos y, además, favoreció la ionización de otros compuestos en el modo de iones positivos. El método instrumental se definió en base a esta condición para el perfil completo de analitos, compuesto

por 15 esteroides. En la Figura 4 se muestran los cromatogramas E1 y E2 correspondientes al límite de cuantificación (LOQ) para la concentración de 5 pg/ml en suero, como demostración de la mejora de la sensibilidad analítica del método.

Un aspecto importante es que los esteroides son muy sensibles a las

superficies de vidrio, sobre todo a bajas concentraciones. El uso de viales de vidrio puede producir variaciones significativas y una pérdida de esteroides, sobre todo en muestras acuosas muy diluidas. Por ello, no deben utilizarse viales ni tubos de vidrio durante la preparación y la manipulación de los patrones y las muestras.

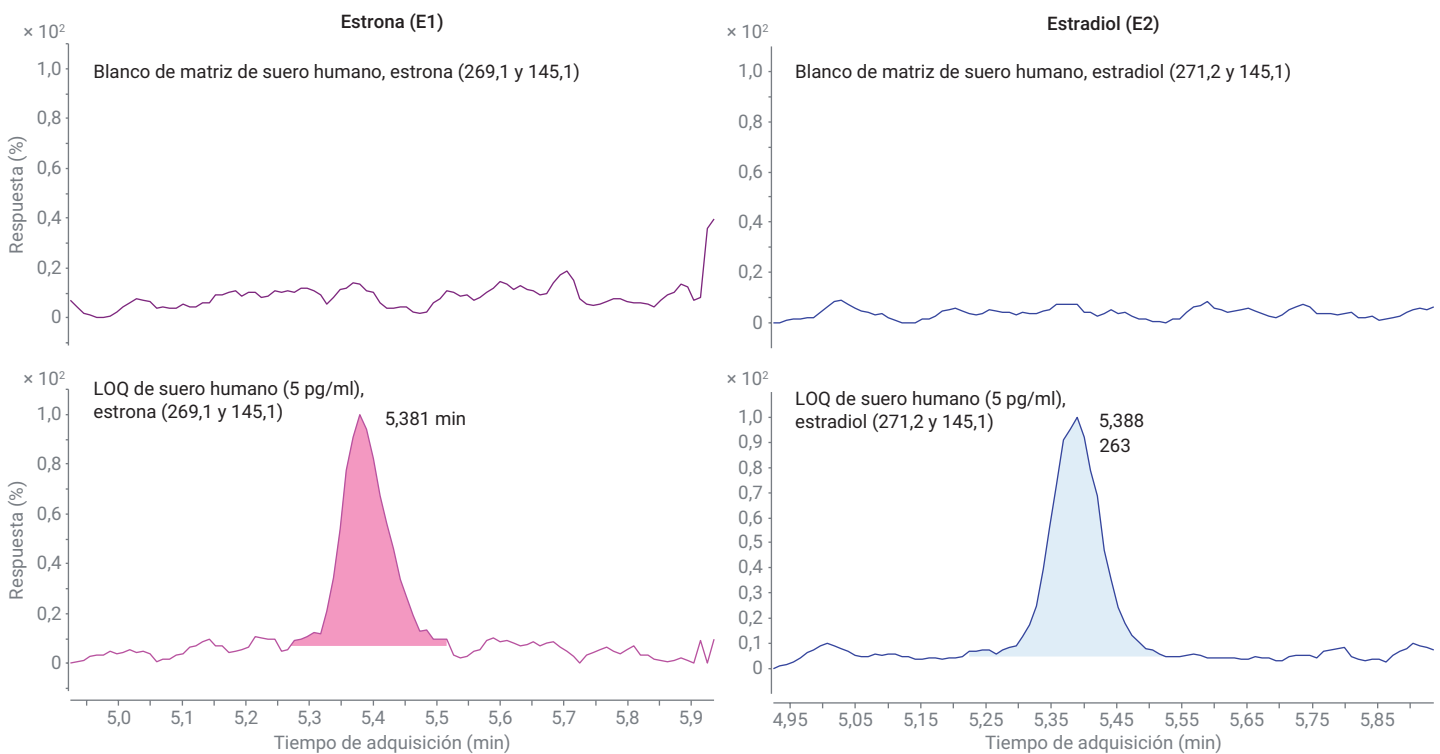


Figura 4. Cromatograma del estrógeno (E1) y el estradiol (E2) para un blanco de suero y una muestra con un límite de cuantificación de 5 pg/ml en suero.

Optimización del método de SLE:

El método de SLE puede desarrollarse a partir de un método existente de LLE, o bien directamente con cartuchos o placas de SLE. En este estudio, el método de SLE se optimizó directamente con placas de SLE, tomando como referencia métodos de LLE publicados. Entre los aspectos de optimización del método de SLE se incluyeron el disolvente, la mezcla de disolventes y la elución de la muestra. La optimización estuvo basada en la evaluación combinada de los valores promedio de recuperación de analitos, DER y efectos de la matriz, tal como se muestra en la Figura 5.

En primer lugar, se estudió el disolvente de extracción; para ello, se evaluaron cuatro disolventes y mezclas de disolventes que se usan habitualmente para la LLE: MTBE, dietil éter (DEE), acetato de etilo y diclorometano (DCM)/MTBE (1:4). Tal como se muestra en el primer grupo comparativo de selección del disolvente (parte izquierda

de la Figura 5), la extracción con MTBE consiguió los mejores valores promedio de efectos de la matriz (es decir, la matriz más limpia); sin embargo, los valores promedio de recuperación fueron bajos. La mayor eficiencia se obtuvo en la extracción con acetato de etilo, pero ese disolvente también incrementó la supresión iónica de la matriz. La extracción con DEE y con la mezcla de DCM/MTBE dio lugar a valores bajos de recuperación de analitos; además, la extracción con DCM/MTBE también provocó problemas de reproducibilidad. Por todo ello, se llevaron a cabo pruebas adicionales con la mezcla MTBE/acetato de etilo para buscar el mejor equilibrio posible entre los valores de recuperación de analitos y los efectos de la matriz.

En el segundo grupo comparativo, correspondiente a la optimización de la mezcla de disolventes (parte central de la Figura 5), se utilizaron relaciones de mezcla de 1:1, 2:1 y 1:2 para el MTBE y el acetato de etilo, y dichas

mezclas se usaron para la extracción de las muestras. En la Figura 5 puede apreciarse que la mezcla de extracción de MTBE/acetato de etilo 1:1 consiguió el mejor equilibrio posible entre la recuperación de analitos y los efectos de la matriz; por este motivo, se seleccionó como disolvente óptimo para la extracción. En estos estudios se llevó a cabo una extracción doble con 500 µl de disolvente. Asimismo, la extracción de las muestras se evaluó en profundidad mediante una extracción triple con 400 µl del disolvente óptimo. Los resultados se muestran en el tercer grupo comparativo (parte derecha de la Figura 5). La extracción triple con un volumen de elución de 400 µl permitió incrementar los valores promedio de recuperación de analitos sin que eso influyese en los efectos de la matriz. Por lo tanto, se seleccionó como método óptimo de SLE una extracción triple con 400 µl de MTBE/acetato de etilo 1:1.

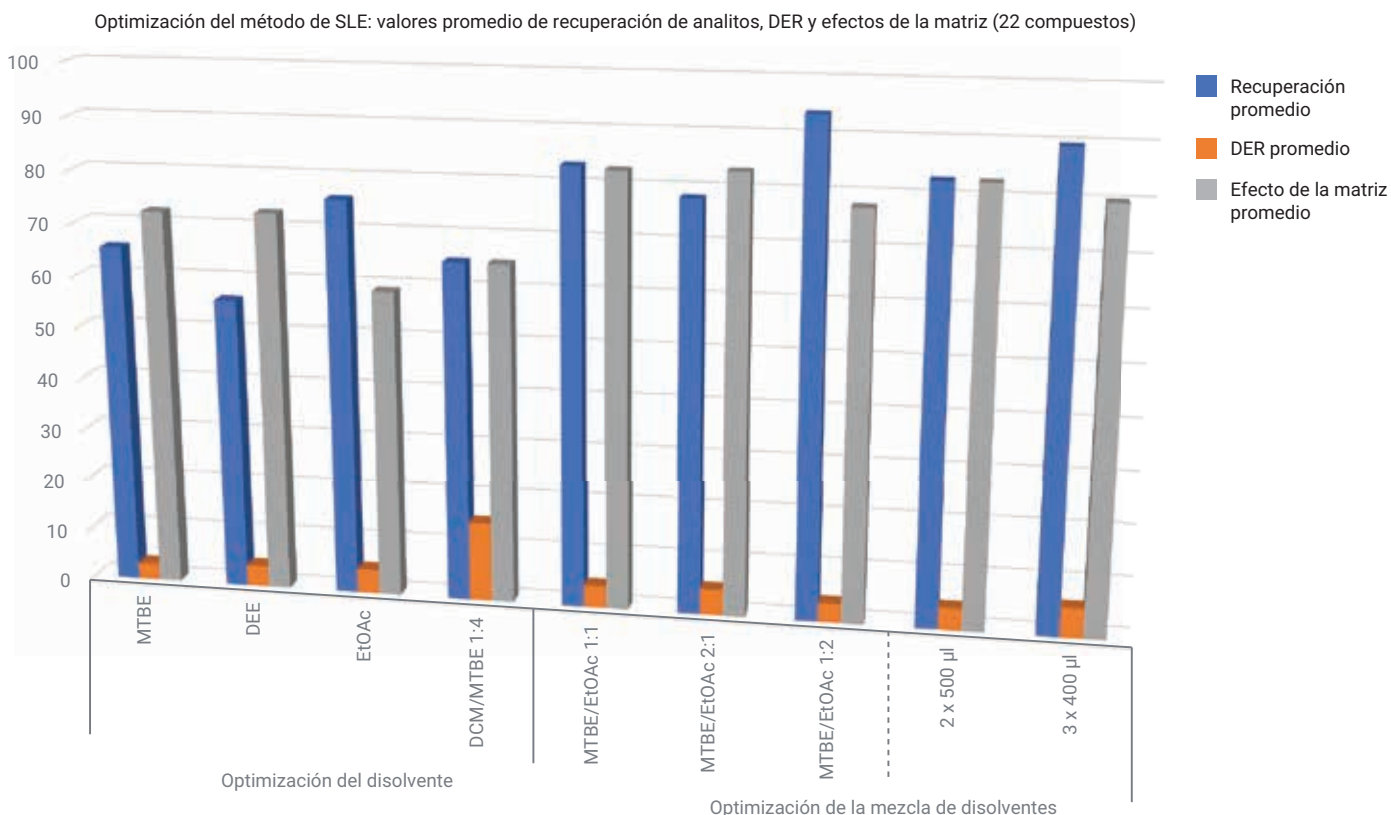


Figura 5. Optimización del método de SLE en términos de selección del disolvente y elución de la muestra. La optimización estuvo basada en la evaluación combinada de los valores promedio de recuperación de analitos, DER y efectos de la matriz.

Verificación del método

Para verificar el método optimizado, se llevó a cabo un ensayo de exactitud y precisión de tres días de duración con el fin de obtener resultados cuantitativos completos. Los resultados que se muestran en la Tabla 3 incluyen datos de las curvas de calibración y del ensayo de exactitud y precisión de tres días de duración. Las curvas de calibración se obtuvieron aplicando una regresión lineal

con un factor de ponderación de $1/x^2$ para todos los analitos, con unos valores $R^2 > 0,99$. Se estableció un límite de cuantificación de 5 pg/ml en suero para la mayoría de los analitos, excepto para el estradiol y la testosterona (10 pg/ml) y la progesterona, la 17-hidroxipregnenolona y la hidrocortisona (20 pg/ml), debido a las interferencias de la matriz o a la presencia de analitos en el blanco de matriz. El ensayo de exactitud y precisión de tres

días de duración sirvió para verificar que el método ofreciera una cuantificación fiable, así como para estudiar la reproducibilidad entre lotes de las placas Chem Elut S, ya que se usaron placas de SLE de tres lotes de fabricación. En la Figura 6 se muestra un resumen de la reproducibilidad entre lotes de las placas de SLE, basado en el ensayo de exactitud y precisión de los analitos.

Tabla 3. Resultados de verificación del método para la determinación cuantitativa de 15 esteroides en suero humano.

Analito	LOQ (pg/ml)	Rango de calibración (pg/ml)	Concentración enriquec. control calidad (pg/ml)	Exactitud y precisión						
				Día 1 (lote 1 placas SLE)		Día 2 (lote 2 placas SLE)		Día 3 (lote 3 placas SLE)		DER (%) intradiar./lote (n = 18)
				Exactitud (%) (n = 6)	DER (%) (n = 6)	Exactitud (%) (n = 6)	DER (%) (n = 6)	Exactitud (%) (n = 6)	DER (%) (n = 6)	
Estríol	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
Aldosterona	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
Cortisona	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
Hidrocortisona	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-hidroxipregnenolona	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-desoxicortisol	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
Androstenediona	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
Estrona	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

Analito	LOQ (pg/ml)	Rango de calibración (pg/ml)	Concentración enriquec. control calidad (pg/ml)	Exactitud y precisión						
				Día 1 (lote 1 placas SLE)		Día 2 (lote 2 placas SLE)		Día 3 (lote 3 placas SLE)		DER (%) intradiar./lote (n = 18)
				Exactitud (%) (n = 6)	DER (%) (n = 6)	Exactitud (%) (n = 6)	DER (%) (n = 6)	Exactitud (%) (n = 6)	DER (%) (n = 6)	
11-desoxicorticosterona	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-metoxiestrona	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
Testosterona	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-metoxiestradiol	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-hidroxiprogesterona	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
Progesterona	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

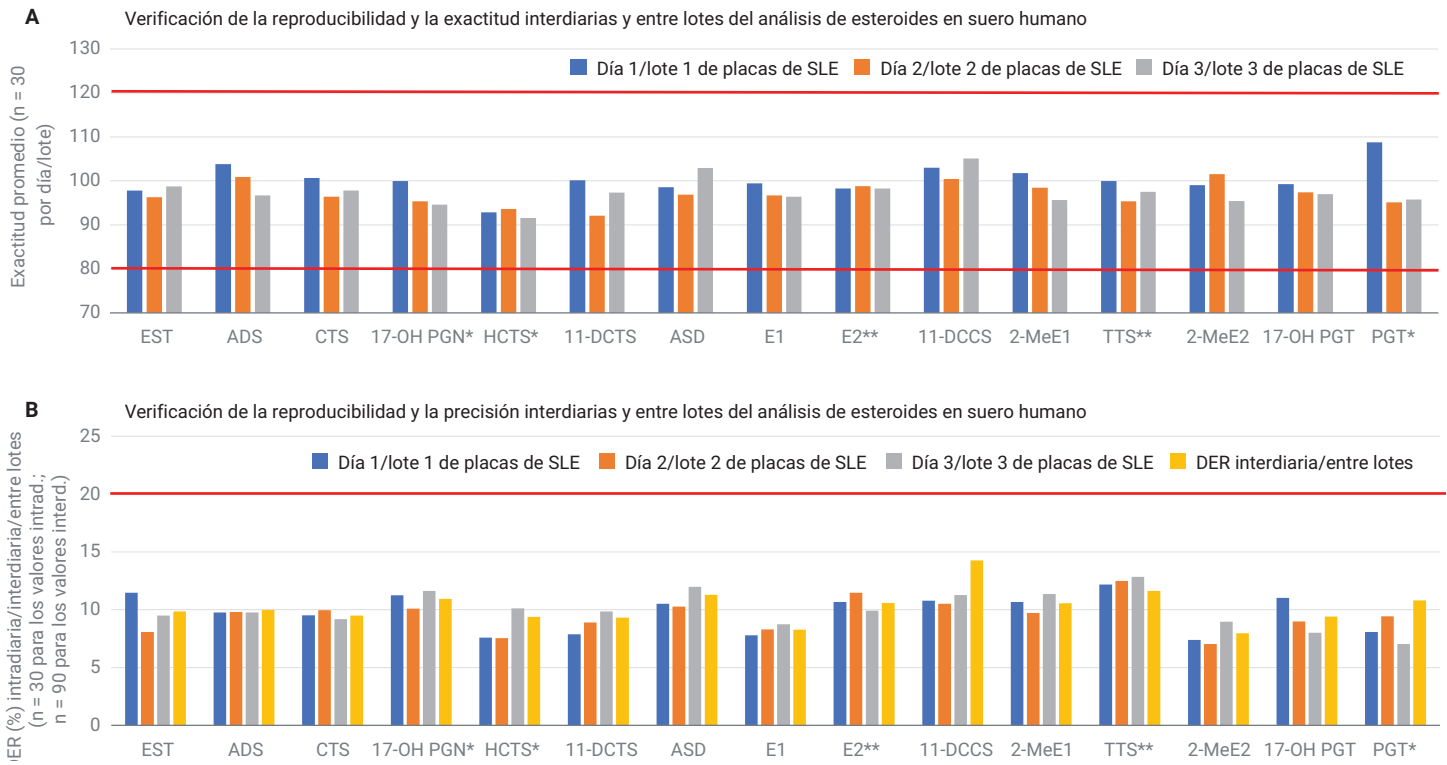


Figura 6. Verificación interdiaria y resumen de reproducibilidad del rendimiento entre lotes de placas para el método Agilent Chem Elut S en función de la exactitud y la precisión.

Comparación de métodos y productos

El rendimiento del método Chem Elut S desarrollado, expresado en términos de valores de recuperación de analitos, reproducibilidad, efectos de la matriz y linealidad de la curva de calibración, se comparó con el de los métodos de LLE convencional y SLE con un producto con tierra de diatomeas elaborado por otro fabricante.

La SLE, en comparación con la LLE, ofrece un ahorro sensible de tiempo y mano de obra. El flujo de trabajo de SLE mejora sensiblemente la preparación de muestras gracias al ahorro de tiempo y mano de obra en etapas críticas, como las de mezcla de muestras, separación de fases y transferencia del sobrenadante orgánico. Gracias a la eliminación de estas etapas, el protocolo de SLE permite obtener un

ahorro de tiempo igual o superior al 50 %, en función del número de muestras.

Además de ahorrar tiempo y mano de obra, el procedimiento de SLE evita la formación de emulsiones y mejora la fiabilidad del método.

En la Figura 7 se compara el rendimiento de los métodos en términos de recuperación de analitos (7A) y reproducibilidad (7B). El protocolo de SLE permite un estrecho contacto entre las fases acuosa y orgánica, lo que consigue un reparto eficiente y posibilita mejorar los valores de recuperación de analitos. Mediante los métodos de SLE, la recuperación de analitos puede incrementarse entre un 10 y un 20 % en comparación con los valores obtenidos con el método de LLE. Los valores más elevados de recuperación de analitos hacen que mejore la respuesta de los

analitos y, gracias a ello, la sensibilidad analítica de los métodos.

Los valores de recuperación obtenidos con el método de SLE con tierra de diatomeas fueron equivalentes o ligeramente inferiores; sin embargo, se observaron variaciones significativas entre pocillos, sobre todo para los analitos más polares. Esto puede atribuirse a la falta de uniformidad de la tierra de diatomeas utilizada como absorbente y a la variabilidad de la capacidad de retención de agua. Debido a la mejora de la reproducibilidad entre pocillos y de la sensibilidad analítica del método que proporcionan las placas Chem Elut S, la linealidad de la curva de calibración también mejoró. Todas estas mejoras hacen que el método de cuantificación resulte más fiable y uniforme.

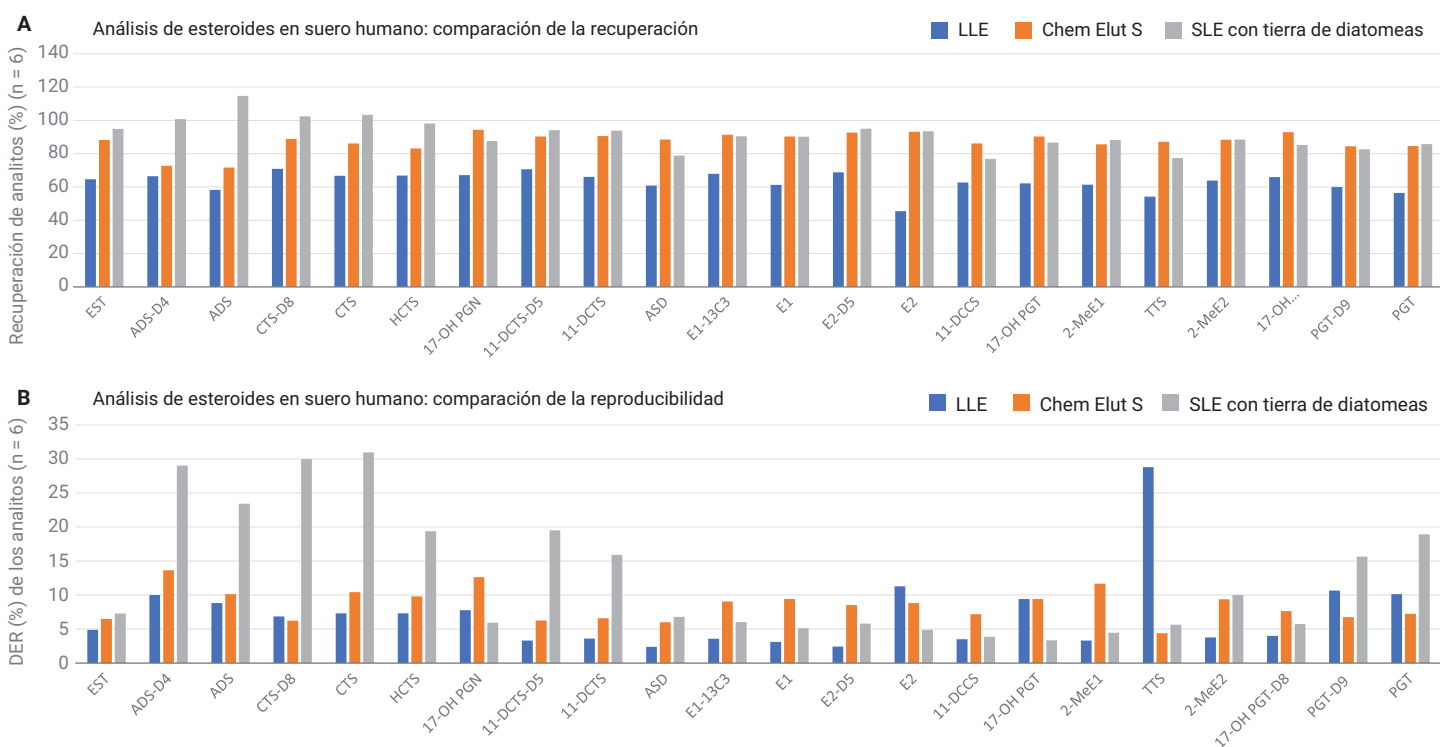


Figura 7. Comparación del rendimiento de distintos métodos y productos: LLE, Agilent Chem Elut S y SLE con tierra de diatomeas.

Eliminación de fosfolípidos de la matriz

El uso de placas Chem Elut S para la preparación de los fluidos biológicos también posibilita la eliminación de fosfolípidos parciales.

En este estudio se utilizó suero sin hormonas para conseguir una buena selectividad de la matriz para límites de cuantificación extremadamente bajos de los esteroides de interés. Sin embargo, el suero purificado tampoco contenía fosfolípidos y puede que no sea necesario para las pruebas de otras aplicaciones. Para estudiar la eliminación de fosfolípidos, se empleó plasma sin purificar para elaborar perfiles de fosfolípidos de la matriz con el método Chem Elut S y los métodos de LLE convencional y SLE con un producto con tierra de diatomeas elaborado por otro fabricante. La comparación de los perfiles, en la Figura 8A, muestra que el uso del método Chem Elut S con MTBE como disolvente consiguió una eliminación de fosfolípidos un 99 % mayor que la obtenida con el método de SLE con un producto de tierra de diatomeas elaborado por otro fabricante, y un 30 % mayor que la obtenida con el método de LLE con MTBE.

También se llevaron a cabo estudios comparativos adicionales de los métodos de SLE con placas Chem Elut S y con tierra de diatomeas, usando para ello diferentes disolventes de extracción y distintos tipos de plasma. Los resultados de dichos estudios se muestran en la Figura 8B. Las respuestas totales de los fosfolípidos se normalizaron en función de la abundancia. Algunas de las conclusiones fueron las siguientes:

- Los distintos tipos de plasma pueden presentar variaciones en la abundancia de fosfolípidos (el plasma lipémico es el que presenta una mayor abundancia).
- Los diferentes disolventes extraen distintas concentraciones de fosfolípidos; por ejemplo, el acetato de etilo y el DCM extraen más fosfolípidos que el MTBE y el DEE.
- El método Chem Elut S puede eliminar fosfolípidos de forma más eficiente que el método de SLE con un producto con tierra de diatomeas elaborado por otro fabricante.

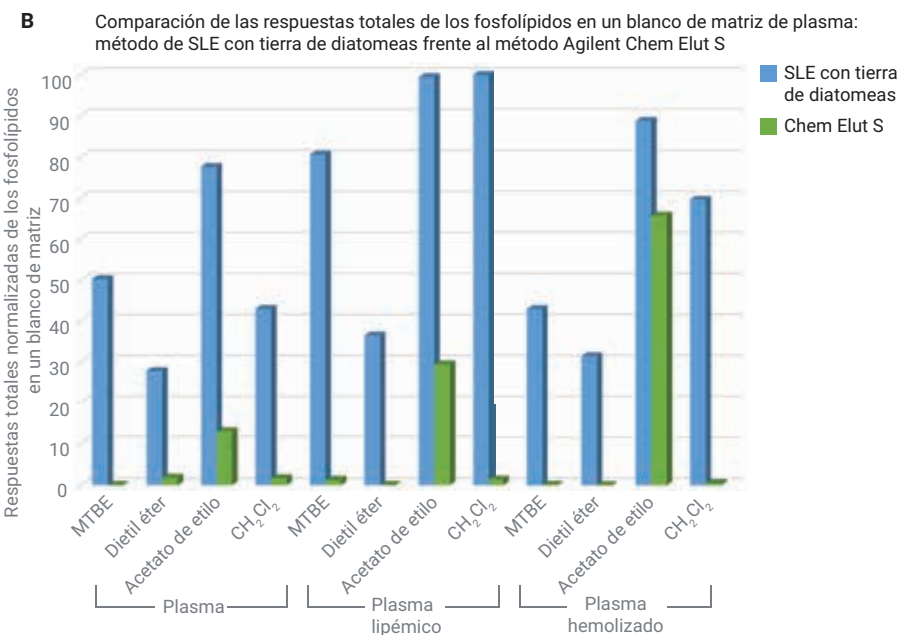
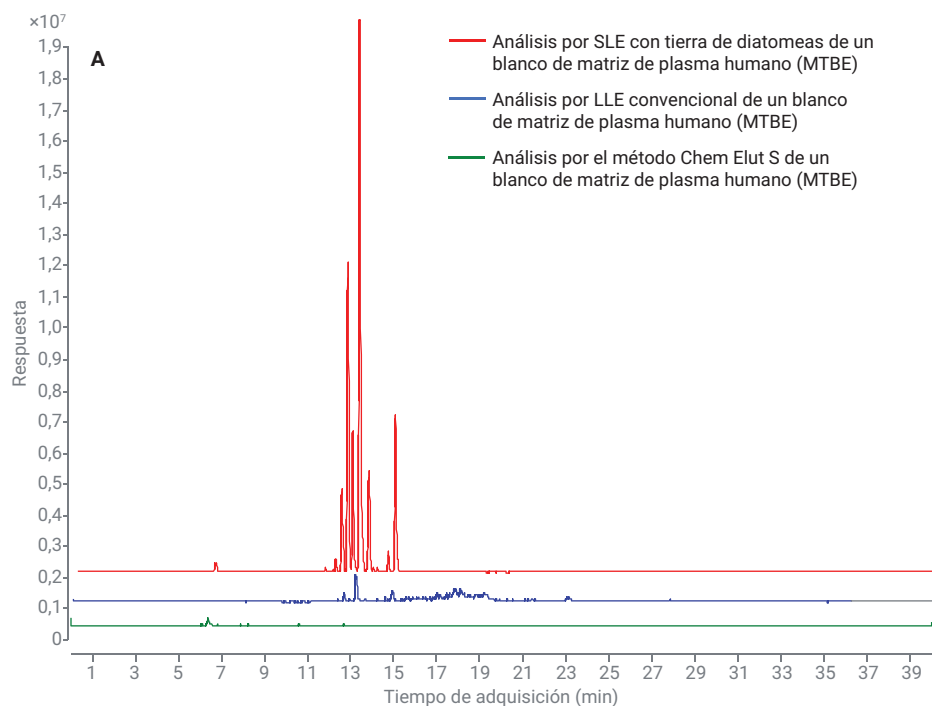


Figura 8. Comparación de la eliminación de fosfolípidos en plasma con distintos disolventes y para distintos métodos: Agilent Chem Elut S, SLE con tierra de diatomeas y LLE.

Conclusión

Se desarrolló y verificó un método de preparación de muestras con placas Agilent Chem Elut S de 2 ml para la determinación cuantitativa de un perfil de 15 esteroides en suero humano. El método de SLE se optimizó en términos del disolvente utilizado y la elución de la muestra, tomando como referencia la recuperación de analitos, la reproducibilidad del método y los efectos de la matriz. El ensayo de exactitud y precisión de tres días de duración sirvió para verificar que este método ofrece una linealidad aceptable de la curva de calibración, unos valores excelentes de exactitud y precisión intradiarias e interdiarias, una excelente recuperación de analitos y una buena reproducibilidad. En comparación con los métodos de LLE convencional y SLE con tierra de diatomeas, el método Chem Elut S consiguió unos valores totales de recuperación de analitos más elevados que la LLE convencional y una mayor uniformidad y reproducibilidad entre los pocillos de un mismo cartucho que el método de SLE con tierra de diatomeas. También permitió eliminar de forma eficiente los fosfolípidos

de las matrices de fluidos biológicos como el plasma y el suero. El protocolo desarrollado con el formato de placa de 96 pocillos es idóneo para dar respuesta a las necesidades de preparación rápida y automatizada de muestras de los laboratorios de alta productividad. El cómodo procedimiento de carga y elución también simplifica el flujo de trabajo de extracción de líquidos y permite conseguir un importante ahorro de tiempo y mano de obra. Las placas Chem Elut S tienen una mayor capacidad de retención de las muestras que los materiales absorbentes de tierra de diatomeas, lo que consigue una adsorción eficiente de las muestras y reduce la probabilidad de que las muestras atraviesen directamente el material. El nuevo diseño de estas placas ofrece las siguientes ventajas:

- Amplio espacio de cabeza para las muestras y eluyente
- Frita superior cuadrada que es capaz de retener muestras hasta que se aplique presión o vacío
- Faldón completo que garantiza la compatibilidad con el hardware
- Elución rápida y uniforme

Referencias

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. *Nota de aplicación de Agilent Technologies*, número de publicación 5991-2473EN, **2013**.

www.agilent.com/chem

Solo para uso en investigación. Prohibido su uso en procedimientos diagnósticos.

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Impreso en EE. UU., 15 de mayo de 2019
5994-0949ES

