

Détermination quantitative d'un panel de stéroïdes endogènes dans le sérum humain par LC/MS/MS

Utilisation d'une plaque d'extraction liquide sur support solide (SLE) Agilent Chem Elut S

Auteur

Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

Résumé

Le produit d'extraction liquide sur support solide (SLE) Agilent Chem Elut S comporte un support synthétique possédant une meilleure capacité de rétention d'eau et produisant des résultats plus répétables que la terre de diatomée conventionnelle. Cette étude illustre l'utilisation de plaques à 96 puits de 2 mL Chem Elut S pour la détermination quantitative d'un panel de 15 stéroïdes endogènes dans le sérum humain par LC/MS/MS. Les échantillons de sérum ont été préparés à l'aide de l'extraction liquide sur support solide (SLE) pour extraire les composés cibles et supprimer les interférences de la matrice dues aux sels, protéines et partiellement les phospholipides. L'ensemble du traitement d'échantillons a été effectué sur une plaque à 96 puits au sein d'un processus séquentiel incluant le chargement de l'échantillon aqueux sur l'adsorbant de SLE, puis l'élution avec un solvant non miscible à l'eau sous l'effet de la gravité. La procédure sur plaque avec Chem Elut S permet de réaliser des économies de temps et de main-d'œuvre substantielles par rapport à l'extraction liquide/liquide (LLE) traditionnelle. Avec une excellente exactitude (80 à 120 %) et reproductibilité (RSD < 15 %), la méthode de SLE a été validée sur une plage de 5 à 10 000 pg/mL dans le sérum pour les stéroïdes cibles, à l'exception de l'œstradiol et de la testostérone, pour lesquels la plage s'étendait de 10 à 10 000 pg/mL, ainsi que de l'hydrocortisone, la 17-hydroxyprégnénolone, et la progestérone pour lesquelles elle était comprise entre 20 et 10 000 pg/mL. La sélectivité et l'effet mémoire de la méthode ont également été évalués. L'augmentation de la limite de quantification (LOQ) pour cinq composés était due à la sélectivité dans la matrice de sérum. De plus, l'adsorbant de SLE synthétique a également permis de diminuer le contenu en phospholipides des matrices de fluide biologique par rapport à un produit de SLE à terre de diatomée et à la LLE traditionnelle, étant donné le solvant utilisé pour l'extraction.

Introduction

La LLE traditionnelle a été largement utilisée pour l'extraction des stéroïdes endogènes au sein de matrices biologiques telles que le sérum et le plasma pour l'analyse des stéroïdes avec ou sans dérivation¹⁻³. Selon ces protocoles, les échantillons de sérum ou de plasma étaient généralement aliquotés dans des tubes de microcentrifugation individuels avant l'addition du solvant d'extraction. Après mélange et centrifugation des échantillons, la couche organique supérieure était transférée dans un autre jeu de tubes ou sur une plaque à 96 puits pour la suite du traitement des échantillons. Dans la pratique, cette procédure comprend des étapes laborieuses et chronophages, comme le marquage des tubes, le mélange des échantillons, la séparation des phases et le transfert de la couche organique, qui affectent l'efficacité de la préparation d'échantillons à haute cadence.

La SLE est une autre approche qui permet d'éviter ces inconvénients. L'adsorbant des cartouches de SLE présente une surface chimiquement inerte sur laquelle l'échantillon aqueux peut se fixer. Après un temps de stabilisation, les composés cibles sont élués avec un solvant non miscible à l'eau sous l'effet de la gravité ou par l'application d'un vide ou d'une pression faible, tandis que la phase aqueuse reste dans la cartouche. En raison de la large surface aqueuse fixée sur l'adsorbant de SLE, les composés cibles sont extraits efficacement dans le solvant organique à mesure qu'il s'écoule à travers le support. La Figure 1 illustre le processus d'extraction.

Avec la SLE, les étapes de mélange ne sont pas nécessaires et la formation d'émulsions peut être complètement évitée. De plus, le contact étroit entre les phases aqueuse et organique permet une séparation efficace et un taux de récupération élevé des composés. Grâce à la facilité du chargement et de l'élué, la procédure de SLE est simple et entraîne une réduction considérable des manipulations et du temps nécessaires. Enfin, le format de SLE en plaque à 96 puits est particulièrement adapté à l'automatisation, qui permet d'augmenter la cadence de préparation des échantillons.

Traditionnellement, l'adsorbant utilisé pour la SLE est constitué de terre de diatomée purifiée. Cependant, la terre de diatomée est un matériau naturel qui est composé de micro-organismes fossilisés irréguliers. Il est donc

difficile de contrôler l'homogénéité des particules d'adsorbant d'un lot à l'autre. La variabilité de l'adsorbant rend plus difficiles la fabrication du produit et la réalisation du contrôle qualité, entraînant un manque de régularité dans les performances d'extraction. De surcroît, comparée à un support synthétique, la terre de diatomée peut présenter une capacité plus faible et variable de rétention d'eau.

L'adsorbant synthétique Chem Elut S améliore nettement la capacité de rétention d'eau, la reproductibilité entre les lots et la régularité des performances. Cette note d'application illustre l'utilisation de plaques à 96 puits Chem Elut S pour la détermination quantitative d'un panel de 15 stéroïdes endogènes (Tableau 1) dans le sérum humain par LC/MS/MS.

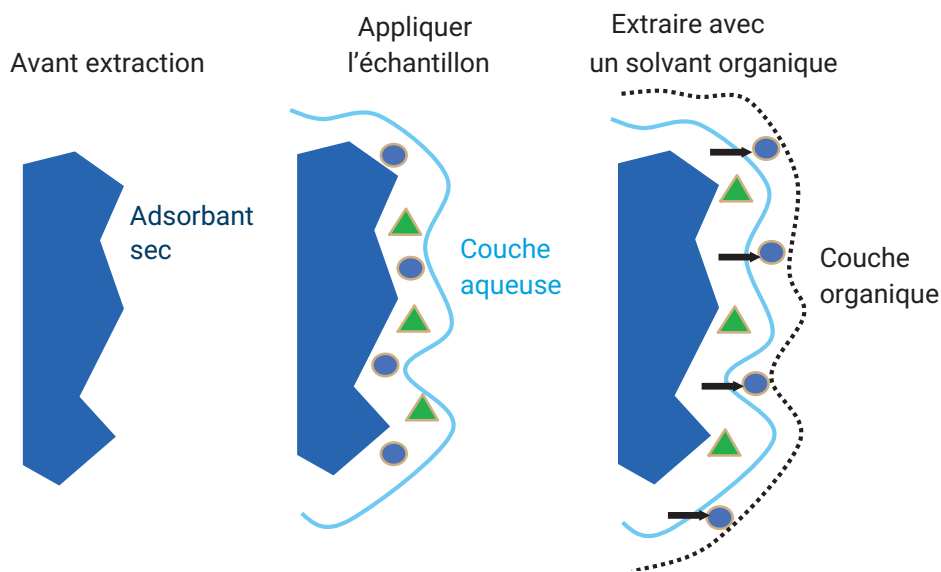


Figure 1. Processus et mécanisme d'extraction des composés par SLE.

Tableau 1. Formules moléculaires et structures des 15 stéroïdes cibles.

Nom	Log P	Formule moléculaire	Structure
2-méthoxyœstriadiol (2-MeE1)	4	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	
Œstriol	2,5	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	
2-méthoxyœstrone (2-MeE1)	3,1	C ₁₉ H ₂₄ O ₃	
Progestérone (PGT)	3,9	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	
17-hydroxyprogestérone (17-OH PGT)	3,2	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	
11-désoxycortisol (11-DCTS)	2,5	C ₂₁ H ₃₀ O ₄	
Œstradiol (E2)	4	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	
Testostérone (TTS)	3,4	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	

Nom	Log P	Formule moléculaire	Structure
Hydrocortisone (HCTS)	1,6	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	
Androstènedione (ASD)	2,7	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	
17-α-hydroxyprégnénolone (17-OH PGN)	3,1	C ₂₁ H ₃₂ O ₃	
11-désoxycorticostérone (11-DCCS)	2,9	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	
Aldostérone	1,1	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	
Œstrone (E1)	3,1	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	
Cortisone (CTS)	1,5	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	

Données expérimentales

Réactifs et produits chimiques

Tous les réactifs et solvants étaient de qualité HPLC ou analytique. Le méthanol (MeOH) provenait de Honeywell (Muskegon, MI, États-Unis), le méthyl *t*-butyl éther (MTBE) provenait de VWR-BDH Chemicals (Radnor, PA, États-Unis) et l'acétate d'éthyle (EtOAc) provenait de J.T. Baker (Center Valley,

PA, États-Unis). Le fluorure d'ammonium, tous les étalons de stéroïdes et les solutions mères d'étalons internes (ÉI), à 1 mg/mL dans le MeOH ou à 100 µg/mL dans le MeOH, provenaient de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, États-Unis). Le sérum humain (DC Mass Spect Gold, MSG4000) a été acheté chez Golden West Biologicals, Inc. (Temecula, CA, États-Unis). Le sérum a été stocké à -70 °C jusqu'à utilisation.

Étalons et solutions

La solution de dopage d'étalons était à 500 ng/mL dans un mélange MeOH/eau 1/1 et la solution de dopage des ÉI était à 50 ng/mL dans un mélange MeOH/eau 1/1. Les composés stéroïdes sont sensibles aux surfaces de verre, surtout à faible concentration. Il est donc important d'utiliser des flacons en plastique pour la préparation et le stockage de toutes les solutions de dopage. Toutes les solutions de dopage ont été stockées à -20 °C jusqu'à leur utilisation.

Les solutions de fluorure d'ammonium (NH_4F) 1 mM dans l'eau et le MeOH ont été préparées en dissolvant 37,04 mg de NH_4F dans 1 L d'eau Milli-Q et de MeOH. Les solutions de NH_4F 0,2 mM dans l'eau (phase mobile A) et de NH_4F 0,2 mM dans le MeOH (phase mobile B) ont été préparées en diluant les solutions de 1 mM solutions avec de l'eau Milli-Q et du MeOH, respectivement.

Le solvant d'extraction, un mélange MTBE/EtOAc 1/1, a été nouvellement préparé pour chaque journée d'analyses en mélangeant 100 mL de MTBE et de EtOAc. Une solution de MeOH/eau 1/1 a été utilisée pour reconstituer les échantillons séchés après la SLE.

Équipements et matériel

L'équipement utilisé pour la préparation des échantillons comprenait les éléments suivants :

- Centrifugeuse Centra CL3R (Thermo IEC, MA, États-Unis)
- Agitateur vortex multitube (VWR, PA, États-Unis)
- Répéteur et pipettes Eppendorf
- Évaporateur SPE Dry 96
- Processeur d'échantillons à collecteur à pression positive 96 positions Agilent (PPM-96, réf. 5191-4116)
- Pipette ViaFlo 96 canaux (Integra, Hudson, NH, USA)
- Plaque à 96 puits de 2 mL Agilent Chem Elut S, 200 μL (réf. 5610-2003)
- Plaque de collecte Agilent à 96 puits carrés de 2 mL (réf. 5133009)
- Tapis de fermeture Agilent pour plaque à 96 puits carrés (réf. 5133005)

Paramètres de l'instrument

Les échantillons ont été analysés sur un LC Agilent 1290 Infinity comprenant une pompe binaire Agilent 1290 Infinity (G4220A), un passeur automatique d'échantillons à haute performance Agilent 1290 Infinity (G4226A) et un compartiment à colonne thermostaté Agilent 1290 Infinity (G131C). Le système de UHPLC était couplé à un LC/MS

triple quadripôle Agilent 6490 équipé d'une source d'ionisation electrospray Agilent Jet Stream et de la technologie iFunnel. Le logiciel de station de travail Agilent MassHunter a été utilisé pour l'acquisition et le traitement des données.

Voir le Tableau 2 pour les paramètres des composés et la Figure 2 pour le chromatogramme LC/MS/MS des stéroïdes à 1 ng/mL dans le sérum.

Paramètres HPLC			
Colonne	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 100 × 2,1 mm, 1,8 μm (réf. 959758-902) Colonne de garde Agilent ZORBAX RRHD C18, 5 × 2,1 mm, 1,8 μm (réf. 821725-901)		
Débit	0,4 mL/min		
Température de colonne	40 °C		
Volume d'injection	20 μL		
Phase mobile	A) Fluorure d'ammonium 0,2 mM dans l'eau B) Fluorure d'ammonium 0,2 mM dans le MeOH		
Rinçage de l'aiguille	ACN/MeOH/IPA/H ₂ O 1/1/1/1 avec AF à 0,2 %		
Gradient	Temps (min)	%B	Débit (mL/min)
	0	50	0,4
	3,0	60	0,4
	8,0	90	0,4
	8,5	100	0,4
Fin d'analyse	8,5 minutes		
Durée postanalyse	2,5 minutes		
Paramètres MS			
Température du gaz	180 °C		
Débit du gaz	11 L/min		
Nébuliseur	20 psi		
Chauffage pour gaz de gainage	400 °C		
Débit du gaz de gainage	10 L/min		
Capillaire	3 500 V (positive), 3 000 V (négative)		
Paramètres iFunnel	RF haute pression : 150 V (positive et négative) RF basse pression : 100 V (positive et négative)		
Acquisition des données	dMRM		

Tableau 2. Composés stéroïdes, ÉI utilisé, temps de rétention et paramètres MRM.

Composé	Étalon interne utilisé	Temps de rétention (min)	Polarité	Ion précurseur (m/z)	Ion fils (m/z)			
					Ion de quantification	CE (V)	Ion de qualification	CE (V)
Œstriol	ÉI 1	2,04	NÉG	287,2	171,0	45	143,1	73
Aldostérone-d ₄ (ÉI1)		2,31	POS	365,2	347,1	17	319,2	21
Aldostérone	ÉI 1	2,32	POS	361,2	343,2	17	91,1	80
Cortisone-d ₈ (ÉI2)		2,71	POS	369,2	169,2	21	125,1	49
Cortisone	ÉI 2	2,75	POS	361,2	163,2	25	91,0	73
Hydrocortisone	ÉI 2	3,24	POS	363,2	121,1	25	91,1	73
17-hydroxyprégnénolone	ÉI 2	3,24	NÉG	331,2	313,2	21	--	--
11-désoxycortisol-d ₅ (ÉI 3)		4,53	POS	352,3	100,0	37	113,0	45
11-désoxycortisol	ÉI 3	4,58	POS	347,2	109,0	41	97,0	41
Androstènedione	ÉI 3	5,31	POS	287,2	97,0	25	109,0	29
Œstradiol-d ₅ (ÉI 4)		5,39	NÉG	276,2	147,0	45	187,0	49
Œstrone- ¹³ C ₃ (ÉI 5)		5,43	NÉG	272,3	148,0	41	146,0	61
Œstrone	ÉI 5	5,42	NÉG	269,1	145,0	49	143,1	73
Œstradiol	ÉI 4	5,45	NÉG	271,2	145,1	49	183,0	49
11-désoxycorticostérone	ÉI 3	5,72	POS	331,0	97,1	25	109,1	33
2-méthoxyestrone	ÉI 5	5,85	NÉG	299,2	284,1	25	--	--
Testostérone	ÉI 6	5,86	POS	289,3	97,1	23	109,1	25
2-méthoxyestradiol	ÉI 4	6,01	NÉG	301,2	286,2	25	--	--
17-hydroxyprogestérone-d ₈ (ÉI 6)		6,21	POS	339,3	100,1	45	113,2	37
17-hydroxyprogestérone	ÉI 6	6,26	POS	331,2	109,1	33	97,1	29
Progestérone-d ₉ (ÉI7)		7,39	POS	324,3	100,1	29	113,0	25
Progestérone	ÉI 7	7,44	POS	315,2	97,1	25	108,9	37

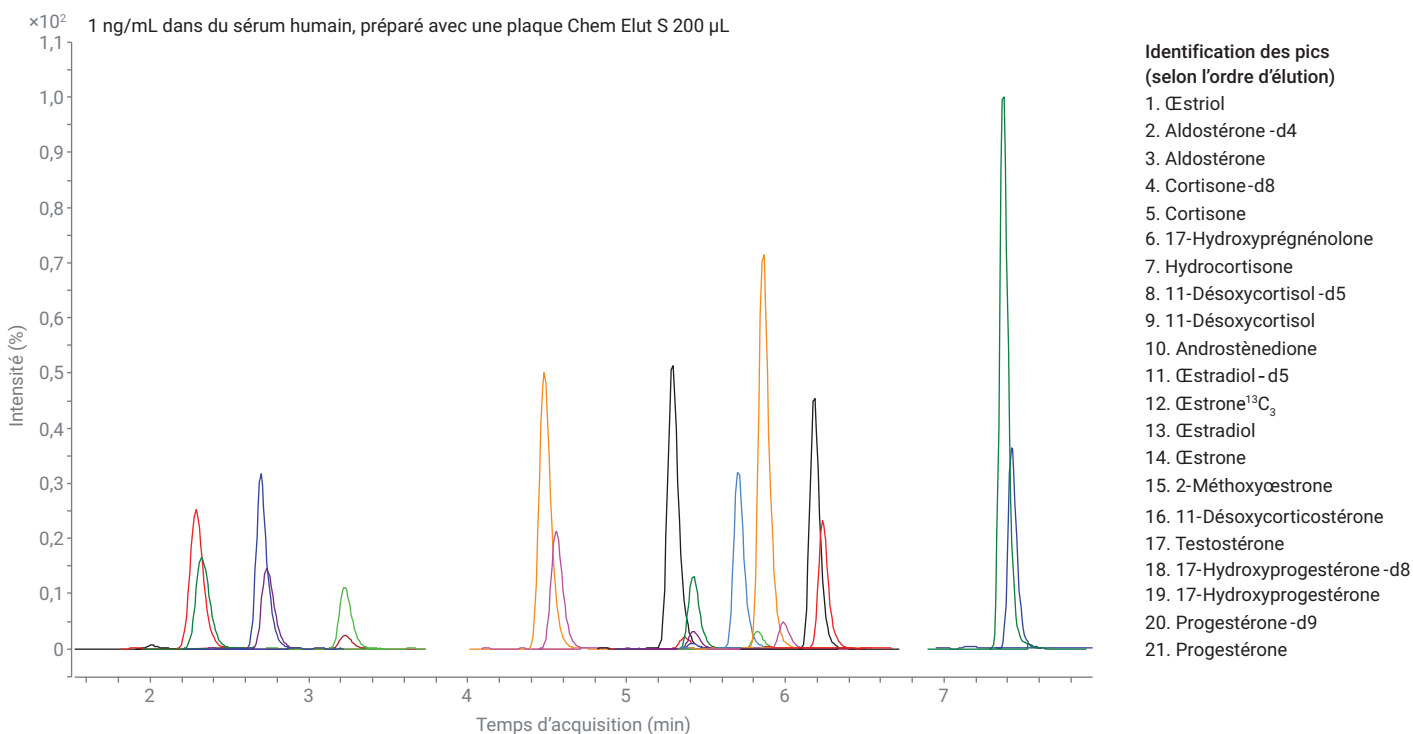


Figure 2. Chromatogramme LC/MS/MS de stéroïdes à 1 ng/mL dans le sérum préparés à l'aide de la méthode d'extraction liquide sur support solide Agilent Chem Elut S.

Préparation des mélanges étalons et des échantillons de CQ

Une solution de dopage d'étalons intermédiaire à 50 ng/mL a été préparée à partir de la solution de dopage d'étalons à 500 ng/mL (dans un mélange MeOH/eau 1/1). La solution de dopage d'étalons intermédiaire a ensuite été utilisée pour préparer les étalons dans du sérum humain requis pour obtenir la courbe d'étalonnage. Les mélanges étalons, à 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1 000, 5 000 et 10 000 pg/mL dans le sérum ont été préparés en dopant le volume approprié de la solution de dopage d'étalons intermédiaire dans un blanc de sérum. Les tests de vérification de l'exactitude et de la précision de la méthode ont été réalisés avec des échantillons de CQ à quatre niveaux de concentration. Ces niveaux comprenaient la limite inférieure de quantification (LLOQ) de 5 (10/20) pg/mL, un niveau de concentration moyen de 100 pg/mL, un niveau de concentration élevé de 1 000 pg/mL et la limite supérieure de quantification (HLOQ) de 10 000 pg/mL. Ces échantillons de CQ ont été préparés en dopant le volume approprié d'échantillon de sérum intermédiaire. Tous les mélanges étalons et les échantillons de CQ ont été préparés dans des tubes à capsules à pression de 2 mL ou dans tubes en plastique de 5 mL. Ils ont ensuite été aliquotés dans une plaque à 96 puits pour l'extraction.

Extraction des échantillons

Les paramètres d'extraction par SLE, notamment le choix du solvant ainsi que le volume et la durée de l'élution, ont été optimisés en termes de taux de récupération des composés et de propreté de la matrice. La Figure 3 présente en détail la procédure optimale de préparation des échantillons. L'ensemble du protocole comprenait quatre parties importantes : l'aliquotage des échantillons sur la plaque, le mélange avec les ÉI et le transfert sur la plaque de SLE, l'extraction des

échantillons sur la plaque de SLE et le post-traitement des échantillons sur la plaque de collecte. Les échantillons de sérum ont été aliquotés dans une plaque de collecte à puits de 1 mL, puis la solution de dopage des ÉI a été ajoutée aux aliquotes. Après agitation des échantillons au vortex, ils ont tous été complètement transférés sur une plaque Chem Elut S à puits de 2 mL, qui était posée sur une plaque de collecte à puits carrés de 2 mL. Il est recommandé d'ajouter le solvant

d'extraction à la plaque de SLE avec soin afin d'éviter toute éclaboussure de solvant susceptible d'entraîner une contamination croisée. L'élution a été effectuée sous l'effet de la gravité jusqu'à l'étape finale de séchage de l'adsorbant, où une pression ou un vide a été lentement appliqué. Puisque le MTBE et l'EtOAc utilisés pour l'extraction sont des solvants volatils, il est important d'accomplir les étapes d'extraction sous hotte aspirante.

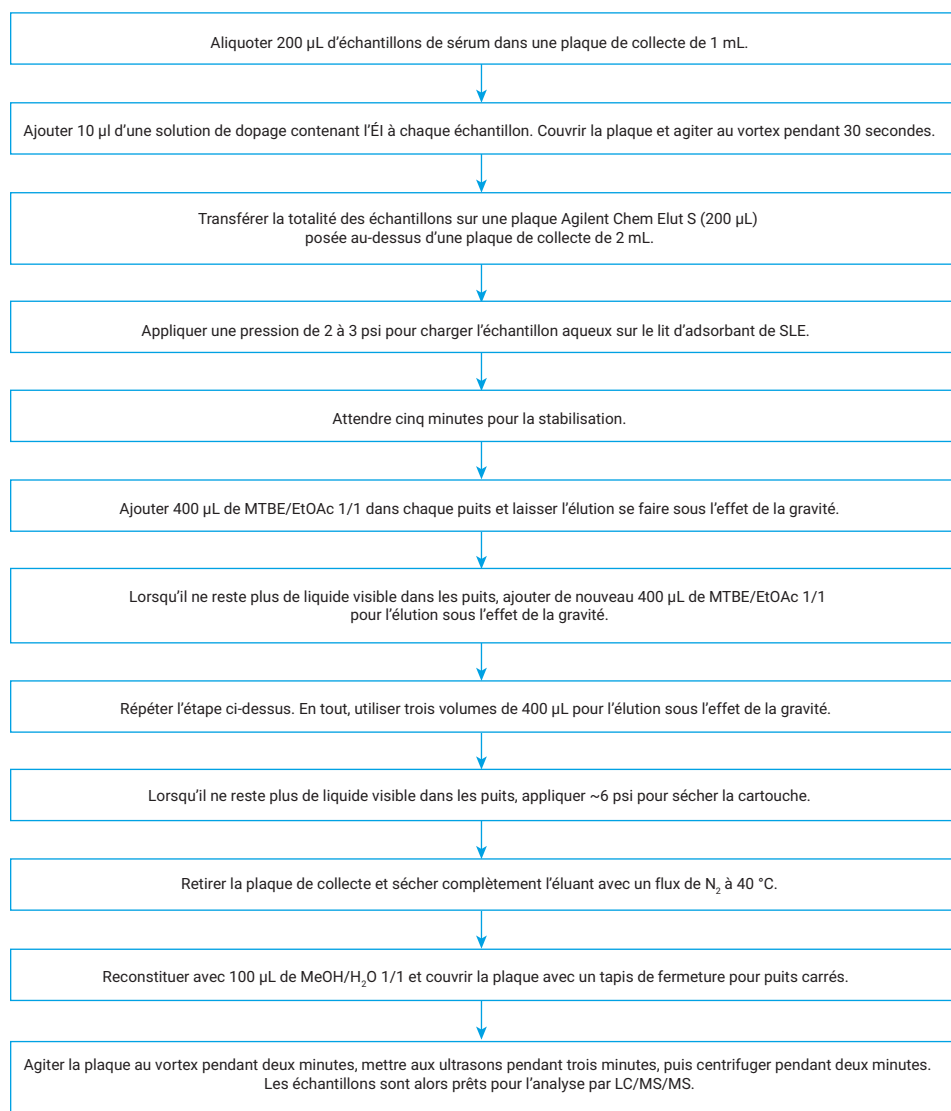


Figure 3. Schéma de la procédure de préparation des échantillons pour l'analyse des stéroïdes dans du sérum avec une plaque à puits de 2 mL Agilent Chem Elut S 200 µL.

Vérification de la méthode

La vérification de la méthode a impliqué des mesures de l'exactitude et de la précision (E et P) sur trois jours. Puisque trois différents lots de plaques de SLE ont été utilisés chaque jour pour l'évaluation de E et P, la vérification de E et P sur trois jours a aussi été utilisée pour les tests de reproductibilité des plaques de SLE d'un lot à l'autre. Les mélanges étalons et les échantillons de CQ ont été pré-dopés de façon appropriée. Les échantillons ont été aliquotés sur une plaque de collecte selon la séquence suivante : double blanc de matrice, blanc de matrice (dopé avec les ÉI), premier jeu de mélanges étalons, deux à trois blancs de matrice, LLOQ (n = 6), CQ de niveau moyen (n = 6), CQ de niveau élevé (n = 6) et HLOQ (n = 6), deux à trois blancs de matrice pour l'effet mémoire, double blanc de matrice, blanc de matrice, second jeu de mélanges étalons, deux à trois blancs de matrice.

Comparaison des méthodes et des produits

La méthode de SLE validée a également été comparée avec la LLE et avec la SLE avec terre de diatomée du point de vue du taux de récupération des composés, de la reproductibilité (RSD), des effets de la matrice et de la linéarité de la courbe d'étalonnage.

Le taux de récupération absolu des composés a été étudiée en comparant la réponse de l'instrument pour les composés (les surfaces de pics) entre les échantillons de CQ pré-dopés et post-dopés à 1 ng/mL dans le sérum. Les échantillons de CQ pré-dopés ont été dopés de façon appropriée directement dans le sérum et les échantillons ont été préparés selon la méthode développée. Les échantillons de CQ post-dopés ont été dopés dans des blancs de matrice après extraction. Plus précisément, le post-dopage a été réalisé durant l'étape de reconstitution des échantillons à l'aide de la solution d'étalon pur appropriée pour reconstituer les blancs de matrice séchés. Les effets de matrice ont été étudiés en comparant la réponse instrumentale pour les composés (les surfaces de pics) entre les échantillons de CQ post-dopés et les étalons purs correspondants dans un blanc de solvant.

Diminution du contenu en phospholipides de la matrice

La propreté de la matrice a été évaluée en suivant le profil de phospholipides. L'extraction d'échantillon de sérum à l'aide de la plaque Chem Elut S a démontré une diminution des phospholipides partiels. Les profils de phospholipides des blancs de matrice ont été comparés pour du sérum déstéroïdé et d'autres types de plasma. L'effet de différents solvants d'extraction sur la diminution des phospholipides a été aussi comparé en utilisant une plaque Chem Elut S et une plaque de SLE concurrente à base de terre de diatomée.

Résultats et discussion

L'objectif de cette étude était d'illustrer l'utilisation de plaques Chem Elut S pour la détermination quantitative des stéroïdes dans le sérum dans les applications de recherche clinique.

Développement et validation de la méthode

Méthode et précautions particulières :

Avec une source d'ionisation electrospray ou d'ionisation chimique à pression atmosphérique, il est très difficile d'ioniser ces cinq stéroïdes : œstriol, œstrogène, œstradiol, 2-méthoxyœstrogène et 2-méthoxyœstradiol. En effet, le signal de ces composés est à peine détectable dans les conditions habituelles, même à forte concentration. Leur dérivatisation peut résoudre ce problème, mais elle requiert des étapes supplémentaires de préparation d'échantillons. Il est également difficile de suivre une méthode mixte de préparation d'échantillons de stéroïdes, avec et sans dérivatisation. Il a été rapporté que l'utilisation d'un tampon de fluorure d'ammonium favorise l'ionisation en mode ions négatifs⁴ et améliore considérablement la sensibilité analytique pour les stéroïdes⁵. À la lumière de ces résultats, un tampon de fluorure d'ammonium 1 mM a été utilisé comme phase mobile pour tous ces composés stéroïdes difficiles, permettant une amélioration substantielle de la sensibilité analytique de l'instrument. Une étude plus approfondie de la concentration du tampon a montré qu'une concentration en fluorure d'ammonium plus faible (0,2 mM) donnait une meilleure sensibilité analytique. De plus, la même concentration en sels dans les deux phases mobiles (A et B) donnait des résultats plus cohérents. Les conditions ont donc été considérées comme optimales avec 0,2 mM de fluorure d'ammonium dans l'eau pour la phase mobile A et dans le MeOH pour la phase mobile B.

L'utilisation d'un tampon de fluorure d'ammonium a non seulement augmenté l'ionisation des composés stéroïdes difficiles en mode négatif, mais aussi amélioré l'ionisation des autres composés en mode positif, comme indiqué précédemment⁵. Une méthode instrumentale a été établie suivant ces conditions pour les 15 stéroïdes

du panel. La Figure 4 représente les chromatogrammes de E1 et E2 pour une concentration de 5 pg/mL, c'est-à-dire la limite de quantification (LOQ), et illustre l'amélioration de la sensibilité analytique de la méthode.

Fait important, les composés stéroïdes sont très sensibles aux surfaces de verre, en particulier à faible concentration.

L'utilisation de flacons en verre peut entraîner des variations importantes et la perte de composés stéroïdes, surtout avec les échantillons à contenu aqueux très élevé. Il faut donc éviter d'utiliser des flacons et des tubes en verre pour la préparation et la manipulation des étalons et des échantillons.

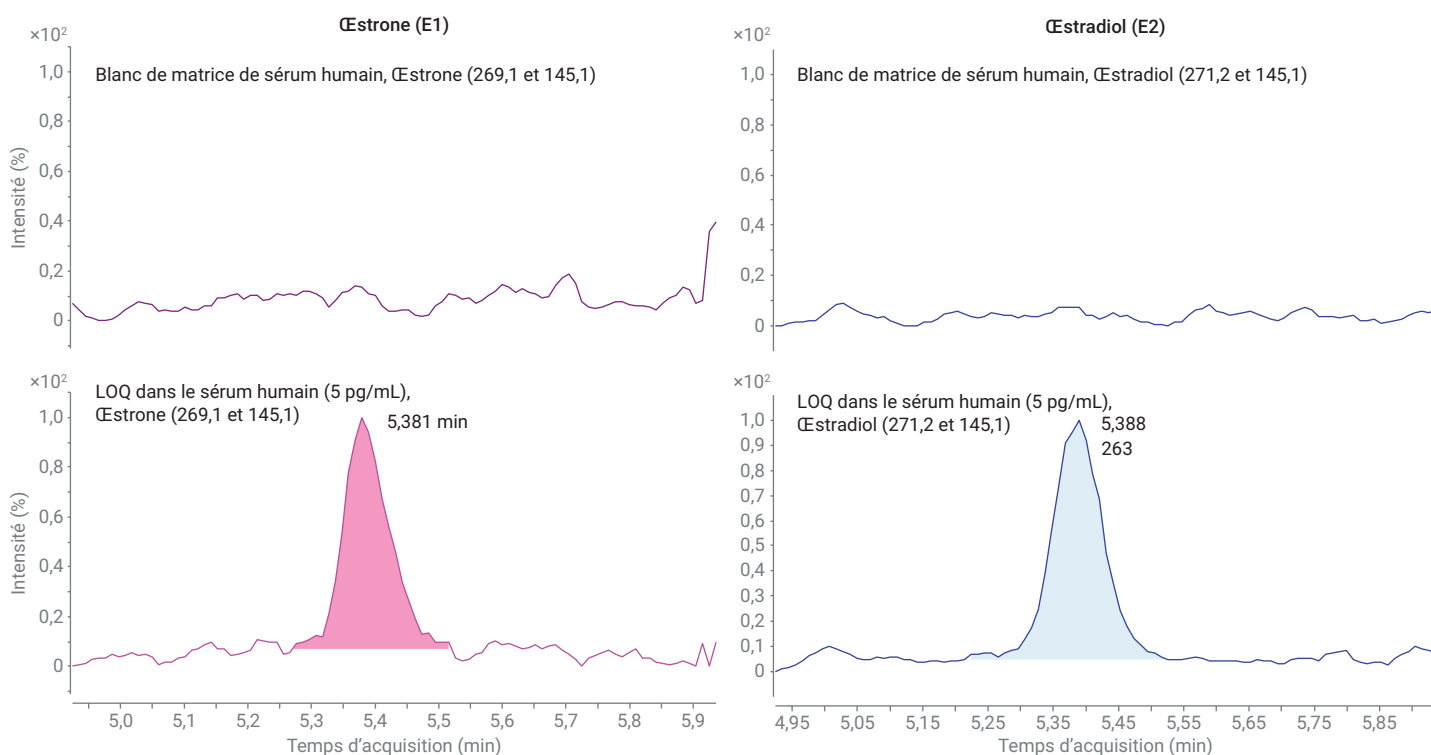


Figure 4. Chromatogramme de l'œstrogène (E1) et de l'œstradiol (E2) pour le blanc de sérum et la LOQ de 5 pg/mL dans le sérum.

Optimisation de la méthode de SLE :

La méthode de SLE peut être développée à partir d'une méthode de LLE existante ou directement avec les cartouches ou plaques de SLE. Dans cette étude, la méthode de SLE a été optimisée directement avec les plaques de SLE en se référant à des méthodes de LLE de la littérature. L'optimisation de la méthode de SLE a inclus l'optimisation du solvant, du mélange de solvants et de l'éluion des échantillons. L'optimisation était fondée sur l'évaluation combinée de la récupération moyenne des composés, de la RSD et des effets de la matrice, comme illustré dans la Figure 5.

L'étude a d'abord porté sur le solvant d'extraction avec l'évaluation de quatre solvants et mélanges de solvants fréquemment utilisés en LLE : MTBE, éther diéthylique (DEE), EtOAc et DCM/MTBE (1/4). Comme illustré dans la première comparaison de groupe de

solvants d'extraction dans la Figure 5 (à gauche), l'extraction avec le MTBE présentait le meilleur effet de matrice moyen, indiquant la matrice la plus propre, mais la récupération moyenne était plus faible. L'EtOAc a généré l'extraction la plus efficace, mais aussi le plus de suppression d'ions due à la matrice. L'extraction avec le DEE et le mélange DCM/MTBE donnait une plus faible récupération des composés, mais le mélange DCM/MTBE présentait aussi une plus faible reproductibilité. L'étude s'est donc concentrée sur le mélange MTBE/EtOAc pour trouver le meilleur compromis entre taux de récupération des composés et effets de la matrice.

Dans la deuxième comparaison de groupe de la Figure 5 (au milieu) pour l'optimisation du mélange de solvants, le MTBE et l'EtOAc ont été mélangés dans un rapport 1/1, 2/1 et 1/2, puis utilisés pour l'extraction des

échantillons. La Figure 5 montre que le mélange d'extraction MTBE/EtOAc 1/1 représentait le meilleur compromis entre récupération des composés et effets de la matrice. Ce mélange a donc été sélectionné comme solvant optimal d'extraction. Ces résultats ont été obtenus en effectuant des doubles extractions avec 500 µL de solvant. L'extraction des échantillons a ensuite été évaluée en utilisant 400 µL de solvant optimal pour une triple extraction. Les résultats sont représentés dans la troisième comparaison de groupe de la Figure 5 (à droite). L'éluion avec 400 µL dans une triple extraction a encore amélioré le taux de récupération moyen des composés sans augmenter les effets de la matrice. Par conséquent, la méthode de SLE a été optimisée avec une triple extraction avec 400 µL de MTBE/EtOAc 1/1.

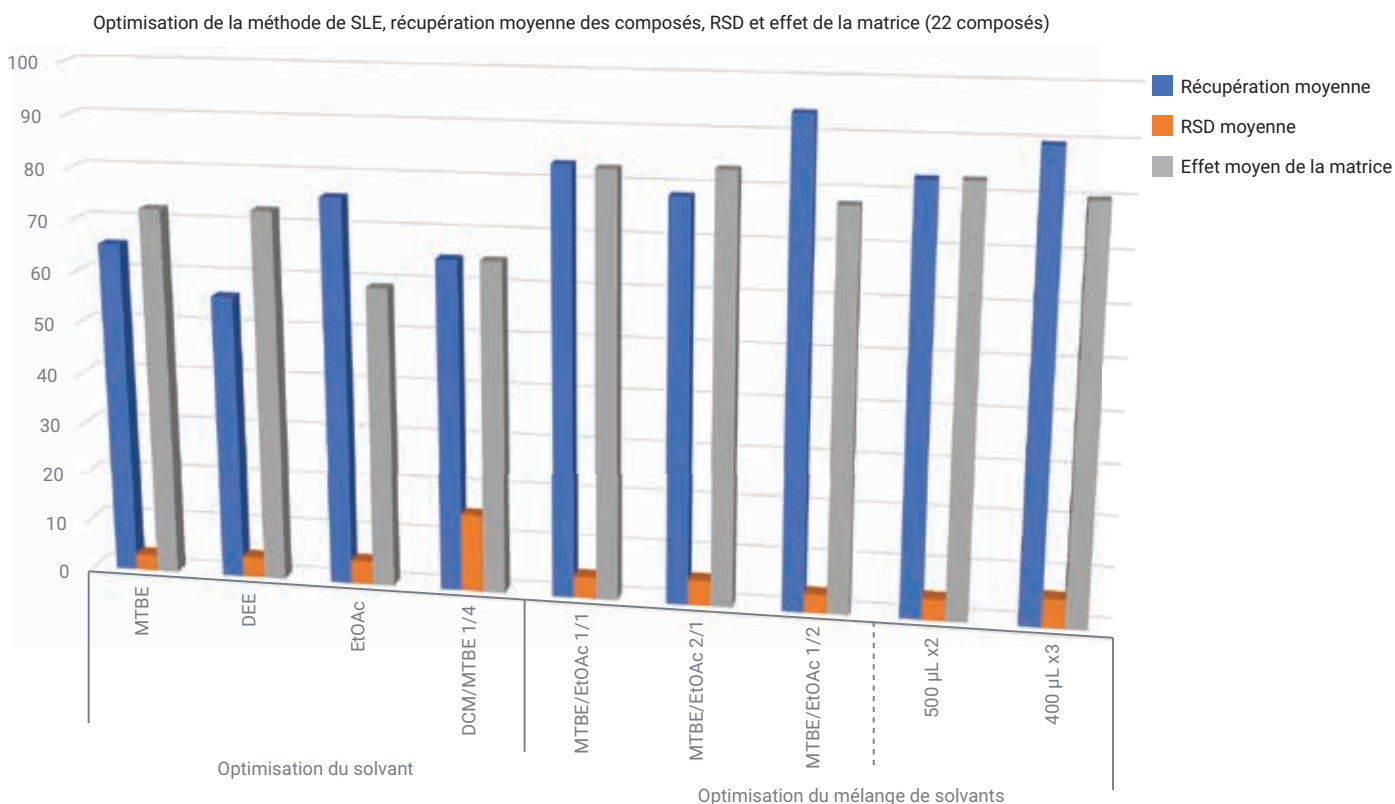


Figure 5. Optimisation de la méthode de SLE en termes de choix du solvant et d'éluion des échantillons. L'optimisation était fondée sur l'évaluation combinée du taux de récupération moyen des composés, de la RSD et des effets de matrice.

Vérification de la méthode

La méthode optimisée a été validée en analysant l'exactitude et la précision sur trois jours par la collecte des résultats quantitatifs. Les résultats présentés dans le Tableau 3 incluent les données des courbes d'étalonnage et les données d'exactitude et de précision des lots de chacune des trois journées. Les courbes d'étalonnage ont été obtenues à l'aide d'une régression linéaire avec

une pondération de $1/x^2$ pour tous les composés, avec $R^2 > 0,99$. Une LOQ de 5 pg/mL dans le sérum a été déterminée pour tous les composés, à l'exception de l'œstradiol et de la testostérone (10 pg/mL) ainsi que de la progestérone, la 17-hydroxyprégnénone et l'hydrocortisone (20 pg/mL) à cause des interférences de la matrice ou des composés dans le blanc de matrice. En plus de démontrer que la méthode

assure des quantifications fiables, les analyses de l'exactitude et de la précision sur trois jours ont aussi permis d'évaluer la reproductibilité entre les lots de plaques Chem Elut S puisque trois lots de plaques de SLE ont été utilisés. La Figure 6 résume les résultats de reproductibilité entre les lots de plaques de SLE en fonction de l'exactitude et de la précision pour les composés.

Tableau 3. Résultats de la vérification de la méthode pour la détermination quantitative de 15 composés stéroïdes dans le sérum humain.

Composé	LOQ (pg/mL)	Plage d'étalonnage (pg/mL)	Concentration de dosage CQ (pg/mL)	Exactitude et précision						
				1 ^{er} jour (1 ^{er} lot de SLE)		2 ^e jour (2 ^e lot de SLE)		3 ^e jour (3 ^e lot de SLE)		RSD en % interjournalier/interlot (n = 18)
				Exactitude en % (n = 6)	RSD en % (n = 6)	Exactitude en % (n = 6)	RSD en % (n = 6)	Exactitude en % (n = 6)	RSD en % (n = 6)	
Œstriol	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
Aldostérone	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
Cortisone	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
Hydrocortisone	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-hydroxyprégnénone	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-désoxycortisol	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
Androstènedione	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
Œstrone	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
Œstradiol	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

Composé	LOQ (pg/mL)	Plage d'étalonnage (pg/mL)	Concentration de dopage CQ (pg/mL)	Exactitude et précision						
				1 ^{er} jour (1 ^{er} lot de SLE)		2 ^e jour (2 ^e lot de SLE)		3 ^e jour (3 ^e lot de SLE)		RSD en % interjournalier/interlot (n = 18)
				Exactitude en % (n = 6)	RSD en % (n = 6)	Exactitude en % (n = 6)	RSD en % (n = 6)	Exactitude en % (n = 6)	RSD en % (n = 6)	
11-désoxycorticostérone	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-méthoxyestrone	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
Testostérone	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-méthoxyestradiol	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-hydroxyprogestérone	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
Progestérone	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

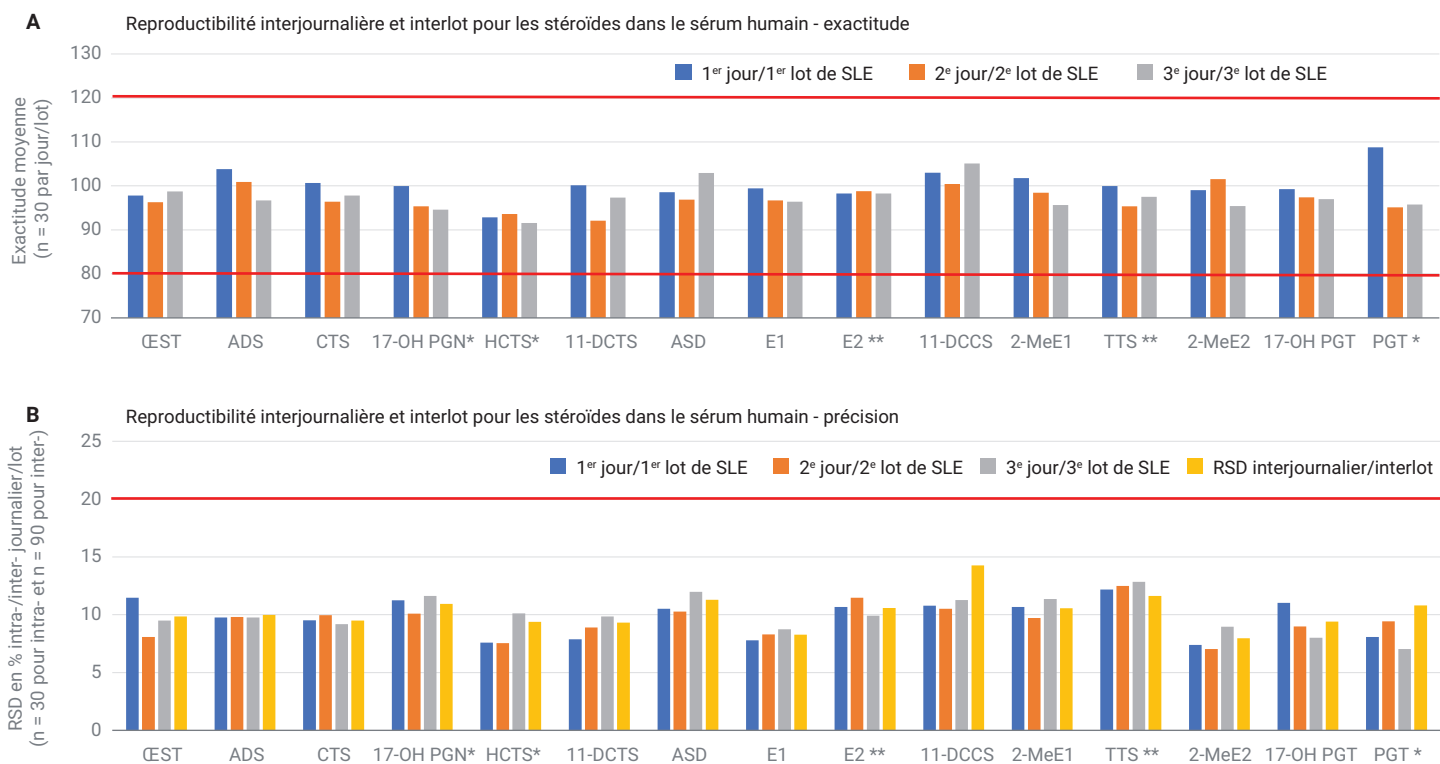


Figure 6. Résumé de la reproductibilité des performances entre les lots de plaques et de la vérification interjournalière pour la méthode Agilent Chem Elut S en fonction de l'exactitude et de la précision.

Comparaison des méthodes et des produits

Les performances de la méthode Chem Elut S développée ici ont été comparées à celles de la LLE traditionnelle et d'un produit de SLE à terre de diatomée concurrent en se basant sur le taux de récupération des composés, la reproductibilité, les effets de la matrice et la linéarité de la courbe d'étalonnage.

Comparée à la LLE, la SLE permet des économies évidentes de temps et de main-d'œuvre. La procédure de SLE améliore sensiblement l'efficacité de la préparation des échantillons en réduisant le nombre et la durée des manipulations pour certaines étapes critiques comme le mélange des échantillons, la séparation des phases et le transfert du surnageant organique. En rendant ces

étapes inutiles, le protocole de SLE peut aisément entraîner un gain de temps d'au moins 50 %, en fonction du nombre d'échantillons. En plus d'engendrer des économies de temps et de main-d'œuvre, la procédure de SLE empêche la formation des émulsions et améliore la fiabilité de la méthode.

La Figure 7 présente une comparaison des performances pour la récupération des composés (7A) et la reproductibilité (7B). Le protocole de SLE implique un contact étroit entre les phases aqueuse et organique, permettant une séparation efficace et améliorant le taux de récupération des composés. Avec la méthode de SLE, le taux de récupération a augmenté de 10 à 20 % par rapport à la méthode de LLE. Un taux de récupération plus élevé améliore la réponse des composés et entraîne l'augmentation de

la sensibilité analytique de la méthode.

Un taux de récupération équivalent ou légèrement supérieur a été obtenu avec le produit de SLE à terre de diatomée. Toutefois, les variations entre les puits étaient importantes, notamment dans le cas des composés plus polaires. Cela peut être attribué au manque de régularité de la terre de diatomée et de la capacité de rétention d'eau de cet adsorbant. Grâce à l'augmentation de la reproductibilité entre les puits et de la sensibilité analytique des plaques Chem Elut S, la linéarité de la courbe d'étalonnage a été également améliorée. Toutes ces améliorations rendent la méthode de quantification plus fiable et permettent d'obtenir des résultats cohérents.

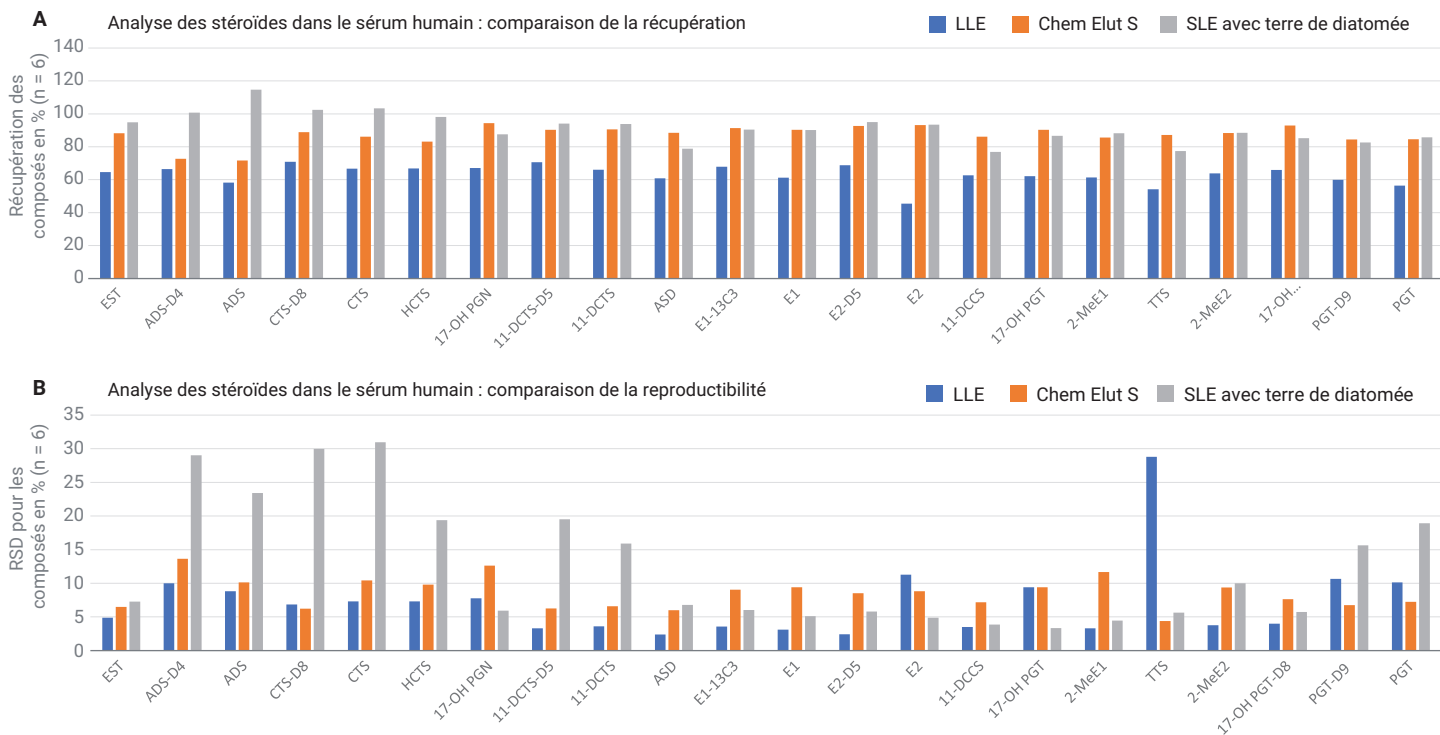


Figure 7. Comparaison des performances des méthodes et produits entre la LLE, Agilent Chem Elut S et la SLE avec terre de diatomée.

Diminution du contenu en phospholipides de la matrice

L'utilisation de plaques Chem Elut S pour la préparation des liquides biologiques permet également de réduire partiellement le contenu en phospholipides.

Dans cette étude, du sérum déstéroïdé a été utilisé pour obtenir une bonne sélectivité aux limites de quantification extrêmement faibles pour les stéroïdes cibles. Mais le sérum déstéroïdé a aussi été appauvri en phospholipides et peut ne pas être nécessaire pour d'autres tests applicatifs. L'appauvrissement du contenu en phospholipides a été étudié en utilisant du plasma non déstéroïdé pour le profilage des phospholipides dans la matrice à l'aide de la LLE standard, de Chem Elut S et d'un produit de SLE à terre de diatomée concurrent. La comparaison des profils dans la Figure 8A montre que l'utilisation de la méthode Chem Elut S avec du MTBE a permis une diminution des phospholipides 99 % supérieure à celle du produit de SLE à terre de diatomée concurrent et 30 % supérieure à la LLE effectuée avec du MTBE.

D'autres études de comparaison entre Chem Elut S et le produit de SLE à terre de diatomée ont été menées avec différents solvants d'extraction sur différents types de plasmas et les résultats sont représentés dans la Figure 8B. Les réponses totales pour les phospholipides ont été normalisées en se basant sur l'abondance. Les résultats indiquent que :

- Différents types de plasmas peuvent présenter des variations d'abondance en phospholipides, les plasmas lipémiques contenant les phospholipides les plus abondants.
- Différents solvants extraient différentes quantités de phospholipides, l'EtOAc et le DCM extrayant plus de phospholipides que le MTBE et le DEE.
- Chem Elut S est plus efficace dans la réduction du contenu en phospholipides que le produit de SLE à terre de diatomée concurrent.

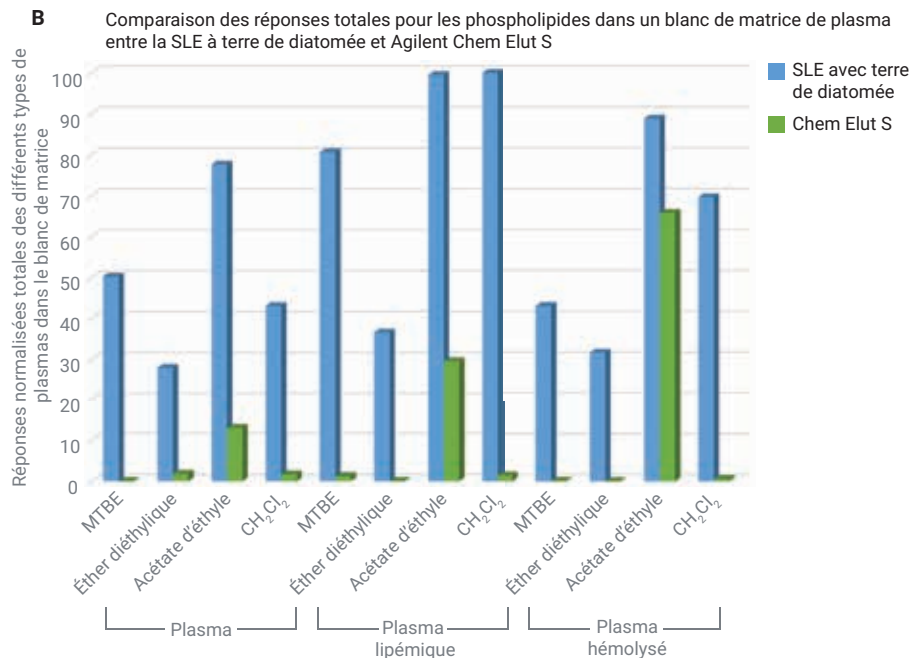
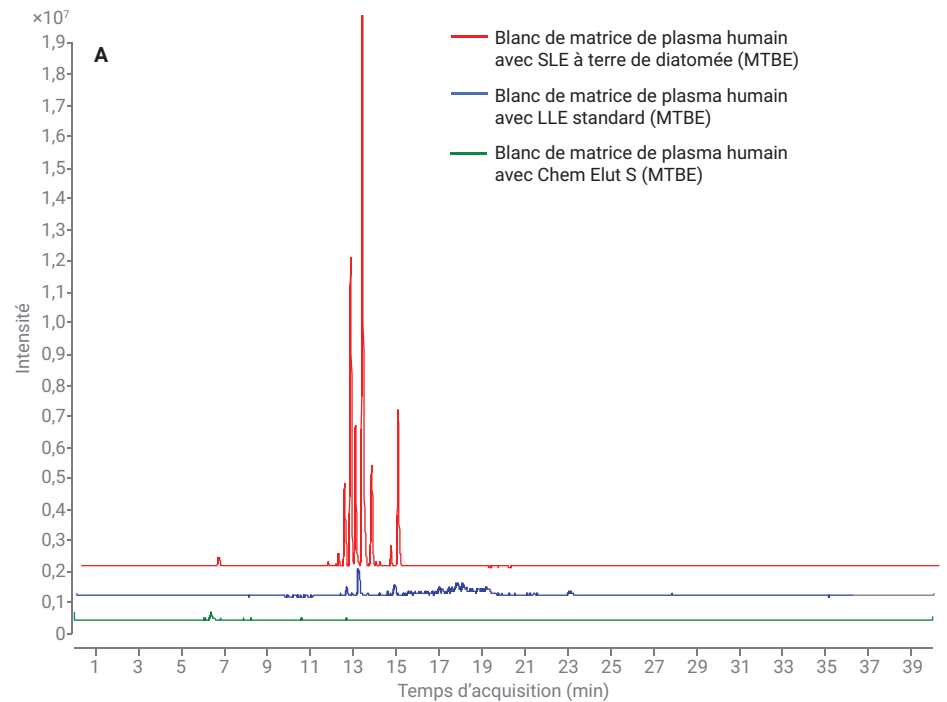


Figure 8. Comparaison de la réduction du contenu en phospholipides dans le plasma entre Agilent Chem Elut S, la SLE avec terre de diatomée et la LLE avec différents solvants.

Conclusion

Une méthode de préparation d'échantillons avec des plaques à puits de 2 mL Agilent Chem Elut S a été développée et validée pour la détermination quantitative d'un panel de 15 stéroïdes dans le sérum humain. La méthode de SLE a été optimisée en termes de choix du solvant et d'élution en fonction du taux de récupération des composés, de la reproductibilité de la méthode et des effets de la matrice. Des analyses de l'exactitude et de la précision sur trois jours ont démontré que cette méthode donnait une linéarité acceptable de la courbe d'étalonnage, une exactitude et une précision intra- et interjournalières remarquables, un excellent taux de récupération des composés et une très bonne reproductibilité. Comparée à la LLE standard et à la SLE avec terre de diatomée, la méthode Chem Elut S a permis un meilleur taux de récupération des composés global que la LLE standard, ainsi qu'une meilleure régularité des performances de l'adsorbant et une plus grande reproductibilité entre les puits que la SLE avec terre de diatomée. Elle a également assuré une réduction plus efficace du contenu en phospholipides pour les matrices de fluides biologiques comme le plasma et le sérum. Le protocole développé avec le format plaque à 96 puits est bien adapté aux besoins en préparation d'échantillons rapide et automatisable des laboratoires à cadence élevée. Le processus de chargement et d'élution pratique simplifie également la procédure d'extraction liquide en apportant des économies substantielles de temps et de main-d'œuvre. Chem Elut S possède une capacité de rétention de l'échantillon supérieure aux adsorbants à terre de diatomée, assurant une adsorption efficace de l'échantillon et réduisant les risques qu'il ne passe dans l'effluent. Le nouveau format sous forme de plaque offre :

- Un large espace de tête (headspace) pour les échantillons et l'éluant.
- Un fritté supérieur carré qui maintient l'échantillon jusqu'à l'application de pression ou de vide.
- Une jupe complète pour la compatibilité matérielle.
- Une élution rapide et régulière.

Références

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*, publication number 5991-2473EN, **2013**.

www.agilent.com/chem

Destiné à la recherche uniquement. Ne pas utiliser à des fins diagnostiques.

Ces informations peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Imprimé aux États-Unis, le 15 mai 2019
5994-0949FR

