

# Determinazione quantitativa di un pannello di steroidi endogeni nel siero umano mediante LC/MS/MS

Usando una piastra per l'estrazione liquida su supporto (SLE) Agilent Chem Elut S

## Autore

Limian Zhao  
Agilent Technologies, Inc.

## Abstract

L'estrazione liquida su supporto Agilent Chem Elut S (Chem Elut S) utilizza mezzi sintetici per una maggiore uniformità e una capacità più elevata di trattenere acqua rispetto alla terra di diatomee tradizionale. Questo studio mostra l'impiego delle piastre Chem Elut S a 96 pozetti da 2 mL per la determinazione quantitativa di un pannello di 15 steroidi endogeni nel siero umano mediante LC/MS/MS. I campioni di siero sono stati preparati usando l'estrazione liquida su supporto (SLE) per estrarre gli analiti target e rimuovere le interferenze dovute alla matrice come sali, proteine e parte dei fosfolipidi. L'intero trattamento del campione è stato condotto a lotti in piastre a 96 pozetti, con caricamento dei campioni acquosi sull'adsorbente per SLE e quindi eluizione per gravità con un solvente non miscibile con acqua. Il flusso di lavoro di Chem Elut S su piastra permette un significativo risparmio di tempo e manodopera rispetto all'estrazione liquido-liquido (LLE) tradizionale. Con un'eccellente accuratezza analitica del metodo (dall'80 al 120%) e un'eccellente riproducibilità ( $RSD < 15\%$ ), il metodo SLE comprovato è stato verificato nell'ampio intervallo di calibrazione da 5 a 10.000 pg/mL in siero per gli steroidi target, tranne per estradiolo e testosterone (da 10 a 10.000 pg/mL) e per idrocortisone, 17-idrossipregnolone e progesterone (da 20 a 10.000 pg/mL). Sono stati valutati anche la selettività del metodo e l'effetto memoria e l'innalzamento del limite di quantificazione (LOQ) per cinque analiti è stato dovuto alla selettività nella matrice di siero. Inoltre, l'adsorbente sintetico per SLE permette una migliore deplezione dei fosfolipidi da matrici di fluidi biologici rispetto alla SLE a base di terra di diatomee e alla LLE tradizionale, a parità di solvente usato per l'estrazione.

## Introduzione

La LLE tradizionale è stata ampiamente usata per l'estrazione degli steroidi endogeni da matrici di campioni biologici come siero e plasma per analizzarli con o senza derivatizzazione.<sup>1-3</sup> In questi protocolli, i campioni biologici come siero o plasma sono stati generalmente suddivisi in aliquote nelle singole provette per microcentrifuga ed è stato aggiunto solvente di estrazione. Dopo la miscelazione e centrifugazione del campione, lo strato organico superiore è stato trasferito in un altro set di provette o in una piastra a 96 pozzi per il successivo trattamento. In pratica, questa procedura include passaggi laboriosi e dispendiosi in termini di tempo come l'etichettatura delle provette, la miscelazione dei campioni, la separazione delle fasi e il trasferimento dello strato organico, che sono i passaggi che limitano la velocità nella preparazione del campione ad alta produttività.

Un approccio alternativo alla LLE che permette di ovviare a questi svantaggi è la SLE. L'adsorbente delle cartucce per SLE fornisce una superficie chimicamente inerte che viene rivestita dal campione acquoso. Una volta raggiunto l'equilibrio, gli analiti target sono eluiti per gravità, vuoto leggero o pressione con un solvente non miscibile con acqua, mentre la fase acquosa resta nella cartuccia. Grazie all'ampia superficie acquosa supportata dall'adsorbente per SLE, gli analiti target sono estratti efficacemente nel solvente organico che passa attraverso il mezzo. La Figura 1 mostra il processo di estrazione. Con la SLE, i passaggi di miscelazione non sono necessari e si può prevenire efficacemente la formazione di emulsioni. Inoltre, il contatto intimo

tra la fase acquosa e quella organica permette una ripartizione efficace, con elevato recupero degli analiti. Il flusso di lavoro della SLE è semplice in quanto consta solo di caricamento ed eluizione, con necessità significativamente ridotte di manodopera e tempo. Infine, il formato per SLE su piastra a 96 pozzi è particolarmente adatto all'automazione, il che aumenta la produttività della preparazione del campione.

Tradicionalmente, l'adsorbente usato per la SLE è terra di diatomée altamente purificata. La terra di diatomée, però, è un materiale naturale, costituito da microrganismi fossili irregolari, ed è difficile controllare l'uniformità delle

particelle di adsorbente da lotto a lotto. La variabilità dell'adsorbente rende più difficili la fabbricazione del prodotto e il controllo della qualità e porta a incoerenze nelle prestazioni. Inoltre, la terra di diatomée può presentare una capacità di trattenere l'acqua inferiore e incostante rispetto a un mezzo sintetico.

L'adsorbente sintetico Chem Elut S migliora notevolmente la capacità di trattenere l'acqua, l'uniformità da lotto a lotto e l'uniformità delle prestazioni. Questa Nota applicativa mostra l'impiego delle piastre Chem Elut S a 96 pozzi per la determinazione quantitativa di un pannello di 15 steroidi endogeni (Tabella 1) nel siero umano.

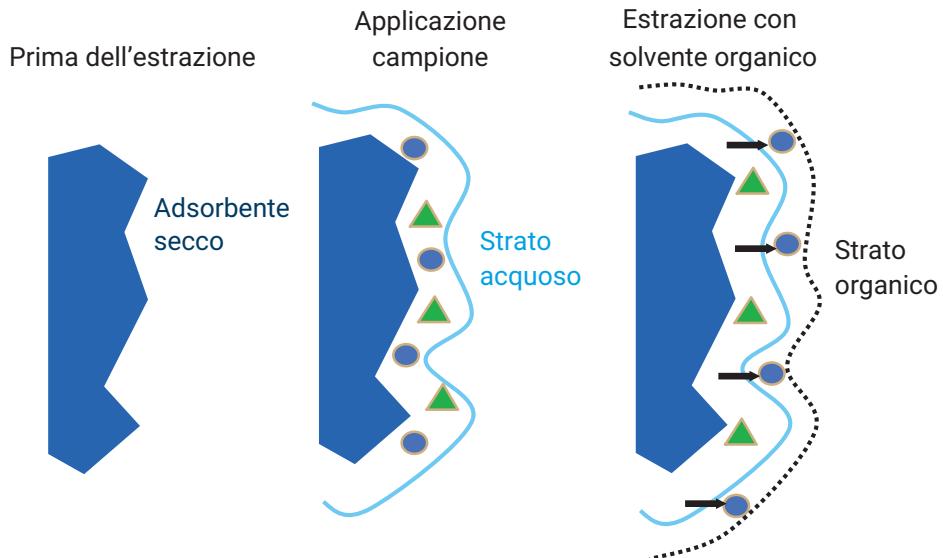


Figura 1. Processo e meccanismo dell'estrazione di analiti della SLE.

**Tabella 1.** Formule molecolari e strutture di 15 steroidi target.

Nome	Log P	Formula molecolare	Struttura
2-Metossiestradiolo (2-MeE1)	4	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>3</sub>	
Estriolo (E2)	2,5	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	
2-Metossiestrone (2-MeE1)	3,1	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	
Progesterone (PGT)	3,9	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	
17-Idrossiprogesterone (17-OH PGT)	3,2	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	
11-Deossicortisolo (11-DCTS)	2,5	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	
Estradiolo (E2)	4	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	
Testosterone (TTS)	3,4	C <sub>19</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	

Nome	Log P	Formula molecolare	Struttura
Idrocortisone (HCTS)	1,6	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub>	
Androstenedione (ASD)	2,7	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub>	
17- $\alpha$ -Idrossipregnolone (17-OH PGN)	3,1	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>	
11-Deossicorticosterone (11-DCCS)	2,9	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>	
Aldosterone	1,1	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>5</sub>	
Estrone (E1)	3,1	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	
Cortisone (CTS)	1,5	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	

## Condizioni sperimentali

### Reagenti e prodotti chimici

Tutti i reagenti e i solventi erano di grado HPLC o analitico. Il metanolo (MeOH) è stato acquistato da Honeywell (Muskegon, MI, USA), il metil-*t*-butil etere (MTBE) da VWR-BDH Chemicals (Radnor, PA, USA) e l'etilacetato (EtOAc) da J.T. Baker (Center Valley, PA, USA). Il fluoruro

d'ammonio, tutti gli standard di steroidi e le soluzioni madri di standard interni, alla concentrazione di 1 mg/mL in MeOH o di 100 µg/mL in MeOH, sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Il siero umano (DC Mass Spect Gold, MSG4000) è stato acquistato da Golden West Biologicals, Inc. (Temecula, CA, USA). Il siero è stato conservato a -70 °C fino al momento dell'uso.

### Standard e soluzioni

La soluzione standard di fortificazione aveva una concentrazione di 500 ng/mL in MeOH/acqua 1:1 e la soluzione IS di fortificazione aveva una concentrazione di 50 ng/mL in MeOH/acqua 1:1. Gli steroidi sono sensibili alle superfici in vetro, specialmente a bassi livelli. È quindi importante usare vial in plastica per la preparazione e la conservazione di tutte le soluzioni di fortificazione. Tutte le soluzioni di fortificazione sono state conservate a -20 °C fino al momento dell'uso.

Le soluzioni di fluoruro d'ammonio ( $\text{NH}_4\text{F}$ ) 1 mM in acqua e MeOH sono state ottenute dissolvendo 37,04 mg di  $\text{NH}_4\text{F}$  in 1 L di acqua Milli-Q e MeOH. La soluzione di  $\text{NH}_4\text{F}$  0,2 mM in acqua (fase mobile A) e di  $\text{NH}_4\text{F}$  0,2 mM in MeOH (fase mobile B) sono state preparate diluendo soluzioni 1 mM rispettivamente con acqua Milli-Q e MeOH.

Il solvente di estrazione, MTBE/EtOAc 1:1, è stato preparato fresco mescolando 100 mL di MTBE ed EtOAc e usato in giornata. Per ricostituire i campioni essiccati dopo SLE è stata usata una soluzione MeOH/acqua 1:1.

### Apparecchiature e materiali

Le apparecchiature usate per la preparazione del campione comprendevano:

- Centrifuga Centra CL3R (Thermo IEC, MA, USA)
- Vortexer multitubo (VWR, PA, USA)
- Dispensatore e pipette Eppendorf
- Evaporatore SPE Dry 96
- Processore per collettore a pressione positiva 96 Agilent (PPM-96, codice 5191-4116)
- Sistema di gestione dei liquidi ViaFlo 96 (Integra, Hudson, NH, USA)
- Piastra a 96 pozzi Agilent Chem Elut S da 2 mL, 200  $\mu\text{L}$  (codice 5610-2003)
- Piastra di raccolta Agilent a 96 pozzi quadrati da 2 mL (codice 5133009)
- Tappi di chiusura Agilent per 96 pozzi quadrati (codice 5133005)

### Condizioni strumentali

I campioni sono stati analizzati con un sistema LC Agilent 1290 Infinity formato da una pompa binaria Agilent 1290 Infinity (G4220A), un autocampionatore ad alte prestazioni Agilent 1290 Infinity (G4226A) e un comparto colonna termostatato Agilent 1290 Infinity (G131C). Il sistema UHPLC è stato abbinato a un sistema LC/MS Agilent

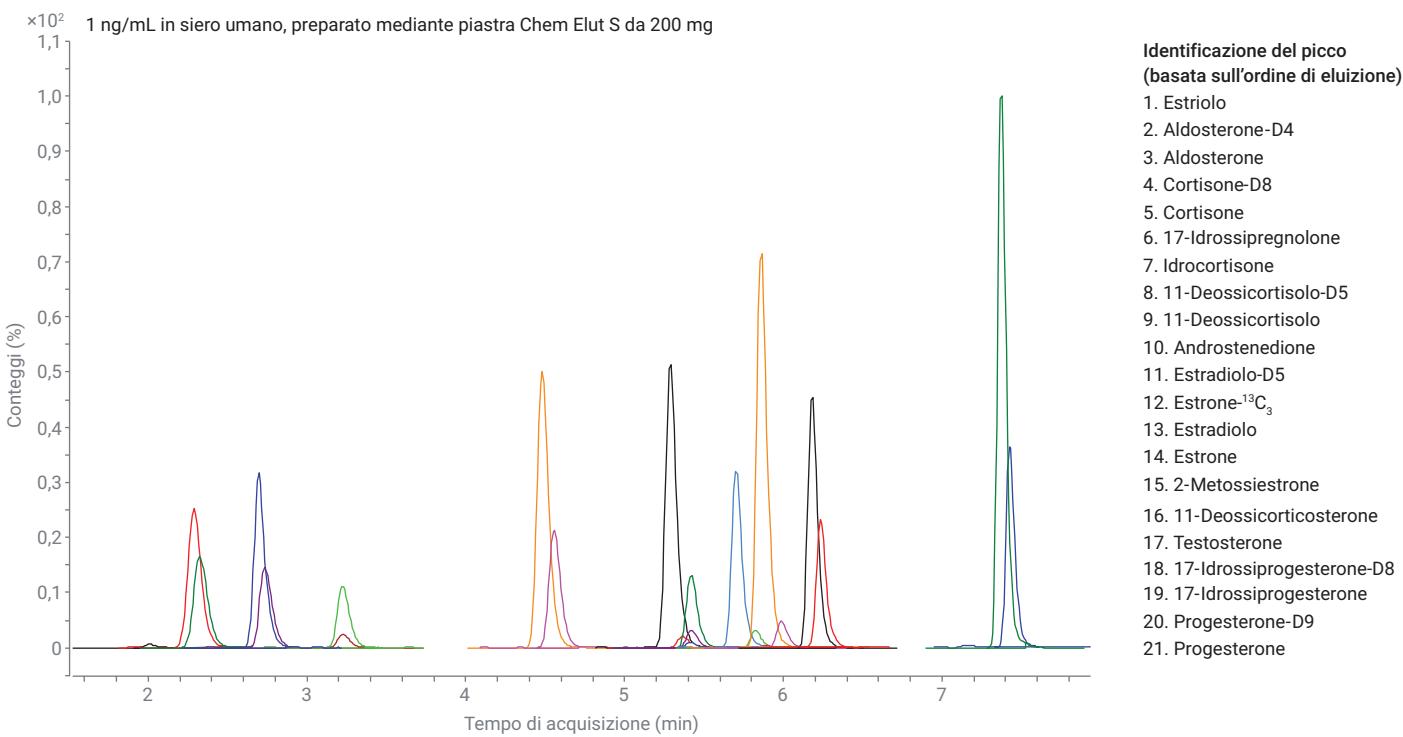
G6490 a triplo quadrupolo dotato di sorgente di ionizzazione iFunnel eletrospray Agilent Jet Stream. Per l'acquisizione dei dati e la relativa analisi è stato usato il software Agilent MassHunter Workstation.

Si veda la Tabella 2 per i parametri analitici e la Figura 2 per il cromatogramma LC/MS/MS di 1 ng/mL di steroidi in siero.

Condizioni HPLC			
Colonna	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 100 × 2,1 mm, 1,8 $\mu\text{m}$ (codice 959758-902) Precolonna Agilent ZORBAX RRHD C18, 5 × 2,1 mm, 1,8 $\mu\text{m}$ (codice 821725-901)		
Flusso	0,4 mL/min		
Temperatura della colonna	40 °C		
Volume di iniezione	20 $\mu\text{L}$		
Fase mobile	A) Fluoruro d'ammonio 0,2 mM in acqua B) Fluoruro d'ammonio 0,2 mM in MeOH		
Lavaggio dell'ago	ACN/MeOH/IPA/H <sub>2</sub> O 1:1:1:1 con FA 0,2%		
Gradiente	Tempo (min)	%B	Flusso (mL/min)
	0	50	0,4
	3,0	60	0,4
	8,0	90	0,4
	8,5	100	0,4
Tempo finale	8,5 minuti		
Tempo post-analisi	2,5 minuti		
Condizioni MS			
Temperatura del gas	180 °C		
Flusso del gas	11 L/min		
Nebulizzatore	20 psi		
Riscaldatore dello sheath gas	400 °C		
Flusso dello sheath gas	10 L/min		
Capillare	3.500 V (positivo) 3.000 V (negativo)		
Parametri iFunnel	RF alta pressione: 150 V (positivo e negativo) RF bassa pressione: 100 V (positivo e negativo)		
Acquisizione dei dati	dynamic MRM		

**Tabella 2.** Analiti steroidei, IS utilizzato, tempo di ritenzione e condizioni MRM.

Analita	Standard interno utilizzato	Tempo di ritenzione (min)	Polarità	Ione precursore (m/z)	Ione prodotto (m/z)			
					Ione quantificatore	CE (V)	Ione qualificatore	CE (V)
Estriolo	IS 1	2,04	NEG	287,2	171,0	45	143,1	73
Aldosterone-D <sub>4</sub> (IS1)		2,31	POS	365,2	347,1	17	319,2	21
Aldosterone	IS 1	2,32	POS	361,2	343,2	17	91,1	80
Cortisone-D <sub>8</sub> (IS2)		2,71	POS	369,2	169,2	21	125,1	49
Cortisone	IS 2	2,75	POS	361,2	163,2	25	91,0	73
Idrocortisone	IS 2	3,24	POS	363,2	121,1	25	91,1	73
17-idrossipregnenolone	IS 2	3,24	NEG	331,2	313,2	21	--	
11-deossicortisol-D <sub>5</sub> (IS3)		4,53	POS	352,3	100,0	37	113,0	45
11-deossicortisol	IS 3	4,58	POS	347,2	109,0	41	97,0	41
Androstenedione	IS 3	5,31	POS	287,2	97,0	25	109,0	29
Estradiolo-D <sub>5</sub> (IS4)		5,39	NEG	276,2	147,0	45	187,0	49
Estrone- <sup>13</sup> C <sub>3</sub> (IS5)		5,43	NEG	272,3	148,0	41	146,0	61
Estrone	IS 5	5,42	NEG	269,1	145,0	49	143,1	73
Estradiolo	IS 4	5,45	NEG	271,2	145,1	49	183,0	49
11-deossicorticosterone	IS 3	5,72	POS	331,0	97,1	25	109,1	33
2-metossiestrone	IS 5	5,85	NEG	299,2	284,1	25	--	--
Testosterone	IS 6	5,86	POS	289,3	97,1	23	109,1	25
2-metossiestradiolo	IS 4	6,01	NEG	301,2	286,2	25	--	--
17-idrossiprogesterone-D <sub>8</sub> (IS6)		6,21	POS	339,3	100,1	45	113,2	37
17-idrossiprogesterone	IS 6	6,26	POS	331,2	109,1	33	97,1	29
Progesterone-D <sub>9</sub> (IS7)		7,39	POS	324,3	100,1	29	113,0	25
Progesterone	IS 7	7,44	POS	315,2	97,1	25	108,9	37



**Figura 2.** Cromatogramma LC/MS/MS di 1 ng/mL di steroidi in siero preparati usando il metodo di estrazione liquida su supporto Agilent Chem Elut S.

## Preparazione di standard di calibrazione e di campioni QC

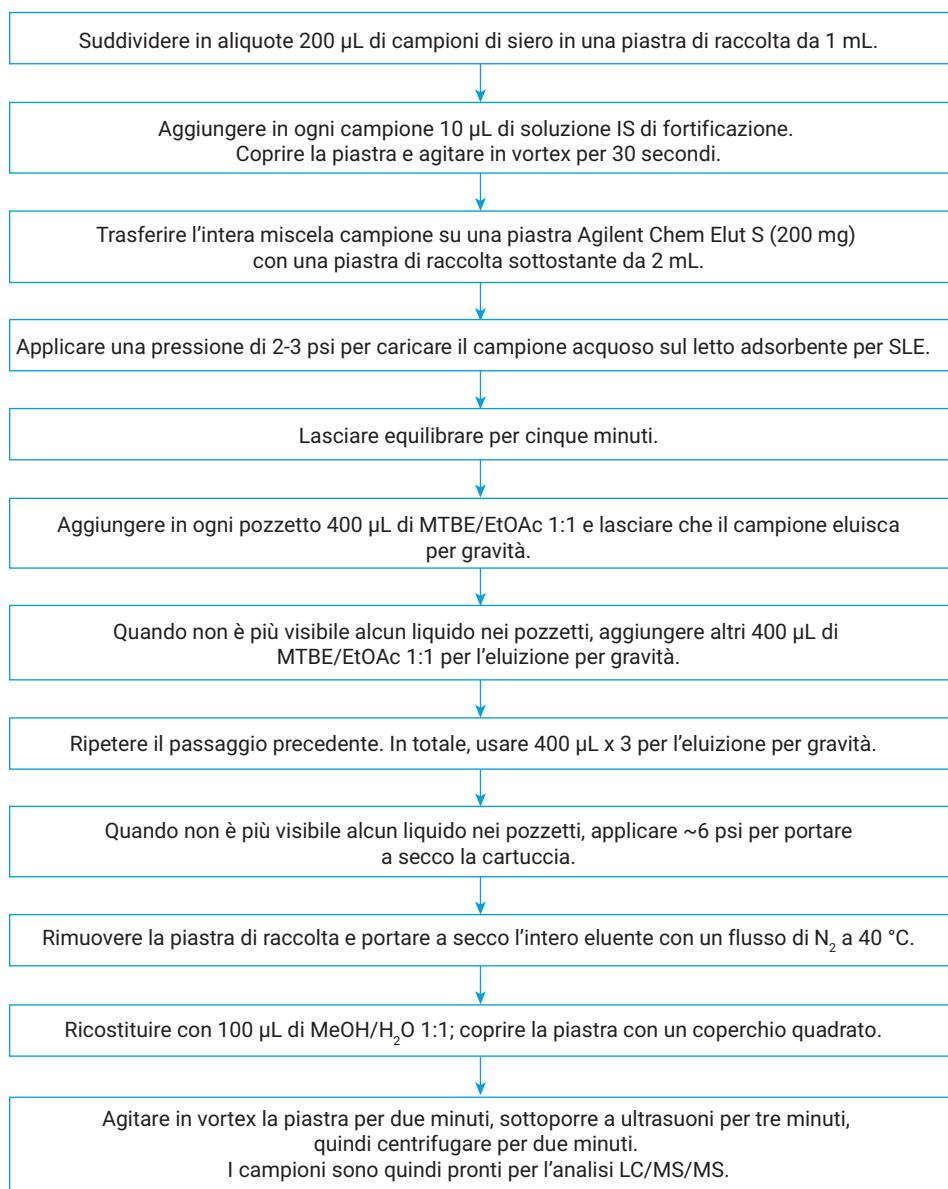
È stata preparata una soluzione standard intermedia di fortificazione a 50 ng/mL in siero usando la soluzione standard di fortificazione da 500 ng/mL (in MeOH/acqua 1:1). Questa soluzione standard intermedia di fortificazione è stata quindi usata per preparare gli standard della curva di calibrazione in siero umano. Gli standard di calibrazione, a 5, 10, 20, 50, 100, 500, 1.000, 5.000 e 10.000 pg/mL in siero, sono stati preparati aggiungendo il volume appropriato di soluzione standard intermedia di fortificazione al bianco siero. Per i test di verifica dell'accuratezza e della precisione del metodo sono stati analizzati quattro livelli di campioni di controllo qualità (QC), incluso il limite inferiore di quantificazione (LLOQ) di 5(10/20) pg/mL, il QC intermedio di 100 pg/mL, il QC alto di 1.000 pg/mL e il limite superiore di quantificazione (HLOQ) di 10.000 pg/mL. Questi campioni QC sono stati preparati allo stesso modo aggiungendo il volume appropriato di campione intermedio di siero. Tutti gli standard di calibrazione e i QC sono stati preparati in provette con tappo a scatto da 2 mL o in provette in plastica da 5 mL. Sono quindi stati suddivisi in aliquote nella piastra a 96 pozzetti per l'estrazione.

## Estrazione del campione

L'ottimizzazione dell'estrazione SLE si è basata sulla considerazione del recupero degli analiti e della purificazione della matrice, inclusa la scelta dei tempi e del volume di eluizione e del solvente. La Figura 3 descrive dettagliatamente la procedura ottimale di preparazione del campione. L'intero protocollo include quattro parti principali: la suddivisione del campione sulla piastra, la miscelazione con l'IS e il trasferimento alla piastra per SLE, l'estrazione del campione sulla piastra per SLE e il post-trattamento del campione sulla piastra di raccolta. I campioni di siero sono stati suddivisi

in aliquote su una piastra di raccolta da 1 mL ed è stata aggiunta la soluzione IS di fortificazione. Dopo l'agitazione del campione in vortex, l'intera miscela è stata trasferita su una piastra Chem Elut S da 2 mL con una piastra di raccolta quadrata sottostante da 2 mL. Prestare cautela quando si aggiunge il solvente di estrazione alla piastra per SLE per

evitare che schizzi, con conseguente contaminazione crociata. L'eluizione per gravità è stata usata fino al passaggio finale di essiccatore dell'adsorbente, dove è stata applicata una pressione o creato il vuoto lentamente. A causa dell'uso dei solventi volatili MTBE ed EtOAc per l'estrazione, è importante condurre i relativi passaggi sotto cappa.



**Figura 3.** Schema del flusso di lavoro per la preparazione del campione per l'analisi di steroidi nel siero mediante piastra Agilent Chem Elut S da 2 mL, 200 µL.

## **Verifica del metodo**

La verifica del metodo ha richiesto l'analisi su tre giorni dell'accuratezza e della precisione (A e P). Poiché sono stati usati tre diversi lotti di piastre per SLE per l'analisi di A e P di ogni giorno, la verifica del metodo per A e P su tre giorni è stata usata anche per i test di riproducibilità da lotto a lotto della piastra per SLE. Sia gli standard di calibrazione sia i campioni QC sono stati appropriatamente pre-addizionati. I campioni sono stati suddivisi in aliquote in una piastra di raccolta con la sequenza seguente: bianco doppia matrice, bianco matrice (addizionata di IS), primo set di standard di calibrazione, da due a tre bianchi matrice, LLOQ ( $n = 6$ ), QC intermedi ( $n = 6$ ), QC alto ( $n = 6$ ) e HLOQ ( $n = 6$ ), da due a tre bianchi matrice per l'effetto memoria, bianco doppia matrice, bianco matrice, un secondo set di standard di calibrazione, da due a tre bianchi matrice.

## **Confronto tra metodi e prodotti**

Il metodo SLE verificato è stato confrontato con LLE e SLE a base di terra di diatomee in termini di recupero di analiti, riproducibilità (RSD), effetto matrice e linearità della curva di calibrazione.

I recuperi assoluti degli analiti sono stati studiati confrontando le risposte strumentali degli analiti (aree dei picchi) tra campioni QC pre-addizionati e post-addizionati a 1 ng/mL in siero. I campioni QC pre-addizionati sono stati correttamente fortificati direttamente nel siero e i campioni sono stati preparati con il metodo sviluppato. I campioni QC post-addizionati sono stati fortificati nei bianchi matrice dopo l'estrazione. Nel dettaglio, la post-addizione è avvenuta durante il passaggio di ricostituzione del campione usando la soluzione standard pura appropriata per ricostituire i campioni di bianco matrice portati a secco. L'effetto matrice è stato studiato confrontando le risposte strumentali degli analiti (aree dei picchi) dei campioni QC post-addizionati con i rispettivi standard puri creati in solvente del bianco reagente.

## **Deplezione dei fosfolipidi dalla matrice**

La purificazione della matrice è stata studiata monitorando il profilo fosfolipidico. L'estrazione del campione di siero con la piastra Chem Elut S ha dimostrato la parziale deplezione dei fosfolipidi. I profili fosfolipidici dei bianchi matrice sono stati confrontati per il siero strippato e per altri tipi di plasma. E' stato ulteriormente confrontato l'uso di diversi solventi di estrazione per la deplezione dei fosfolipidi usando la piastra Chem Elut S e una piastra corrispondente per SLE a base di terra di diatomee di un concorrente.

## **Risultati e discussione**

Questo studio si è incentrato sulla dimostrazione dell'uso delle piastre Chem Elut S per la determinazione quantitativa degli steroidi nel siero per applicazioni di ricerca clinica.

### **Sviluppo e ottimizzazione del metodo**

#### **Metodo strumentale e precauzioni particolari:**

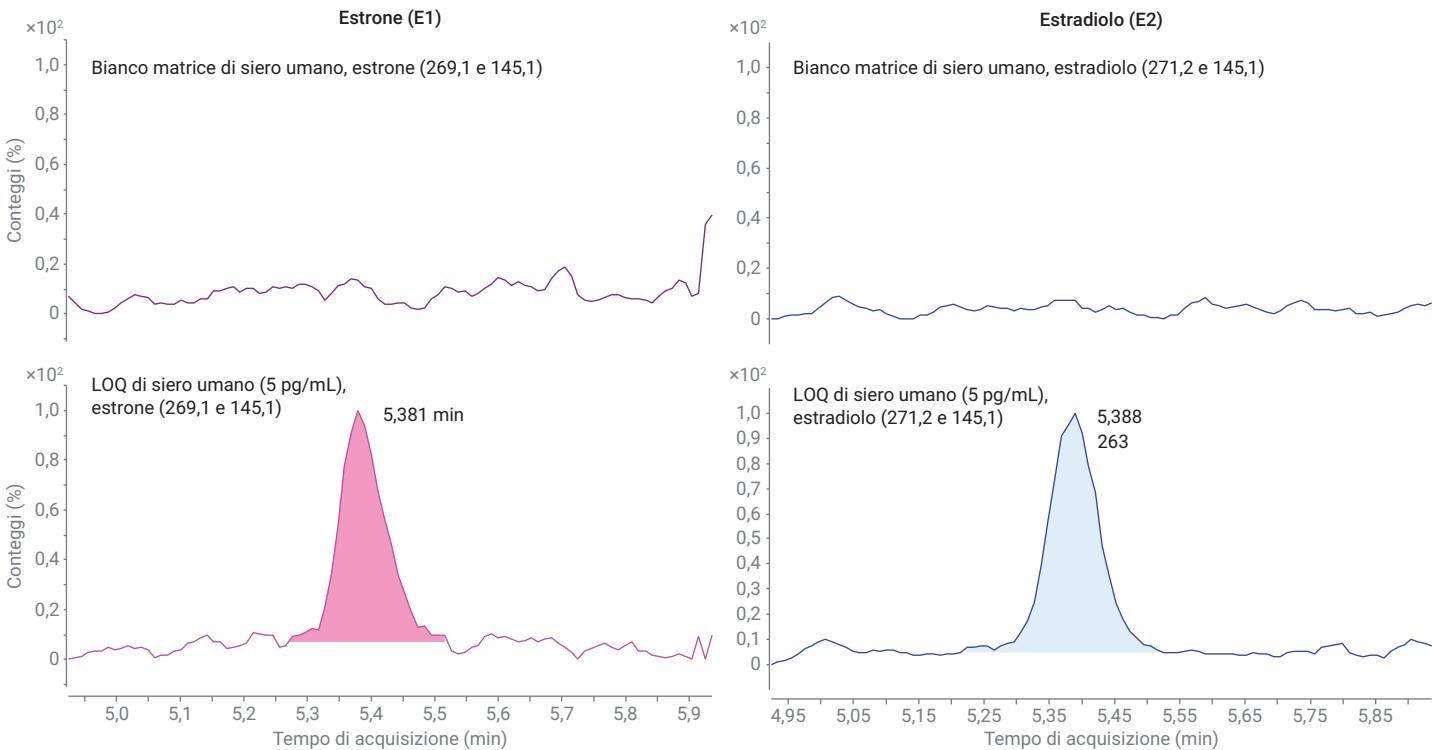
La ionizzazione di cinque analiti steroidei: estriolo, estrogeno, estradiolo, 2-metossiestrogeno e 2-metossiestradiolo, con una sorgente ESI o APCI è molto difficile. In condizioni normali, è difficile vedere i segnali di questi composti anche ad alte concentrazioni. La derivatizzazione di questi composti è possibile ma richiede passaggi aggiuntivi durante la preparazione del campione. È anche difficile effettuare un metodo di preparazione del campione combinato per gli steroidi con e senza derivatizzazione. È stato riferito che l'uso del tampone fluoruro d'ammonio facilita la ionizzazione in modalità negativa<sup>4</sup> e migliora notevolmente la sensibilità analitica degli steroidi.<sup>5</sup> In base a questi risultati, è stato usato un tampone fluoruro d'ammonio 1 mM come fase mobile per questi composti steroidei difficili, che ha permesso un significativo miglioramento delle sensibilità analitiche degli strumenti. Un'ulteriore indagine delle concentrazioni di tampone ha riscontrato che concentrazioni inferiori di fluoruro d'ammonio (0,2 mM) fornivano una migliore sensibilità analitica. Inoltre, la stessa concentrazione salina nelle fasi mobili A e B ha fornito risultati più coerenti. È stato quindi deciso come condizione ottimizzata di usare fluoruro d'ammonio 0,2 mM in acqua e MeOH come fasi mobili A e B.

Come citato precedentemente,<sup>5</sup> l'uso del tampone fluoruro d'ammonio non solo ha aumentato la ionizzazione di questi composti steroidei difficili in modalità negativa ma ha anche aumentato la ionizzazione di altri composti in modalità positiva. È stato definito un metodo strumentale basato su questa condizione per l'intero pannello di 15 analiti steroidei.

La Figura 4 mostra i cromatogrammi E1 ed E2 al livello di 5 pg/mL in siero, il limite di quantificazione (LOQ), come dimostrazione della migliore sensibilità analitica del metodo.

Un'informazione importante è che i composti steroidei sono molto sensibili alle superfici in vetro, specialmente a basse concentrazioni. L'uso di

vial in vetro potrebbe determinare variazioni significative e perdita di composti steroidei, specialmente in campioni contenenti alti livelli di acqua. Di conseguenza, è necessario evitare vial e provette di vetro durante la preparazione e la manipolazione di standard e campioni.



**Figura 4.** Cromatogramma di estrogeno (E1) ed estradiolo (E2) per bianco siero e LOQ a 5 pg/mL in siero.

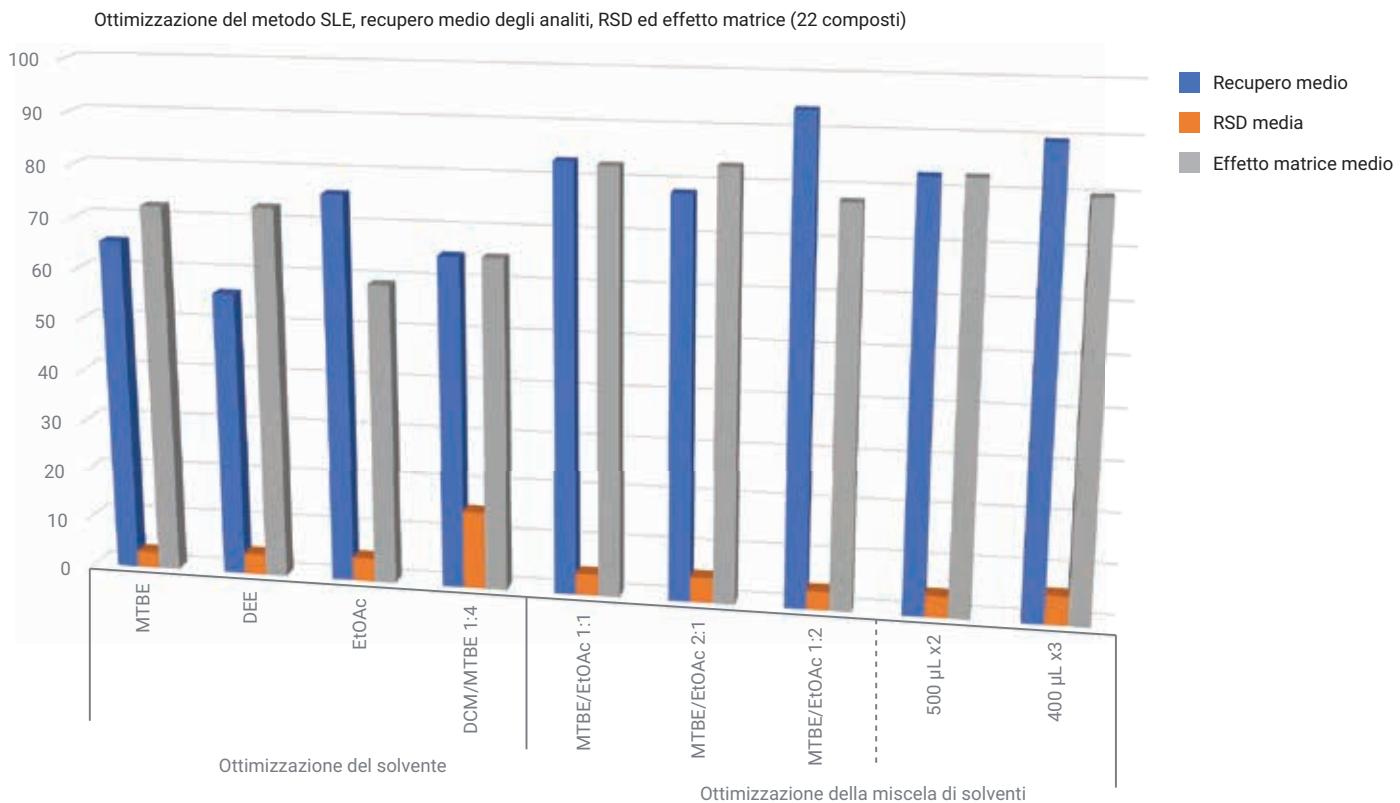
**Ottimizzazione del metodo SLE:** Il metodo SLE può essere sviluppato da un metodo LLE esistente o può essere sviluppato direttamente su cartucce o piastre per SLE. In questo studio, il metodo SLE è stato ottimizzato direttamente su piastre per SLE facendo riferimento a metodi LLE già pubblicati. L'ottimizzazione del metodo SLE ha incluso l'ottimizzazione di solvente, miscela di solventi ed eluizione dei campioni. L'ottimizzazione si è basata sulla valutazione combinata di recupero medio degli analiti, RSD ed effetto matrice, come illustrato nella Figura 5.

Innanzitutto, è stato studiato il solvente di estrazione valutando quattro solventi/miscele di solventi comunemente usati per la LLE: MTBE, dietiletere (DEE), EtOAc e DCM/MTBE (1:4). Come mostrato nel primo gruppo di confronto

della Figura 5 (a sinistra) per la scelta del solvente, l'estrazione con MTBE fornisce il miglior effetto matrice medio, il che indica una matrice più pulita, ma il recupero medio è inferiore. L'estrazione in EtOAc fornisce la migliore efficienza di estrazione ma determina anche una maggiore soppressione ionica della matrice. L'estrazione con DEE e con la miscela DCM/MTBE ha recuperi inferiori degli analiti e l'estrazione con DCM/MTBE presenta anche una riproducibilità inferiore. Di conseguenza, è stata ulteriormente studiata la miscela MTBE/EtOAc per trovare il miglior equilibrio tra recupero degli analiti ed effetto matrice.

Nel secondo gruppo di confronto (al centro) della Figura 5 per l'ottimizzazione della miscela di solventi, MTBE ed EtOAc sono stati mescolati nel rapporto 1:1, 2:1 e 1:2 e usati per l'estrazione

del campione. La Figura 5 mostra che la miscela di estrazione MTBE/EtOAc 1:1 ha fornito il miglior equilibrio tra recupero degli analiti ed effetto matrice ed è stata quindi scelta come solvente ottimale per l'estrazione. Questi studi si sono basati su estrazioni doppie con 500 µL di solvente. L'estrazione del campione è stata ulteriormente studiata usando 400 µL del solvente ottimale con estrazione tripla. I risultati del confronto sono mostrati nel terzo gruppo di confronto (a destra) nella Figura 5. Usando l'estrazione tripla con eluizione di 400 µL, il recupero medio degli analiti è stato ulteriormente aumentato, senza sacrificare l'effetto matrice. Di conseguenza, il metodo SLE è stato ottimizzato con estrazione tripla usando 400 µL di MTBE/EtOAc 1:1.



**Figura 5.** Ottimizzazione del metodo SLE per la scelta del solvente e l'eluizione del campione. L'ottimizzazione si è basata sulla valutazione combinata di recupero medio degli analiti, RSD ed effetto matrice.

## Verifica del metodo

Il metodo ottimizzato è stato verificato mediante analisi di accuratezza e precisione su 3 giorni per acquisire i risultati quantitativi completi. I risultati mostrati nella Tabella 3 includono dati della curva di calibrazione e dati di accuratezza e precisione su tre giorni/lotti. Le curve di calibrazione sono state generate usando una regressione

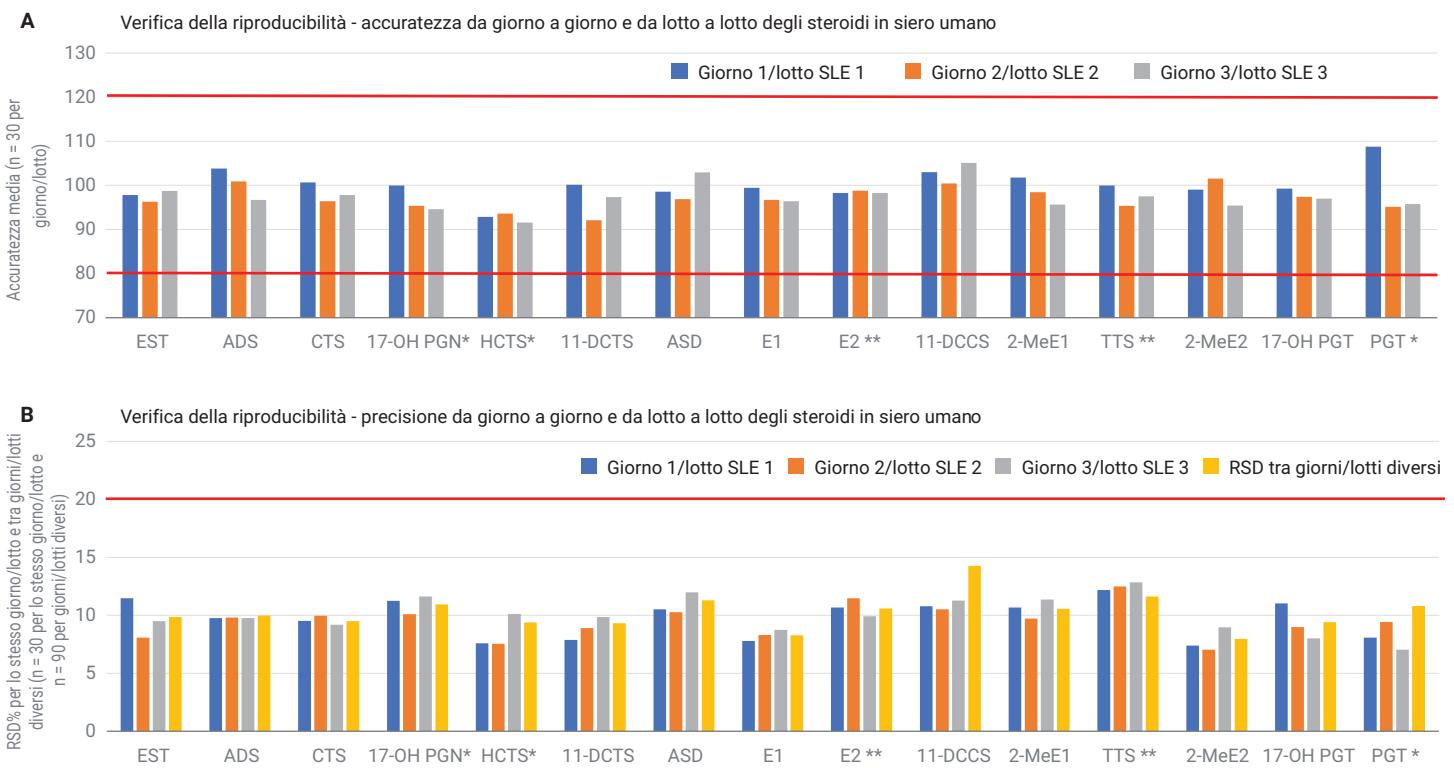
lineare con peso  $1/x^2$  per tutti gli analiti, con  $R^2 > 0,99$ . Per la maggior parte degli analiti è stato stabilito un LOQ di 5 pg/mL in siero, tranne per estradiolo e testosterone (10 pg/mL) e per progesterone, 17-idrossipregnolone e idrocortisone (20 pg/mL) a causa dell'interferenza dovuta alla matrice o di analiti presenti nel bianco matrice. Le analisi di accuratezza e precisione

su 3 giorni non solo dimostrano che il metodo permette una quantificazione affidabile, ma anche la riproducibilità da lotto a lotto della piastra Chem Elut S in quanto sono state usate piastre per SLE di tre lotti di fabbricazione. La Figura 6 mostra il prospetto riassuntivo della riproducibilità da lotto a lotto delle piastre per SLE, basata sull'accuratezza e la precisione degli analiti.

**Tabella 3.** Risultati relativi alla verifica del metodo per la determinazione quantitativa di 15 composti steroidei nel siero umano.

Analita	LOQ (pg/mL)	Intervallo di calibrazione (pg/mL)	Concentrazione di fortificazione dei QC (pg/mL)	Accuratezza e precisione					
				Giorno 1 (lotto SLE 1)		Giorno 2 (lotto SLE 2)		Giorno 3 (lotto SLE 3)	
				Accuratezza% (n = 6)	RSD% (n = 6)	Accuratezza% (n = 6)	RSD% (n = 6)	Accuratezza% (n = 6)	RSD% (n = 6)
Estriolo	5	5-10.000	5	95	18,0	97	6,9	103	11,6
			100	102	6,5	97	8,3	107	5,2
			1.000	98	2,8	92	1,2	92	4,6
			10.000	107	5,9	92	5,6	101	4,2
Aldosterone	5	5-10.000	5	106	4,7	103	12,4	100	9,4
			100	96	9,3	101	12,8	97	3,0
			1.000	111	2,5	103	4,2	98	1,9
			10.000	113	2,4	95	7,5	107	4,2
Cortisone	5	5-10.000	5	104	9,8	92	10,1	99	7,6
			100	93	7,0	93	9,2	97	7,6
			1.000	104	3,5	94	3,7	100	2,4
			10.000	106	5,6	95	7,8	106	5,5
Idrocortisone	20	20-10.000	20	89	6,5	97	13,6	86	12,6
			100	96	18,2	90	6,7	96	9,5
			1.000	96	4,4	93	2,4	93	4,1
			10.000	95	6,3	92	4,1	97	6,8
17-idrossipregnolone	20	20-10.000	20	109	1,8	99	18,9	91	8,1
			100	94	19,2	91	8,2	103	15,4
			1.000	94	6,0	91	2,1	100	5,2
			10.000	93	3,6	97	3,8	106	9,3
11-deossicortisol	5	5-10.000	5	99	8,3	95	10,7	95	16,2
			100	94	6,5	89	10,4	97	9,1
			1.000	105	1,5	87	3,8	99	1,7
			10.000	110	2,7	92	7,2	104	4,5
Androstenedione	5	5-10.000	5	99	11,4	102	9,5	110	11,2
			100	88	8,2	89	8,8	106	10,7
			1.000	104	2,1	90	3,7	91	1,6
			10.000	109	5,5	101	5,7	108	7,6
Estrone	5	5-10.000	5	95	8,7	92	11,3	102	8,9
			100	98	10,1	95	7,5	99	4,3
			1.000	104	2,8	95	2,8	96	3,0
			10.000	105	6,2	94	3,3	98	4,3
Estradiolo	10	10-10.000	10	105	10,2	101	19,3	100	9,7
			100	97	11,4	96	10,2	102	10,2
			1.000	99	3,0	102	5,1	95	2,4
			10.000	101	2,9	102	2,1	100	4,3

Analita	LOQ (pg/mL)	Intervallo di calibrazione (pg/mL)	Concentrazione di fortificazione dei QC (pg/mL)	Accuratezza e precisione						
				Giorno 1 (lotto SLE 1)		Giorno 2 (lotto SLE 2)		Giorno 3 (lotto SLE 3)		RSD% tra giorni/lotti diversi (n=18)
				Accuratezza% (n = 6)	RSD% (n = 6)	Accuratezza% (n = 6)	RSD% (n = 6)	Accuratezza% (n = 6)	RSD% (n = 6)	
11-Deocticorticosterone	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-Metossiestrone	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
Testosterone	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-Metossiestradiolo	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-idrossiprogesterone	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
Progesterone	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.** Prospetto riassuntivo della verifica della riproducibilità da giorno a giorno e delle prestazioni della piastra da lotto a lotto del metodo Agilent Chem Elut S in base ad accuratezza e precisione.

## Confronto tra metodi e prodotti

Il metodo Chem Elut S sviluppato è stato confrontato con la LLE tradizionale e la SLE a base di terra di diatomee di un concorrente in termini di prestazioni basate su recupero di analiti, riproducibilità, effetto matrice e linearità della curva di calibrazione.

Quando si confronta la SLE con la LLE, il risparmio in termini di manodopera e di tempo sono evidenti. Il flusso di lavoro della SLE migliora significativamente l'efficienza della preparazione del campione facendo risparmiare manodopera e tempo in passaggi critici quali miscelazione dei campioni, separazione delle fasi e trasferimento del surnatante organico. Eliminando la necessità di questi passaggi, il protocollo

SLE può far facilmente risparmiare il 50% o più del tempo a seconda del numero di campioni. Oltre al risparmio di tempo e manodopera, la procedura con SLE impedisce la formazione di emulsioni e migliora l'affidabilità del metodo.

La Figura 7 mostra il confronto delle prestazioni dei metodi in base al recupero di analiti (7A) e alla riproducibilità (7B). Il protocollo SLE fornisce un contatto intimo tra la fase acquosa e quella organica permettendo una ripartizione efficace, che può migliorare il recupero degli analiti. Usando i metodi SLE, i recuperi di analiti sono aumentati del 10-20% in generale rispetto ai recuperi mediante il metodo LLE. Recuperi maggiori di analiti migliorano le risposte e determinano una migliore sensibilità analitica del metodo.

Recuperi equivalenti o leggermente superiori sono stati ottenuti usando SLE a base di terra di diatomee ma sono state osservate variazioni significative da un pozzetto all'altro, specialmente per gli analiti più polari. Questo può essere attribuito alla non uniformità dell'adsorbente in terra di diatomee e della diversa capacità di trattenere l'acqua. Grazie alla migliore riproducibilità da pozzetto a pozzetto e alla migliore sensibilità analitica del metodo rappresentato dalle piastre Chem Elut S, è migliorata anche la linearità della curva di calibrazione. Tutti questi miglioramenti hanno reso il metodo di quantificazione più affidabile e costante.

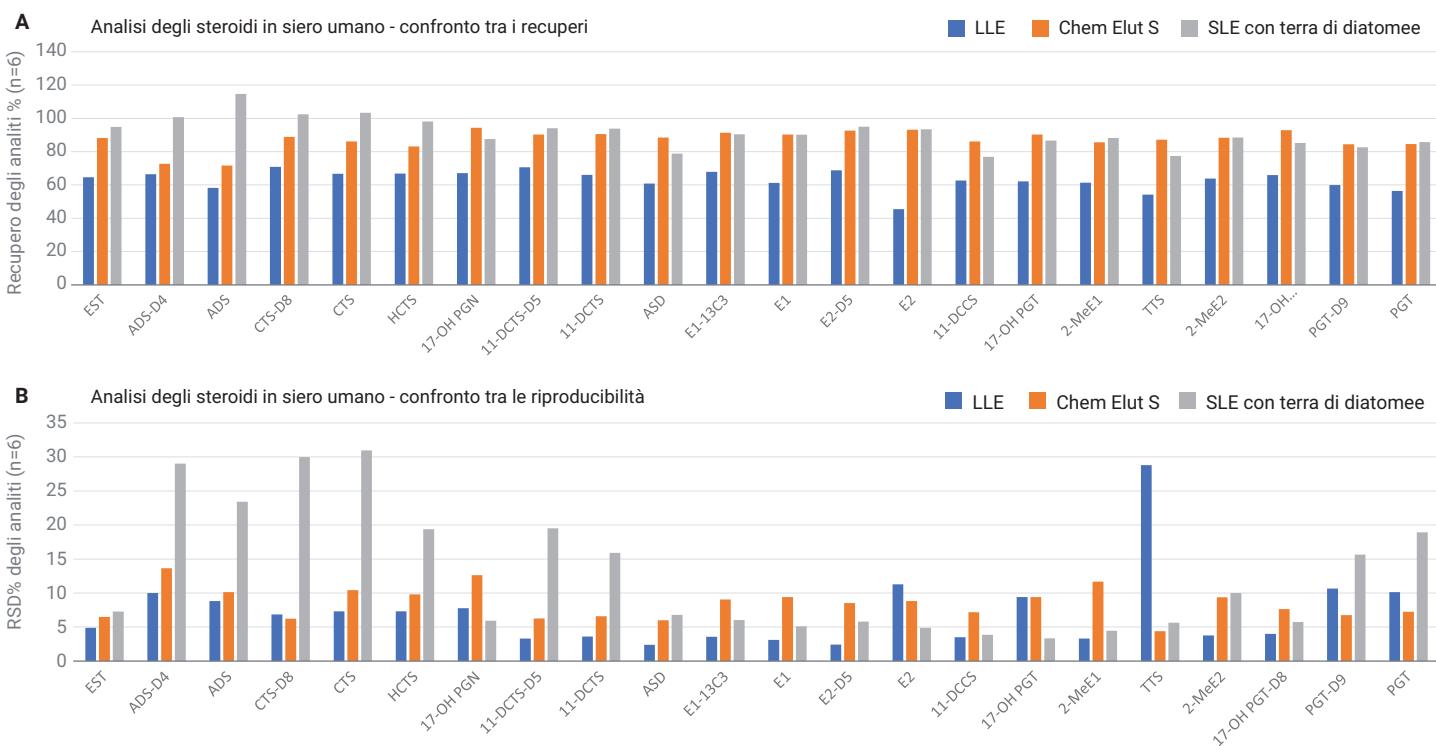


Figura 7. Confronto di metodi e prestazioni dei prodotti tra LLE, Agilent Chem Elut S e SLE con terra di diatomee.

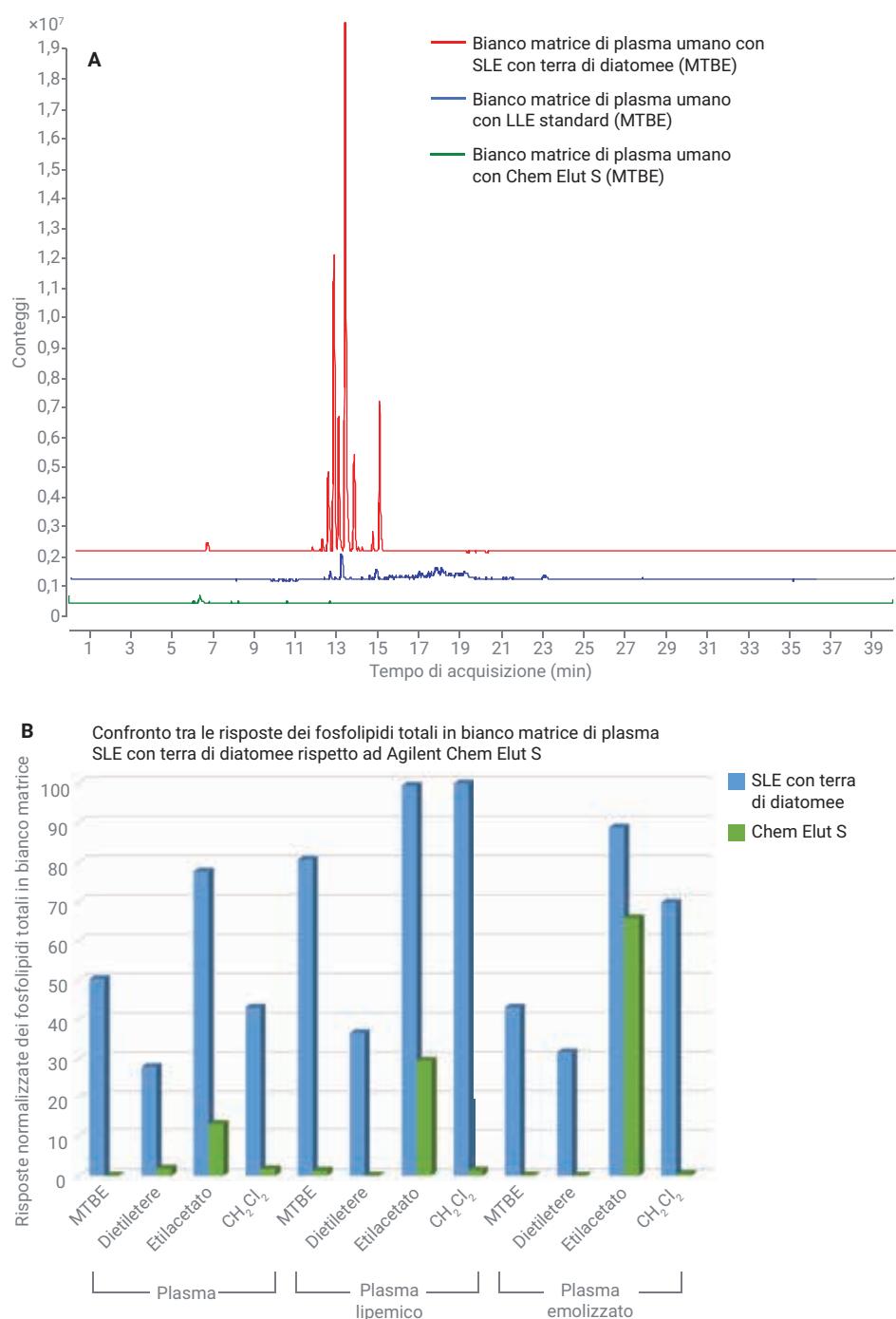
## Deplezione dei fosfolipidi dalla matrice

L'uso delle piastre Chem Elut S per la preparazione di liquidi biologici fornisce anche una parziale deplezione dei fosfolipidi.

Questo studio ha utilizzato siero strizzato, privato di ormoni, per ottenere una buona selettività in matrice ai limiti estremamente bassi di quantificazione degli steroidi target. Il siero strizzato è stato tuttavia privato anche dei fosfolipidi e potrebbe non essere utile per altri test applicativi. È stato usato plasma non strizzato per la profilazione dei fosfolipidi nella matrice, per valutare la deplezione dei fosfolipidi mediante LLE standard, Chem Elut S e un metodo SLE con terra di diatomee di un concorrente. Il confronto dei profili nella Figura 8A mostra che l'uso del metodo Chem Elut S con il solvente MTBE ha fornito una deplezione dei fosfolipidi superiore del 99% rispetto alla SLE con terra di diatomee del concorrente e superiore del 30% rispetto alla LLE con MTBE.

Sono stati condotti ulteriori studi di confronto tra Chem Elut S e SLE con terra di diatomee usando diversi solventi di estrazione su diversi tipi di plasma e i risultati sono mostrati nella Figura 8B. Le risposte dei fosfolipidi totali sono state normalizzate in base all'abbondanza. I risultati indicano che:

- Diversi tipi di plasma possono presentare variazioni nell'abbondanza dei fosfolipidi, con il plasma lipemico che contiene una maggiore quantità di fosfolipidi.
- Diversi solventi estraggono livelli diversi di fosfolipidi, con EtOAc e DCM che estraggono più fosfolipidi che MTBE e DEE.
- Chem Elut S può fornire una deplezione più efficiente dei fosfolipidi rispetto alla SLE con terra di diatomee di un concorrente.



**Figura 8.** Confronto della deplezione dei fosfolipidi nel plasma tra Agilent Chem Elut S, SLE con terra di diatomee e LLE usando solventi diversi.

## Conclusion

È stato sviluppato un metodo di preparazione del campione usando le piastre Agilent Chem Elut S da 2 mL e ne è stata verificata la determinazione quantitativa di un pannello di 15 composti steroidei nel siero umano. Il metodo SLE è stato ottimizzato per uso del solvente ed eluizione del campione in base al recupero degli analiti, alla riproducibilità del metodo e all'effetto matrice. Le analisi di accuratezza e precisione su 3 giorni hanno verificato che il metodo ha fornito un'accettabile linearità della curva di calibrazione, accuratezza e precisione eccezionali sia in giorni diversi che nello stesso giorno, recupero degli analiti e riproducibilità del metodo eccellenti. Quando confrontato con LLE standard e SLE con terra di diatomee, il metodo Chem Elut S ha fornito recuperi globali superiori degli analiti rispetto alla LLE standard, migliore uniformità dell'adsorbente e migliore riproducibilità della cartuccia da un pozzetto all'altro rispetto alla SLE con terra di diatomee. Ha anche fornito un'efficiente deplezione dei fosfolipidi per matrici di fluidi biologici come plasma e siero. Il protocollo sviluppato sulla piastra

a 96 pozetti è adatto alle necessità dei laboratori ad alta produttività per una preparazione del campione rapida e automatizzabile. La comoda procedura di caricamento ed eluizione semplifica anche il flusso di lavoro dell'estrazione liquida con significativo risparmio in termini di manodopera e tempo. Chem Elut S ha maggiori capacità di trattenere il campione rispetto agli adsorbenti di terra di diatomee, offrendo un'efficiente adsorbimento del campione e riducendone la probabilità di degradazione. La nuova struttura della piastra offre:

- Ampio spazio di testa per campioni ed eluente
- Frit superiore quadrato che trattiene il campione finché non viene applicata una pressione o creato il vuoto
- Piena compatibilità hardware
- Eluizione rapida e costante

## Bibliografia

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](http://www.agilent.com/chem)

**Solo per scopi di ricerca. Non utilizzabile per procedure diagnostiche.**

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2019  
Stampato negli Stati Uniti, 15 maggio 2019  
5994-0949ITE

