

Desarrollo de un método analítico para la determinación de esteroides en suero humano mediante un sistema on-line extracción en fase sólida-cromatografía de líquidos-espectrometría de masas

I. Mendiara, K. Bentayeb, C. Domeño, C. Nerín

GUIA (Grupo Universitario de Investigación Analítica)
Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A).
Universidad de Zaragoza, Mariano Esquillor s/n, 50018, Zaragoza, Spain.
Tel. +34-976845296, Fax +34-976762388, e-mail: isabelmn@unizar.es

Abstract

Se ha desarrollado un método analítico para determinar cinco esteroides presentes en suero humano. Los esteroides son biomoléculas marcadoras de enfermedades hereditarias relacionadas con el metabolismo del colesterol como la Hipercolesterolemia Familiar. El sistema realiza el tratamiento de muestra, cromatografía y detección de forma automática, facilitando el procesamiento y análisis de muestras biológicas.

Introducción

El metabolismo del colesterol transcurre a través de complejas reacciones biológicas reguladas enzimáticamente. Los esteroides informan sobre el estado de dicho metabolismo. Los esteroides se encuentran en el suero, matriz acuosa con numerosas sustancias orgánicas e inorgánicas disueltas. Se han estudiado cinco esteroides: dos precursores (desmosterol y lanosterol) y tres fitoesteroides (estigmasterol, campesterol y sitosterol). Los precursores informan sobre el grado de síntesis de colesterol a nivel hepático y los fitoesteroides de la tasa de absorción de colesterol a nivel intestinal. Los tratamientos de muestra para analitos en suero, suelen comenzar con una extracción líquido-líquido (Bligh/Dyer), conocida por su eficacia para extraer lípidos. Se basa en la adición al suero de una mezcla miscible de cloroformo-metanol y posterior extracción de la fase inferior, donde quedan los esteroides. Anteriormente, estos analitos, se determinaban por cromatografía de gases, técnica que alargaba el tratamiento de muestra, ya que era necesario que derivatizar los analitos para hacerlos más volátiles. En la actualidad, la introducción de los sistemas on-line, que utilizan un sistema de extracción en fase sólida (SPE) acoplado a un cromatógrafo de líquidos con detector de espectrometría de masas, ha permitido simplificar el proceso ya que integran gran parte del tratamiento de la muestra y su

determinación en un mismo análisis y no es necesario el proceso de derivatización.

Experimental

En el protocolo diseñado se parten de 300 µl de suero y se someten a la extracción Bligh/Dyer, se extrae la fase inferior que queda y se añade MeOH posteriormente, el extracto resultante se introduce en el sistema. El proceso instrumental tiene cinco partes: Carga de la muestra, lavado de interferencias, elución de los analitos, cromatografía y detección (Figura 1). La duración de las etapas y el tipo de eluyente (Tabla 1), se han optimizado durante el desarrollo experimental.

Resultados y discusión

Condiciones de análisis

La duración de las etapas de carga y lavado fue determinada en base a dos objetivos. El primero es que todos los analitos de la muestra lleguen y se retengan en el cartucho SPE y el segundo es conseguir que las macromoléculas sean eliminadas. Posteriormente la etapa de elución se determinó calculando el volumen necesario para recuperar el 100% de los analitos retenidos en el cartucho SPE. Por último se diseñó el gradiente cromatográfico adecuado para los compuestos. Se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Flujo y composición de los eluyentes, tiempos y posición de la válvula.

t (min)	RAM				LC/MS		
	Bomba 1				Bomba 3		
	Flujo (mL/min)	MeOH/H ₂ O (60/40) (%)	H ₂ O (%)	IsOH (%)	Flujo (mL/min)	MeOH (%)	H ₂ O (%)
0 A	2.0	100	0	0	0.3	100	0
4 A	1.0	0	100	0	0.3	100	0
5 A	2.0	0	0	100	0.3	100	0
8 A	2.0	0	0	100	1	100	0
9 B	0.4	0	0	100	0.3	0	100
33 B	0.4	0	0	100	0.7	85	15
35 A	0.5	100	0	0	0.7	85	15
37 A	1.5	0	0	100	0.7	85	15
44 A	0.4	100	0	0	0.7	100	0
50 A	2	100	0	0	0.3	100	0

Tratamiento del suero

Se optimizó el volumen necesario de metanol a añadir al extracto final (fase clorofórmica inferior de la extracción) (1mL), para generar un extracto adecuado para ser introducido en el sistema. Así, se evita la evaporación a sequedad y posterior redisolución.

Parámetros analíticos

Los parámetros analíticos del método obtenidos informan que el método es reproducible y preciso. Los LOD (límites de detección) y LOQ (límites de cuantificación) son adecuados para la detección y cuantificación de los analitos incluso para concentraciones inferiores a su rango normal en el suero. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características analíticas del método

Compuesto	m/z	R ²	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	%Reproducibilidad (n=5)	%Recuperación	Rangos en suero (µg/g)
Desmosterol	367.5	0.99	5	17	15	96	1.1-1.2
Lanosterol	409.5	0.99	1	4	12	93	0.1-3.2
Estigmasterol	395.5	0.99	7	25	16	96	0.1-23
Campesterol	383.5	0.99	8	25	11	82	0.1-35
Sitosterol	397.5	0.99	13	43	10	80	6.7-9.5

Conclusiones

- ✓ El método planteado consigue analizar esteroides, metabolitos humanos, que se encuentran a bajas concentraciones en el suero.
- ✓ Se consigue un tratamiento de muestra simple, reproducible y sin interferencias, partiendo una muestra compleja como es el suero.
- ✓ El número de muestras que pueden procesarse al día aumenta de 8 (cromatografía de gases) a 30 (sistema on-line).

REFERENCIAS

Mendiara, I.; Domeno, C.; Nerín, C. 2012 Development of a fast sample treatment for the analysis of free and bonded sterols in human serum by LC-MS *J. Sep. Sci.* 2012, 35, 3308-3316.

Trufelli, H.; Palma, P.; Famigliani, G.; Cappiello, 2011. An overview of matrix effects in liquid chromatography–mass spectrometry *A. Mass Spectrom. Rev.* 2011, 30, 491-509.

Bentayeb, K.; Batlle, R.; Sánchez, C.; Nerín, C.; Domeño, C. 2008. Determination of bile acids in human serum by on-

line restricted access material-ultra high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2008, 869, 1-8.

Lembcke, J.; Ceglarek, U.; Fiedler, G. M.; Baumann, S.; Leichtle, A.; Thiery, 2005. Rapid quantification of free and esterified phytosterols in human serum using APPI-LC-MS/MS. *J. Lipid Res.* 2005, 46, 21-26

Phillips, K. M.; Ruggio, D. M.; Bailey, J. A. 1999 Precise quantitative determination of phytosterols, stanols, and cholesterol metabolites in human serum by capillary gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 1999, 732, 17-29.

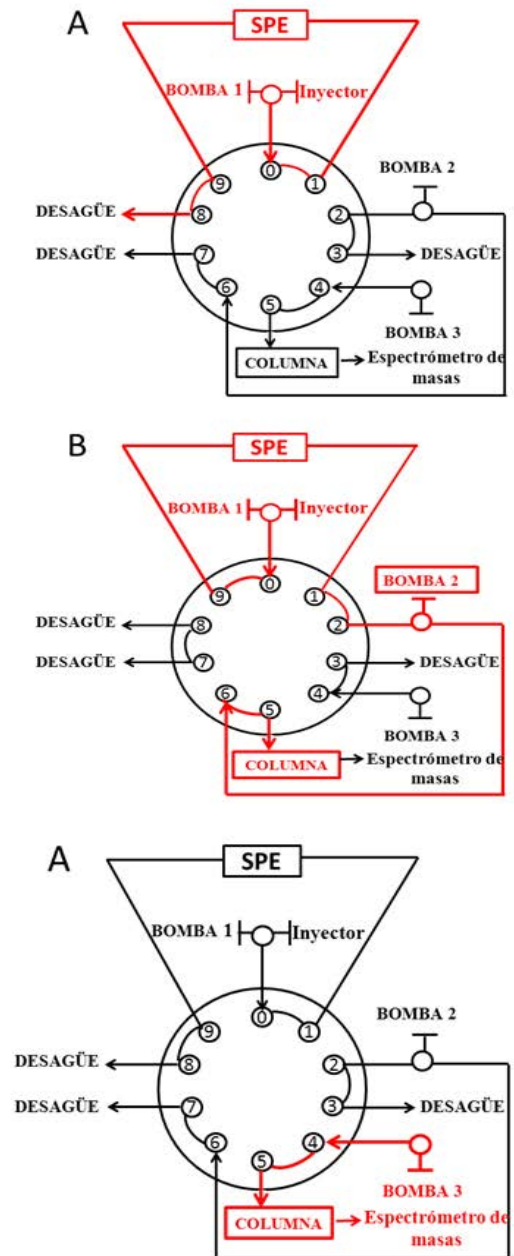


Figura 1. Etapas del proceso. Posición A (superior): carga y lavado de la muestra. Posición B: elución de los analitos e introducción en la columna. Posición A (inferior): cromatografía y detección.