

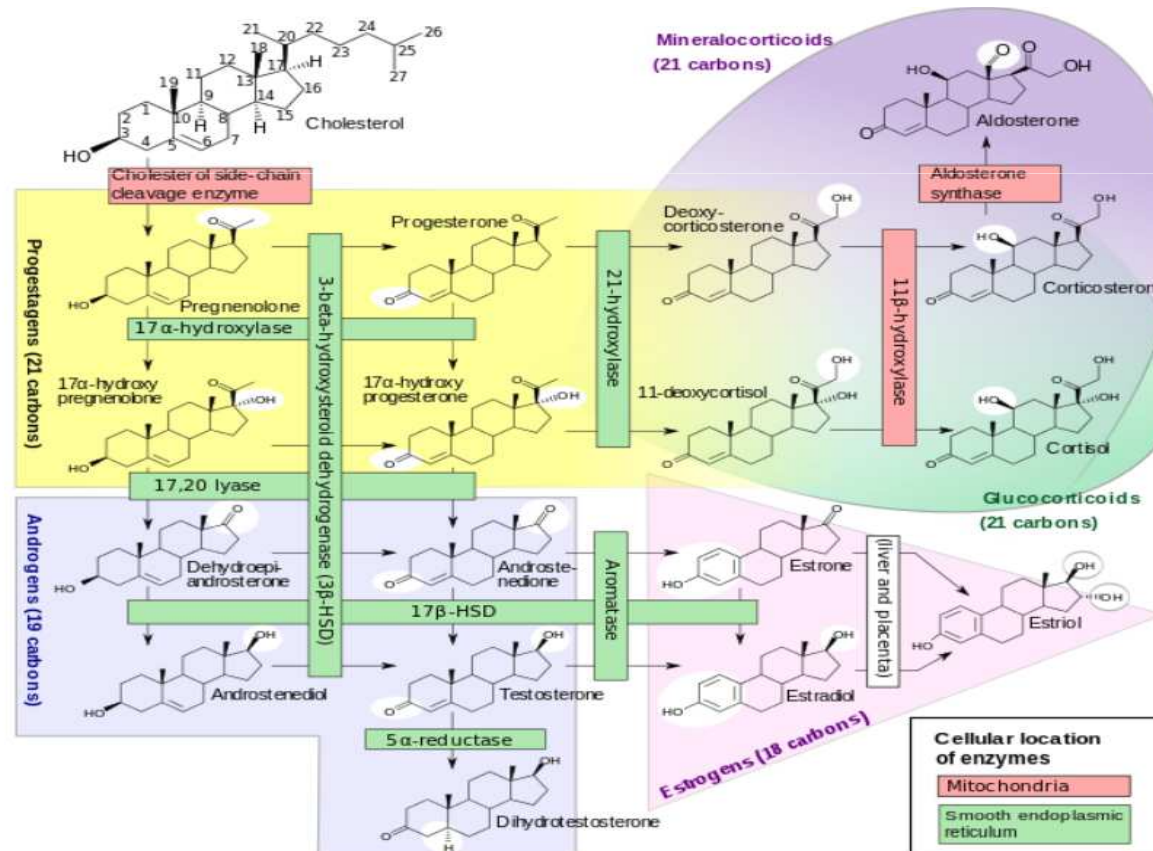
INTÉRÊT DU DOSAGE DES STÉROÏDES PAR LC-MS/MS

C. Le Goff et L. Vroonen

Chimie Clinique, CHU de Liège

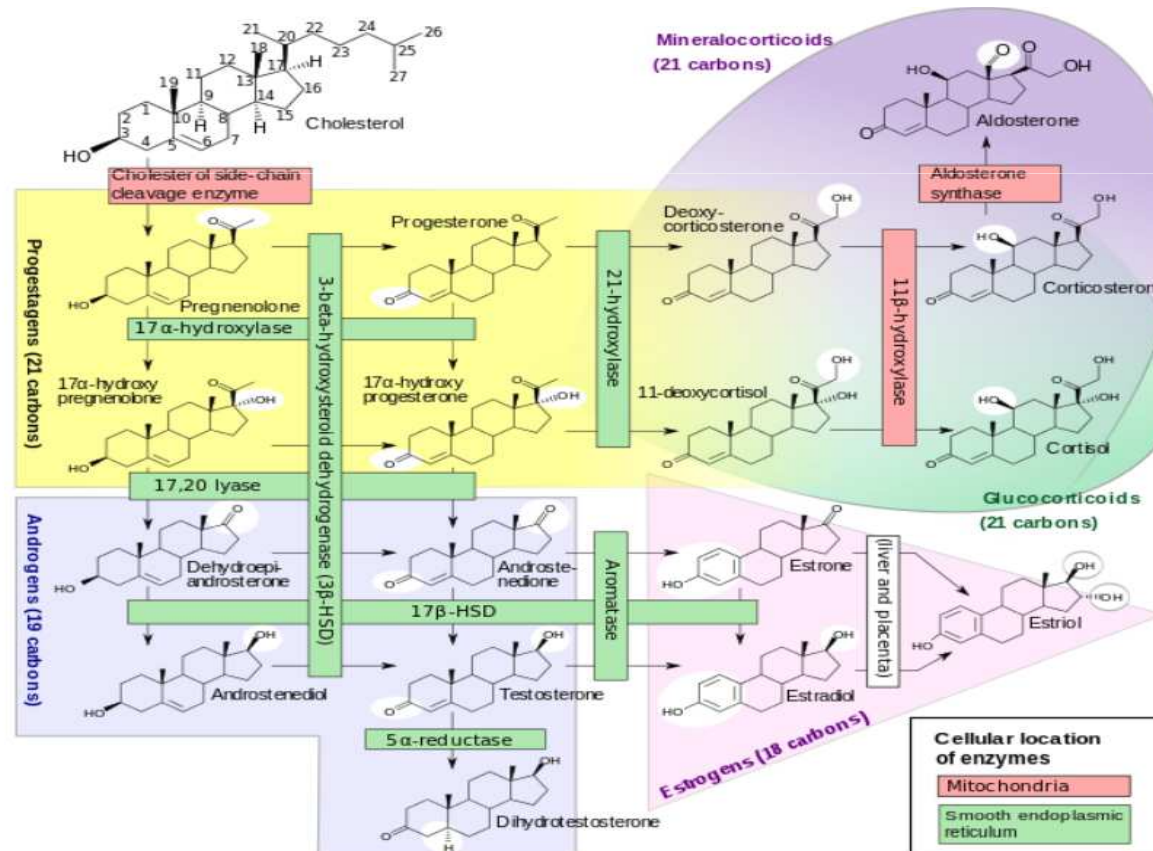
18/10/2018

HORMONES STÉROÏDIENNES



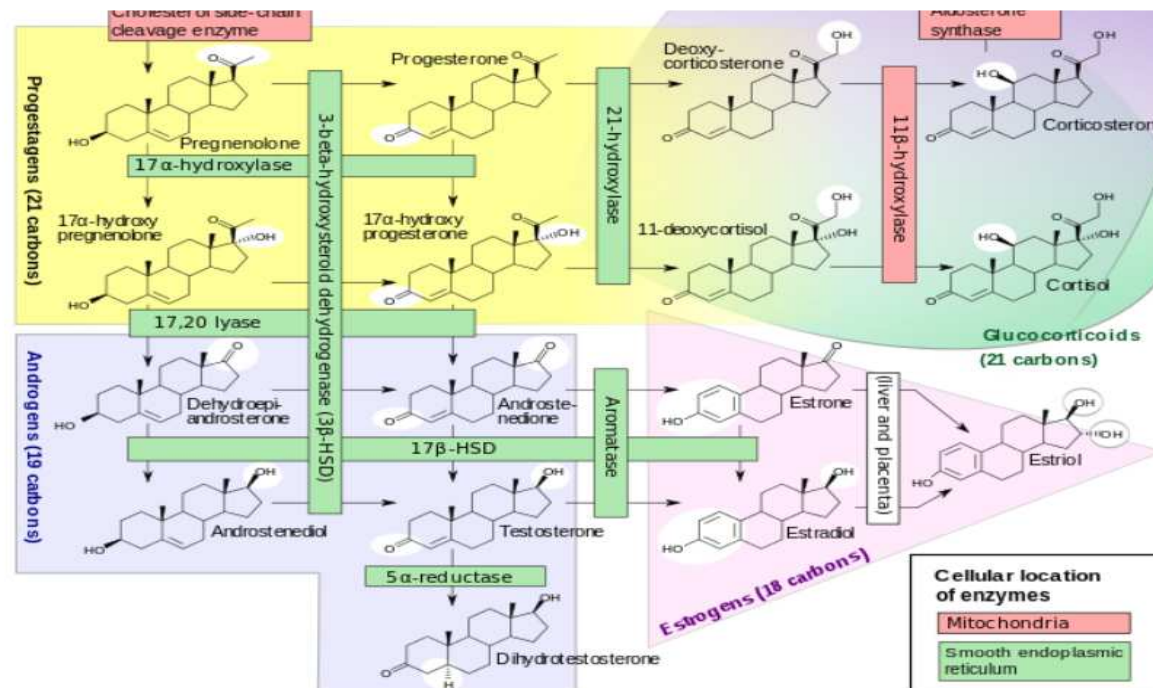
HORMONES STÉROÏDIENNES

- Les hormones stéroïdiennes jouent un rôle crucial dans le contrôle du métabolisme, de l'immunité et l'inflammation.



HORMONES STÉROÏDIENNES

- Les hormones stéroïdiennes jouent un rôle crucial dans le contrôle du métabolisme, de l'immunité et l'inflammation
- Modifications dans le profil → maladie



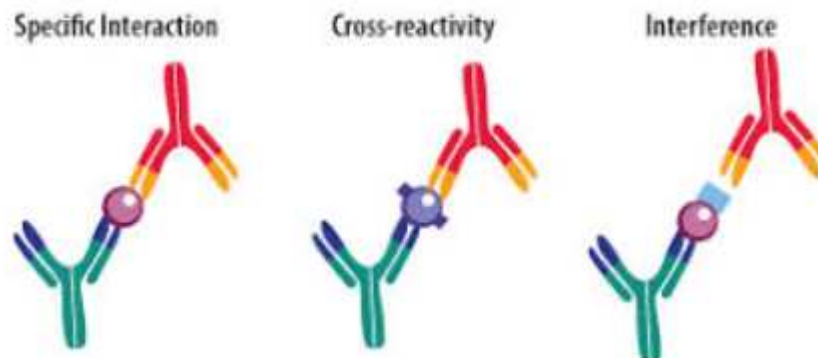
HORMONES STÉROÏDIENNES

- 3 familles:

- Les oestrogéniques: 18 C (oestrone: 270 Da (le + léger))
- Les androgéniques: 19 C (DHEA et TST: 288 Da (les +lourds))
- Les minéralo- et gluco-corticoides: 21 C (Cortisol: 21C (le +lourd))

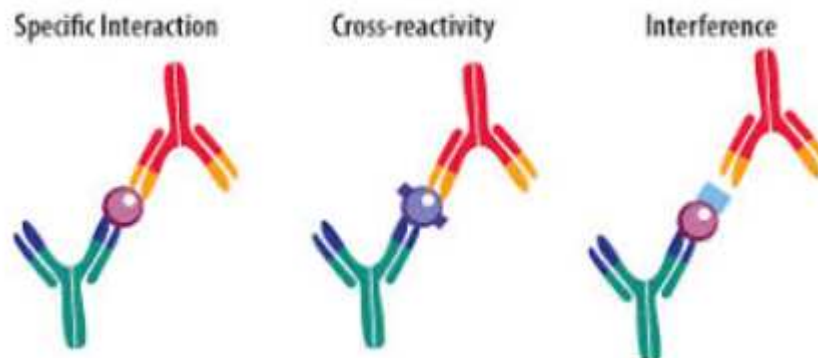
DOSAGE IMMUNO-ESSAIS

- Reconnaissance d'un épitope donné d'une chaîne peptidique par un anticorps
 - Compétition
 - Sandwich



DOSAGE IMMUNO-ESSAIS

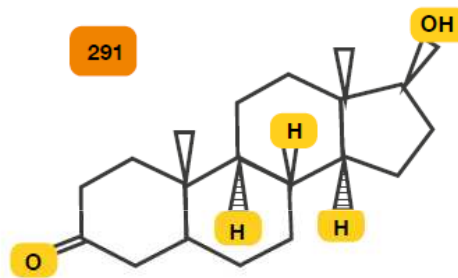
- Reconnaissance d'un épitope d'une chaîne polypeptidique par un anticorps
 - Compétition
 - Sandwich 



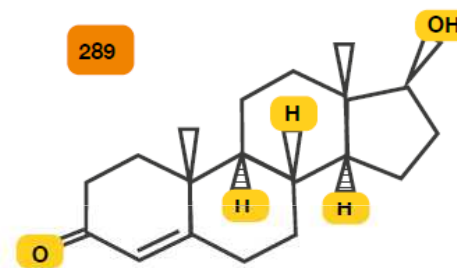
DOSAGE IMMUNO-ESSAIS

- Reconnaiss polypeptidique
 - Compétitif
 - Sandwich

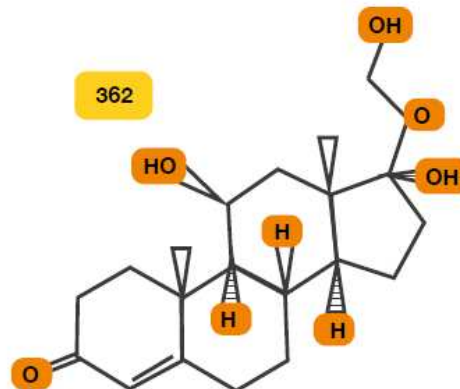
Dihydrotestostérone



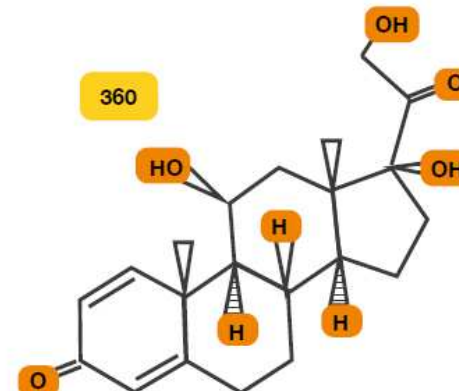
Testostérone



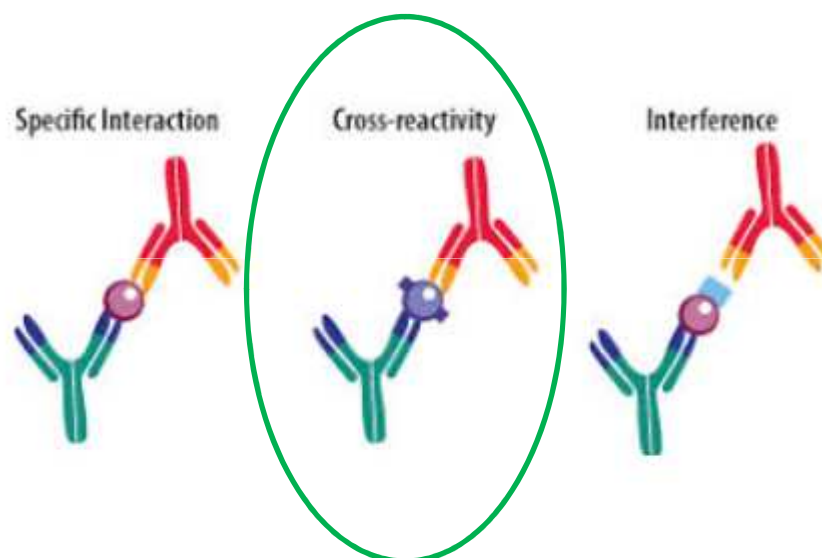
Cortisol



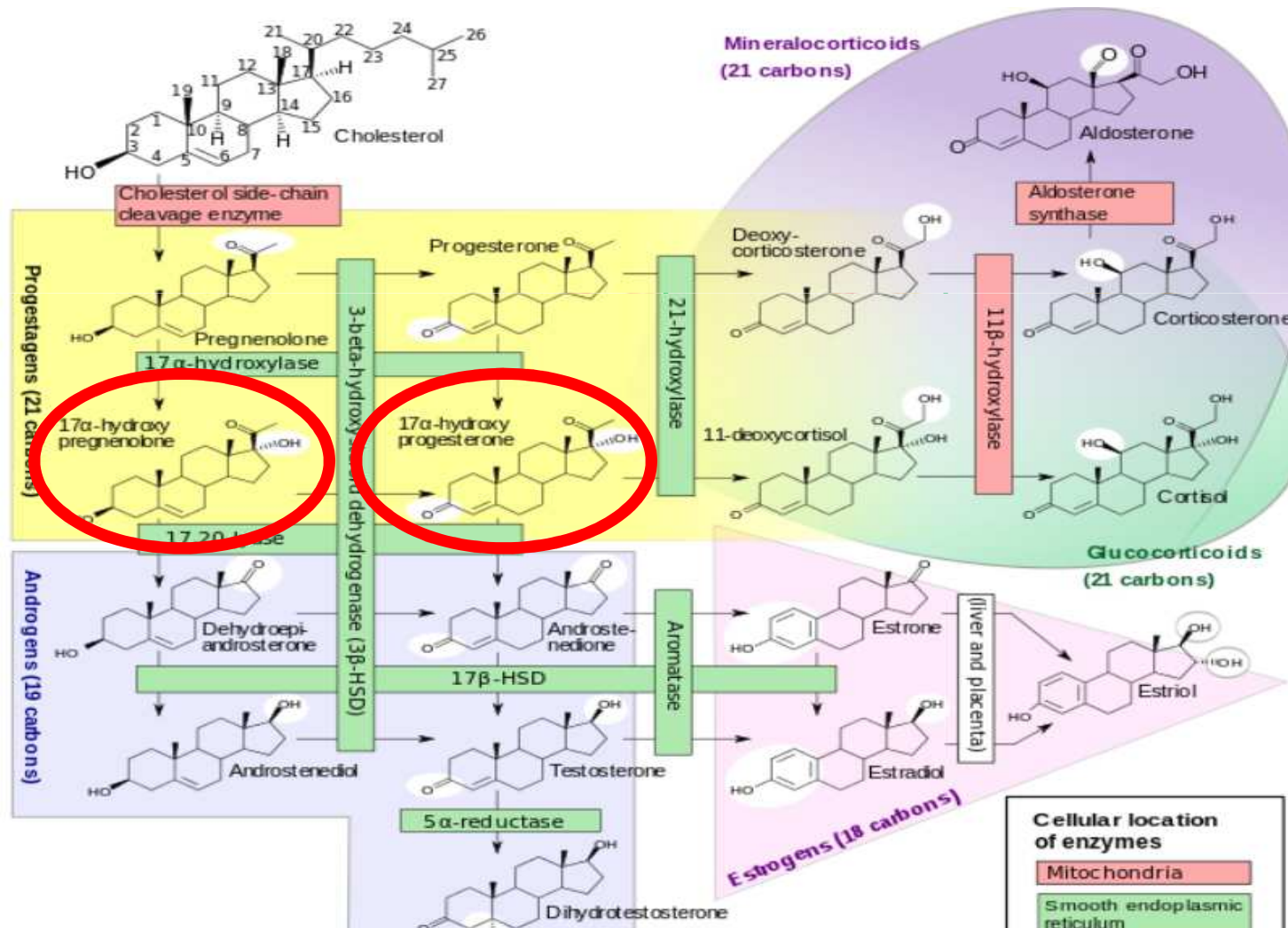
Prednisolone



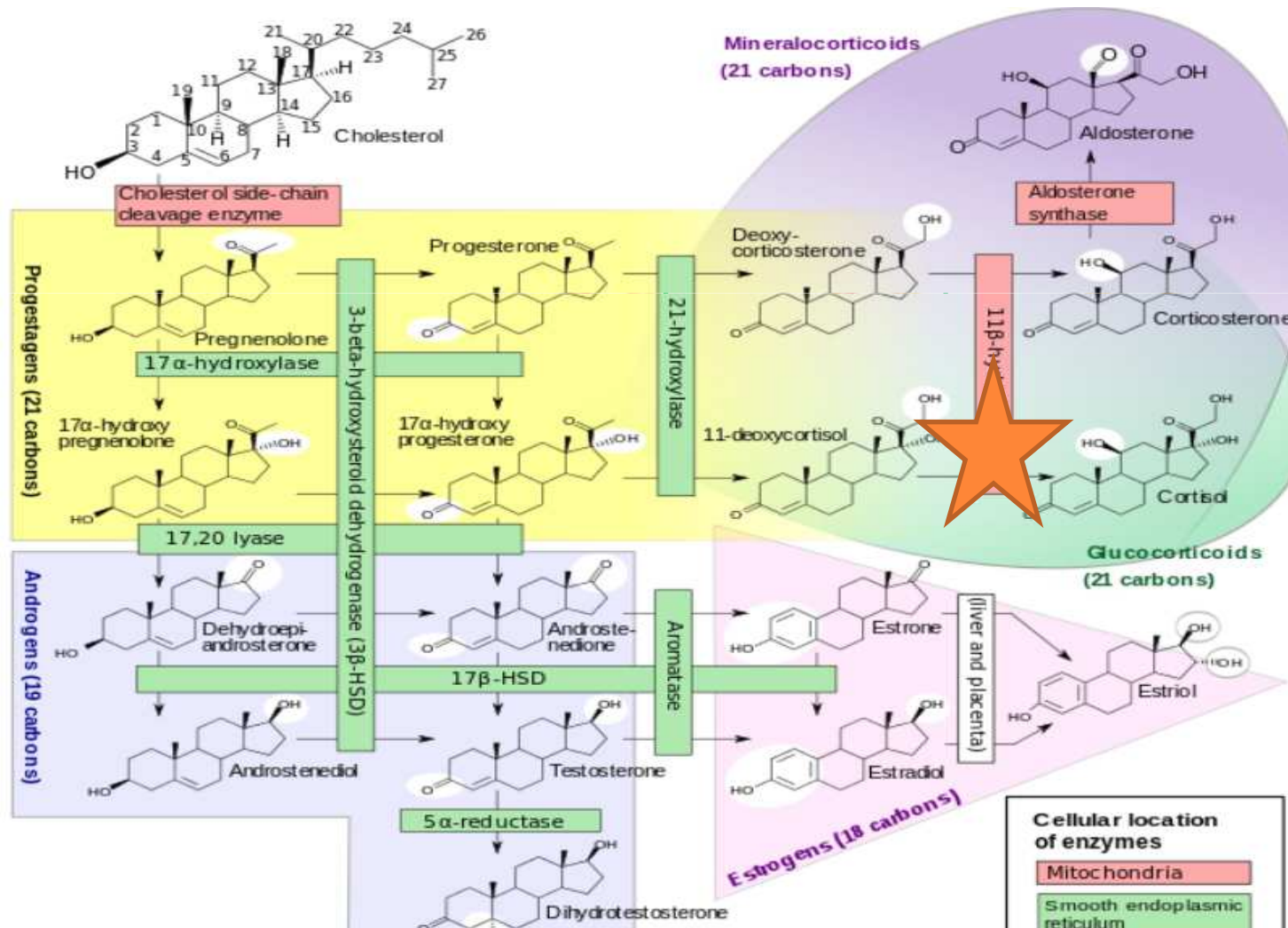
IMMUNO-ESSAIS



IMMUNO-ESSAIS

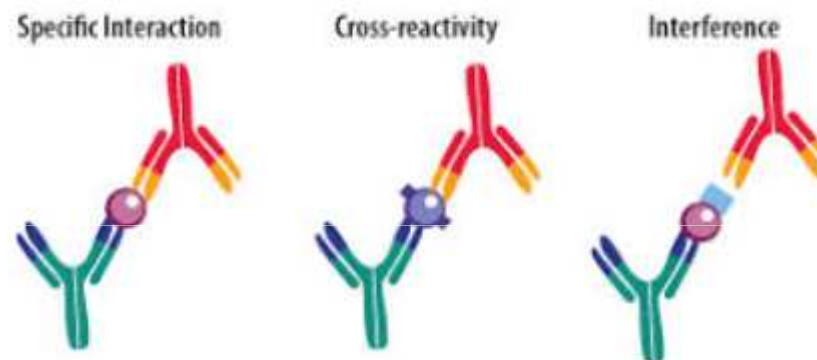


IMMUNO-ESSAIS



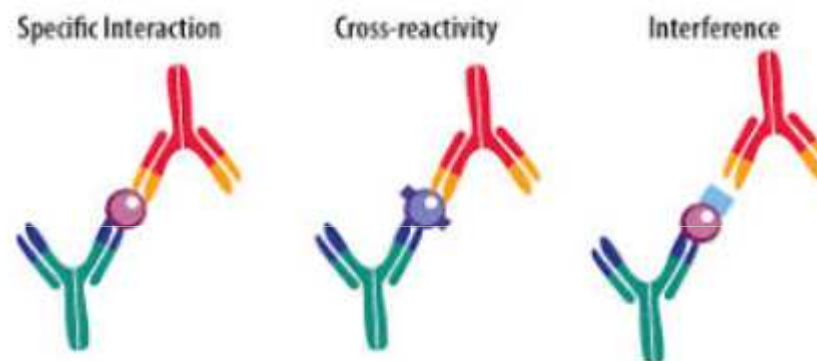
IMMUNO-ESSAIS VERSUS LC-MS/MS

- La concentration en stéroïdes peut être surestimée.



IMMUNO-ESSAIS VERSUS LC-MS/MS

- La concentration en stéroïdes peut être surestimée.

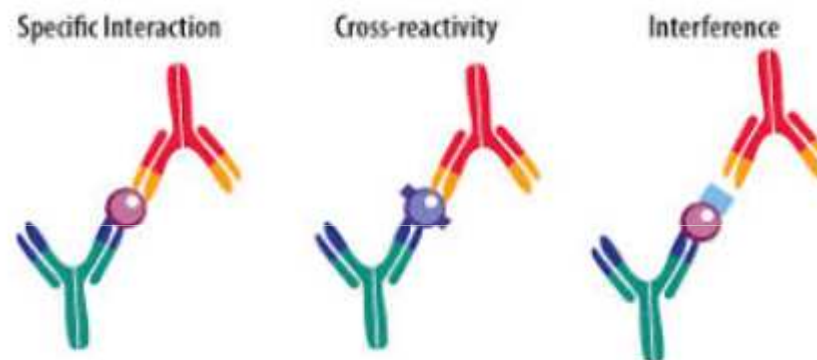


- LC-MS/MS
 - sensibilité
 - spécificité
 - reproductibilité
 - capacité à réaliser des panels



IMMUNO-ESSAIS VERSUS LC-MS/MS

- La concentration en stéroïdes peut être surestimée.



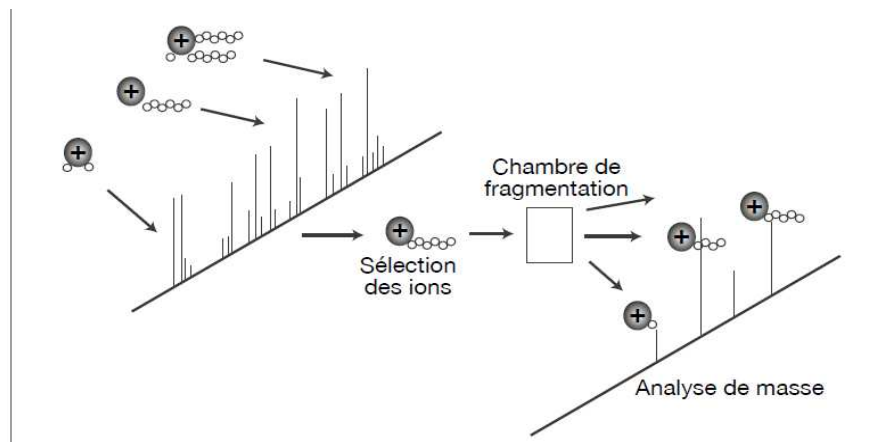
- LC-MS/MS
 - sensibilité
 - spécificité
 - reproductibilité
 - capacité à réaliser des panels



LC-MS/MS



- Il y a une trentaine d'années, la GC-MS
- Supplantée par les IA (Berson et Yalow)
- Grande spécificité ➔ succession de plusieurs opérations de purification : extraction, puis chromatographie, puis séparation des molécules ionisées, puis séparation des ions fils.



DOSAGES

Dosages des stéroïdes par spectrométrie de masse

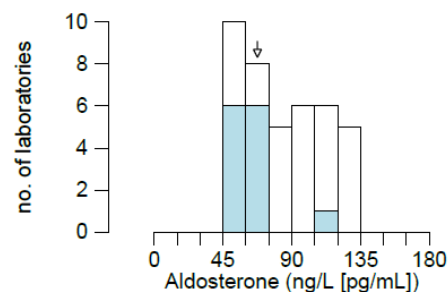
Tableau 1. Comparaison des fidélités intermédiaires obtenues par des méthodes de spectrométrie de masse et des méthodes d'immunoanalyse pour le 11-désoxycortisol sanguin et le cortisol libre urinaire.

Fidélité intermédiaire	11-désoxycortisol sanguin						Cortisol libre urinaire			
	Méthode LC-MS/MS (Xevo TQ-S Waters® et kit PerkinElmer®)		Méthode RIA directe (Diasource®)		Méthode RIA après séparation chromatographique (Diasource®)		Méthode LC-MS/MS (API3000 ABSCIEX® et méthode « maison »)		Méthode par immunoanalyse après extraction (Immuliite2000® Siemens)	
Niveau de concentrations	Pool 1 Faible	Pool 2 Fort	Pool 3 Faible	Pool 4 Fort	Pool 5 Faible	Pool 6 Fort	Pool 7 Faible	Pool 8 Fort	Pool 9 Faible	Pool 10 Fort
Moyenne (nmol/L)	4,5	25,6	5,3	23,9	3,95	18,0	152,2	361,1	172,2	1071,6
Nombre de passages	49	49	55	55	38	40	38	38	92	76
Ecart-type (nmol/L)	0,3	2,3	0,7	3,0	1,0	2,5	7,2	15,5	18,2	94,1
CV (%)	7,3	9,0	14,1	12,5	24,4	14,2	4,7	4,3	10,6	8,8

CV : coefficient de variation ; RIA : radio-immunologie ; LC-MS/MS : spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide.

DOSAGES- QC EXTERNE

Specimen : 456A	n	Mean	SD	CV(%)
All methods [ALTM]	40	83.6	29.6	35.5
DiaSorin Liaison	11	110.2	11.7	10.6
IDS iSYS	11	80.6	28.0	34.8
Tandem Mass Spectrometry	13	59.1	7.1	12.1
non-numeric results	1			



Your result	61.6
Target	59.1
(Tandem Mass Spectrometry)	
Standard Uncertainty	2.7
Your specimen:	
%bias	+4.2
Accuracy Index	16
Your method mean	59.1
Tandem Mass Spectrometry	

18ME09 / Delta4 Androstènedione (nmol/L)

Limites acceptables à $\pm 23,5\%$ (Ricos souhaitable)
Statistiques robustes (algorithme A - norme ISO 13528:2015)

Groupes techniques/pairs	Codage	Histogramme	n	Cible	CV	E/M%	Limites
ENSEMBLE DES RESULTATS	J		49	2,342	37,6		
BECKMAN "RIA directe"	AO		6	1,802	/		
BECKMAN "RIA avec extraction"	AZ		8	6,334	11,9	170,5	4,701-7,967
CISBIO Bioassays "CT"	AN		3	2,790	/		
DIASORIN Liaison	S8 UKV, UKW		8	2,090	28,8	-10,8	
DIASource "RIA CT"	AR		1	4,480	/		
DSL France "Active Coated Tube RIA"	AS		1	2,510	/		
SIEMENS Immulite/ 2000/ 2500	SA U4L, U4R, U4P		6	1,642	/		
LC-MSMS	3M		14	1,925	14,0	-17,8	1,438-2,412
Divers "TRITIUM"	WX		1	2,550	/		
Autres	XX		1	2,970	/		

LC-MS/MS

- QTrap 6500 triple quadrupole MS/MS (Sciex) +LC-30A Nexera UHPLC system (Shimadzu).
- 2 possibilités:



LC-MS/MS



- QTrap 6500 triple quadrupole MS/MS (Sciex) +LC-30A Nexera UHPLC system (Shimadzu).
- 2 possibilités:
 - ➔ Méthode maison

LC-MS/MS



- QTrap 6500 triple quadrupole MS/MS (Sciex) +LC-30A Nexera UHPLC system (Shimadzu).
- 2 possibilités:
 - ➔ Méthode maison
 - ➔ Méthode clé sur porte

LC-MS/MS



- QTrap 6500 triple quadrupole MS/MS (Sciex) +LC-30A Nexera UHPLC system (Shimadzu).
- 2 possibilités:
 - ➔ Méthode maison → temps++++
 - ➔ Méthode clé sur porte

LC-MS/MS



- QTrap 6500 triple quadrupole MS/MS (Sciex) +LC-30A Nexera UHPLC system (Shimadzu).
- 2 possibilités:
 - ➔ Méthode maison → temps++++
 - ➔ Méthode clé sur porte → CE, prix et fermé

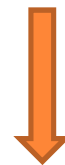
LC-MS/MS



- QTrap 6500 triple quadrupole MS/MS (Sciex) +LC-30A Nexera UHPLC system (Shimadzu).

- 2 possibilités:

- ➔ Méthode maison → temps++++
- ➔ Méthode clé sur porte → CE, prix et fermé



- ➔ MassChrom® kit from chromsystem

LC-MS/MS

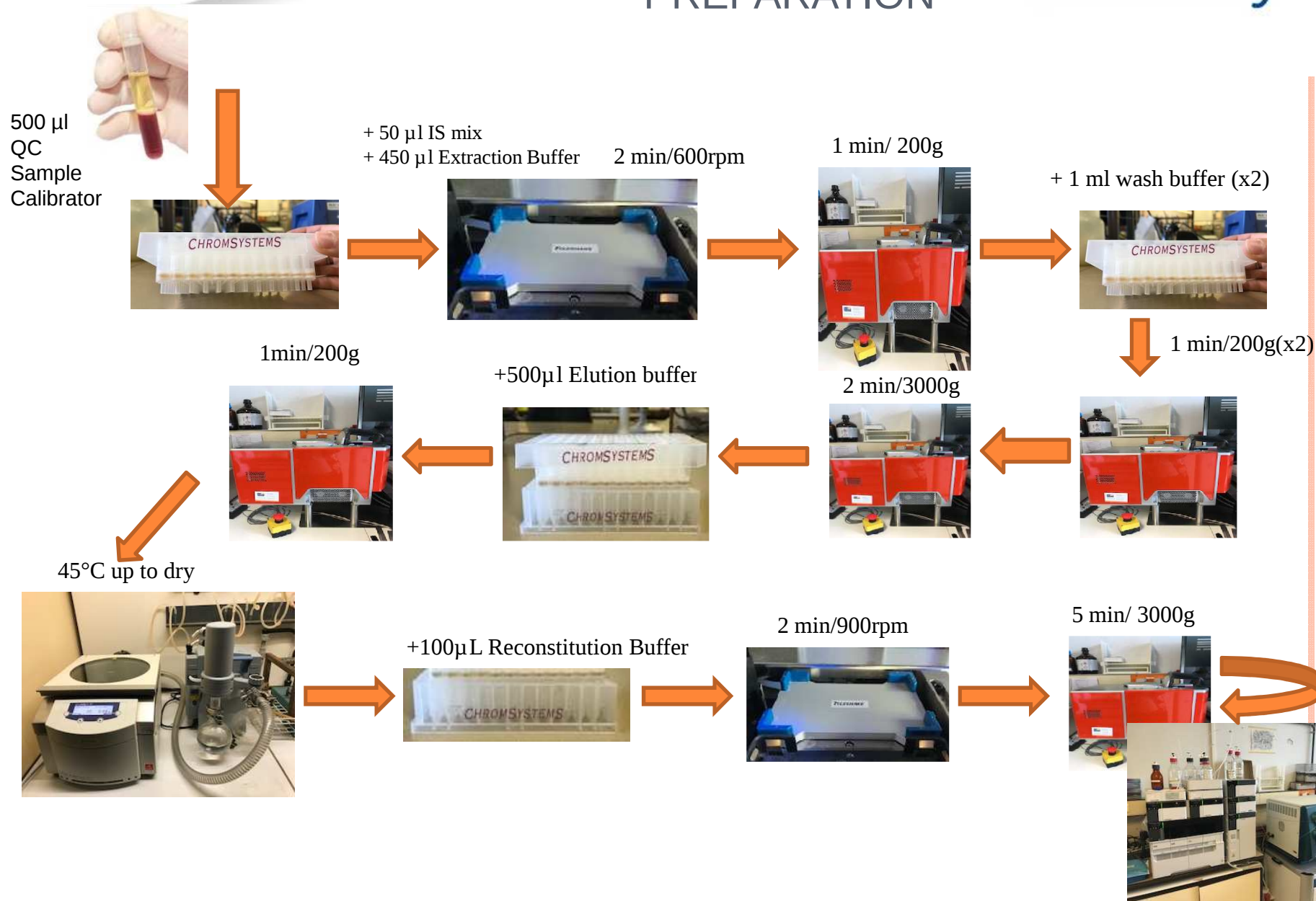


- QTrap 6500 triple quadrupole MS/MS (Sciex) +LC-30A Nexera UHPLC system (Shimadzu).
- Panels de Chromsystems 13 stéroïdes
 - Aldosterone(ALDO)
 - Cortisol(COR)
 - Cortisone
 - Cortsicosterone
 - 11-deoxycortisol(S)
 - Androstenedione (AND),
 - Dehydroepiandrosterone (DHEA)
 - Dehydroepiandrosterone sulfate(DHEAS),
 - Dihydrotestosterone(DHT)
 - Estradiol (E2)
 - 17 α -hydroxyprogesterone (HYP)
 - Progesterone
 - Testosterone(TST)

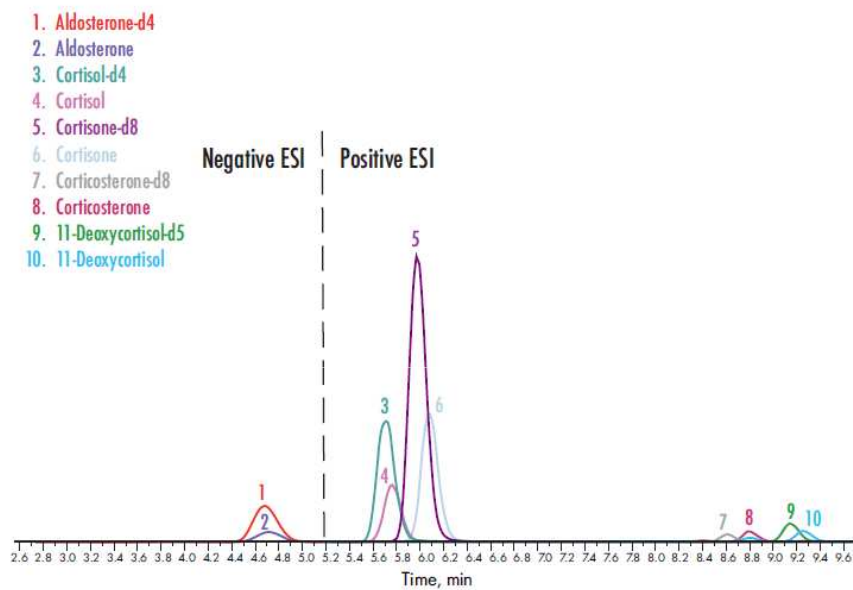
Panel 1

Panel 2

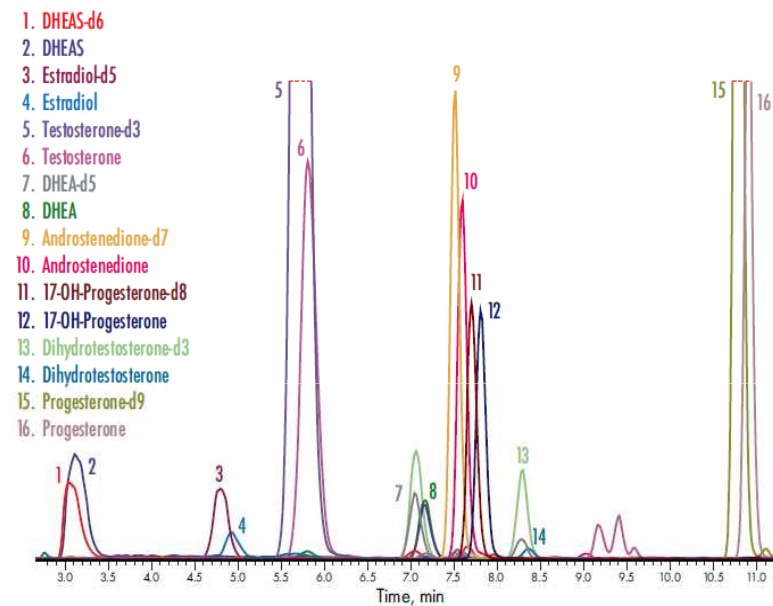
LC-MS/MS: SAMPLE PREPARATION



EXEMPLE D'UN CHROMATOGRAMME



Chromatogram example for panel 1 with the control level II



Chromatogram example for panel 2 with the control level II

TRANSITIONS (PANEL 1)

Molécule / étalon interne	MRM 1	MRM 2	MRM 3
Aldostérone	359 → 331	359 → 189	—
Aldostérone-d ₄	363 → 335	363 → 190	—
Corticostérone	347 → 121	347 → 109	347 → 97
Corticostérone-d ₄	355 → 125	355 → 113	355 → 100
Cortisol	363 → 97	363 → 121 364 → 121*	363 → 327
Cortisol-d ₄	367 → 97	367 → 121 368 → 121*	367 → 331
Cortisone	361 → 163	361 → 121	361 → 105
Cortisone-d ₄	369 → 168	369 → 124	369 → 107
11-déoxycortisol	347 → 97	347 → 109	—
11-déoxycortisol-d ₄	352 → 100	352 → 113	—

TRANSITIONS (PANEL 2)

Molécule / étalon interne	MRM 1	MRM 2
Androstènedione	287 → 109	287 → 97
Androstènedione-d ₃	294 → 113	294 → 100
Déhydroépiandrostérone (DHEA)	289 → 213	271 → 213
Déhydroépiandrostérone (DHEA)-d ₃	294 → 218	276 → 218
Sulfate de déhydroépiandrostérone (SDHEA)	271 → 213	271 → 197
Sulfate de déhydroépiandrostérone (SDHEA)-d ₃	277 → 219	—
Dihydrotestostérone (DHT)	291 → 255	291 → 159
Dihydrotestostérone (DHT)-d ₃	294 → 258	294 → 159
Œstradiol	255 → 159	255 → 133
Œstradiol-d ₃	260 → 161	260 → 135
17α-hydroxyprogestérone	331 → 109	331 → 97
17α-hydroxyprogestérone-d ₃	339 → 113	339 → 100
Progestérone	315 → 97	315 → 109
Progestérone-d ₃	324 → 100	324 → 113
Testostérone	289 → 97	289 → 109
Testostérone-d ₃	292 → 97	292 → 109

EVALUATION ANALYTIQUE

- Calibration: 6 points > réponse déterminée en calculant le rapport entre le pic du stéroïde endogène et celui du deutéré.
- Précision (intra-essais et inter-essais) et l'exactitude ont été établies => n=3 en triplicate, 3 jours.
- Linéarité de la courbe de calibration a été déterminée en faisant une régression linéaire
- L'exactitude a été calculée à partir des valeurs attendues des QCI.
- La limite de détection (LOD) et la limite de quantification (LOQ) ont été calculées avec la plus faible concentration testée.
 - LOD et LOQ = 3:1 et 10:1
signal/bruit rapport
- Corrélations avec d'autres méthodes

EVALUATION ANALYTIQUE

RESULTATS

		Precision						Desirable specification (Ricos)
Substance		Intra-assay			Inter-assay			
		Level 1	Level 2	Level 3	Level 1	Level 2	Level 3	
aldosterone	Concentration (µg/L)	0,10	0,25	1,03	0,10	0,25	1,03	14,70%
	CV(%)	2,6	3,8	2,3	2,6	4,5	3,9	
corticosterone	Concentration (µg/L)	0,83	3,99	30,30	0,83	3,99	30,30	??
	CV(%)	2,8	6,4	2,7	3,3	11,1	9,0	
cortisol	Concentration (nmol/L)	71,2	170	494	71,2	170	494	7,60%
	CV(%)	1,4	3,1	2,8	2,8	3,6	3,6	
cortisone	Concentration (µg/L)	2,06	12,3	29,3	2,06	12,3	29,3	??
	CV(%)	3,3	4,2	6,1	9,6	11,3	6,3	
11-deoxycortisol	Concentration (µg/L)	0,26	1,38	9,14	0,26	1,38	9,14	10,70%
	CV(%)	3,7	5,5	2,8	3,9	5,8	4,1	
Androstenedione	Concentration (µg/L)	0,28	1,16	9,3	0,28	1,16	9,3	??
	CV(%)	10	1,8	3,1	10,5	5,9	3,8	
DHEA	Concentration (µg/L)	1,99	11,6	38,5	1,99	11,6	38,5	??
	CV(%)	1,8	1,3	1,5	4,7	2,98	2,35	
DHEAS	Concentration (µmol/L)	0,69	4,116	13,43	0,69	4,116	13,43	3,20%
	CV(%)	2,7	2,6	2,2	4,8	2,6	2,2	
Dihydrotestosterone	Concentration (µg/L)	0,08	0,37	1,06	0,08	0,37	1,06	??(15%)
	CV(%)	13,5	2,1	2,5	22,2	2,5	2,8	
Estradiol	Concentration (ng/L)	80	390	2460	80	390	2460	11,25%
	CV(%)	2,0	1,3	1,8	8,0	4,0	2,6	
17-Hydroxyprogesterone	Concentration (µg/L)	0,31	1,53	9,01	0,31	1,53	9,01	9,80%
	CV(%)	5,0	1,4	1,9	8,3	4,2	3,2	
Progesterone	Concentration (µg/L)	0,32	3,26	15,6	0,32	3,26	15,6	??
	CV(%)	3,1	1,3	1,8	8,8	3,7	2,3	
Testosterone	Concentration (nmol/L)	0,69	5,24	27,24	0,69	5,24	27,24	4,60%
	CV(%)	3,3	1,2	1,9	8,7	4,2	3,4	

EVALUATION ANALYTIQUE

RESULTATS

		Precision						Desirable specification (Ricos)
Substance		Intra-assay			Inter-assay			
		Level 1	Level 2	Level 3	Level 1	Level 2	Level 3	
aldosterone	Concentration (µg/L)	0,10	0,25	1,03	0,10	0,25	1,03	14,70%
	CV(%)	2,6	3,8	2,3	2,6	4,5	3,9	
corticosterone	Concentration (µg/L)	0,83	3,99	30,30	0,83	3,99	30,30	??
	CV(%)	2,8	6,4	2,7	3,3	11,1	9,0	
cortisol	Concentration (nmol/L)	71,2	170	494	71,2	170	494	7,60%
	CV(%)	1,4	3,1	2,8	2,8	3,6	3,6	
cortisone	Concentration (µg/L)	2,06	12,3	29,3	2,06	12,3	29,3	??
	CV(%)	3,3	4,2	6,1	9,6	11,3	6,3	
11-deoxycortisol	Concentration (µg/L)	0,26	1,38	9,14	0,26	1,38	9,14	10,70%
	CV(%)	3,7	5,5	2,8	3,9	5,8	4,1	
Androstenedione	Concentration (µg/L)	0,28	1,16	9,3	0,28	1,16	9,3	??
	CV(%)	10	1,8	3,1	10,5	5,9	3,8	
DHEA	Concentration (µg/L)	1,99	11,6	38,5	1,99	11,6	38,5	??
	CV(%)	1,8	1,3	1,5	4,7	2,98	2,35	
	Concentration (nmol/L)	0,69	4,116	13,43	0,69	4,116	13,43	3,20%
	CV(%)	2,7	2,6	2,2	4,8	2,6	2,2	
Dihydroepiandrosterone	Concentration (µg/L)	0,08	0,37	1,06	0,08	0,37	1,06	??(15%)
	CV(%)	13,5	2,1	2,5	22,2	2,5	2,8	
Estradiol	Concentration (ng/L)	80	390	2460	80	390	2460	11,25%
	CV(%)	2,0	1,3	1,8	8,0	4,0	2,6	
17-Hydroxyprogesterone	Concentration (µg/L)	0,31	1,53	9,01	0,31	1,53	9,01	9,80%
	CV(%)	5,0	1,4	1,9	8,3	4,2	3,2	
Progesterone	Concentration (µg/L)	0,32	3,26	15,6	0,32	3,26	15,6	??
	CV(%)	3,1	1,3	1,8	8,8	3,7	2,3	
Testosterone	Concentration (nmol/L)	0,69	5,24	27,24	0,69	5,24	27,24	4,60%
	CV(%)	3,3	1,2	1,9	8,7	4,2	3,4	

Cal 1: 40 ng/L

		Precision						Desirable specification (Ricos)
Substance		Intra-assay			Inter-assay			
		Level 1	Level 2	Level 3	Level 1	Level 2	Level 3	
aldosterone	Concentration (µg/L)	0,10	0,25	1,03	0,10	0,25	1,03	14,70%
	CV(%)	2,6	3,8	2,3	2,6	4,5	3,9	
corticosterone	Concentration (µg/L)	0,83	3,99	30,30	0,83	3,99	30,30	??
	CV(%)	2,8	6,4	2,7	3,3	11,1	9,0	
cortisol	Concentration (nmol/L)	71,2	170	494	71,2	170	494	7,60%
	CV(%)	1,4	3,1	2,8	2,8	3,6	3,6	
cortisone	Concentration (µg/L)	2,06	12,3	29,3	2,06	12,3	29,3	??
	CV(%)	3,3	4,2	6,1	9,6	11,3	6,3	
11-deoxycortisol	Concentration (µg/L)	0,26	1,38	9,14	0,26	1,38	9,14	10,70%
	CV(%)	3,7	5,5	2,8	3,9	5,8	4,1	
Androstenedione	Concentration (µg/L)	0,28	1,16	9,3	0,28	1,16	9,3	??
	CV(%)	10	1,8	3,1	10,5	5,9	3,8	
DHEA	Concentration (µg/L)			38,5	1,99	11,6	38,5	??
	CV(%)			1,5	4,7	2,98	2,35	
	Concentration (µg/L)			13,43	0,69	4,116	13,43	3,20%
	CV(%)			2,2	4,8	2,6	2,2	
Dihydroepiandrosterone	Concentration (µg/L)			1,06	0,08	0,37	1,06	??(15%)
	CV(%)		2,1	2,5	22,2	2,5	2,8	
Estradiol	Concentration (ng/L)	80	390	2460	80	390	2460	11,25%
	CV(%)	2,0	1,3	1,8	8,0	4,0	2,6	
17-Hydroxyprogesterone	Concentration (µg/L)	0,31	1,53	9,01	0,31	1,53	9,01	9,80%
	CV(%)	5,0	1,4	1,9	8,3	4,2	3,2	
Progesterone	Concentration (µg/L)	0,32	3,26	15,6	0,32	3,26	15,6	??
	CV(%)	3,1	1,3	1,8	8,8	3,7	2,3	
Testosterone	Concentration (nmol/L)	0,69	5,24	27,24	0,69	5,24	27,24	4,60%
	CV(%)	3,3	1,2	1,9	8,7	4,2	3,4	

Cal 1: 40 ng/L

Normal
values: 5-25
ng/L!!!!!!

		Precision						Desirable specification (Ricos)
Substance		Intra-assay			Inter-assay			
		Level 1	Level 2	Level 3	Level 1	Level 2	Level 3	
aldosterone	Concentration (µg/L)	0,10	0,25	1,03	0,10	0,25	1,03	14,70%
	CV(%)	2,6	3,8	2,3	2,6	4,5	3,9	
corticosterone	Concentration (µg/L)	0,83	3,99	30,30	0,83	3,99	30,30	??
	CV(%)	2,8	6,4	2,7	3,3	11,1	9,0	
cortisol	Concentration (nmol/L)	71,2	170	494	71,2	170	494	7,60%
	CV(%)	1,4	3,1	2,8	2,8	3,6	3,6	
cortisone	Concentration (µg/L)	2,06	12,3	29,3	2,06	12,3	29,3	??
	CV(%)	3,3	4,2	6,1	9,6	11,3	6,3	
11-deoxycortisol	Concentration (µg/L)	0,26	1,38	9,14	0,26	1,38	9,14	10,70%
	CV(%)	3,7	5,5	2,8	3,9	5,8	4,1	
Androstenedione	Concentration (µg/L)	0,28	1,16	9,3	0,28	1,16	9,3	??
	CV(%)	10	1,8	3,1	10,5	5,9	3,8	
	Concentration (µg/L)	1,99	11,6	38,5	1,99	11,6	38,5	??
	CV(%)	1,8	1,3	1,5	4,7	2,98	2,35	
	Concentration (µmol/L)	0,69	4,116	13,43	0,69	4,116	13,43	3,20%
	CV(%)	2,7	2,6	2,2	4,8	2,6	2,2	
Dihydrotestosterone	Concentration (µg/L)	0,08	0,37	1,06	0,08	0,37	1,06	??(15%)
	CV(%)	13,5	2,1	2,5	22,2	2,5	2,8	
Estradiol	Concentration (ng/L)	80	390	2460	80	390	2460	11,25%
	CV(%)	2,0	1,3	1,8	8,0	4,0	2,6	
17-Hydroxyprogesterone	Concentration (µg/L)	0,31	1,53	9,01	0,31	1,53	9,01	9,80%
	CV(%)	5,0	1,4	1,9	8,3	4,2	3,2	
Progesterone	Concentration (µg/L)	0,32	3,26	15,6	0,32	3,26	15,6	??
	CV(%)	3,1	1,3	1,8	8,8	3,7	2,3	
Testosterone	Concentration (nmol/L)	0,69	5,24	27,24	0,69	5,24	27,24	4,60%
	CV(%)	3,3	1,2	1,9	8,7	4,2	3,4	

Cal 1: 0.06 µg/L

EVALUATION ANALYTIQUE

RESULTATS

		Precision						Desirable specification (Ricos)
Substance		Intra-assay			Inter-assay			
		Level 1	Level 2	Level 3	Level 1	Level 2	Level 3	
aldosterone	Concentration (µg/L)	0,10	0,25	1,03	0,10	0,25	1,03	14,70%
	CV(%)	2,6	3,8	2,3	2,6	4,5	3,9	
corticosterone	Concentration (µg/L)	0,83	3,99	30,30	0,83	3,99	30,30	??
	CV(%)	2,8	6,4	2,7	3,3	11,1	9,0	
cortisol	Concentration (nmol/L)	71,2	170	494	71,2	170	494	7,60%
	CV(%)	1,4	3,1	2,8	2,8	3,6	3,6	
cortisone	Concentration (µg/L)	2,06	12,3	29,3	2,06	12,3	29,3	??
	CV(%)	3,3	4,2	6,1	9,6	11,3	6,3	
11-deoxycortisol	Concentration (µg/L)	0,26	1,38	9,14	0,26	1,38	9,14	10,70%
	CV(%)	3,7	5,5	2,8	3,9	5,8	4,1	
Androstenedione	Concentration (µg/L)			9,3	0,28	1,16	9,3	??
	CV(%)				10,5	5,9	3,8	
	Concentration (µg/L)				1,99	11,6	38,5	??
	CV(%)				4,7	2,98	2,35	
	Concentration (µg/L)				0,69	4,116	13,43	3,20%
	CV(%)		2,6	2,2	4,8	2,6	2,2	
Dihydrotestosterone	Concentration (µg/L)	0,08	0,37	1,06	0,08	0,37	1,06	??(15%)
	CV(%)	13,5	2,1	2,5	22,2	2,5	2,8	
Estradiol	Concentration (ng/L)	80	390	2460	80	390	2460	11,25%
	CV(%)	2,0	1,3	1,8	8,0	4,0	2,6	
17-Hydroxyprogesterone	Concentration (µg/L)	0,31	1,53	9,01	0,31	1,53	9,01	9,80%
	CV(%)	5,0	1,4	1,9	8,3	4,2	3,2	
Progesterone	Concentration (µg/L)	0,32	3,26	15,6	0,32	3,26	15,6	??
	CV(%)	3,1	1,3	1,8	8,8	3,7	2,3	
Testosterone	Concentration (nmol/L)	0,69	5,24	27,24	0,69	5,24	27,24	4,60%
	CV(%)	3,3	1,2	1,9	8,7	4,2	3,4	

Cal 1: 0.06 µg/L

Normal values:
20-150 ng/L (0.02-0.15µg/L)

EVALUATION ANALYTIQUE

RESULTATS

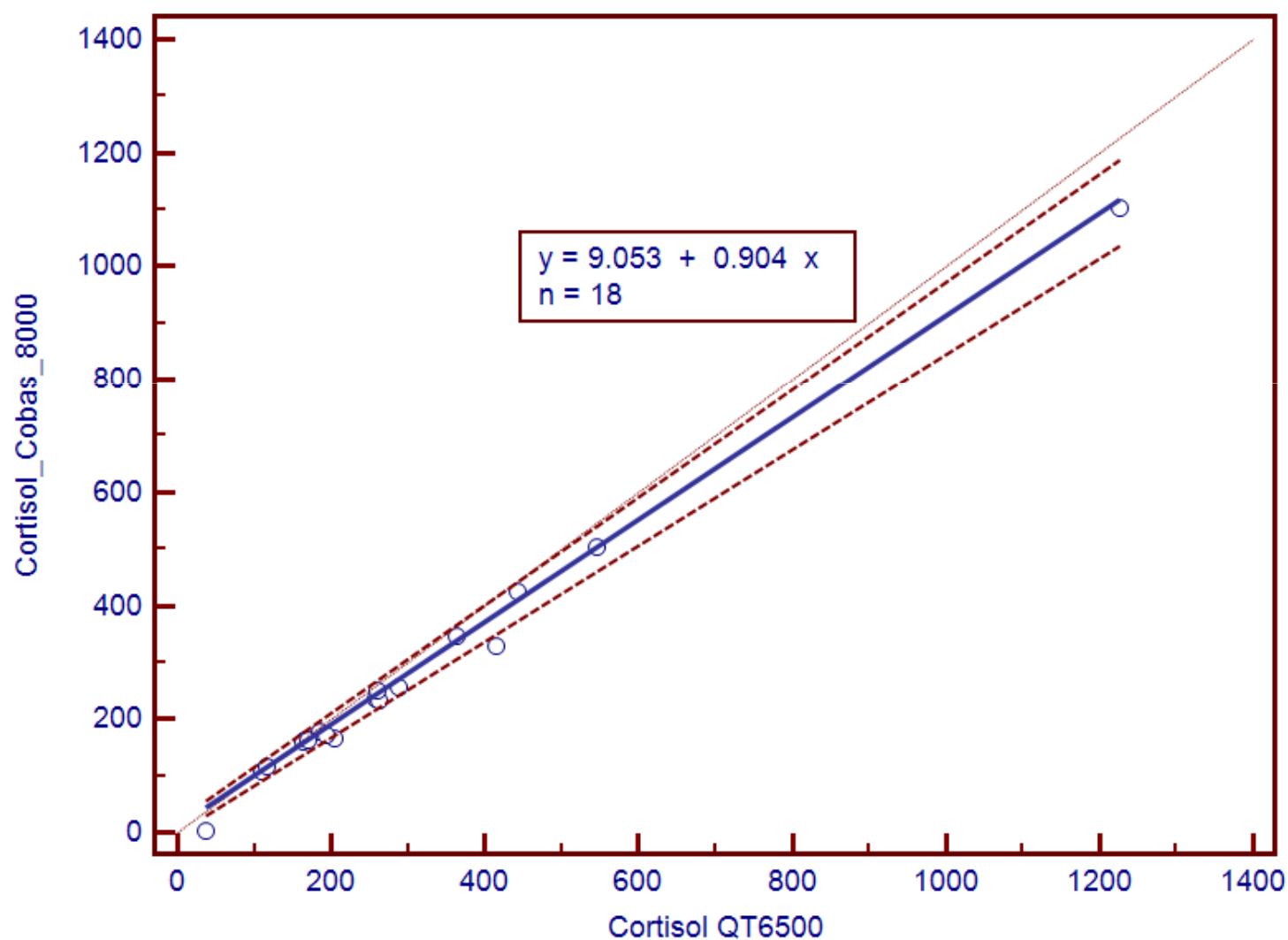
LOQ (µg/L) (SD)(n=5)			
Substance	Chromsystems	6500QT	SD
aldosterone	0,01	0,025	0,008
corticosterone	0,2	0,051	0,013
cortisol	2,2	0,242	0,056
cortisone	0,4	0,057	0,031
11-deoxycortisol	0,02	0,014	0,0045
Androstenedione	0,04	0,071	0,010
DHEA	0,6	0,556	0,153
DHEAS	75	7,343	2,413
Dihydrotestosterone	0,25	0,079	0,028
Estradiol	0,06	0,037	0,0104
17-Hydroxyprogesterone	0,06	0,052	0,024
Progesterone	0,03	0,024	0,011
Testosterone	0,025	0,012	0,004
LOD(µg/L) (SD) (n=5)			
Substance	Chromsystems	6500QT	SD
aldosterone	-	0,007	0,002
corticosterone	-	0,015	0,004
cortisol	-	0,073	0,017
cortisone	-	0,017	0,009
11-deoxycortisol	-	0,004	0,001
Androstenedione	-	0,021	0,003
DHEA	-	0,167	0,046
DEHEAS	-	2,203	0,724
Dihydrotestosterone	-	0,024	0,008
Estradiol	-	0,011	0,003
17-Hydroxyprogesterone	-	0,016	0,007
Progesterone	-	0,007	0,003
Testosterone	-	0,004	0,001

EVALUATION ANALYTIQUE

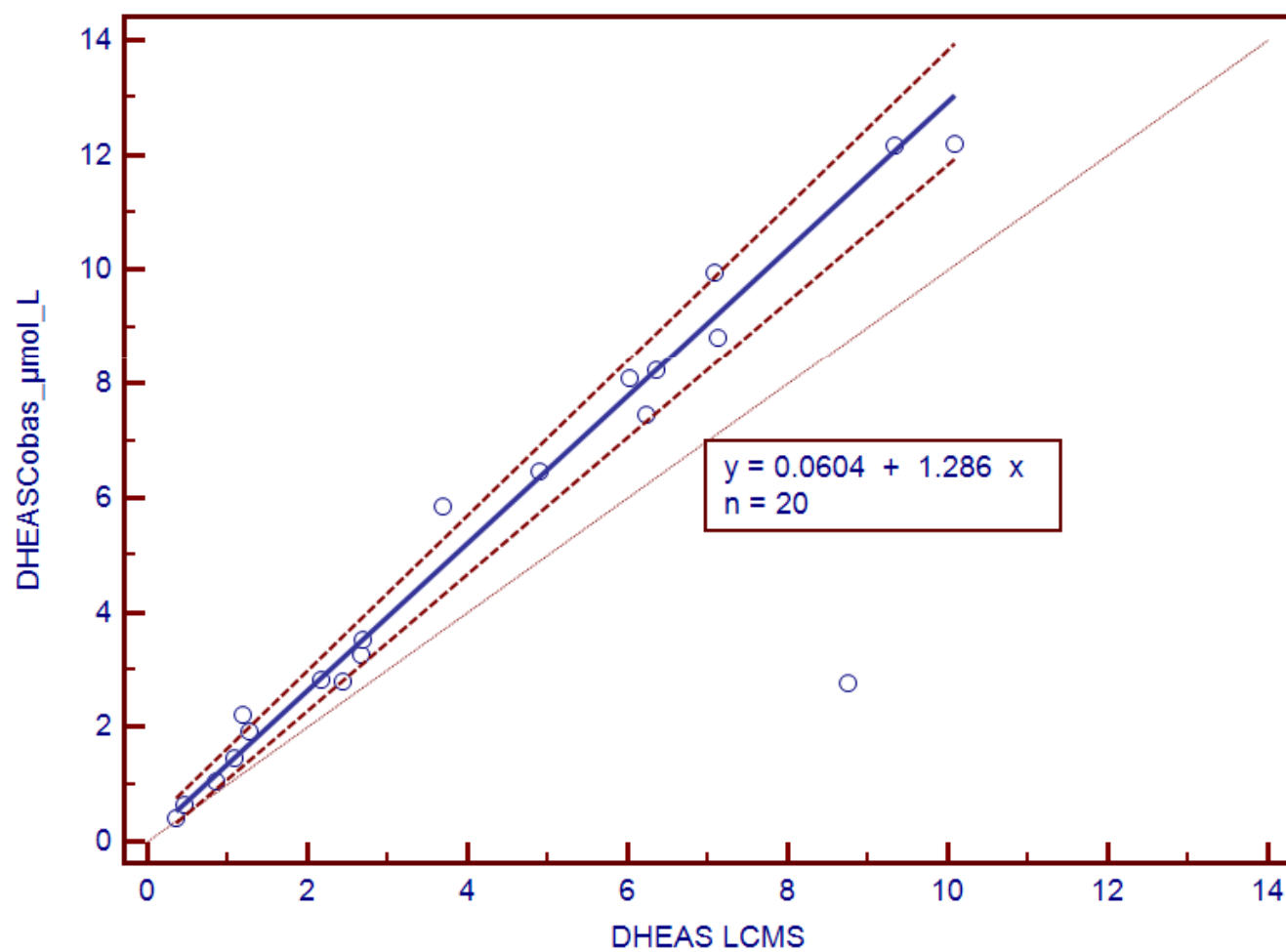
RESULTATS

Substance	Recovery(%) n=3, 3 days			Desirable biais (Ricos)
	Level 1	Level 2	Level 3	
aldosterone	0.10	0.25	1.03	12.40%
	101.33+/-2.65%	103.56+/-9.62%	99.29+/-3.55%	
corticosterone	0.83	3.99	30.30	??
	102.72+/-3.20%	103.80+/-13.92%	95.30+/-7.92%	
cortisol	71.2	170	494	10.30%
	101.45+/-2.49%	101.67+/-9.05%	99.27+/-3.46%	
cortisone	2.06	12.3	29.3	??
	109.61+/-8.54%	96.99+/-14.51%	100.93+/-6.28%	
11-deoxycortisol	0.26	1.38	9.14	9.50%
	99.66+/-3.89%	101.22+/-9.37%	100.42+/-3.78%	
Androstenedione	0.28	1.16	9.3	??
	98.21+/-11.54%	95.22+/-6.35%	95.95+/-4.52%	
DHEA	1.99	11.6	38.5	??
	96.16+/-3.50%	99.74+/-3.50%	99.37+/-2.03%	
DHEAS	0.69	4.116	13.43	7.90%
	101.52+/-5.03%	99.75+/-2.09%	100.11+/-3.17%	
Dihydrotestosterone	0.08	0.37	1.06	??
	95.21+/-16.70%	106.11+/-16.39%	106.93+/-5.07%	
Estradiol	80	390	2460	8.30%
	98.75+/-7.07%	99.68+/-5.35%	98.62+/-2.35%	
17-Hydroxyprogesterone	0.31	1.53	9.01	13.50%
	94.30+/-7.98%	100.24+/-5.67%	101.09+/-2.65%	
Progesterone	0.32	3.26	15.6	??
	102.29+/-7.29%	101.39+/-6.18%	99.90+/-2.45%	
Testosterone	0.69	5.24	27.24	6%
	96.92+/-7.77%	99.38+/-6.09%	100.38+/-2.64%	

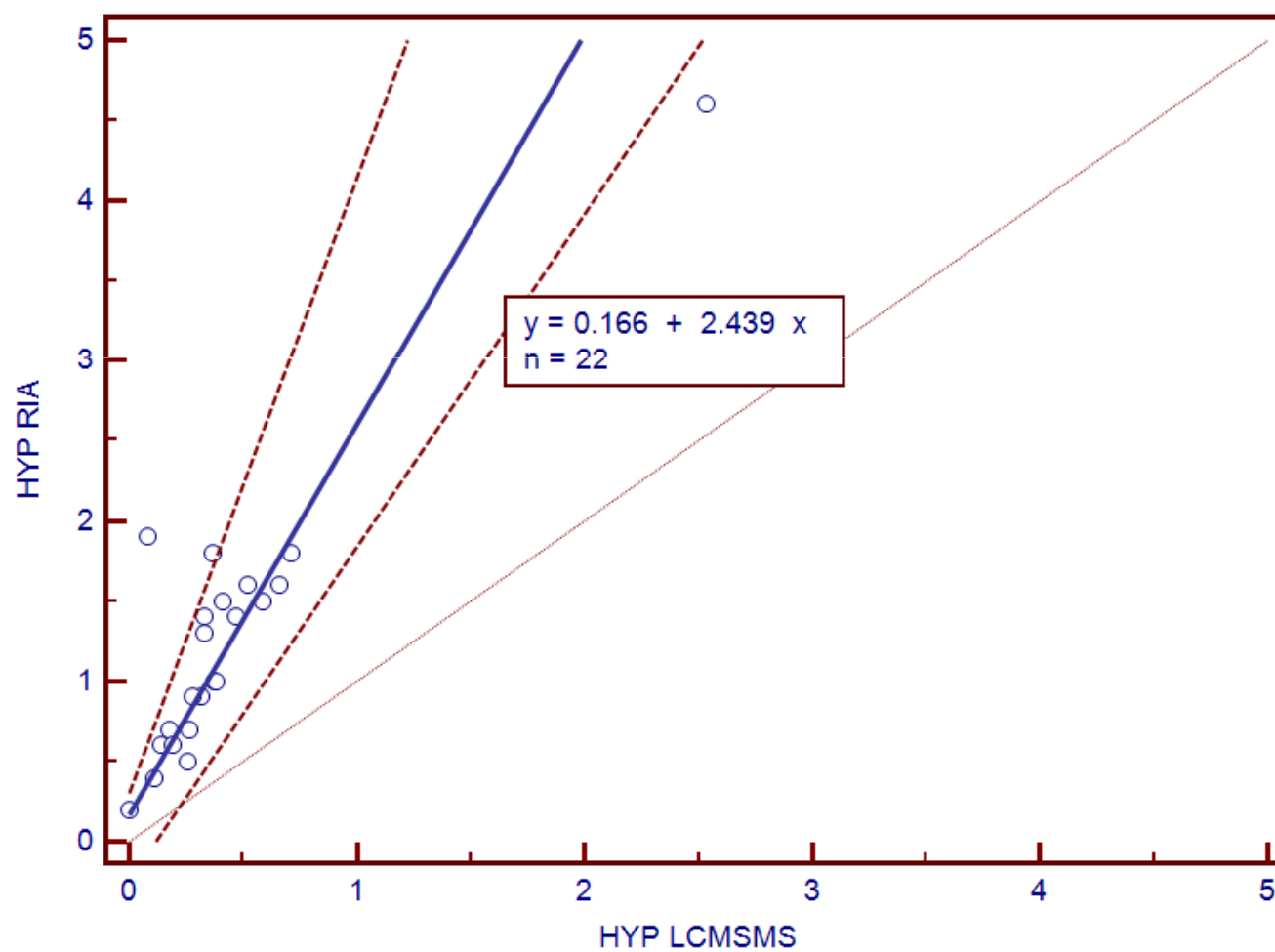
CORRELATION



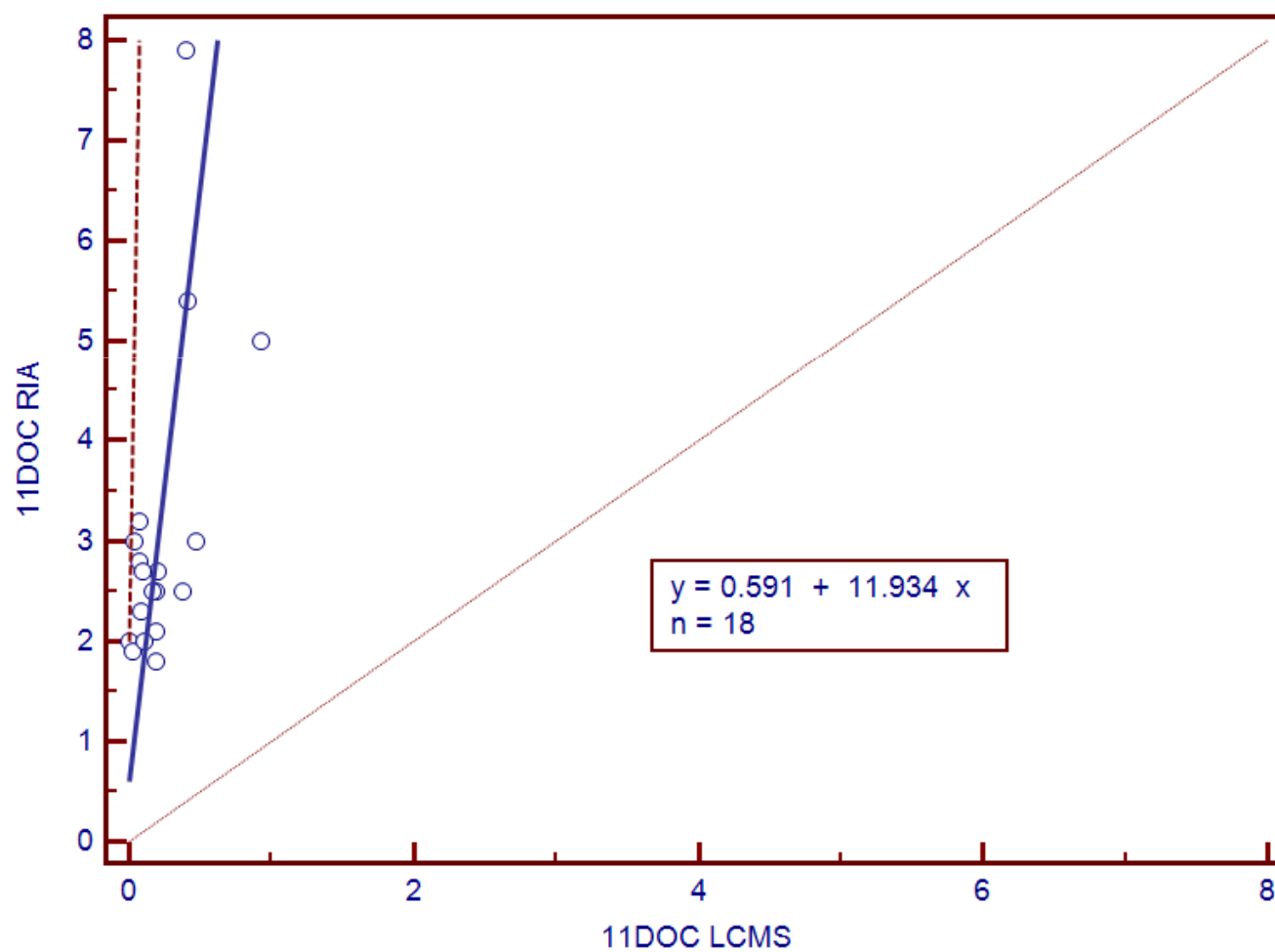
CORRELATION



CORRELATION



CORRELATION



VALEURS DE REFERENCE

➤ Critères:

- normotensif (PA<140/90 mmHg)
- Pas de traitement anti-hypertenseurs ni de corticoides
- Pas fumeur
- Pas de contraception oral
- A jeun

➤ Recrutement:

- 514 volontaires Caucasiens(144 F: age moyen 55 ± 15 ans, 117 M: age moyen: 37 ± 13 ans).
- 253 enfants: age moyen 8.4 ± 4.4 ans.
- Tubes prélevés le matin → centrifugés immédiatement pdt 10min à 2500g, stockés à -80°C avant dosage.
- 95th percentile calculé en accord avec CLSI C28-A3.
- Comité d'éthique OK

PASSAGE DU RIA À LA LC-MS/MS POUR L'ALDOSTERONE PLASMATIQUE ET URINAIRE

 **Homemade**

ALDOSTERONE

❑ Phase pré-analytique

Type d'échantillon:

- Serum
- Plasma EDTA
- Urine de 24h

Supine position: >2 h before sampling

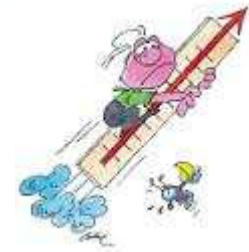
Upright position: > 1 h standing activity before sampling

Orthostasis → values 2- to 3-fold higher than in supine patients

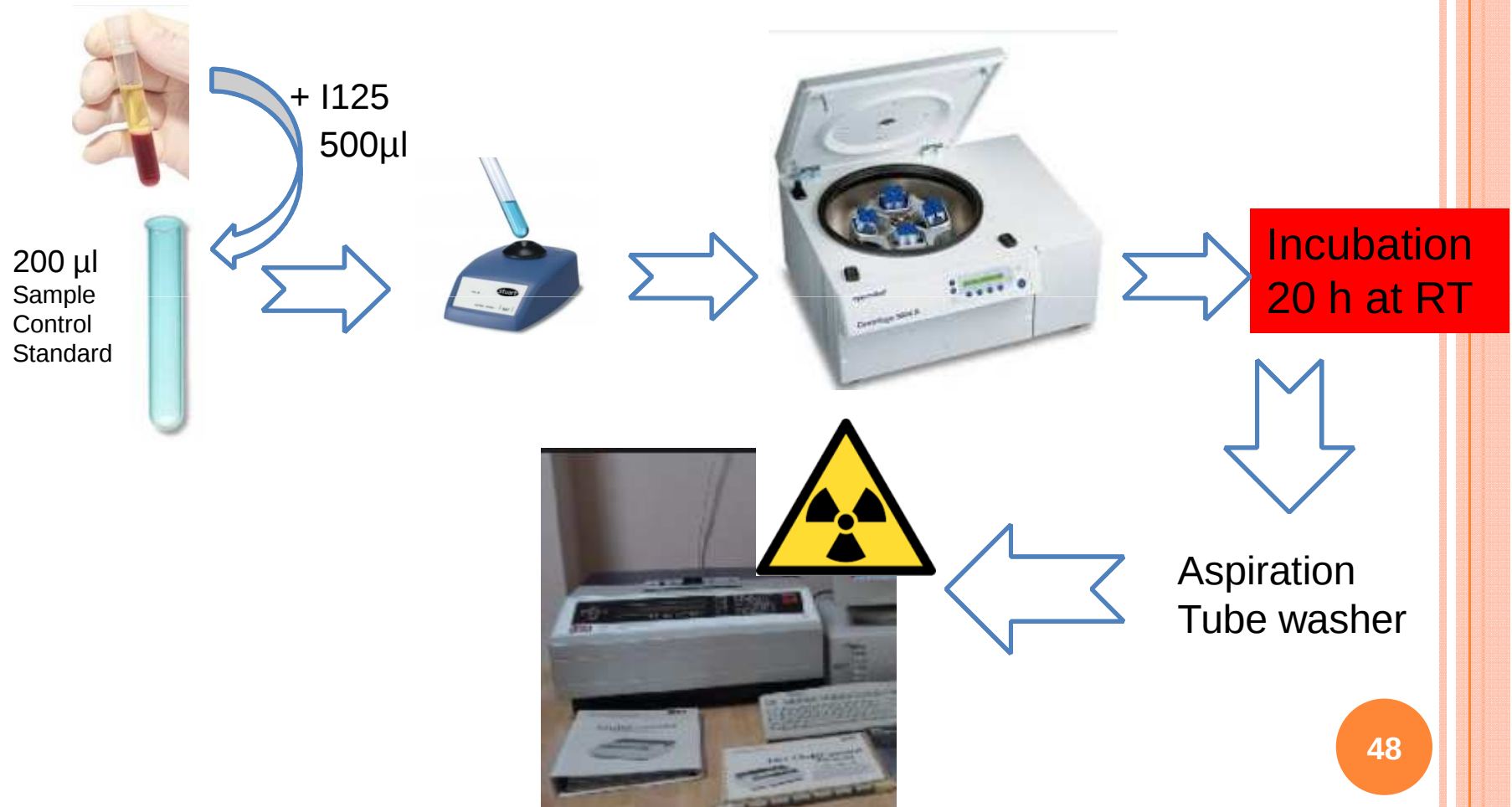


ETAPES SUIVIES.....

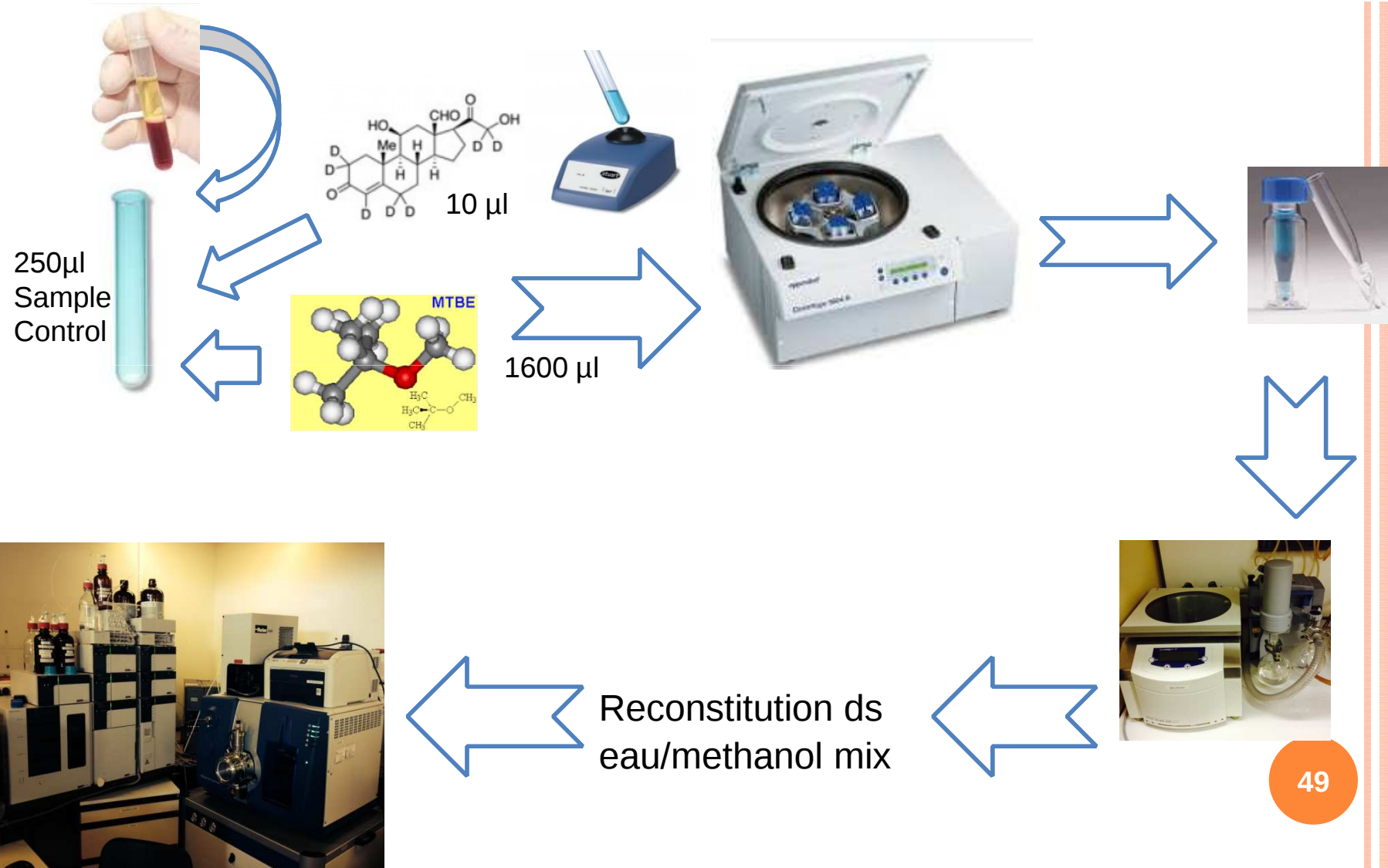
- Développement de la méthode maison
- Validation de la méthode
- Comparaison du RIA à notre nouvelle méthode en LC-MS/MS



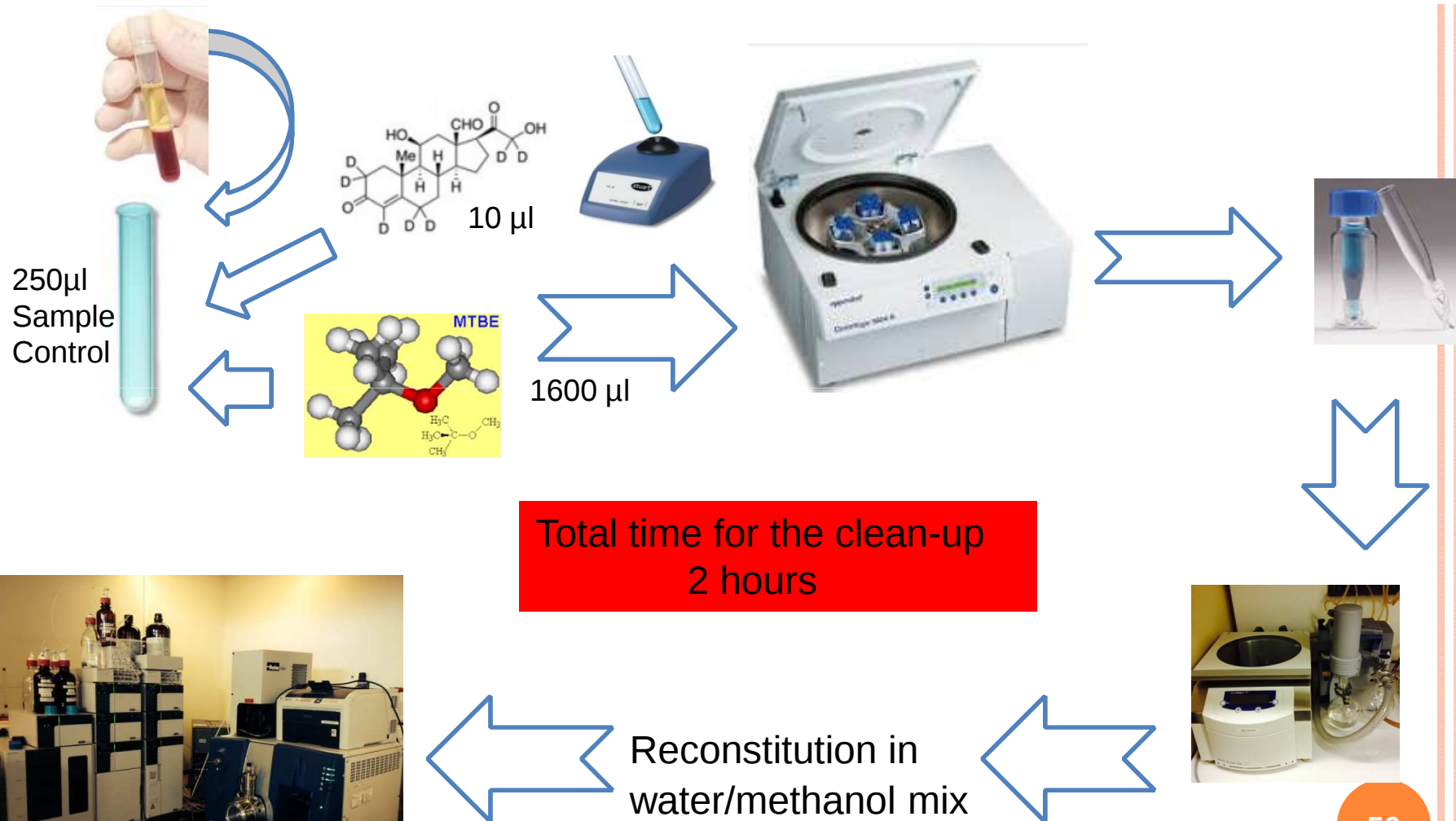
RIA: METHODE ANALYTIQUE (SERUM-PLASMA)



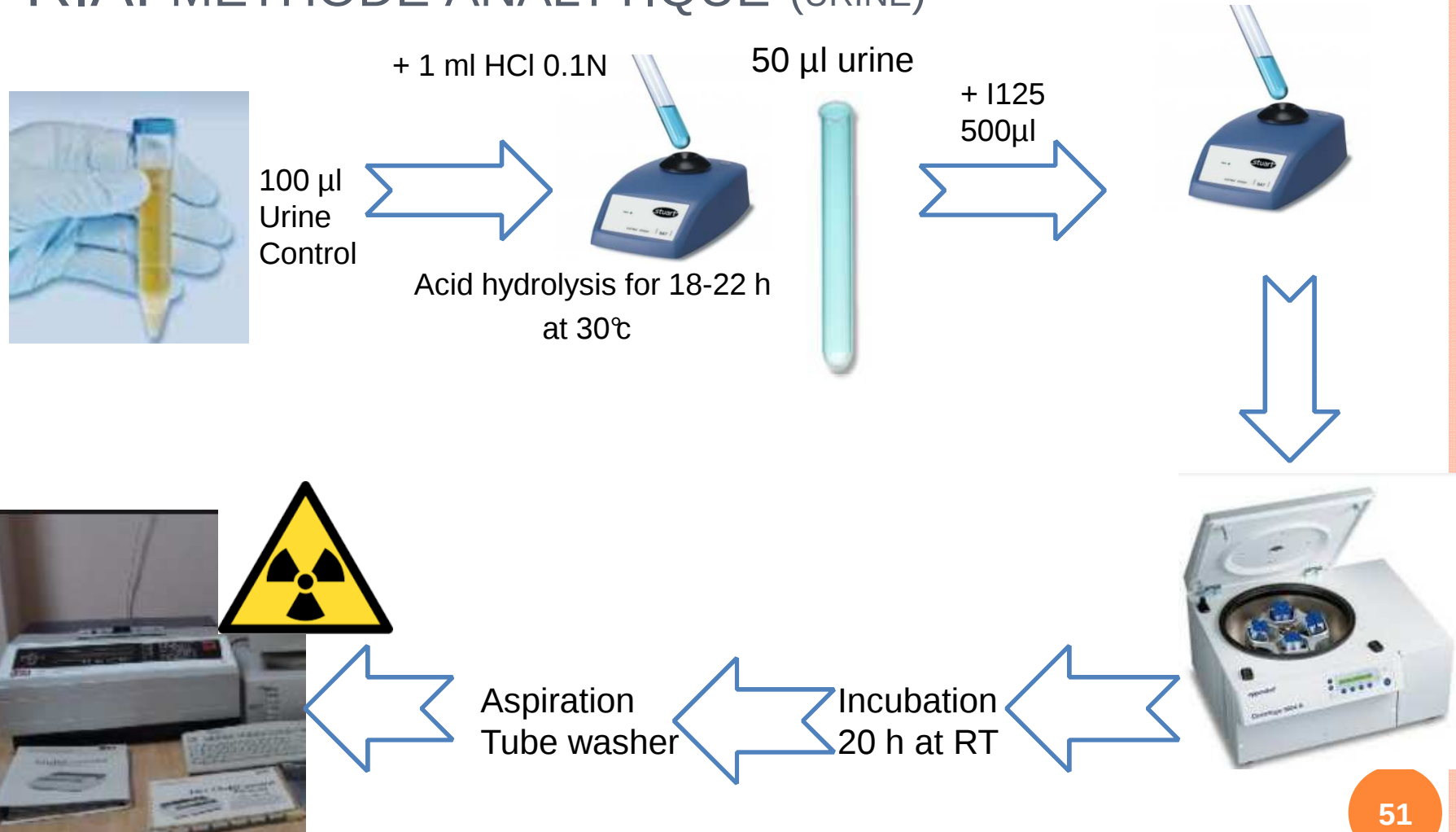
LC-MS/MS: METHODE ANALYTIQUE (SERUM-PLASMA)



LC-MS/MS: METHODE ANALYTIQUE (SERUM-PLASMA)

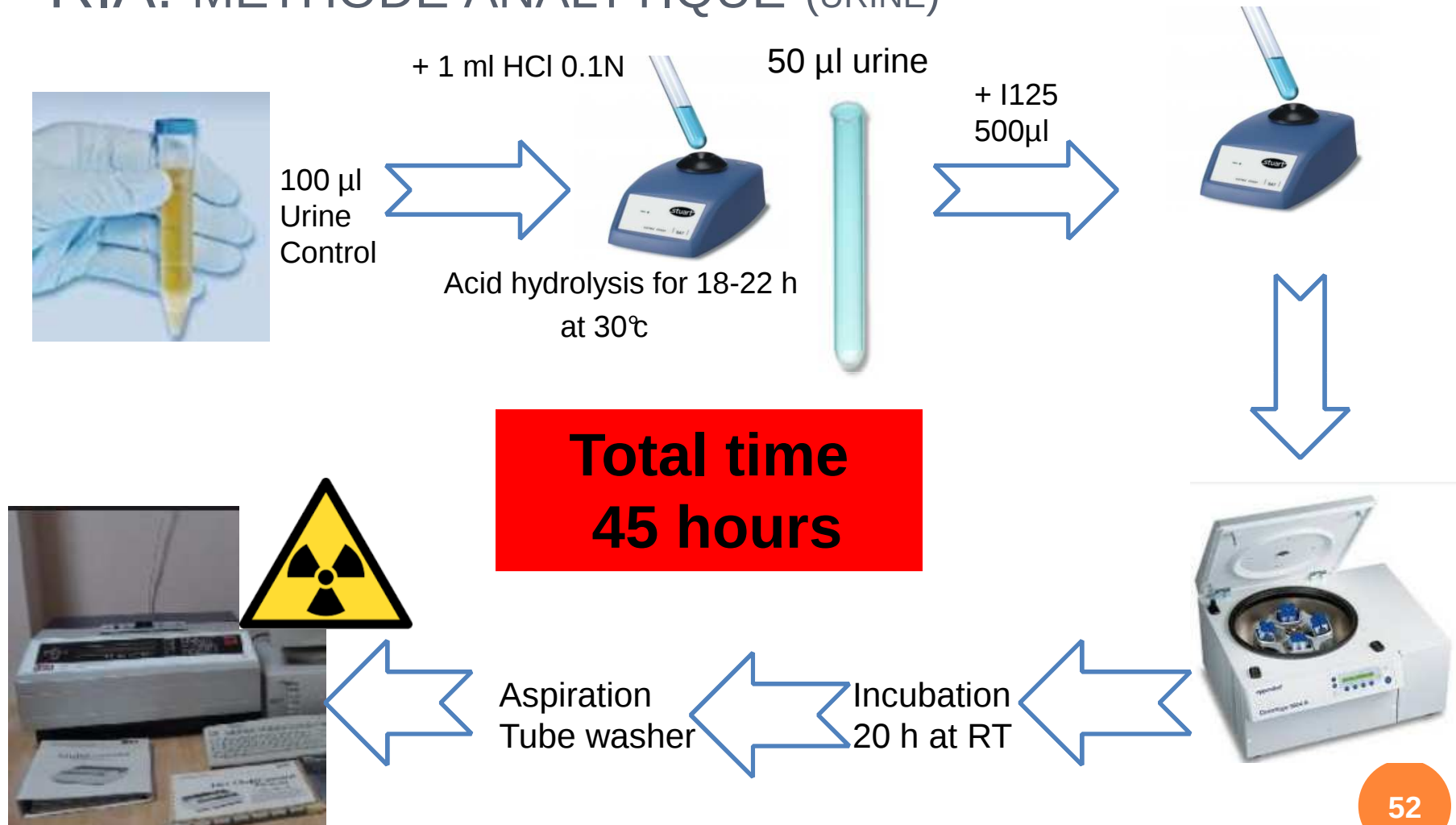


RIA: METHODE ANALYTIQUE (URINE)



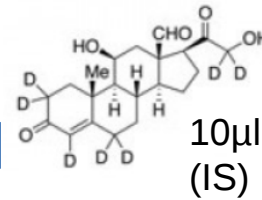
aldosterone 18-glucuronide → aldosterone

RIA: METHODE ANALYTIQUE (URINE)



aldosterone 18-glucuronide → aldosterone

Acid hydrolysis for 18-22 h
at 30°C



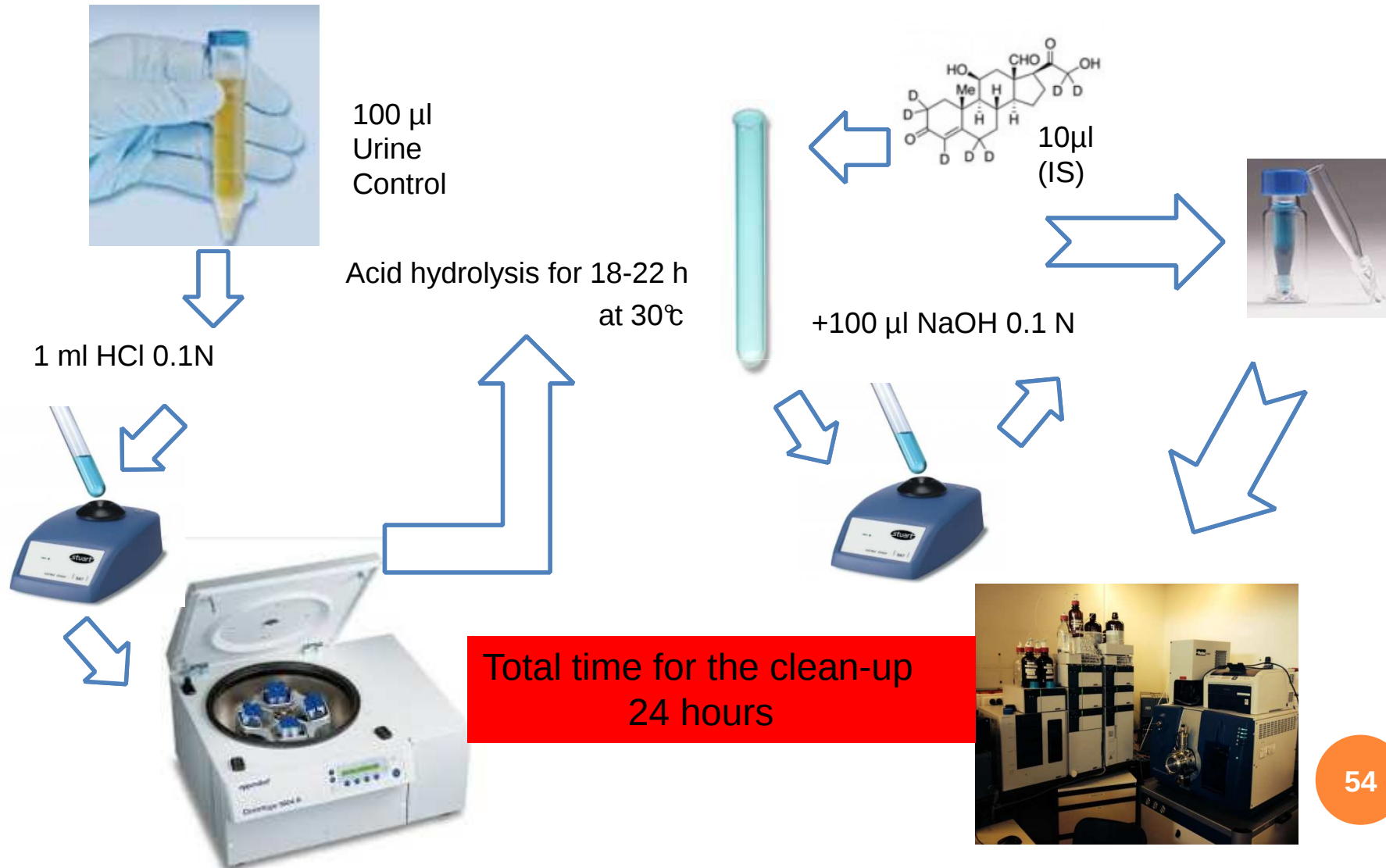
10μl
(IS)

+100 µl NaOH 0.1 N



53

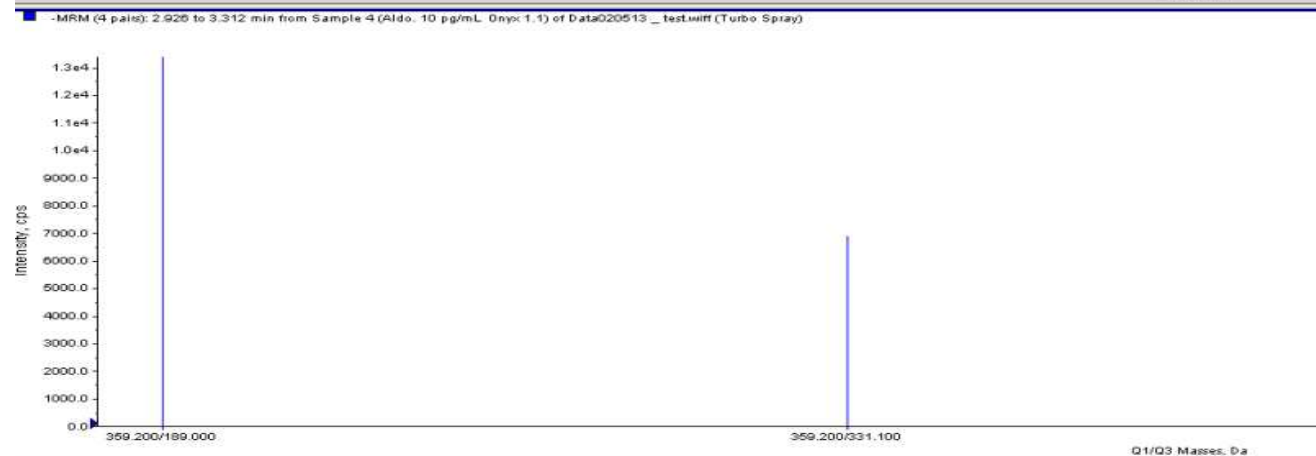
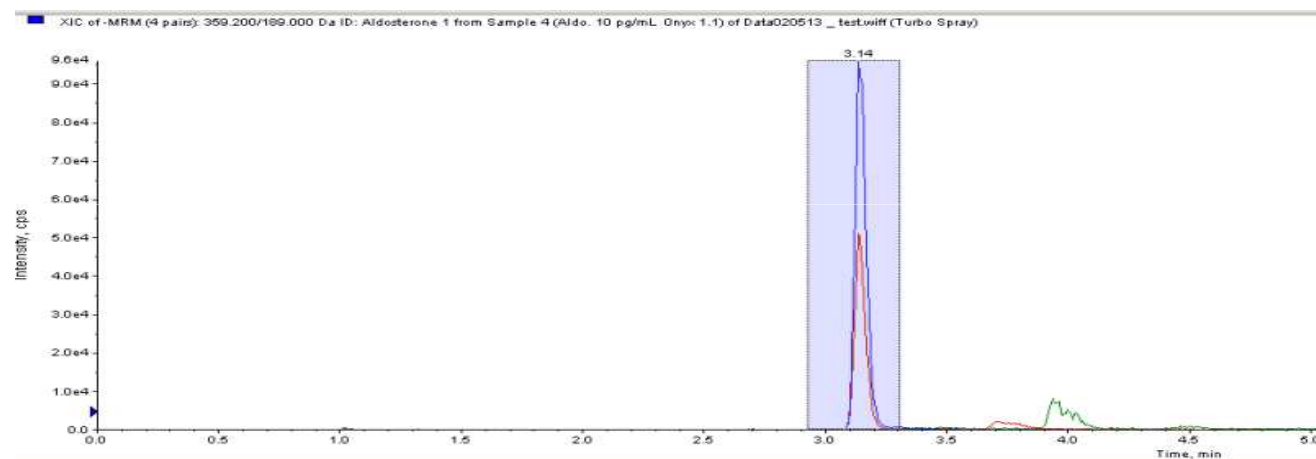
LC-MS/MS: METHODE ANALYTIQUE (URINE)



aldosterone 18-glucuronide → aldosterone

ALDOSTERONE LC-MS/MS

Analyte	MW	Polarity	Transition type	Analyte Q1 value (m/z)	Analyte Q3 value (m/z)	IS Q1 value (m/z)	IS Q3 value (m/z)
Aldosterone	360.2	Negative	Quantifier	359.2	189.2	366.2	338.1
Aldosterone	360.2	Negative	Qualifier	359.2	331.1	366.2	338.1



PROTOCOLE DE VALIDATION

VALIDATION

- Profil d'exactitude

- 3 jours avec

- 5 pools plasmatiques à $\neq$ conc

- 8 pools urinaires à $\neq$ conc

N=3

COMPARISON RIA-LC-MS/MS

- 68 plasmas routine

- 22 urines routine

ALDOSTERONE VALIDATION - PRECISION

Pool	n	Mean (nmol/L)	WRCV (%)	WRSD (nmol/L)	BRCV (%)	BRSD (nmol/ L)
P1	9	0.06	3.6	0.00	4.8	0.00
P2	9	0.11	5.1	0.01	5.1	0.01
P3	9	0.31	3.5	0.01	3.5	0.01
P4	9	0.71	2.9	0.02	3.1	0.02
P5	9	2.20	2.8	0.06	2.8	0.06
U1	12	2.99	15.4	0.47	15.4	0.47
U2	12	20.25	6.4	1.30	6.4	1.30
U3	12	30.44	7.3	2.22	7.3	2.22
U4	12	90.19	2.5	2.22	4.5	4.02
U5	12	133.60	5.0	6.62	7.0	9.34
U6	12	188.89	5.1	9.70	7.4	13.99
U7	12	311.63	5.4	16.73	5.4	16.73
U8	12	52.74	6.0	3.19	8.6	4.54

ALDOSTERONE VALIDATION- RECOVERY

Sample preparation	Matrix	Concentration (nmol/L)	Mean Recovery (95% CI)
Human plasma	water	0.07	99.4 (86.3–112.5)
	water	0.28	101.6 (93.1–110.0)
	water	1.39	102.5 (96.0–109.0)
	plasma	0.07	92.4 (86.3–98.5)
	plasma	0.28	103.4 (94.0–112.8)
	plasma	1.39	101.6 (95.1–108.1)
Human urine	water	1.39	109.2 (100.2–118.2)
	water	27.70	104.7 (99.8–109.6)
	water	138.50	121.2 (105.1–137.3)
	urine	1.39	104.6 (95.2–114.0)
	urine	27.70	86.7 (76.1–97.3)
	urine	138.50	98.2 (84.1–112.3)

ALDOSTERONE VALIDATION- LOD ET LOQ

- Serum-Plasma

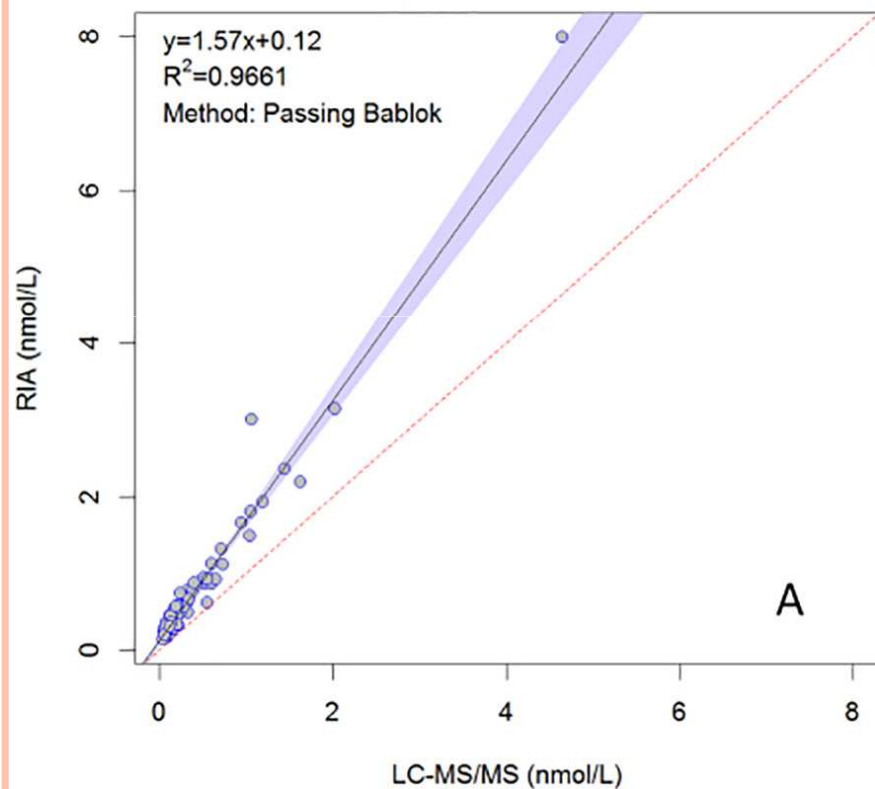
- LOD : 6 ng/L
- LOQ: 15.1 ng/L

- Urine

- LOD : 1.1 µg/L
- LOQ: 2.4 µg/L

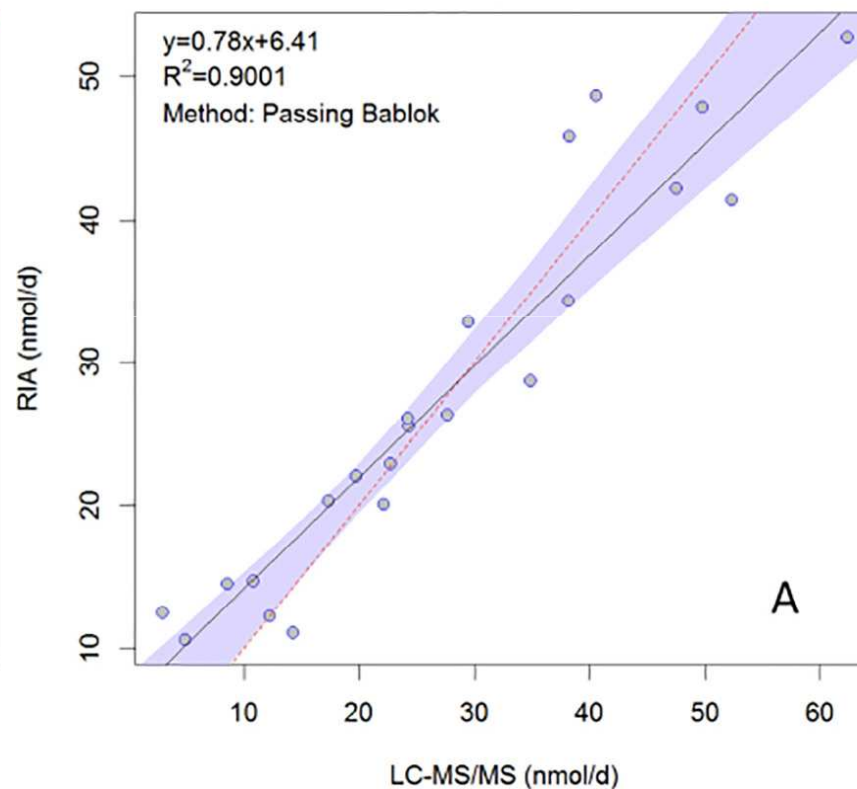
Plasma

Regression Plot

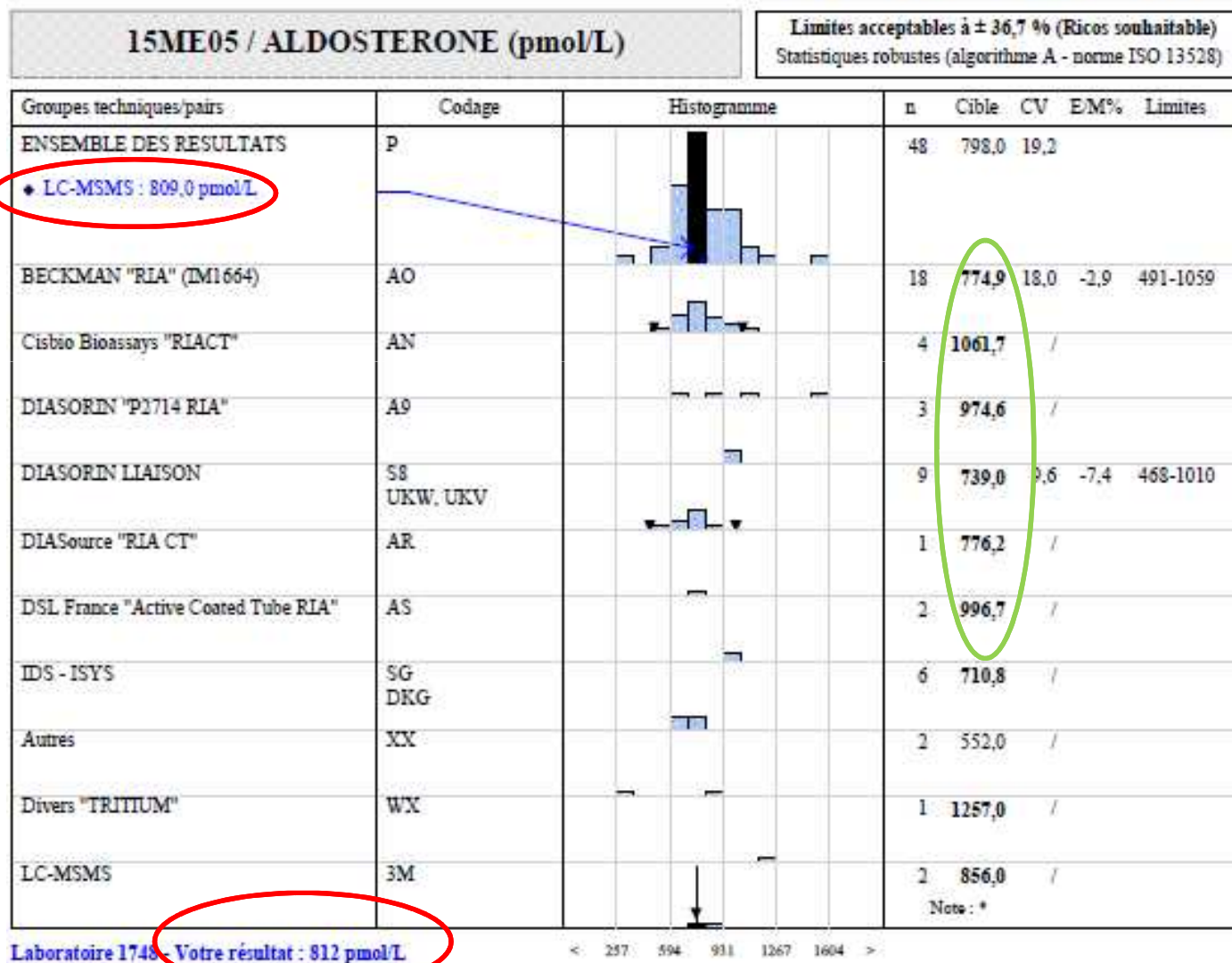


Urine

Regression Plot



COMPARISON RIA-LCMS CONTROL EXTERNE (PLASMA)

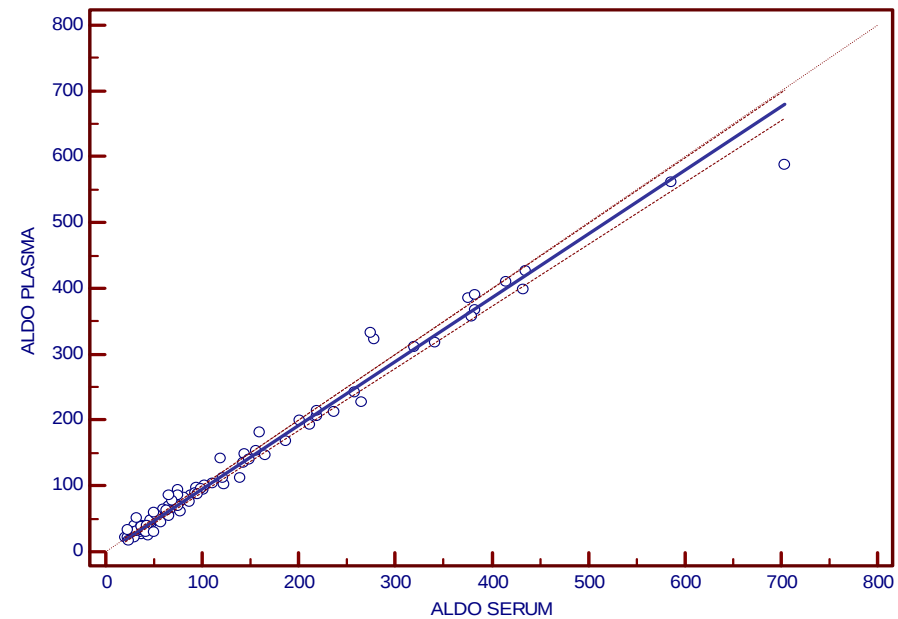
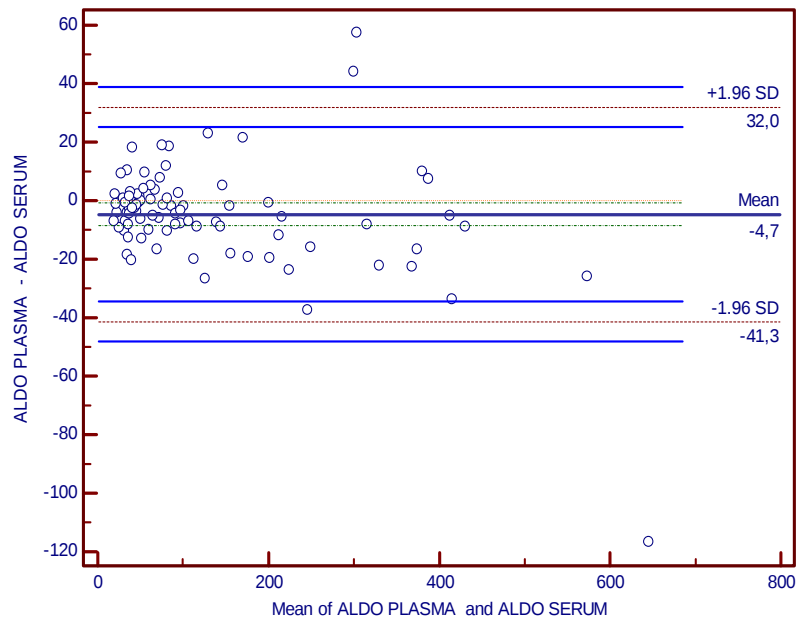


SERUM-PLASMA CORRELATION

$$y = -1.049451 + 0.967033 x$$

X= serum

Y= plasma



REFERENCE VALUES ALDOSTERONE

Serum/plasma

- Mayo Clinic:
 - ❑ -30 days: 170-1540 ng/L
 - ❑ 31 days-11 months: 65-860 ng/L
 - ❑ 1-10 years:
 - ❑ < or =400 ng/L (supine)
 - ❑ < or =1240 ng/L (upright)
 - ❑ > or =11 years: < or =210 ng/L (a.m. peripheral vein specimen)
- Liège University Hospital:

Matrix	Gender	Reference interval
Plasma	Female	<263 ng/L
	Male	<148 ng/L
Urine	Female	<22 µg/24h
	Male	

Urinary

- Mayo clinic:
 - ❑ 0-30 days: 0.7-11.0 mcg/24 hours*
 - ❑ 31 days-11 months: 0.7-22.0 mcg/24 hours*
 - ❑ > or =1 year: 2.0-20.0 mcg/24 hours
- Liège University Hospital:

REFERENCE VALUES ALDOSTERONE

Serum/plasma

- Mayo Clinic:
 - ❑ -30 days: 170-1540 ng/L
 - ❑ 31 days-11 months: 65-860 ng/L
 - ❑ 1-10 years:
 - ❑ < or =40 ng/L
 - ❑ < or =11 ng/L
 - ❑ > or =11 ng/L (a.m. pe
- Liège U

Urinary

- Mayo clinic:
 - ❑ 0-30 days: 0.7-11.0 mcg/24 hours*
 - ❑ 31 days-11 months: 0.7-22.0

Clinical Mass Spectrometry 9 (2018) 7–17



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Mass Spectrometry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/clinms



Migration from RIA to LC-MS/MS for aldosterone determination:
Implications for clinical practice and determination of plasma and urine
reference range intervals in a cohort of healthy Belgian subjects

Caroline M. Le Goff^{a,*}, Ana Gonzalez-Antuña^a, Stéphanie D. Peeters^a, Neus Fabregat-Cabello^a,
Jessica G. Van Der Gugten^b, Laurent Vroonen^c, Hans Pottel^d, Daniel T. Holmes^b, Etienne Cavalier^a



CAS CLINIQUE

➔ *ALDOSTERONE DETERMINATION*

- RIA > 1000 ng/L
- LC-MS/MS for confirmation
= 65.72 ng/L

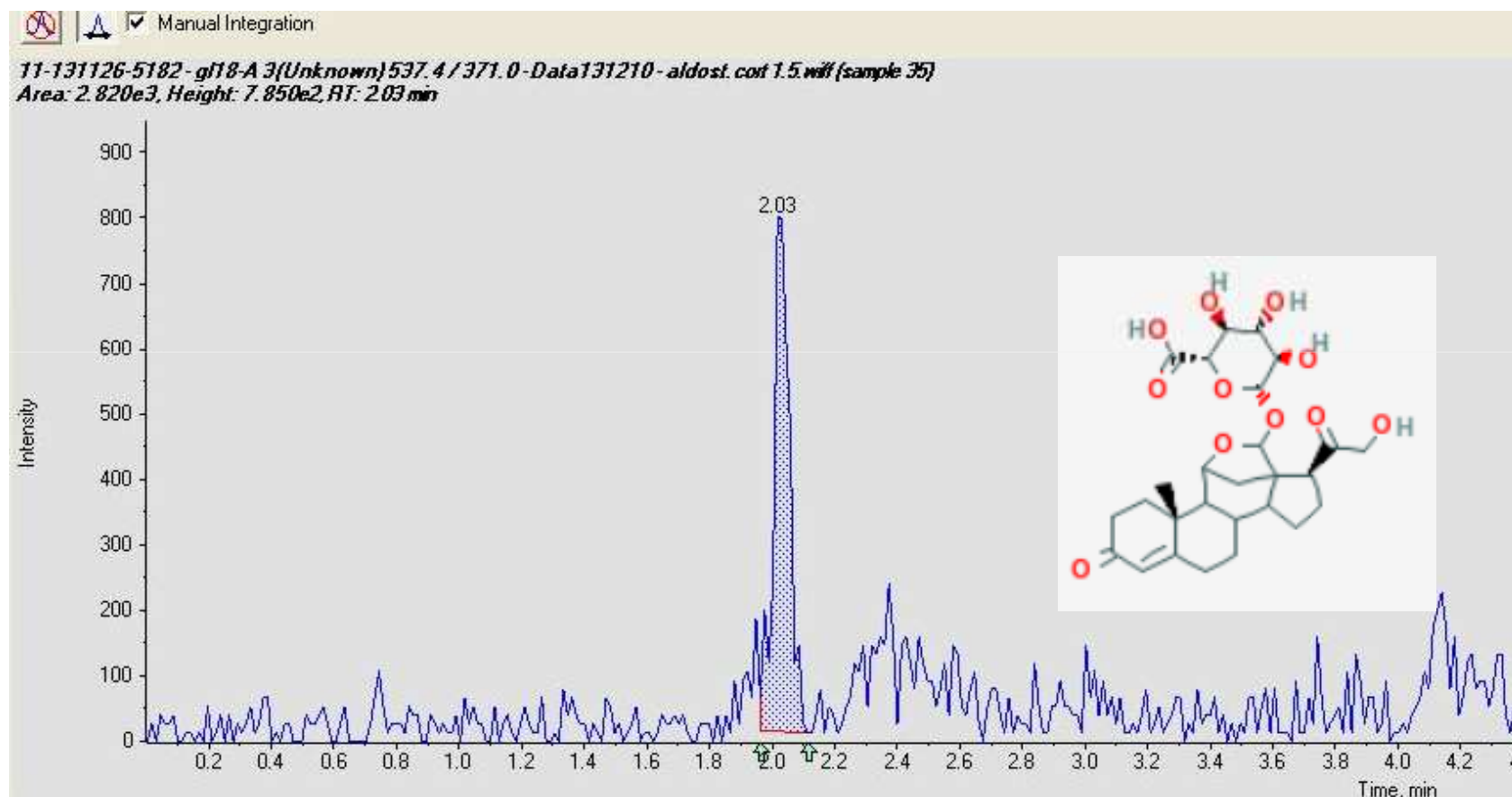
CAS CLINIQUE

→ *ALDOSTERONE DETERMINATION*

- RIA > 1000 ng/L
- LC-MS/MS for confirmation
= 65.72 ng/L

→ Aldosterone glucuronide

ALDOSTERONE-18-GLUCURONIDE

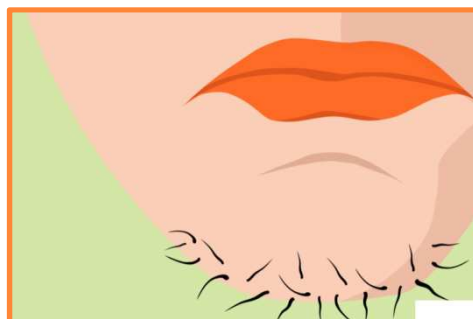


UN AUTRE EXEMPLE

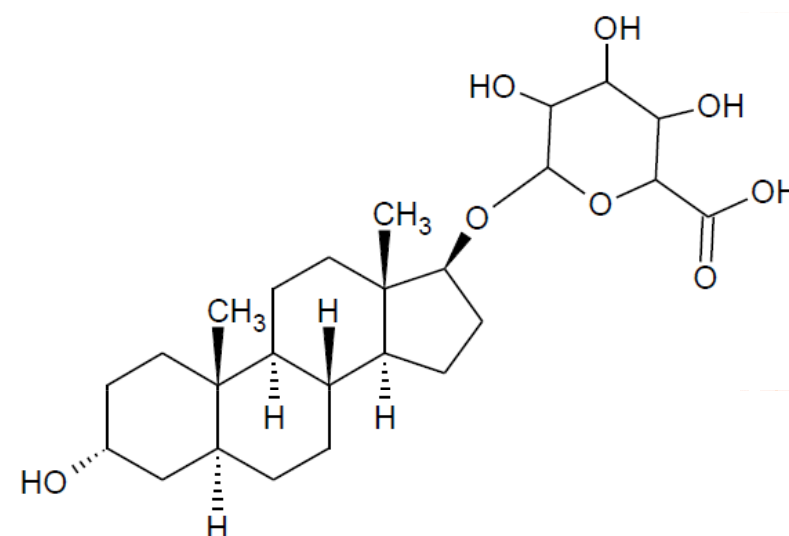
➔ PASSAGE DE L'ELISA À LA LC-MS/MS



GLUCURONIDE D'ANDROSTANEDIOL- (ADG)



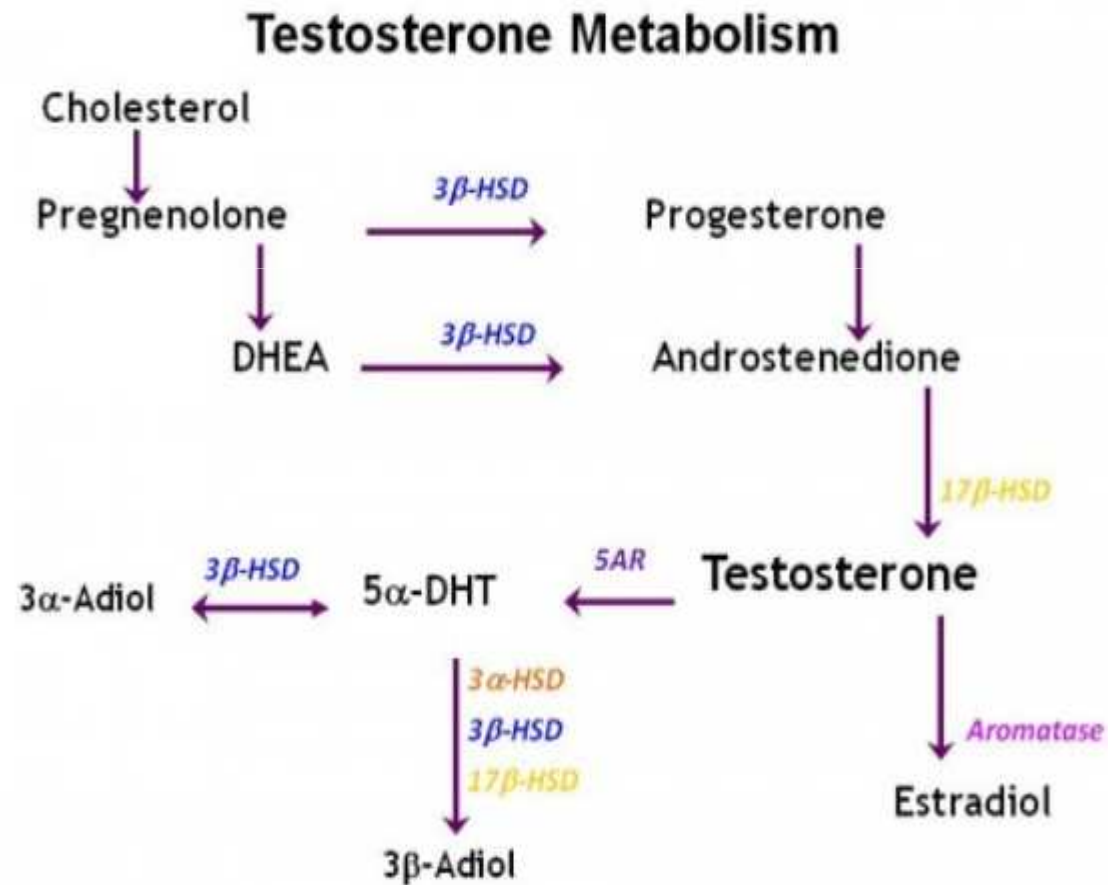
Valeurs de référence
F: 0.3-7.9 ng/mL
H: 2.5-23.6 ng/mL



- 3 α -diol-17G or 5 α β -DiolG
- MW: 468 g/mol
- Androstenediol glucuronide , 3-Alpha glucuronide Androstenediol , 5-Alpha, 3-alpha-Androstenediol glucuronide , 5-Alpha-androstenediol...

→ CAS: 102029-79-8

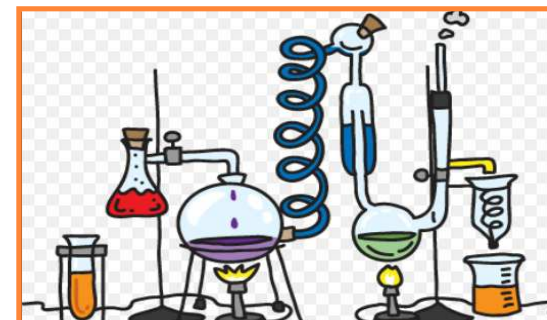
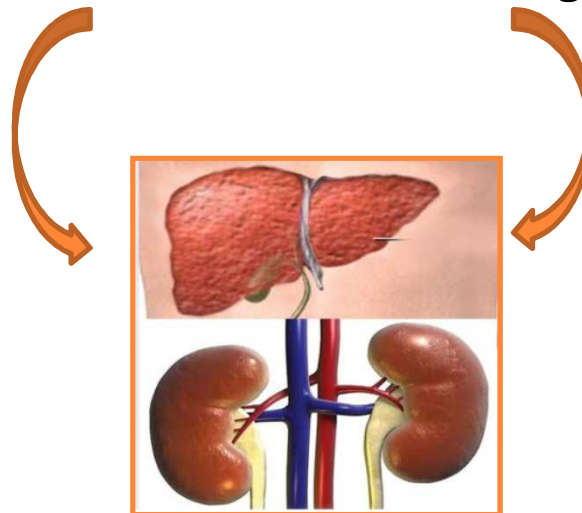
GLUCURONIDE D'ANDROSTANEDIOL- (ADG)



GLUCURONIDE D'ANDROSTANEDIOL- (ADG)

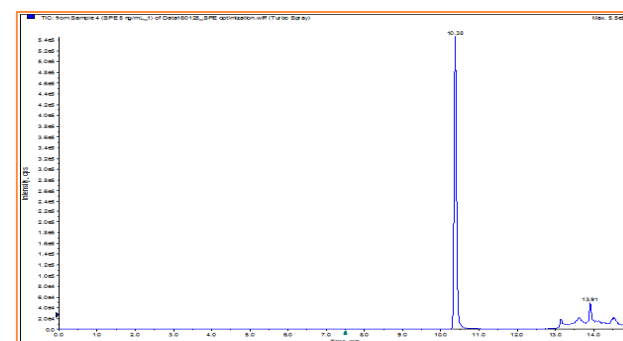
- Conjugaison avec l'acide glucuronique = l'étape d'inactivation la plus importante pour les androgènes

➔ Plus polaire ➔ plus facilement libéré dans le sang ➔



OBJECTIFS

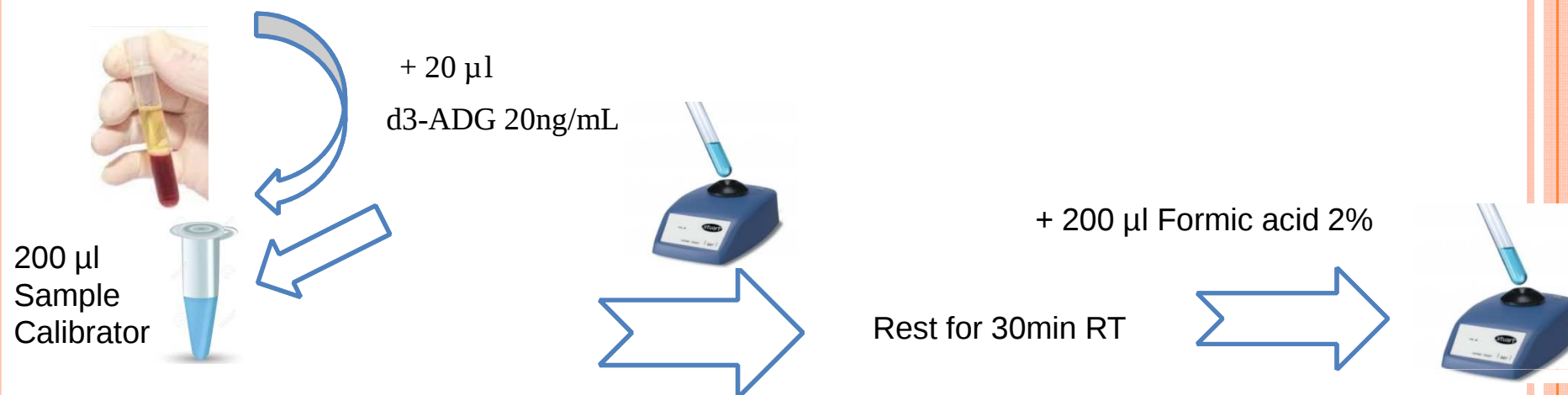
- 1/ Développement et Validation



- 2/ Comparison



LC-MS/MS: PREPARATION DES ÉCHANTILLONS



LC-MS/MS CONDITIONS

LC-CONDITIONS



- C18 Acquity HPLC BEH (1.7 μ m particle size, 2.1x3.00 mm) (Waters)
- Mobile phase:
 - A: 0.01% formic acid solution and 1mM ammonium formate and LC-MS water.
 - B: 0.01% formic acid solution and 1mM ammonium formate in LC-MS methanol.
- The flow rate was 0.3ml/min.
- Injection volume: 30 μ L



LC-MS/MS CONDITIONS

LC-CONDITIONS



- C18 Acquity HPLC BEH (1.7 μ m particle size, 2.1x3.00 mm) (Waters)

- Mobile phase:

- A: 0.01% formic acid solution and 1mM ammonium formate and LC-MS water.

- B: 0.01% formic acid solution and 1mM ammonium formate in LC-MS methanol.

- The flow rate was 0.3ml/min.
 - Injection volume: 30 μ L

Gradient conditions

Time(min)	%B
0	30
2	30
11	65
11.5	95
13.5	95
14	30
15	30



LC-MS/MS CONDITIONS

MS-CONDITIONS



- Detection mode
- ➔ MRM in **positive** mode (ESI+).

For ADG:

- MRM transitions were:
486.35 → 257.2 (quantifier)
486.35 → 275.2 (qualifier)

For d3-ADG:

- MRM transitions were:
489.4 → 260.2 (quantifier)
489.4 → 278.2 (qualifier)

- Curtain gas: 35 psi
- Ionspray voltage: 5500 V
- Source temperature: 500°C
- Gas 1: 50 psi
- Gas 2: 50 psi
- Entrance Potential: +10 V



LC-MS/MS VALIDATION

- Validation
 - Sélectivité

LC-MS/MS VALIDATION

■ Validation

- Sélectivité
- Calibration - linéarité

Concentration(ng/mL)
0.1
0.5
1.5
10

LC-MS/MS VALIDATION

■ Validation

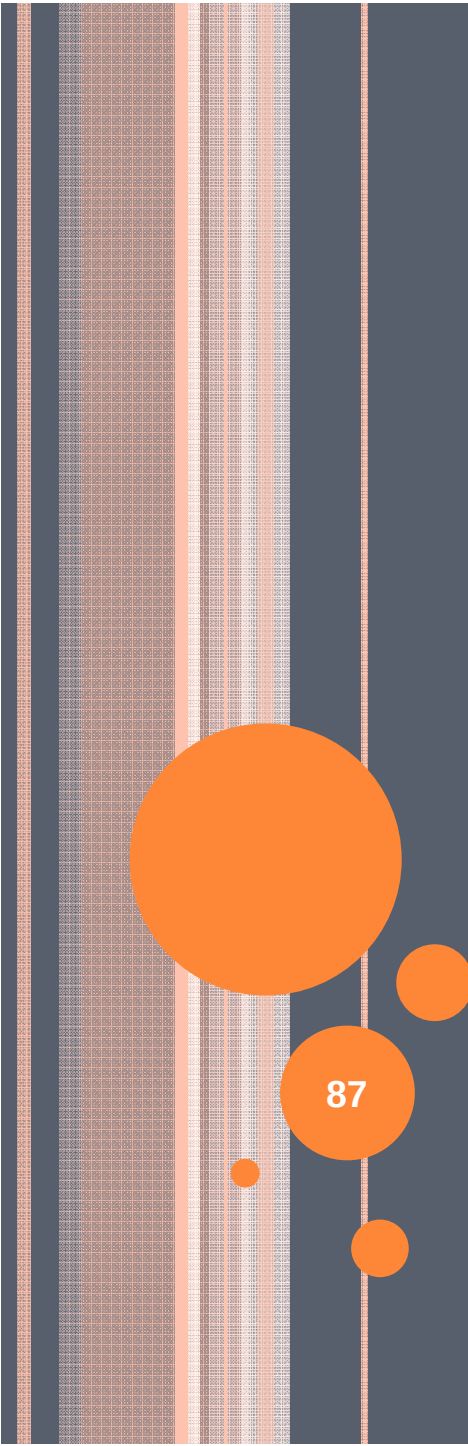
- Sélectivité
- Calibration - linéarité
- CV intra- et inter-assay
- Rendement

Concentration(ng/mL)
0.1
0.5
1.5
10

Water spiked (ng/mL)	Plasma free spiked (ng/mL)	N
0.2	0.2	3 x 3 days
1	1	3 x 3 days
5	5	3 x 3 days

COMPARAISONS

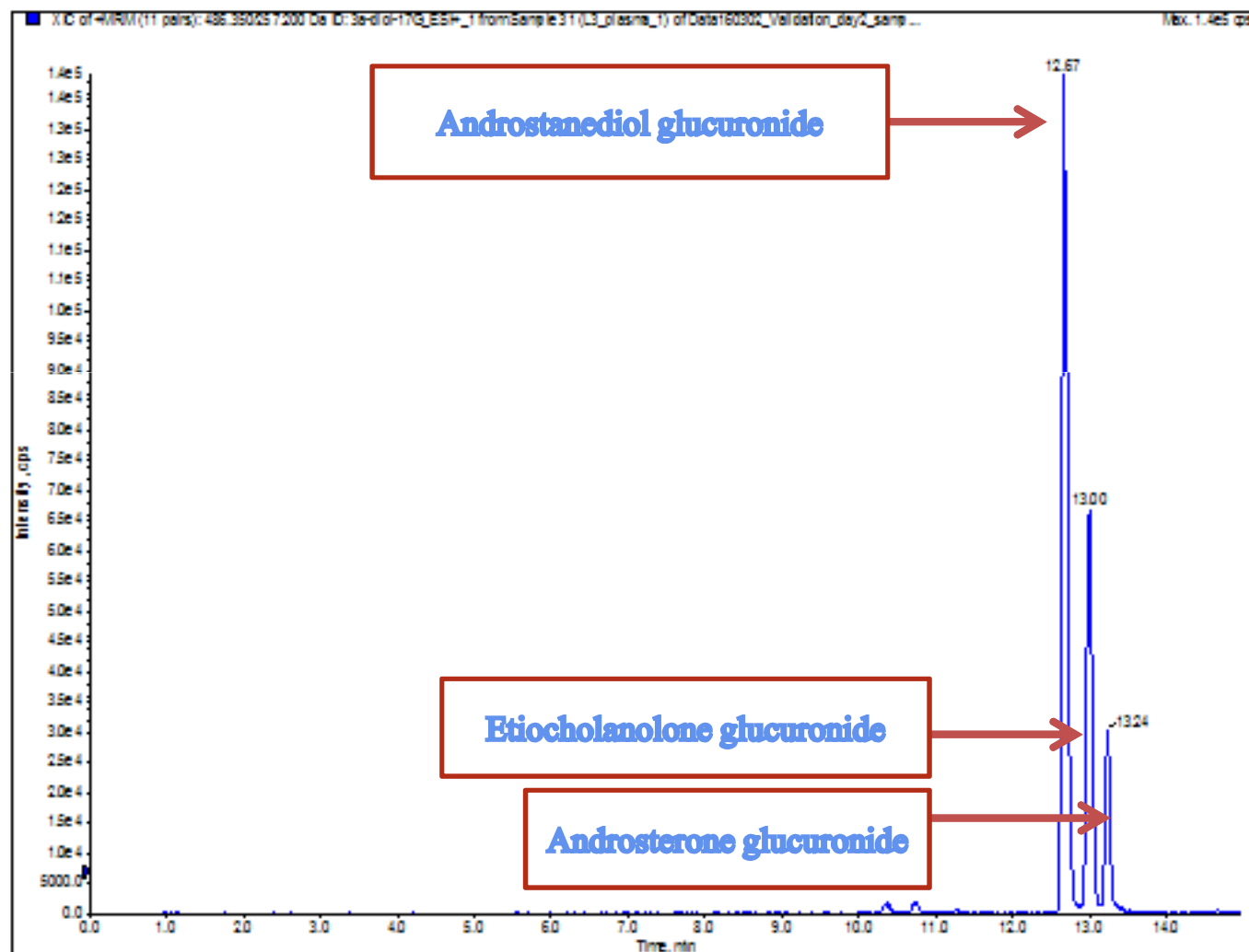
- ➔ 46 sera de la routine
- ➔ DiaSource ELISA(3-ALPHA-DIOL) versus LC-MS/MS
- ➔ Plasma et sérum



RESULTATS

87

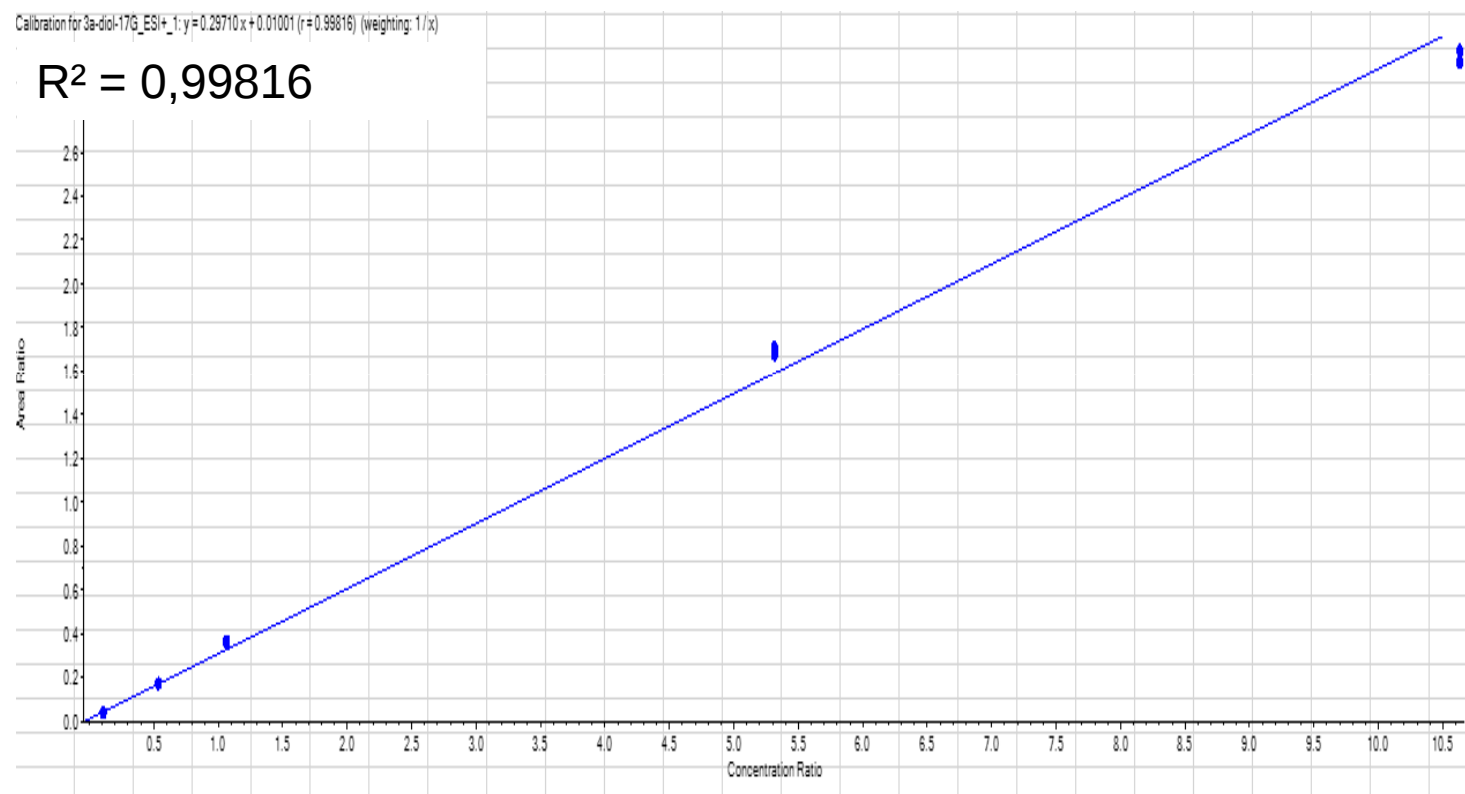
ADG CHROMATOGRAMME



CALIBRATION

Calibration for 3a-diol-17G_ESI+ 1: y = 0.28710 x + 0.01001 (r = 0.99816) (weighting: 1/x)

$R^2 = 0,99816$



Conc (ng/mL)
0.1
0.5
1.5
10

INTRA AND INTER-RUN PRECISION

Concentration level (ng/mL)	Mean introduced concentration (ng/mL)	Repeatability (RSD%) ¹	Intermediate precision (RSD%) ¹
0.2	0.2130	4.624	7.438
1.0	1.063	2.516	4.692
5.0	5.316	6.321	6.321

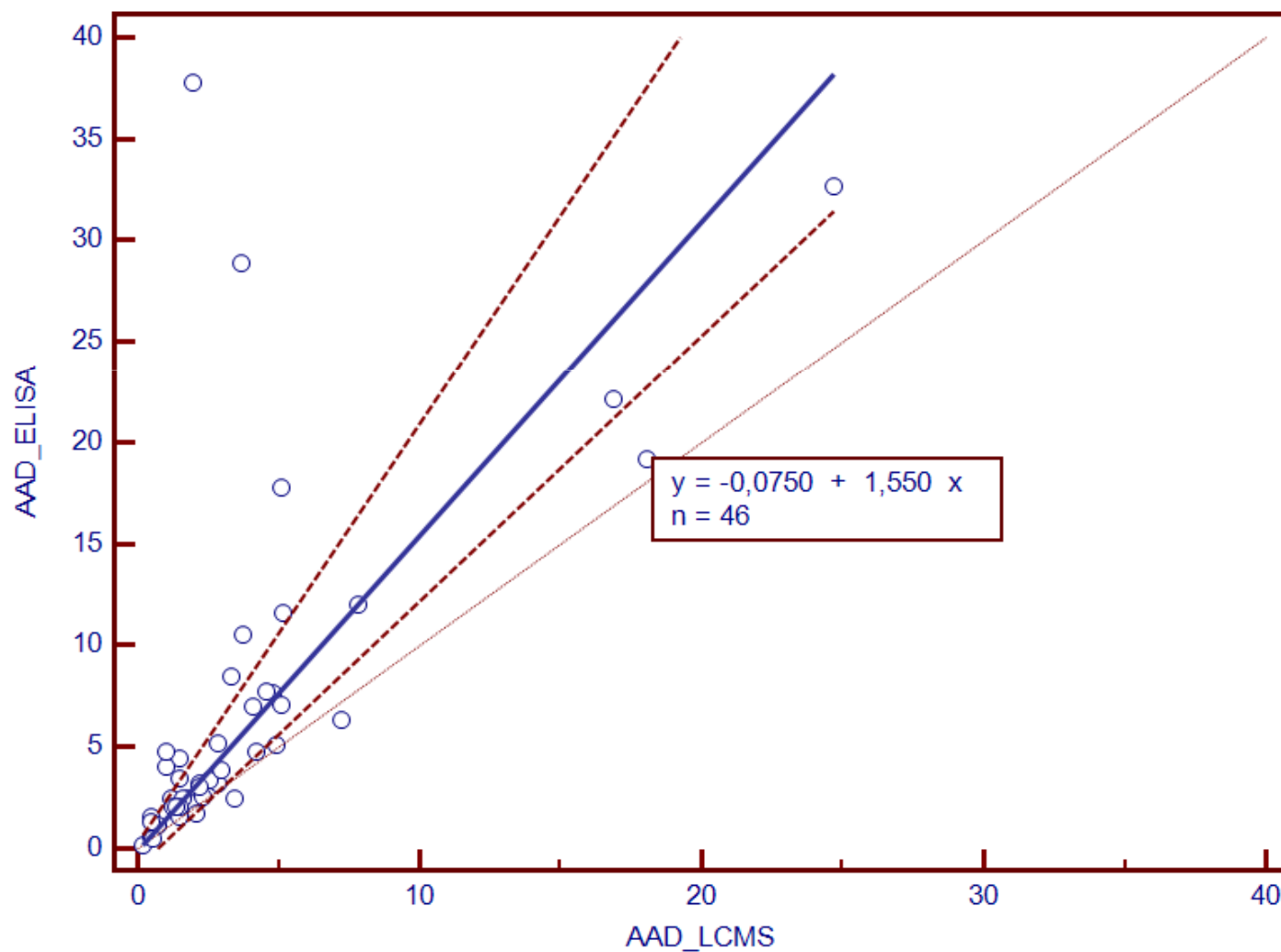
RECOVERY IN PLASMA

Concentration (ng/mL)	Mean introduced concentration (ng/mL)	Mean of the results (ng/mL)	Recovery(%)	95% CI recovery(%)
0,2	0,2130	0,2170	101,9	[96,62 ; 107,1]
1,0	1,063	1,108	104,3	[101,0 ; 107,5]
5,0	5,316	5,271	99,16	[94,30 ; 104,0]

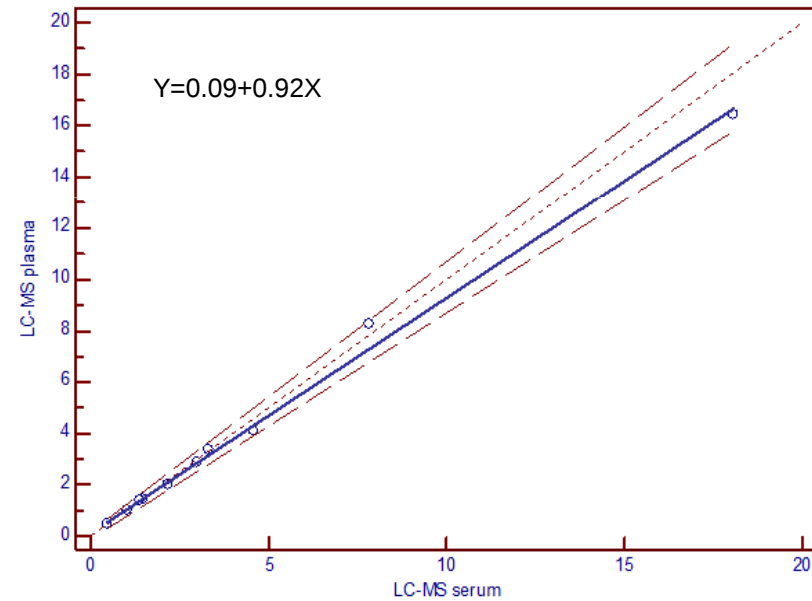
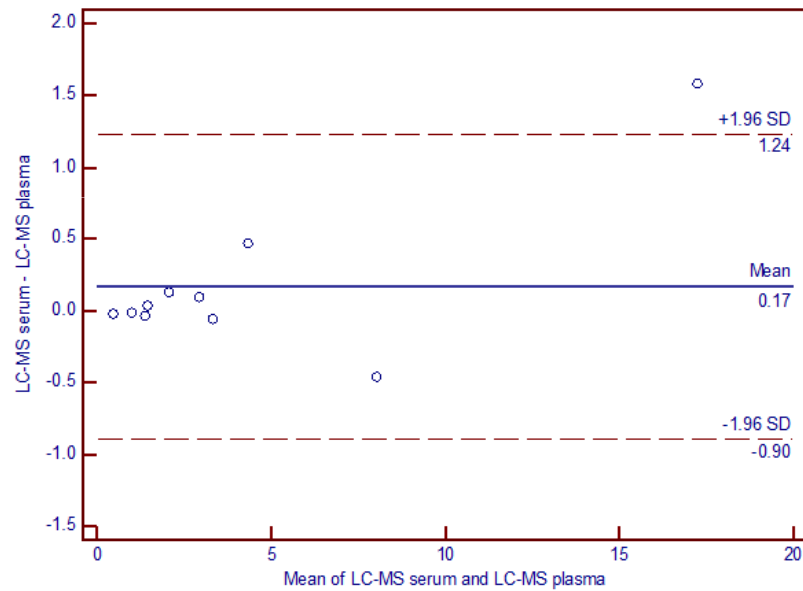
LOD-LOQ

- LOD (3:1 signal/bruit) = $0.018 (\pm 0.002) \mu\text{g/L}$ (n = 5).
- LOQ (10:1 signal/bruit) = $0.059 (\pm 0.006) \mu\text{g/L}$ (n = 5).

COMPARISON ELISA - LC-MS/MS



COMPARISON SERUM-PLASMA



RIA-ELISA

<i>Advantages</i>	<i>Disadvantages</i>
Low cost	RIA → special room (dangerous)
Automated	Sensitivity -
No development needed	Specificity ----
	More consumables

LC-MS/MS

<i>Advantages</i>	<i>Disadvantages</i>
Low operating costs	Price of LC-MSMS instrument
Low interference	Development +++
Reference method	Requires technical expertise +++
No lot-to-lot variability	Noisy, generates heat
Sensitivity	Nitrogen (generator) and compressed air
RIA lab closed	Checking peak by peak
High Throughput	Yearly maintenance costs+++

CONCLUSIONS

- Expérience pour le développement si méthode maison
- - pour un kit
- +/- des kits en LC-MS/MS:
 - Plus facile mais on ne sait rien!
 ➔ s'il y a un problème ➔ difficile à résoudre
 - Prix 

CONCLUSIONS

- La LC-MS/MS = appliquée au dosage des stéroïdes apportent d'excellentes performances analytiques.
- Adaptée pour dosage de stéroïdes nécessitant de bonnes spécificités et sensibilités tels que le 11-désoxycortisol ou la testostérone.
- Possible d'obtenir en une seule analyse un ensemble de résultats pour différents stéroïdes, ou profil stéroïdien → un gain de temps et réduisant le volume d'échantillon nécessaire ce qui est intéressant en endocrinologie pédiatrique.
- Les immunodosages automatisés gardent leur place pour le dosage de molécules nécessitant un rendu de résultats quotidiens, dont les spécificités et sensibilités sont suffisantes et pour lesquelles les demandes quotidiennes sont nombreuses comme pr l'estradiol ou le cortisol.
- → la complémentarité des techniques

REMERCIEMENTS

- Mon équipe, mon labo 😊



