ORMONI STEROIDEI SIERICI/PLASMATICI in LC/MS – Codice LC72415

(17-OH-Progesterone, Deidroepiandrosterone (DHEA), Deidroepiandrosterone solfato (DHEAS), Androstenedione, Cortisolo, 11-Deossicortisolo, Corticosterone, Aldosterone, Testosterone, Diidrotestosterone, Androsterone, Estrone, Estradiolo, Pregnenolone, 17-OH-Pregnenolone, Progesterone, 11-Deossicorticosterone, 21-Deossicortisolo, Cortisone)

INTRODUZIONE

Ormoni e meccanismi dell'azione ormonale

Il termine "ormone" indica una sostanza che, prodotta da una cellula endocrina cioè a secrezione interna, viene liberata nel circolo sanguigno provocando risposte funzionali in cellule localizzate a varia distanza dalla sua sede di produzione. Per l'espletamento dell'azione ormonale sono necessari, oltre alla sintesi e alla secrezione, il trasporto nel circolo sanguigno e la destinazione nei tessuti bersaglio dove sono presenti i recettori, strutture specializzate che riconoscono lo stimolo specifico e ne traducono il messaggio.

I recettori possono essere sulla membrana della cellula o all'interno di essa; l'ormone che non può attraversare la membrana (per es., un peptide) si lega a recettori localizzati sulla membrana plasmatica, mentre quello che diffonde attraverso la membrana plasmatica all'interno della cellula (steroidi, iodotironine) si lega a recettori intracellulari (in genere situati nel nucleo). Indipendentemente dalla struttura e dal tipo di ormone, i recettori hanno caratteristiche comuni: tutti presentano una regione in grado di riconoscere e legare l'ormone e un'altra deputata alla generazione di un segnale intracellulare che traduce il messaggio ormonale in risposte funzionali della cellula bersaglio; anche le proprietà che regolano il legame dell'ormone (affinità, specificità, saturabilità, capacità di trasduzione, cioè di evocare effetti specifici) sono comuni per tutti i recettori.

La comunicazione affidata agli ormoni avviene per la maggior parte attraverso il circolo ematico (azione endocrina), ma, in parte minore, anche mediante altre modalità. Alcuni ormoni agiscono infatti sulle cellule immediatamente circostanti la cellula che li produce (azione paracrina); in altre evenienze, invece, interagiscono con la stessa cellula secretrice (azione autocrina); altri ormoni, infine, vengono prodotti dai neuroni del sistema nervoso (azione neurocrina, che in realtà rappresenta una forma specializzata di azione paracrina). Sono stati identificati più di cinquanta ormoni, le cui caratteristiche funzionali vengono determinate dalla diversa struttura molecolare. In base a questa, essi vengono suddivisi in quattro grandi categorie: proteine e peptidi; steroidi; derivati dagli amminoacidi; derivati dagli acidi grassi polinsaturi.

Gli ormoni, interagendo con i recettori localizzati a livello dei tessuti bersaglio, evocano risposte specifiche: regolano le attività enzimatiche, l'espressione genica e la sintesi delle proteine.

Classificazione ormoni steroidei

Sono liposolubili, diffondono liberamente all'interno della cellula ed esercitano la loro azione dopo essersi legati a recettori localizzati nel nucleo. La loro struttura chimica, che è policiclica, deriva dal colesterolo. Sono suddivisi, in base alla sede di produzione, in steroidi gonadici e surrenalici; vengono inclusi in questa categoria anche la vitamina D e i suoi analoghi. Gli ormoni steroidei prodotti dal surrene e dalle gonadi si dividono in sottogruppi in base al numero di atomi di carbonio del nucleo steroideo: il progesterone, i glucocorticoidi e i mineralcorticoidi derivano per sintesi successive dal pregnano, una sostanza semplice che contiene 21 atomi di carbonio, mentre gli estrogeni provengono dal nucleo dell'estrano che ha 18 atomi di carbonio, e gli androgeni dal nucleo dell'androstano, che contiene 19 atomi di carbonio.

La sintesi degli ormoni steroidei segue tappe biosintetiche identiche sia nel surrene sia nell'ovaio o nel testicolo e la differenziazione nelle tre ghiandole endocrine dipende da una diversa distribuzione tessuto-specifica degli enzimi di sintesi. La steroidogenesi passa attraverso una serie di tappe enzimatiche, in massima parte catalizzate dagli enzimi citocromo P450 (cP450) localizzati all'interno delle cellule, e inizia dalla trasformazione del colesterolo in pregnenolone. Questa tappa enzimatica è la più importante in quanto controlla la sintesi di tutti gli ormoni steroidei; anche in presenza di notevoli quantità di colesterolo, la possibilità di proseguimento della via biosintetica appare limitata, poiché dipende dall'attività dagli enzimi cP450. Il pregnenolone formato fuoriesce dal mitocondrio e viene trasferito sul reticolo endoplasmatico, dove subisce le successive modificazioni enzimatiche da parte dei cP450. Il pregnenolone è quindi il precursore comune dei principali ormoni steroidei.

Gli androgeni vengono sintetizzati dalle cellule di Leydig del testicolo, dalla zona reticolare del surrene e dalle cellule della teca del follicolo e dall'interstizio dell'ovaio. La via biosintetica che procede dal pregnenolone segue due possibili direzioni: la prima via consiste nella trasformazione del pregnenolone in 17-idrossipregnenolone, di questo in deidroepiandrosterone, quindi in androstenediolo, e infine in testosterone, che è il principale ormone maschile. La seconda via consiste nella trasformazione del pregnenolone in progesterone, di questo in 17-idrossiprogesterone e quindi nella formazione di androstenedione, a sua volta successivamente trasformato in testosterone. In alcuni tessuti il testosterone necessita di un'ulteriore reazione di trasformazione in 5α-diidrotestosterone per esplicare la sua attività. Nel surrene dove, rispetto al testicolo, vi è una diversa distribuzione degli enzimi che catalizzano queste vie biosintetiche, la maggior parte della produzione di androgeni surrenali è diretta verso l'elaborazione di precursori del testosterone e, in maniera particolare, di deidroepiandrosterone e androstenedione, che hanno un'attività ormonale di più modesta entità. Circa il 50% del pregnenolone metabolizzato nella corteccia surrenale viene convertito in deidroepiandrosterone.

Gli estrogeni e il progesterone, i principali ormoni femminili, sono gli steroidi prodotti in maggiore quantità dall'ovaio e sono coinvolti nella regolazione del ciclo mestruale e nella gravidanza. La formazione di questi steroidi deriva da tappe enzimatiche diversificate nei compartimenti cellulari dell'ovaio: follicoli e cellule interstiziali. Le cellule della granulosa, che contornano l'ovulo nel contesto del follicolo, subiscono la trasformazione in cellule luteiniche dopo l'ovulazione e il prodotto della trasformazione del pregnenolone è rappresentato dal progesterone. Le cellule della teca del follicolo e quelle interstiziali producono in prevalenza androstenedione attraverso le vie biosintetiche che sono già state descritte per gli androgeni. Anche le tappe enzimatiche coinvolte nel successivo destino metabolico dell'androstenedione hanno una caratteristica localizzazione cellulare: infatti il testosterone è sintetizzato solamente nelle cellule dell'ilo, mentre all'interno delle cellule della granulosa l'androstenedione viene trasformato in testosterone e a sua volta in estrone e estradiolo. Le cellule interstiziali hanno anche la capacità di trasformare il testosterone in diidrotestosterone.

Al contrario degli ormoni peptidici, la secrezione degli steroidi in circolo non procede attraverso un loro immagazzinamento all'interno delle cellule ma segue immediatamente la sintesi. Essi viaggiano nel plasma legati a proteine di trasporto specifiche, dotate di alta affinità, quali la globulina legante il cortisolo (CBG, Cortisol binding protein), le globuline leganti gli steroidi sessuali (SHBG, Sex hormone binding protein) e la proteina legante la vitamina D (DBP, Vitamin D binding protein). La CBG è una glicoproteina in grado di legare con uguale affinità cortisolo e progesterone. Le SHGB sono globuline che legano con elevata affinità il testosterone, mentre l'estradiolo è legato in prevalenza all'albumina. Il 98% degli steroidi gonadici, il 95% del cortisolo e il 50% dell'aldosterone circolano legati alle rispettive proteine di trasporto. Poiché solo l'ormone libero è in grado d'interagire con i recettori, e quindi di esprimere l'attività biologica, il legame plasmatico costituisce un'importante fase di riserva nel metabolismo di questi ormoni. Gli steroidi sintetici impiegati in terapia solitamente non contraggono legame con le proteine di trasporto e sono quindi in grado di esercitare effetti biologici immediati. I glucocorticoidi e i mineralcorticoidi vengono metabolizzati attraverso reazioni enzimatiche che determinano la perdita della loro attività ormonale oppure attraverso coniugazione con gruppi chimici che li rendono idrosolubili e ne determinano l'eliminazione con le urine. L'unica reazione metabolica che non si traduce in una perdita dell'attività biologica è rappresentata dalla conversione del testosterone in diidrotestosterone nelle cellule bersaglio. *

*Bibliografia

Enciclopedia della Scienza e della Tecnica (2007)

Andreani, Cassano 1977: Andreani, Domenico - Cassano, Cataldo, *Trattato italiano di endocrinologia*, Roma, SEU, 1977.

Becker 1995: Becker, Kenneth L., *Principles and practice of endocrinology and metabolism*, 2. ed., Philadelphia, Lippincott, 1995 (1. ed.: 1990).

Faglia 1998: Faglia, Giovanni, *Malattie del sistema endocrino e del metabolismo*, 2. ed., Milano, McGraw-Hill, 1998 (1. ed.: 1993).

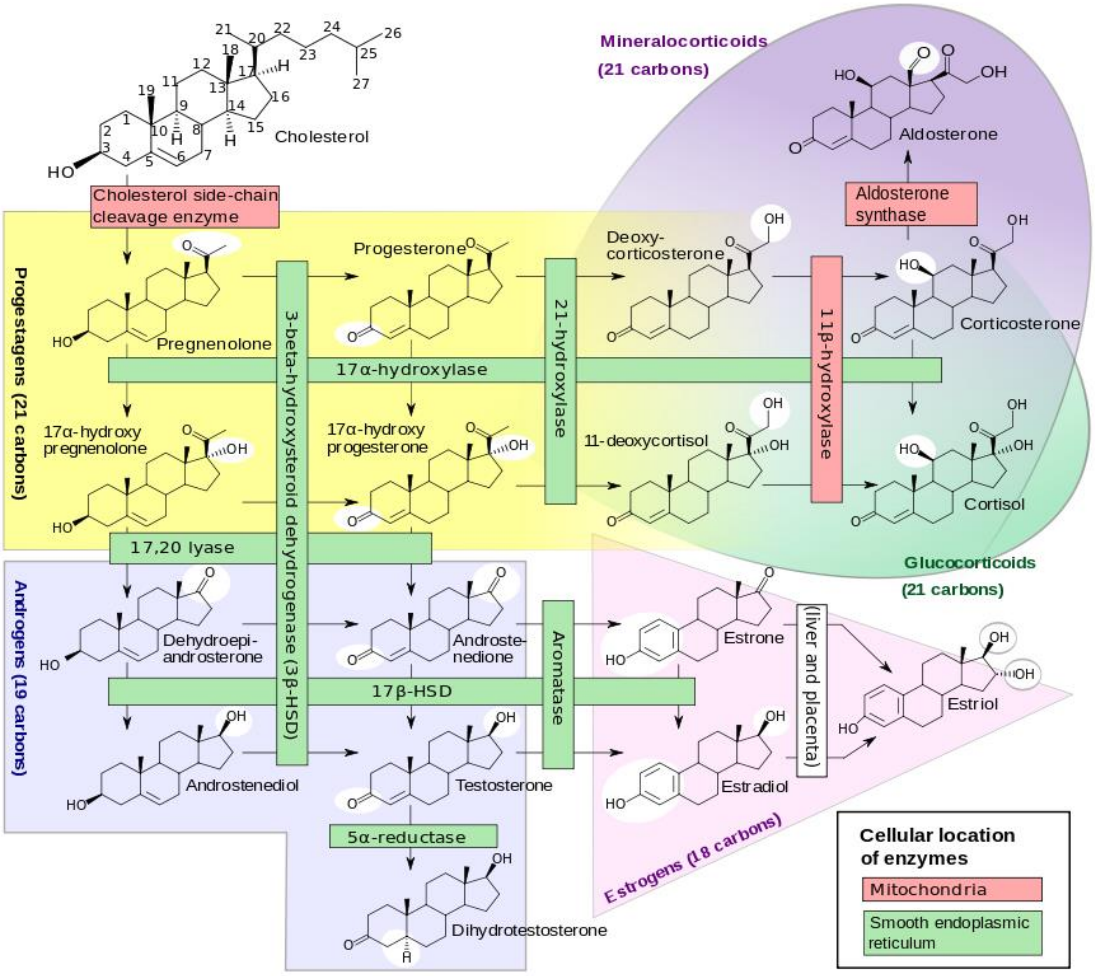
Felig 1995: Felig, Philip - Baxter, John D. - Frohman, Lawrence A., *Endocrinology and metabolism*, 3. ed., New York, McGraw-Hill, 1995 (1. ed.: 1981).

Giusti, Serio 1988: Giusti, Giorgio - Serio, Mario, *Endocrinologia, fisiopatologia e clinica*, Firenze, USES, 1988.

Pinchera 1991: Pinchera, Aldo e altri, *Endocrinologia e metabolismo. Fisiopatologia e clinica*, Milano, Ambrosiana, 1991.

Williams 1998: Williams, Robert H., *Williams textbook of endocrinology*, 9. ed., edited by Jean D. Wilson e altri, Philadelphia-London, Saunders, 1998 (1. ed.: 1950).

Schema della via biosintetica



EUREKA S.R.L. LAB DIVISION
Via M. D'Antona 28
60033 Chiaravalle (AN) - Italy
Tel. +39 071 7450790
eureka-support@sentinel.it
www.eurekakit.com

Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE del 27/10/1998 sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo:
Gli Ormoni steroidei vengono deproteinizzati con un opportuno reagente, addizionati con gli standard interni deuterati e purificati in colonne di clean up. Dopo aver essiccato l'eluato, esso viene poi ripreso con una opportuna soluzione prima di venire iniettato in LC/MS.

Recupero %			
	C Loq	Cm	Cs
17-OH-Progesterone	113,33%	113,29%	137,20%
Androstenedione	109,26%	109,32%	133,01%
DHEAS	33,51%	36,23%	51,59%
DHEA	95,27%	102,64%	131,00%
Testosterone	115,66%	108,49%	132,23%
Cortisolo	79,02%	83,31%	93,94%
Corticosterone	107,30%	103,81%	123,70%
Aldosterone	106,27%	64,57%	84,14%
11-Deossicortisolo	97,53%	107,30%	120,76%
Diidrotestosterone	104,93%	104,83%	129,73%
Androsterone	114,53%	99,58%	127,62%
Estrone	86,91%	101,00%	110,40%
Beta-Estradiolo	101,53%	106,49%	125,98%
Pregnenolone	99,76%	98,21%	125,96%
17-OH-Pregnenolone	95,38%	100,59%	130,62%
Progesterone	113,41%	108,95%	124,70%
11-Deossicorticosterone	108,47%	108,79%	125,30%
Cortisone	71,91%	87,50%	97,35%
21-Deossicortisolo	116,58%	100,60%	123,21%

Sensibilità del Metodo (LLOD) :

17-OH-Progesterone	0,002 ng/ml
Androstenedione	0,003 ng/ml
DHEAS	2,0 ng/ml
DHEA	0,015 ng/ml
Testosterone	0,002 ng/ml
Cortisolo	0,15 ng/ml
Corticosterone	0,008 ng/ml
Aldosterone	0,005 ng/ml
11-Deossicortisolo	0,003 ng/ml
Diidrotestosterone	0,002 ng/ml
Androsterone	0,04 ng/ml
Estrone	0,002 ng/ml
Beta-Estradiolo	0,005 ng/ml
Pregnenolone	0,008 ng/ml
17-OH-Pregnenolone	0,02 ng/ml
Progesterone	0,007 ng/ml
11-Deossicorticosterone	0,005 ng/ml
Cortisone	0,1 ng/ml
21-Deossicortisolo	0,005 ng/ml

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ) :	17-OH-Progesterone	0,006 ng/ml
	Androstenedione	0,009 ng/ml
	DHEAS	6,79 ng/ml
	DHEA	0,044 ng/ml
	Testosterone	0,007 ng/ml
	Cortisolo	0,444 ng/ml
	Corticosterone	0,022 ng/ml
	Aldosterone	0,014 ng/ml
	11-Deossicortisolo	0,008 ng/ml
	Diidrotestosterone	0,007 ng/ml
	Androsterone	0,111 ng/ml
	Estrone	0,006 ng/ml
	Beta-Estradiolo	0,011 ng/ml
	Pregnenolone	0,02 ng/ml
	17-OH-Pregnenolone	0,061 ng/ml
	Progesterone	0,02 ng/ml
	11-Deossicorticosterone	0,012 mg/ml
	Cortisone	0,22 ng/ml
	21-Deossicortisolo	0,01 ng/ml
Range di Linearità :	17-OH-Progesterone	0,006 – 11 ng/ml
	Androstenedione	0,009 - 16 ng/ml
	DHEAS	6,79 – 9160 ng/ml
	DHEA	0,044 - 80 ng/ml
	Testosterone	0,007 - 24 ng/ml
	Cortisolo	0,444 – 800 ng/ml
	Corticosterone	0,022 – 40 ng/ml
	Aldosterone	0,014 – 5 ng/ml
	11-Deossicortisolo	0,008 – 15 ng/ml
	Diidrotestosterone	0,007 – 12,5 ng/ml
	Androsterone	0,111 – 40 ng/ml
	Estrone	0,006 - 2 ng/ml
	Beta-Estradiolo	0,011 - 4 ng/ml
	Pregnenolone	0,02 – 7,334 ng/ml
	17-OH-Pregnenolone	0,061 - 22 ng/ml
	Progesterone	0,02 – 36,667 ng/ml
	11-Deossicorticosterone	0,012 – 22 ng/ml
	Cortisone	0,22 – 400 ng/ml
	21-Deossicortisolo	0,01 – 4 ng/ml

ANALITA	Riproducibilità intra-serie (CV%) Concentrazione			Riproducibilità inter-serie (CV %) Concentrazione		
	C Loq	Cm	Cs	C Loq	Cm	Cs
17-OH-Progesterone	3,58%	1,76%	1,62%	6,49%	2,71%	2,04%
Androstenedione	6,13%	1,35%	1,58%	8,12%	2,39%	2,07%
DHEAS	6,32%	2,10%	2,55%	6,24%	3,08%	1,94%
DHEA	4,21%	2,73%	1,81%	5,21%	3,06%	1,69%
Testosterone	2,65%	1,91%	1,72%	2,95%	2,45%	1,87%
Cortisolo	3,95%	0,77%	0,80%	5,81%	1,76%	0,97%
Corticosterone	2,91%	2,67%	1,11%	4,71%	3,53%	3,21%
Aldosterone	6,51%	4,04%	2,26%	13,2%	7,7%	3,2%
11-Deossicortisolo	6,06%	1,76%	2,17%	7,40%	2,98%	2,50%
Diidrotestosterone	5,09%	1,43%	0,66%	9,64%	2,95%	1,83%
Androsterone	4,58%	1,80%	1,24%	10,56%	2,38%	1,63%
Estrone	5,72%	4,73%	1,75%	6,87%	8,18%	2,47%
Beta-Estradiolo	3,37%	4,33%	4,78%	10,10%	7,15%	4,73%
Pregnenolone	4,46%	3,23%	2,23%	7,01%	5,94%	2,92%
17-OH-Pregnenolone	6,85%	3,48%	3,40%	6,53%	3,79%	2,56%
Progesterone	6,65%	1,28%	1,34%	11,30%	4,20%	1,48%
11-Deossicorticosterone	4,90%	1,27%	1,42%	5,65%	1,87%	2,15%
Cortisone	5,16%	0,89%	0,92%	10,44%	4,28%	1,24%
21-Deossicortisolo	6,20%	2,77%	0,83%	6,87%	4,64%	2,30%

ANALITA	R^2
17-OH-Progesterone	0,9986 ± 0,0003
Androstenedione	0,9982 ± 0,0003
DHEAS	0,9991 ± 0,0004
DHEA	0,9983 ± 0,0002
Testosterone	0,9984 ± 0,0003
Cortisolo	0,9965 ± 0,0004
Corticosterone	0,9968 ± 0,0016
Aldosterone	0,9962 ± 0,0014
11-Deossicortisolo	0,9991 ± 0,0001
Diidrotestosterone	0,9987 ± 0,0007
Androsterone	0,9989 ± 0,0004
Estrone	0,9978 ± 0,0006
Beta-Estradiolo	0,9970 ± 0,0007
Pregnenolone	0,9982 ± 0,0009
17-OH-Pregnenolone	0,9981 ± 0,0010
Progesterone	0,9989 ± 0,0006
11-Deossicorticosterone	0,9985 ± 0,0003
Cortisone	0,9975 ± 0,0005
21-Deossicortisolo	0,9969 ± 0,0006

ANALITA	Accuratezza intra-serie (Errore %)		Accuratezza inter-serie (Errore %)	
	Concentrazione		Concentrazione	
	C1	C2	C1	C2
17-OH-Progesterone	5,73%	3,93%	7,17%	4,83%
Androstenedione	2,97%	4,16%	5,18%	5,14%
DHEAS	2,34%	1,55%	5,58%	3,08%
DHEA	5,70%	4,49%	9,16%	5,32%
Testosterone	6,25%	5,03%	7,33%	5,53%
Cortisolo	5,43%	10,64%	6,13%	11,40%
Corticosterone	5,05%	3,54%	6,79%	5,84%
Aldosterone	5,89%	4,37%	7,55%	6,65%
11-Deossicortisolo	1,89%	1,64%	3,03%	2,58%
Diidrotestosterone	5,05%	3,76%	6,54%	4,55%
Androsterone	1,85%	2,47%	3,42%	3,10%
Estrone	5,99%	2,61%	7,24%	3,18%
Beta-Estradiolo	3,74%	1,07%	5,02%	2,59%
Pregnenolone	5,33%	1,75%	7,25%	2,95%
17-OH-Pregnenolone	8,50%	2,75%	8,19%	4,64%
Progesterone	3,22%	1,98%	4,62%	3,16%
11-Deossicorticosterone	4,58%	4,14%	5,48%	4,69%
Cortisone	4,54%	8,61%	5,21%	9,45%
21-Deossicortisolo	2,90%	7,79%	4,06%	8,95%

ANALITA	Concentrazioni utilizzate per calcolare Riproducibilità e Accuratezza				
	Calibratore (ng/ml)				
	C Loq	C1	Cm	C2	Cs
17-OH-Progesterone	0,006	0,061	0,122	0,367	1,100
Androstenedione	0,009	0,089	0,178	0,533	1,600
DHEAS	6,790	67,901	135,802	407,407	1222,222
DHEA	0,044	0,444	0,889	2,667	8,000
Testosterone	0,007	0,133	0,267	0,800	2,400
Cortisolo	0,444	4,444	8,889	26,667	80,000
Corticosterone	0,022	0,222	0,444	1,333	4,000
Aldosterone	0,014	0,028	0,056	0,167	0,500
11-Deossicortisolo	0,008	0,083	0,167	0,500	1,500
Diidrotestosterone	0,007	0,069	0,139	0,417	1,250
Androsterone	0,111	0,222	0,444	1,333	4,000
Estrone	0,006	0,011	0,022	0,067	0,200
Beta-Estradiolo	0,011	0,022	0,044	0,133	0,400
Pregnenolone	0,020	0,081	0,733	0,041	0,244
17-OH-Pregnenolone	0,061	0,122	0,244	0,733	2,200
Progesterone	0,020	0,407	0,815	2,444	7,333
11-Deossicorticosterone	0,012	0,244	0,489	1,467	4,400
Cortisone	0,220	4,400	8,800	26,600	80,000
21-Deossicortisolo	0,010	0,020	0,040	0,130	0,400

Contenuto della confezione (500 tests) :	Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2–8 °C, eccetto il **Reagente A** ed il **Reagente C** che vanno stoccati a -20°C.
Reagente A – Soluzione Standard Interni deuterati, **10 x 1100 µl**	**Stoccare a –20 °C** **Vedere Avvertenze**
Reagente B – Soluzione Lisante, **1 x 130 ml**	
Reagente C – Soluzione Deproteinizzante, **1 x 260 ml**	**Stoccare a –20 °C**
Reagente D – Soluzione di Condizionamento 1, **1 x 520 ml**	
Reagente E – Soluzione di Condizionamento 2, **1 x 520 ml**	
Reagente F – Soluzione di Condizionamento 3 e Lavaggio 1, **1 x 520 ml**	
Reagente G – Soluzione di Lavaggio 2, **1 x 260 ml**	
Reagente H – Soluzione Eluente, **1 x 260 ml**	
Reagente I – Soluzione Stabilizzante, **1 x 35 ml**	
Calibratore liofilo plasmatico – Livello 0, 8 x 1 ml	**Codice LC72316 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica**
Calibratore liofilo plasmatico – Livello 1, 8 x 1 ml	**Codice LC72316 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica**
Calibratore liofilo plasmatico – Livello 2, 8 x 1 ml	**Codice LC72316 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica**
Calibratore liofilo plasmatico – Livello 3, 8 x 1 ml	**Codice LC72316 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica**
Calibratore liofilo plasmatico – Livello 4, 8 x 1 ml	**Codice LC72316 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica**
Calibratore liofilo plasmatico – Livello 5, 8 x 1 ml	**Codice LC72316 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica**
Calibratore liofilo plasmatico – Livello 6, 8 x 1 ml	**Codice LC72316 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica**
Reagente M1 – Fase Mobile M1, **5 x 500 ml**	
Reagente M2 – Fase Mobile M2, **5 x 500 ml**	
Colonne di Clean up, 500 pz	

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento LC-MS triplo quadrupolo ESI+/- a seconda delle molecole che si necessita analizzare
Evaporatore a centrifuga

Modalità per il prelievo plasmatico :

Prelevare 3 ml di sangue venoso in una provetta con EDTA come anticoagulante. Centrifugare a 4000 rpm per 5 minuti. Separare il plasma e stoccarlo a – 20 °C. Stabile per non più di 1 mese.

Modalità per il prelievo sierico :

Prelevare 3 ml di sangue venoso in una provetta per siero con o senza gel. Centrifugare a 4000 rpm per 5 minuti. Separare il siero e stoccarlo a – 20 °C. Stabile per non più di 1 mese.

Range di Normalità (ng/ml)	
17-OH-Progesterone	< 1,7
Androstenedione	< 2,0
DHEAS	148,0 – 3.852,0
DHEA	M: 1,8 – 12,5 F: 1,3 – 9,8
Testosterone	M: 2,9 – 8,6 F: < 1,7
Cortisolo	46,0 – 207,0
Corticosterone	1,2 – 20,5
Aldosterone	0,025 – 0,229
11-Deossicortisolo	< 0,9
Diidrotestosterone	M: 0,25 – 0,75 F: 0,05 – 0,30
Androsterone	0,20 – 0,80
Estrone	M: 0,01 – 0,06 F: 0,017 – 0,20 (premenopausa) 0,007 - 0,04 (postmenopausa)
Beta-Estradiolo	M: < 0,05 F: 0,05 – 0,145 (follicolare) 0,112 – 0,443 (ovulazione) 0,05 – 0,241 (luteale) < 0,059 (postmenopausa)
Pregnenolone	< 1,3
17-OH-Pregnenolone	< 7,3
Progesterone	M: < 0,13 F: < 9,4
11-Deossicorticosterone	< 0,5
Cortisone	7,1 – 27,9
21-Deossicortisolo	< 0,12

N.B.: i valori riportati sono riferiti a soggetti ADULTI.

Rif. Bibliografici

(1) Taylor et al. A 13-Steroid Serum Panel Based on LC-MS/MS: Use in Detection of Adrenocortical Carcinoma. Clinical Chemistry (2017), 63:12)

(2) Thomas L (Hrsg). Labor und Diagnose. 8. Aufl, Verlag TH Books Frankfurt/Main (2012).

(3) Soldini SJ, Wong EC, Brugnara C, Soldin OP (eds) Dehydroepiandrosterone (DHEA). In: Pediatric Reference Intervals. 7th edition, pp 98. AACC Press Washington DC(2011))

(4) Shackleton C. Genetic disorders of steroid metabolism diagnosed by mass spectrometry. In: Blau N, Duran M, Gibson KM (eds). Laboratory guide to the methods in biochemical genetics (2008), pag. 549-606. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Diluire il **Reagente A** – Soluzione Standard Interni deuterati 1:1 con acqua di grado HPLC. Preparare un volume idoneo considerando il numero di campioni della seduta (40 µl a campione)

FASE 2 :

In provette eppendorf dispensare in sequenza.

	Calibratore	**Campione**	**Controlli**
Calibratore	400 µl		
Campione		400 µl	
Controlli			400 µl
Reagente A – Sol. Std interni deuterati **(precedentemente diluito)**	40 µl	40 µl	40 µl
Vortex per 5 secondi			
Reagente B – Soluzione Lisante	250 µl	250 µl	250 µl
Vortex per 20 secondi			
Reagente C – Soluzione Deproteinizzante (-20°C)	500 µl	500 µl	500 µl

Al vortex per 45 secondi

Centrifugare a 14.000 giri per 10 minuti.

FASE 3 : Condizionamento delle Colonne Clean-up

- Versare 1 ml del **Reagente D** – Soluzione di Condizionamento 1 nelle Colonne di Clean-up
  Scartare l'eluato
  - Far flussare goccia a goccia (1 ml/min ca) senza portare a secco la fase stazionaria

  Oppure

  - Centrifugare a 2000 rpm per 1 minuto

- Versare 1 ml del **Reagente E** – Soluzione di Condizionamento 2 nelle Colonne di Clean-up
  Scartare l'eluato
  - Far flussare goccia a goccia (1 ml/min ca) senza portare a secco la fase stazionaria

  Oppure

  - Centrifugare a 2000 rpm per 1 minuto

- Versare 0.5 ml del **Reagente F** – Soluzione di Condizionamento 3 e Lavaggio 1 nelle Colonne di Clean-up
  Scartare l'eluato
  - Far flussare goccia a goccia (1 ml/min ca) senza portare a secco la fase stazionaria

  Oppure

  - Centrifugare a 2000 rpm per 1 minuto

FASE 4 : Caricamento dei Campioni, Calibratori e Controlli

- Trasferire tutto il surnatante dei campioni, calibratori e controlli, preparati nella FASE 2, nelle Colonne di Clean-up
  Scartare l'eluato
  - Far flussare goccia a goccia (1 ml/min ca) senza portare a secco la fase stazionaria

Oppure

  - Centrifugare a 2000 rpm per 1 minuto

FASE 5 : Lavaggio delle Colonne di Clean-up

- Versare 0,5 ml del **Reagente F** – Soluzione di Condizionamento 3 e Lavaggio 1 nelle Colonne di Clean-up
  Scartare l'eluato
  - Far flussare goccia a goccia (1 ml/min ca) senza portare a secco la fase stazionaria

Oppure

  - Centrifugare a 2000 rpm per 1 minuto

- Versare 0,5 ml del **Reagente G** – Soluzione di Lavaggio 2 nelle Colonne di Clean-up
  Scartare l'eluato
  - Far flussare goccia a goccia (1 ml/min ca) e portare a secco la fase stazionaria con un flusso d'aria

Oppure

  - Centrifugare a 2000 rpm per 1 minuto quindi a 4000 rpm per 1 minuto

FASE 6 : Eluizione

- Posizionare le Colonne di Clean-up nelle provette di raccolta

- Versare 0,5 ml del **Reagente H** – Soluzione Eluente nelle Colonne di Clean-up
  Raccogliere l'Eluato
  - Far flussare goccia a goccia (1 ml/min ca) e portare a secco la fase stazionaria con un flusso d'aria

Oppure

  - Centrifugare a 2000 rpm per 1 minuto quindi a 4000 rpm per 1 minuto

FASE 7 : Portare a secco l'eluato nelle provette di raccolta con evaporatore centrifugo o evaporatore a flusso d'azoto o sistema equivalente (T max 55°C)

FASE 8 : Versare nelle provette di raccolta contenenti i Campioni, i Calibratori ed i Controlli essiccati, 60 µl di **Reagente I** – Soluzione Stabilizzante.

Al vortex per 30 secondi

FASE 9 : Trasferire i campioni in vial con riduttore di volume

N.B: il campione è stabile 2 giorni a 2-8 °C.

INIEZIONE :

- Iniettare 15 µl di campione nel sistema cromatografico (5-20 µl, a seconda della sensibilità strumentale)

ORMONI STEROIDEI - Avvertenze

REAGENTE A – SOLUZIONE STANDARD INTERNI DEUTERATI:

Soluzione contenente: **Aldosterone-*D7*, Cortisolo-*D4*, Testosterone-*D3*, *Estradiolo-D5, Pregnenolone-D4, DHEA-D6, DHEAS-D5, 17-OH-Progesterone 13C3.* *Stoccare a – 20 °C.***		
Ionizzazione:	Ormoni:	Standard interno da utilizzare per la calibrazione:
Positiva	**ANDROSTENEDIONE**	***Testosterone-D3***
Positiva	**DHEAS**	***DHEAS-D5***
Positiva	**DHEA**	***DHEA-D6***
Positiva	**TESTOSTERONE**	***Testosterone-D3***
Positiva	**DIIDROTESTOSTERONE**	***Testosterone-D3***
Positiva	**ANDROSTERONE**	***Testosterone-D3***
Positiva	**ESTRONE**	***DHEA-D6***
Positiva	**BETA-ESTRADIOLO**	***Beta-Estradiolo-D5***
Positiva	**PROGESTERONE**	***Cortisolo-D4***
Positiva	**11-DEOSSICORTICOSTERONE**	***Testosterone-D3***
Positiva	**CORTICOSTERONE**	***Testosterone-D3***
Positiva	**ALDOSTERONE**	***Aldosterone-D7***
Positiva	**11-DEOSSICORTISOLO**	***Cortisolo-D4***
Positiva	**PREGNENOLONE**	***Pregnenolone-D4***
Positiva	**17-OH-PREGNENOLONE**	***Testosterone-D3/Pregnenolone-D4***
Positiva	**CORTISOLO**	***Cortisolo-D4***
Positiva	**17-OH-PROGESTERONE**	***17-OH-Progesterone-13C3***
Positiva	**CORTISONE**	***Cortisolo-D4***
Positiva	**21-DEOSSICORTISOLO**	***Cortisolo-D4***
In caso di bassa sensibilità per il DHEAS e/o ALDOSTERONE		
Negativa	**DHEAS**	***DHEAS-D5***
Negativa	**ALDOSTERONE**	***Aldosterone-D7***

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica *nuova* Poroshell 120 EC C18 (50 x 2,1 mm, 1,9 um), termostatata a 55 °C Disconnettere il detector e far passare una soluzione di Fase Mobile M1 : Fase Mobile M2 (20 : 80 v/v) al flusso di 400 ul / minuto per 10 minuti. **Non riciclare i liquidi di lavaggio**. Condizionare la colonna con una soluzione di Fase Mobile M1 : Fase Mobile M2 (20 : 80 v/v) al flusso di 400 µl / minuto, per 10 minuti. Quindi flussare una soluzione di Fase Mobile M1 : Fase Mobile M2 (80 : 20 v/v) al flusso di 400 µl / minuto, per 5 minuti. Quindi, flussare Fase Mobile M1 : Fase Mobile M2 (65 : 35 v/v) al flusso di 400 µl / minuto, per 10 minuti. Infine, effettuare 3 iniezioni di fase mobile prima di lanciare la seduta.

NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase.

Se la T Amb del Laboratorio è > 25°C si consiglia di conservare a 2-8°C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

PULIZIA E STOCCAGGIO DELLA COLONNA

Disconnettere il detector. Flussare una soluzione di Fase Mobile M1 : Fase Mobile M2 (80 : 20 v/v) al flusso di 400 µl / minuto per 5 minuti scaricandola, quindi flussare Fase Mobile M1 : Fase Mobile M2 (10 : 90 v/v) al flusso di 400 µl / minuto, per 15 minuti. La colonna va stoccata in una soluzione di Fase Mobile M1 : Fase Mobile M2 (10 : 90 v/v)

LAVAGGIO AGO DI INIEZIONE

H_2O:ACN:IPA 33:33:33 + 0.1% Ac. Formico

PARAMETRI SETTATI SU TRIPLO QUADRUPOLO SCIEX 4500

Parametri ESI +

Curtain Gas (CUR): 25
Collision Gas (CAD): 9
Ion Spry Voltage: (IS): 5500 V
Temperature (TEM): 600°C
Ion Source Gas 1 (GS1): 50
Ion Source Gas 2 (GS2): 60

Parametri ESI - (per ottimizzare DHEAS e/o Aldosterone nel caso di scarsa sensibilità in modalità ESI +)

Curtain Gas (CUR): 30
Collision Gas (CAD): 8
Ion Spry Voltage: (IS): -4500 V
Temperature (TEM): 550°C
Ion Source Gas 1 (GS1): 50
Ion Source Gas 2 (GS2): 60

SETTAGGIO DEI FLUSSI

GRADIENTE			
Tempo (min)	**% M1 (POMPA A)**	**% M2 (POMPA B)**	**Flusso (µl/min)**
0	65	35	400
0.50	65	35	400
2.00	55	45	400
7.80	29.5	70.5	400
7.90	2	98	400
9.90	2	98	400
10.0	65	35	400
12.0	65	35	400

Frammentazioni (ottimizzate su TRIPLO QUADRUPOLO SCIEX 4500)

ANALITA	***RT***	**Q1**	**Q3**
Aldosterone - 1 **+**	2.25	361.2	315.1
Aldosterone - 1 **-**	2.25	359.1	188.9
Cortisone - 1	2.66	361.2	163.0
Cortisone - 2	2.66	361.2	121.0
Cortisolo - 1	2.96	363.1	121.0
Cortisolo - 2	2.96	363.1	115.1
21-Deossicortisolo - 1	3.64	347.2	311.1
21-Deossicortisolo - 2	3.64	347.2	269.2
Corticosterone - 1	3.87	347.1	121.1
Corticosterone - 2	3.87	347.1	107.0
11-Deossicortisolo - 1	4.06	347.1	97.0
11-Deossicortisolo - 2	4.06	347.1	109.0
β-Estradiolo - 1	4.60	255.1	159.1
β-Estradiolo - 2	4.60	255.1	144.0
Estrone - 1	4.62	271.2	133.0
Estrone - 2	4.62	271.2	157.0
Androstenedione - 1	4.63	287.1	109.0
Androstenedione - 2	4.63	287.1	97.0
11-Deossicorticosterone - 1	5.01	331.1	97.0
11-Deossicorticosterone - 2	5.01	331.1	109.0
Testosterone - 1	5.05	289.1	97.0
Testosterone - 2	5.05	289.1	109.0
DHEA - 1	5.43	289.1	213.1
DHEA - 2	5.43	289.1	253.0
17-OH-Progesterone - 1	5.53	331.0	97.0
17-OH-Progesterone - 2	5.53	331.0	109
17-OH-Pregnenolone - 1	5.57	297.2	105.0
17-OH-Pregnenolone - 2	5.57	297.2	145.0
Diidrotestosterone (DHT) - 1	6.54	291.1	255.2
Diidrotestosterone (DHT) - 2	6.54	291.1	159.2
Progesterone - 1	6.86	315.1	97.0
Progesterone - 2	6.86	315.1	109.0
Androsterone - 1	7.20	273.1	159.2
Androsterone - 2	7.20	273.1	147.0
Pregnenolone - 1	7.58	299.1	159.2
Pregnenolone - 2	7.58	299.1	131.1
DHEAS - 1 +	3.75	271.2	133.0
DHEAS - 2 +	3.75	271.2	157.0
DHEAS - 1 -	3.75	367.0	133.0
Aldosterone-D7 **+**	2.25	368.2	322.1

Aldosterone-D7 **-**	2.25	366.0	194.1
Cortisolo-D4	2.96	367.1	121.0
B-Estradiolo-D5	5.39	260.2	161.0
Testosterone-D3	5.05	292.2	97.1
DHEA-D6	5.43	277.2	259.2
17-OH-Progesterone-13C3	5.53	334.1	112.1
Pregnenolone-D4	7.58	303.2	285.2
DHEAS-D5 +	3.74	276.2	138.0
DHEAS-D5 -	3.74	374.0	100.0

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
LC72316	Calibratore plasmatico per Ormoni Steroidei	7 x 2 x 1 ml
LC72319	Controllo plasmatico per Ormoni Steroidei – Livelli 1, 2 e 3	3 x 5 x 1 ml
SK72410	Starter kit Ormoni Steroidei	1 Pz
S29057U	Vial standard di vetro da 2 ml con tappo a vite	1 x 100 Pz
S24717	Riduttori di volume per vials da 2 ml	1 x 100 Pz
Z699675902	Colonna analitica Poroshell 120-EC C 18 (50 x 2.1 mm. 1.9 um)	1 Pz
S7344223	Provette Corning mm 13x100	1 x 250 Pz

BIBLIOGRAFIA:

Quantification of corticosteroids in human plasma by liquid chromatography-thermospray mass spectrometry using stable isotope dilution
Hiromi Shibasaki, Takashi Furuta, Yasuji Kasuya

Steroid Hormone Analysis by Tandem Mass Spectrometry
Steven J. Soldin and Offie P.Soldin

Quantification of anabolic hormones and their metabolites in bovine serum and urine by liquid chromatography-tandem mass spectroscophy
R. Draisci, L. Palleschi, E. Ferretti, L.Lucentini, P. Cammarata

Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry
V. Cirimele, P.Kintz, J.P. Goullè, B. Ludes

A Confirmatory HPLC-MS/MS Method for Ten Synthetic Corticosteroids in Bovine Urines, JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY
S. Rhea Savu, L. Silvestro, A. Haag and F. Sorgel, VOL. 31, 1351-1363 (1996).

Automated solid-phase extraction for concentration and clean-up of female steroid hormones prior to liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry.
B. Alvarez Sanchez, F. Priego Capote, J. Ruiz Jimenez, M.D. Luque de Castro. An approach to lipidomics, Journal of Chromatography A, 1207 (2008) 46–54.

Detection, quantification and confirmation of anabolic steroids in equine plasma by liquid chromatography and tandem mass spectrometry
Fuyu Guan, Cornelius E. Uboh, Lawrence R. Soma, Yi Luo, Jeffery Rudy, Thomas Tobin., Journal of Chromatography B, 829 (2005) 56–68.

Liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometric analysis of corticosterone in rat plasma using selected ion monitoring,
Ashok Marwah, Padma Marwah, Henry Lardy. Journal of Chromatography B, 757 (2001) 333–342.

Quantification of corticosteroids in human plasma by liquid chromatography–thermospray mass spectrometry using stable isotope dilution,
Ashok Marwah, Padma Marwah, Henry Lardy, Journal of Chromatography B, 692 (1997) 7–14

ORMONI STEROIDEI SIERICI/PLASMATICI

(Cromatogramma di Riferimento)

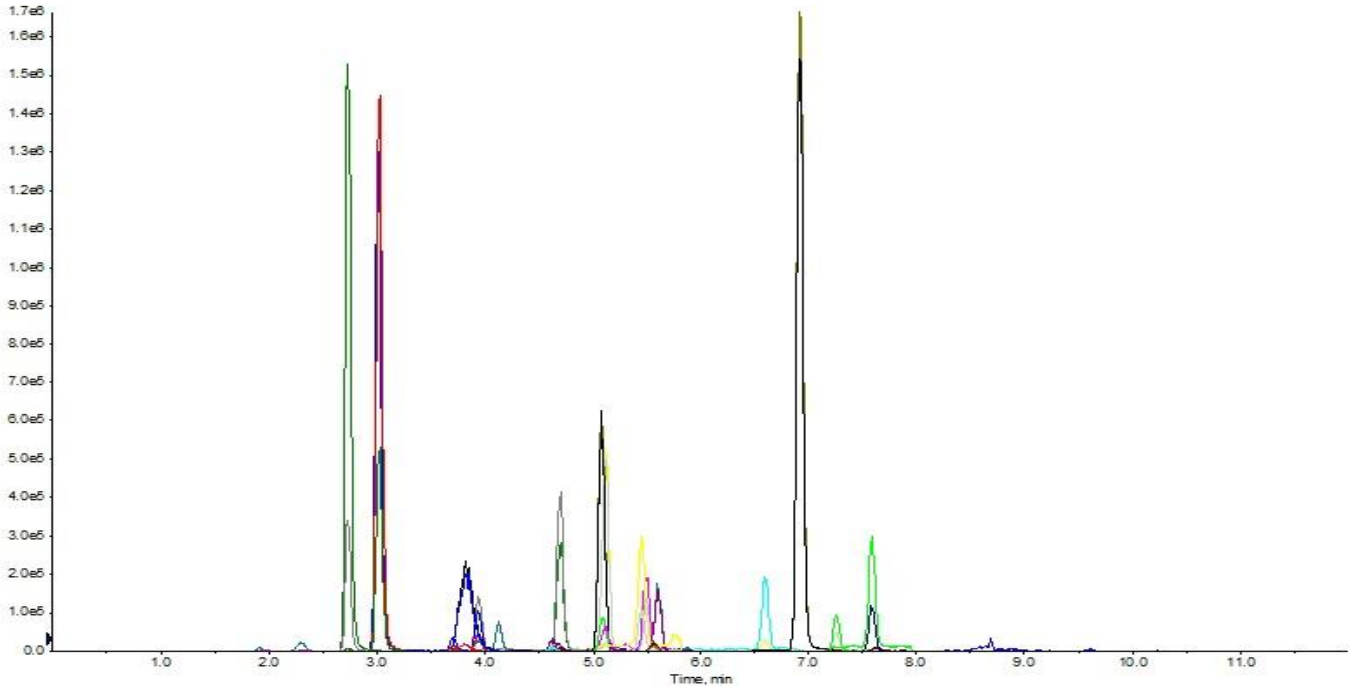


Fig.1 Extract Ion Chromatogram (Positive Ions) – Ormoni Sierici/plasmatici