

CORTISOLO e CORTISONE URINARI in LC/MS – Codice LC91015

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 secernitrice (azione autocrina); altri ormoni, infine, vengono prodotti dai neuroni del sistema nervoso (azione neurocrina, che in realtà rappresenta una forma specializzata di azione paracrina).

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 ed 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.

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.

Cortisolo-Cortisone

Il cortisolo è un ormone steroideo sintetizzato nelle ghiandole surrenali, a partire dal colesterolo, attraverso una cascata enzimatica. E' il principale glucocorticoide negli esseri umani ed agisce come fattore di trascrizione genica influenzando una moltitudine di risposte cellulari in molti tessuti. Il cortisolo gioca un ruolo chiave nel metabolismo del glucosio, nel mantenimento del tono vascolare, regola la risposta immunitaria e la risposta corporea allo stress. La sua produzione è sotto il controllo della ghiandola pituitaria dell'ipotalamo.

Solo una piccola percentuale del cortisolo circolante è biologicamente attivo, la maggior parte del cortisolo è inattivo (legato alle proteine). Quando i valori del cortisolo plasmatico si innalzano, il cortisolo libero (cortisolo non coniugato o idrocortisone) aumenta anch'esso, ed è filtrato dai glomeruli. Il cortisolo urinario libero è ben correlato con la concentrazione del cortisolo libero plasmatico. Il cortisolo libero urinario è quello biologicamente attivo, ed è responsabile dei segnali e sintomi dell'ipercortisolismo (Sindrome di Cushing).

La misurazione dell'escrezione del cortisolo libero nelle 24 ore associato alla spettrometria di massa liquida (LC-MS/MS), viene preferita al test di screening per la Sindrome Di Cushing, poiché elimina interferenze dovute ad esempio all'assunzione di carbamazepina e dei corticosteroidi sintetici, che possono alterare i risultati del cortisolo.

Il cortisone, metabolita del cortisolo, rappresenta un parametro addizionale per aiutare nella diagnosi di vari disordini surrenali, tra cui l'anormalità nel funzionamento dell'11 beta idrossi deidrogenasi (11-beta HSD), l'enzima che converte il cortisolo a cortisone. La mancanza dell'11-beta HSD si verifica in uno stato in cui si ha un eccesso di mineralcorticoidi, poiché il cortisolo (ma non il cortisone), agisce come un agonista del recettore dei mineralcorticoidi.

Il presente metodo permette di determinare contemporaneamente sia il Cortisolo che il Cortisone nelle urine delle 24 h mediante LC-MS/MS.

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).

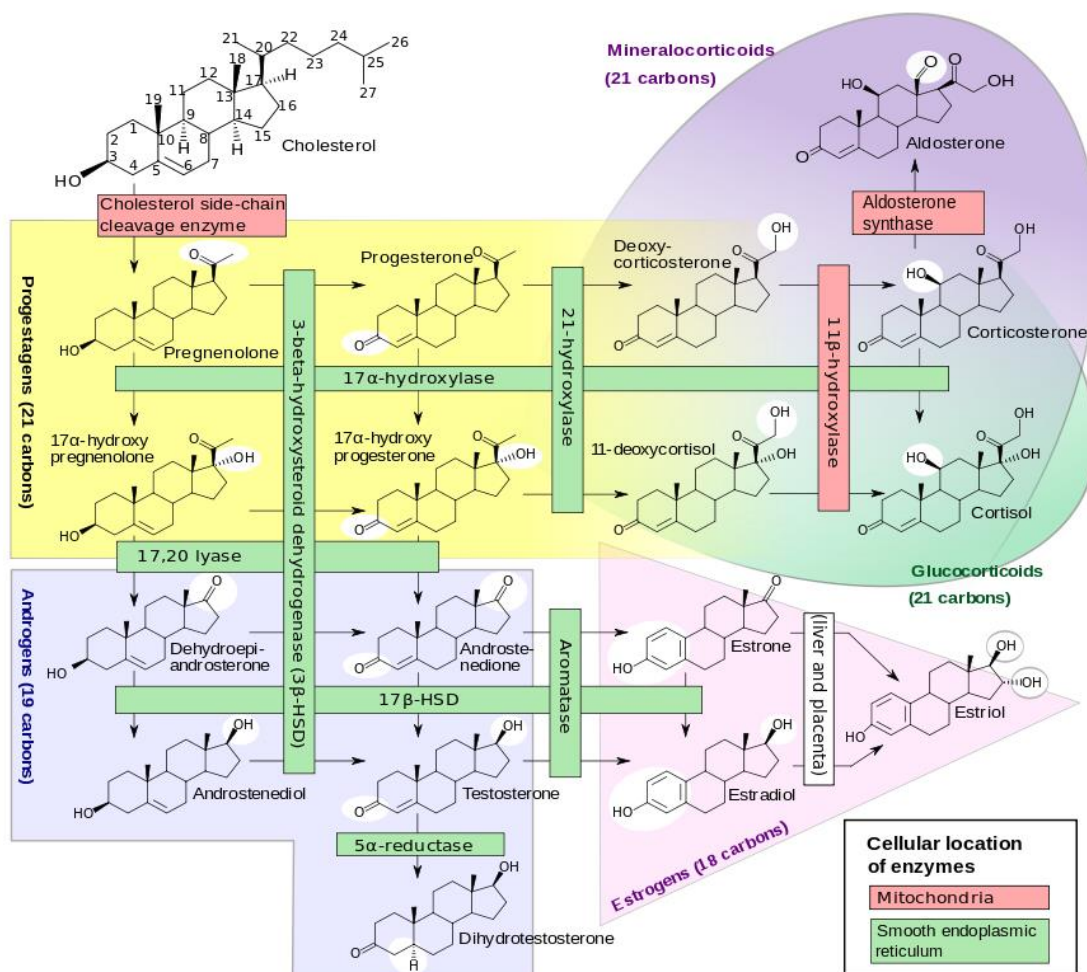
Felig 1995: Felig, Philip - Baxter, John D. - Frohman, Lawrence A., *Endocrinology and metabolism*, 3. ed., New York, McGraw-Hill, 1995 (1. ed.: 1981).

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 e del D.L. n.332 del 08/09/2000 sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

N° 006	Cortisolo e Cortisone urinari in LC/MS	07/2024
--------	--	---------

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo:

L'urina viene diluita con opportuno reagente contenente lo standard interno ed iniettata nel sistema LC-MS/MS-

Recupero del Metodo : 100%

Sensibilità del Metodo (LLOD) :

Cortisolo	0,1 ng/ml
Cortisone	0,1 ng/ml

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ) :

Cortisolo	0,25 ng/ml
Cortisone	0,25 ng/ml

Range di Linearità :

Cortisolo	0,25 – 300 ng/ml
Cortisone	0,25 – 600 ng/ml

Range di normalità:

CORTISOLO

0-2 anni: non stabilito

3-8 anni: 1.4-20 µg/24 ore

9-12 anni: 2.6-37 µg/24 ore

13-17 anni: 4.0-56 µg/24 ore

> o =18 anni: 3.5-45 µg/24 ore

CORTISONE

0-2 anni: non stabilito

3-8 anni: 5.5-41 µg/24 ore

9-12 anni: 9.9-73 µg/24 ore

13-17 anni: 15-108 µg/24 ore

> o =18 anni: 17-129 µg/24 ore

Usare i fattori di conversione sotto elencati per ogni analita da µg/24 ore a nmol/24 ore:

Fattori di conversione:

Cortisolo: µg/24 ore x 2.76=nmol/24 ore (peso molecolare=362.5)

Cortisone: µg/24 ore x 2.78=nmol/24 ore (peso molecolare=360)

Accuratezza intra serie (errore relativo %)
Cortisolo:

C1	C2
2,5 ng/ml	75 ng/ml
11,1%	4,0%

Accuratezza inter serie (errore relativo %)
Cortisolo:

C1	C2
2,5 ng/ml	75 ng/ml
14,6%	4,9%

Riproducibilità intra serie (coefficiente di variazione %) Cortisolo :

CLLOQ	Cm	Cs
0,25 ng/ml	30 ng/ml	160 ng/ml
0,4%	2,4%	1,4%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Cortisolo :

CLLOQ	Cm	Cs
0,25 ng/ml	30 ng/ml	160 ng/ml
12,7%	6,2%	3,1%

Accuratezza intra serie (errore relativo %)
Cortisone:

C1	C2
2,5 ng/ml	150 ng/ml
6,7%	3,2%

Accuratezza inter serie (errore relativo %)
Cortisone:

C1	C2
2,5 ng/ml	150 ng/ml
10,2%	3,3%

Riproducibilità intra serie (errore relativo %)
Cortisone:

CLLOQ	Cm	Cs
0,25 ng/ml	25 ng/ml	300 ng/ml
7,8%	2,3%	1,2%

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) Cortisone:

CLLOQ	Cm	Cs
0,25 ng/ml	25 ng/ml	300 ng/ml
10,3%	2,7%	3,8%

Coefficiente di Correlazione R2 + Dev Std

0,9989 ± 0,0002 Cortisone
0,9984 ± 0,0004 Cortisolo

Contenuto della confezione (500 tests) :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2–8 °C.

Reagente A – Soluzione Estraeante, **3 x 75 ml**

Reagente B – Standard Interno Deuterato, **1 x 500 µl**
Stoccare a -20 °C

Calibratore liofilo urinario – Livello 0, 3 x 1 ml

Codice LC91016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario – Livello 1, 3 x 1 ml

Codice LC91016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario – Livello 2, 3 x 1 ml

Codice LC91016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario – Livello 3, 3 x 1 ml

Codice LC91016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario – Livello 4, 3 x 1 ml

Codice LC91016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario – Livello 5, 3 x 1 ml

Codice LC91016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Calibratore liofilo urinario – Livello 6, 3 x 1 ml

Codice LC91016 (confezionato a parte – vedi scheda tecnica)

Reagente M1 – Fase Mobile M1, **3 x 500 ml**

Reagente M2 – Fase Mobile M2, **3 x 500 ml**

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento LC-MS triplo quadrupolo ESI

Modalità per il prelievo urinario :

Raccogliere l'urina delle 24 ore in contenitori puliti senza conservanti e misurare il volume (L/24h). Se necessario centrifugare i precipitati prima dell'estrazione.

Il campione di urina è stabile 7 giorni a 2-8 °C, 3 mesi a -20 °C. Congelare solo una volta.

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Inserire 150 µl del **Reagente B** – Std interno deuterato nel **Reagente A** – Soluzione Estraeante (stabile 3 mesi a 2-8 °C)

FASE 2 : In vial dispensare in sequenza:

	Calibratore	Campione	Controlli
Calibratore	50 µl		
Campione		50 µl	
Controlli			50 µl
Reagente A – Soluzione Estraeante dopo <u>FASE 1</u>	450 µl	450 µl	450 µl

Agitare al vortex per 10 secondi

INIEZIONE :

- Iniettare 10 µl della soluzione nel sistema LC

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

CORTISOLO e CORTISONE - Avvertenze

REAGENTE B – STANDARD INTERNO DEUTERATO:

Soluzione contenente: Cortisolo-d4 . Stoccare a -20 °C.	
Ormoni:	Standard interno da utilizzare per la calibrazione:
CORTISOLO	Cortisolo-d4
CORTISONE	Cortisolo-d4

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova RRHD Eclipse Plus C18 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm), termostata a 60 °C. Disconnettere il detector e far passare una soluzione di Acetonitrile : Acqua (95 : 5 v/v) al flusso di 600 µl / minuto per 15 minuti. **Non riciclare i liquidi di lavaggio**. Condizionare la colonna con una soluzione di Fase Mobile M1 : Fase Mobile M2 (85 : 15 v/v) al flusso di 600 µl / minuto per 15 minuti. Effettuare due iniezioni di Acqua di grado HPLC prima di procedere con la serie analitica.

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 DELLA COLONNA

Lavare con una soluzione contenente Fase Mobile M2 : Acqua (95 : 5 v/v) al flusso di 600 µl / minuto per 15 minuti. La colonna va stoccata in una soluzione contenente Fase Mobile M2 : Acqua (95 : 5 v/v).

LAVAGGIO AGO DI INIEZIONE

Lavare con una soluzione contenente Metanolo.

PARAMETRI SETTATI SU TRIPLO QUADRUPOLO SCIEX 4500

Parametri

Curtain Gas (CUR): 30
Collision Gas (CAD): 8
Ion Spray Voltage: (IS): 5500 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)
0.00	60	40	400
1.00	60	40	400
2.50	5	95	400
3.50	5	95	400
3.51	60	40	400
5.00	60	40	400

Frammentazioni (ottimizzate su TRIPLO QUADRUPOLO AGILENT 6460)

Analita	Q1	Q3	ENERGIA DI COLLISIONE
Cortisolo	363.1	121.0	8
Cortisone	361.2	163.0	8
Cortisolo-D4	367.1	121	8

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
LC91016	Calibratore urinario per Cortisolo/Cortisone	7 x 2 x 1 ml
LC91019	Controllo urinario per Cortisolo/Cortisone – Livelli 1, 2 e 3	3 x 5 x 1 ml
SK91010	Starter kit Cortisolo/Cortisone	1 Pz
LC91011	Fase Mobile M1	4 x 500 ml
LC91021	Fase Mobile M2	4 x 500 ml
LC91030	Mix Solution Standard interno deuterato	1 x 100 µl
Z959757902	Colonna analitica RRHD Eclipse Plus C 18 (50 x 2,1 mm -1,8 µm)	1 Pz
Z51843550	Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 µl	1 x 100 PZ
Z51820717	Tappi per vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 µl	1 x 100 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 spectroscopy

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. Goull , 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,

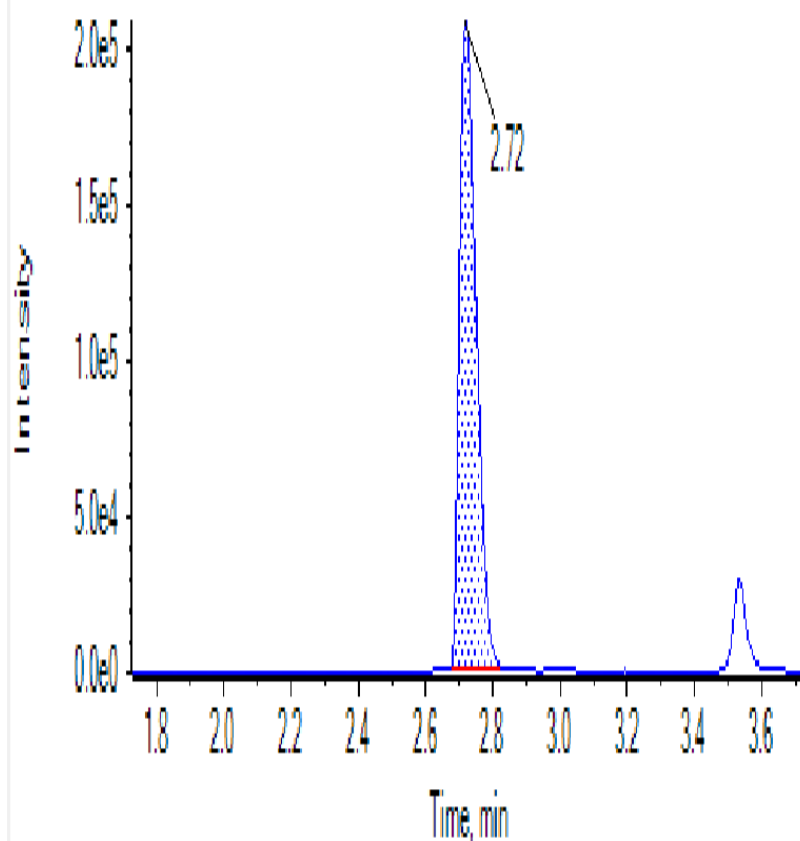
Ashok Marwah, Padma Marwah, Henry Lardy. Journal of Chromatography B, 757 (2001) 333-342.

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

CORTISOLO E CORTISONE URINARI (Cromatogrammi di Riferimento)

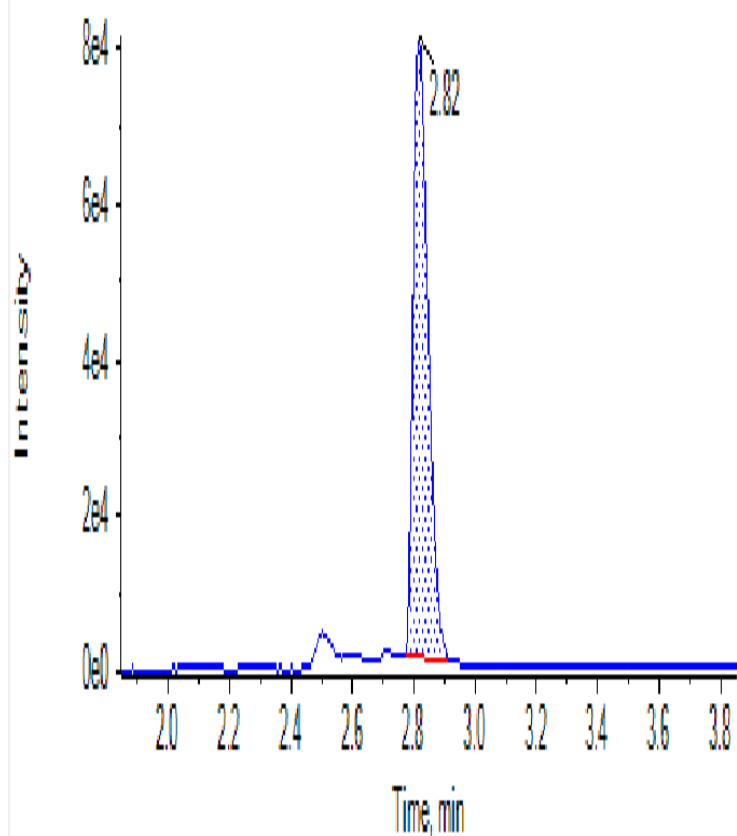
C3 - Cortisone-1 (Unknown) 361.2 / 163.0
Area: 734721, Height: 2.078e5, RT: 2.72 min



Ormone	Tempo di ritenzione
	Min
Cortisone 150 ng/ml	2.72

CORTISOLO E CORTISONE URINARI (Cromatogrammi di Riferimento)

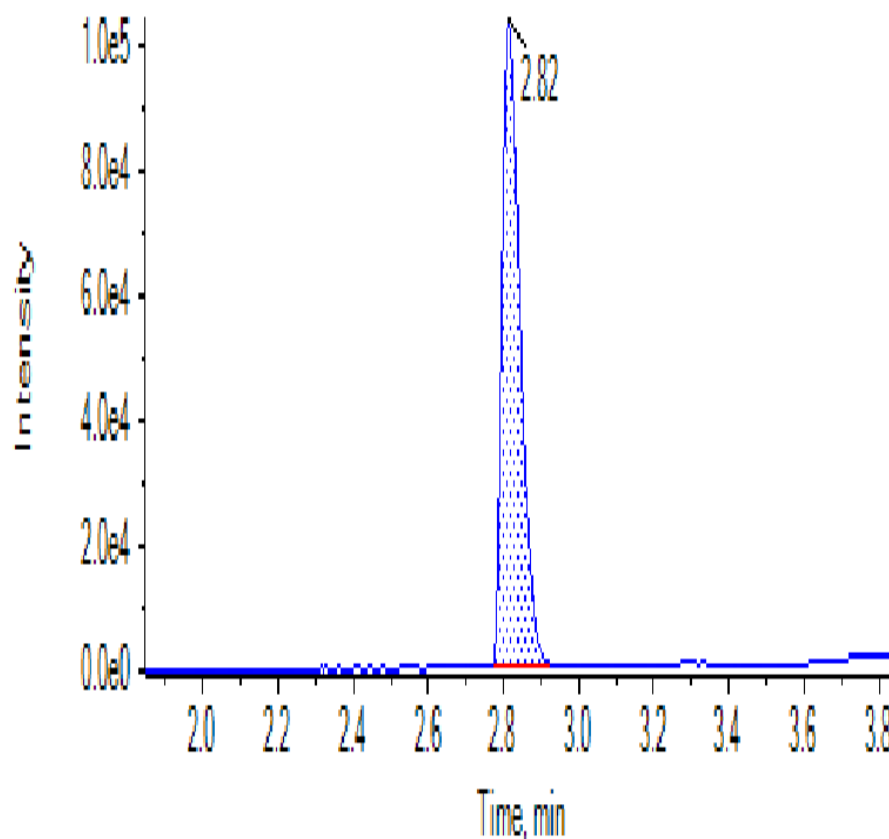
C3 - Cortisol-1 (Unknown) 363.1 / 121.0
Area: 272103, Height: 7.973e4, RT: 2.82 min



Ormone	Tempo di ritenzione
	Min
Cortisolo 75 ng/ml	2.82

CORTISOLO E CORTISONE URINARI (Cromatogrammi di Riferimento)

C3 - Cortisol-D4 (Unknown) 367.1 / 121.0
Area: 349263, Height: 1.032e5, RT: 2.82 min



Standard Interno	Tempo di ritenzione
	Min
Cortisolo-D4	2.82