

# Methodenentwicklung zur Bestimmung von 7 $\alpha$ -Hydroxy-4-cholesten-3-one in Blutserum mittels LC-MS/MS

**Grob Christian**  
Bachelor-Thesis, MLS 2011, Analytische Chemie

Auftraggeber, Dr. Berchtold Christian, Inselspital Bern  
Experte: Dr. Ehrat Markus, EK Biosciences  
Begleitdozent: Prof. Dr. Schlotterbeck Götz, FHNW

## ZUSAMMENFASSUNG

Eine Methode für den Nachweis der Gallensäure Fehlabsorptionen (BAM) wurde in dieser Bachelor Thesis entwickelt und optimiert. Beim zu bestimmenden Analyt handelt es sich um 7 $\alpha$ -Hydroxy-4-cholesten-3-one (C4), ein Abbauprodukt in der Gallensäure-synthese. Der Cut-Off der krankhaften Konzentration im Blutserum

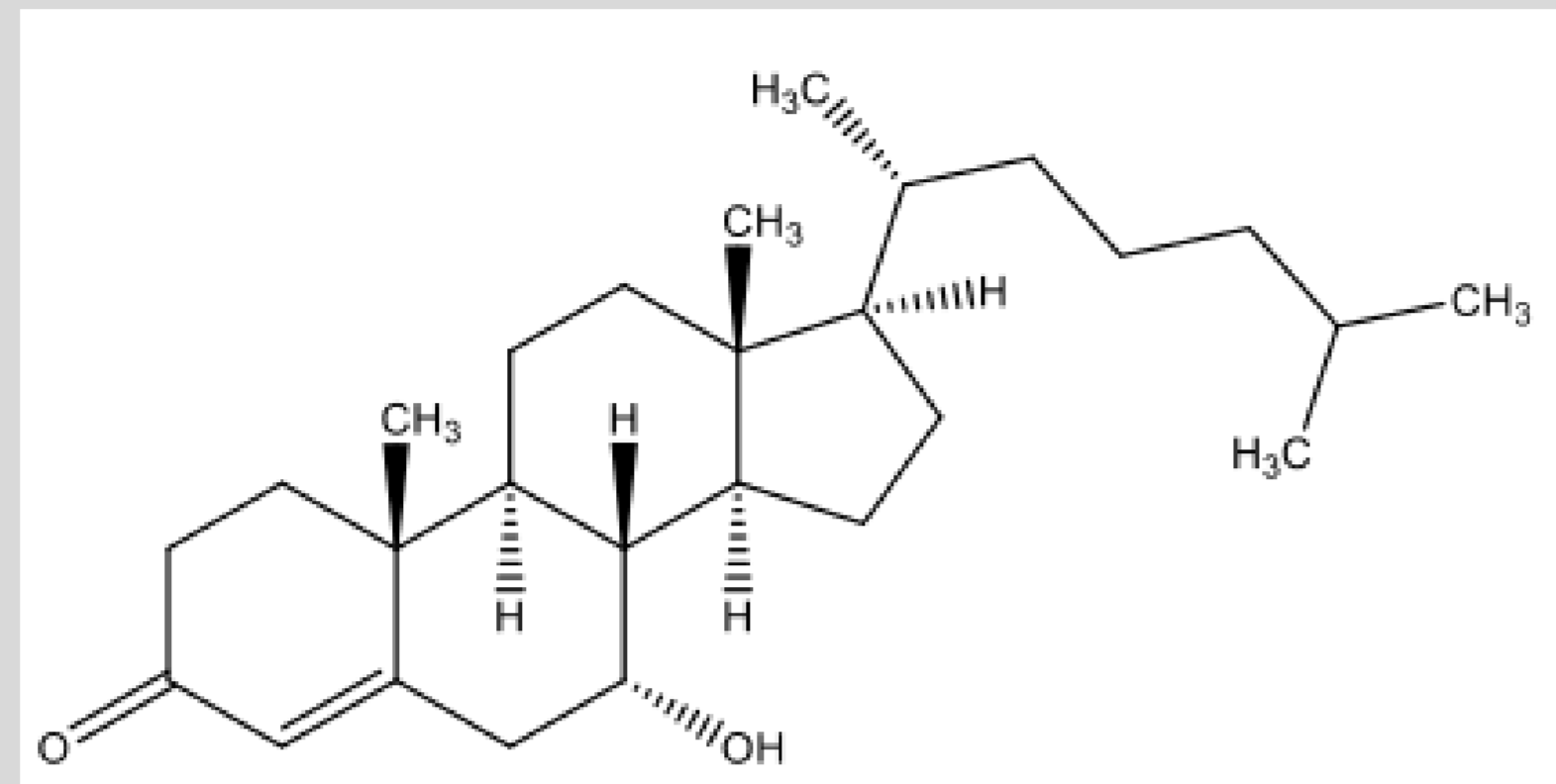


Abb. 1: Der Analyt 7 $\alpha$ -Hydroxy-4-cholesten-3-one

beträgt 30ng/ml und es wurde eine Methode für die Quantifizierung im Bereich von 5ng/ml bis 300ng/ml entwickelt. Zur Reinigung von der Blutmatrix wurde eine Proteinfällung mittels Acetonitril und eine anschliessende Extraktion mit Extraktionsplatten von Tecan verwendet. Die Extraktionsausbeute betrug nach abgeschlossener Optimierung bei der Cut-Off Konzentration 51.4% mit einem Variationskoeffizient von kleiner als 6%. Die Anforderung an einen Test mit einer Bestimmungsgrenze (LLOQ) von 5ng/ml wurde erreicht und die Präzision lag mit 18.06% in den getroffenen Richtlinien.

## EINLEITUNG

Das Universitätsinstitut für Klinische Chemie hatte die Absicht einen routinemässig durchführbaren Diagnostest für den Nachweis von Gallensäure Fehlabsorptionen (BAM) zu entwickeln. Diese Fehlabsorptionen sind Syndrome welche sich durch einen wässrigen Durchfall (Diarrhoe) zeigen. Bisher wurden diese mittels einem 75Selen-markierten Homocholicsäure Taurin Test (75SeHCAT) nachgewiesen. Da dieser Test aber sehr aufwändig und kostspielig ist, werden oft keine diagnostischen Tests durchgeführt, sondern es wird eine Behandlungskur angesetzt und die Wirkung verfolgt [1, 2].

Beim neuen Routinetest mittels LC-MS/MS soll das Abbauprodukt C4 quantifiziert werden, um die Aktivität des Enzyms das für den Abbau zu den Gallensäuren verantwortlich ist, widerzuspiegeln. Daraus kann anschliessend geschlossen werden, ob eine Überproduktion vorliegt und der Patient somit krank wäre.

## RESULTATE

### MS Parameter

Die Fragmente und die dazugehörigen MS Parameter wie die Cone- und Kollisionsspannung wurden durch eine automatische Methode bestimmt und anschliessend manuell kontrolliert.

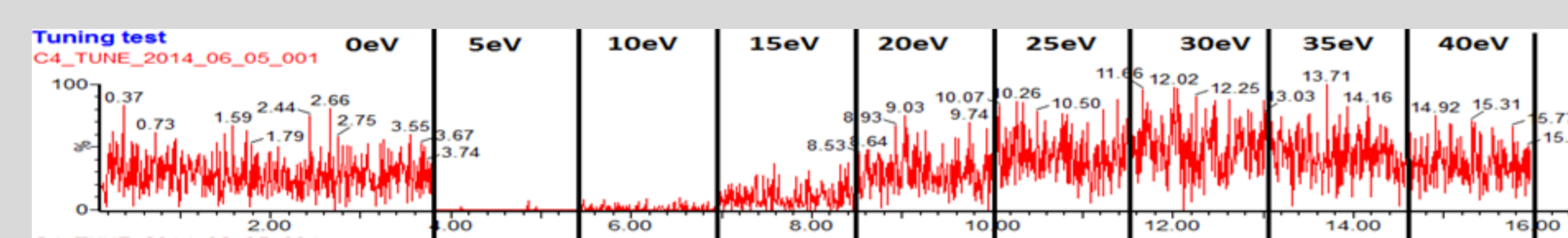


Abb. 2: Manuelle Kollisionsenergiebestimmung eines der neuen Fragmente

### LC Methode

Nach der abgeschlossenen MS Optimierung wurde die LC Methode optimiert. Dafür wurden verschiedene Eluiermittel, sowie Zusammensetzungen, unterschiedliche Säulen und zusätzlich ein 2D-LC System getestet. In der finalen Methode wurde ein 1D-LC-MS/MS System mit einer UPLC 18C BEH Säule verwendet. Die Methode konnte durch einen steileren Gradienten und höhere Flüsse auf 5 Minuten verkürzt werden.

### Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung von Blutserumproben ist durch die sensitive ESI-MS/MS Technik stark vereinfacht worden, dennoch wurde ein Reinigungsschritt vor der Injektion entwickelt um die Matrix abzutrennen und dadurch die Spezifität und Sensitivität zu erhöhen.

Die verschiedenen durchgeführten Tests und ihre Extraktionsausbeuten können aus der der Abbildung 3 entnommen werden.

Aufgrund der besten Extraktionsausbeuten der AC Platten, verglichen mit allen Reinigungsverfahren, wurde entschieden, auf diese Methode als Probenvorbereitung zu setzen. Ein weiterer grosser Vorteil dieser Platten ist,

dass sie ohne Probleme für den Pipettierroboter automatisiert werden können.

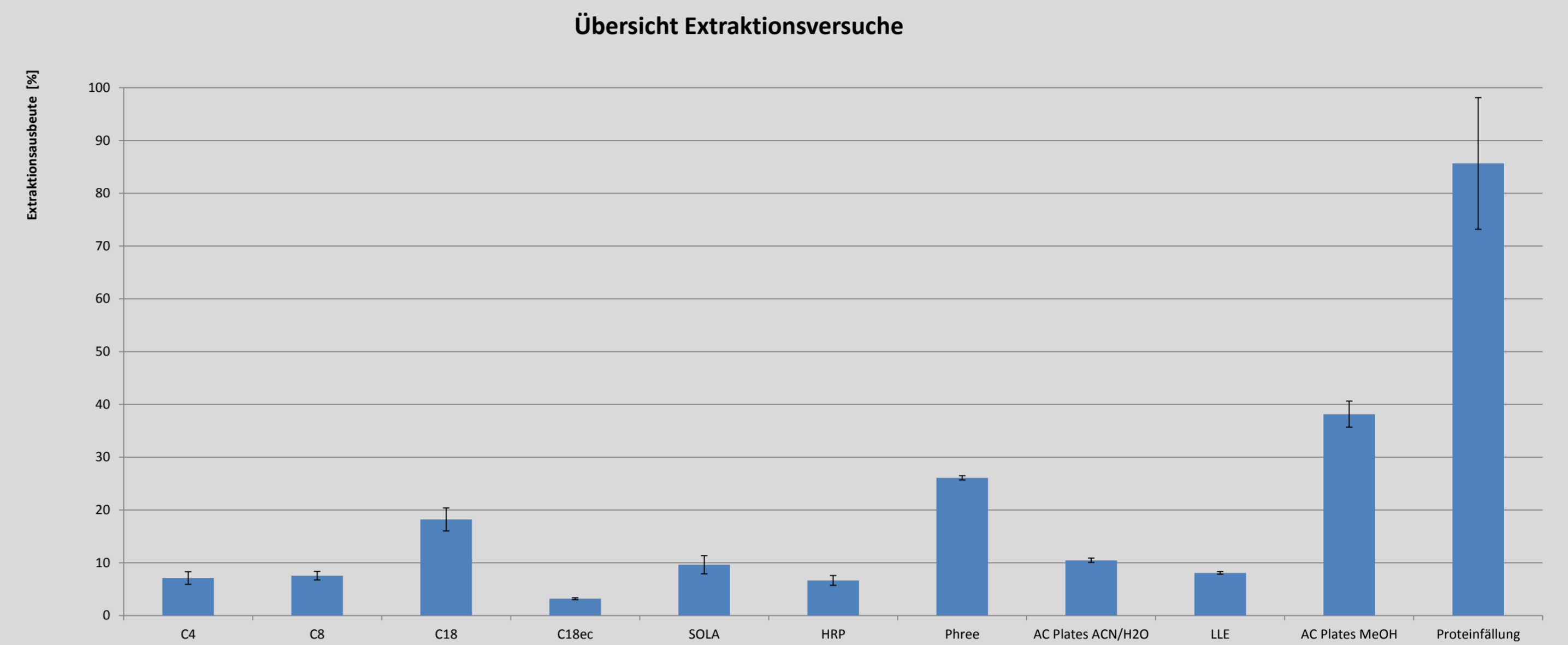


Abb. 3: Verschiedene Extraktionsversuche für eine optimale Probenvorbereitung

### Validierung

Die Validierung der Methode wurde mit folgenden Parameter durchgeführt.

#### Linearität

Die Linearität war mit 0.9967 über der Anforderung von 0.99.

#### Präzision

Die Variationskoeffizienten der Mess- und Methodenpräzision betragen an der Bestimmungsgrenze weniger als 18% und an den weiteren getesteten Konzentrationen weniger als 6%. Diese Werte lagen ebenfalls in den Anforderungen des Validierungsplans.

#### Wiederfindung

Die Richtlinien im Bereich von 70-110% zu liegen, wurden mit Wiederfindungen von 78-107% erreicht.

#### Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze bei 5ng/ml wurde mit einem Signal/Noise von 20.43 erreicht.

(Anforderung Signal/Noise: 9)

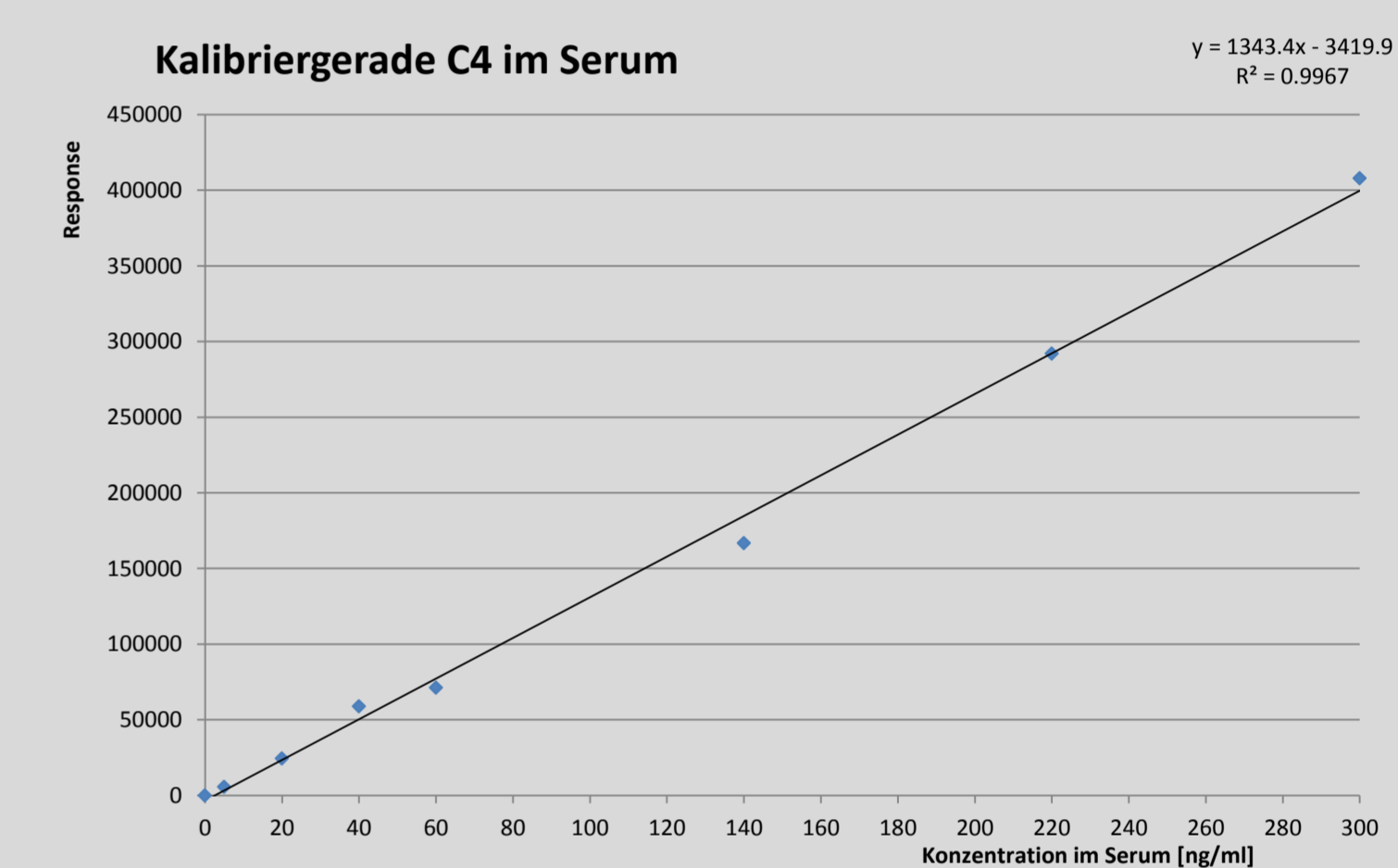


Abb. 4: Kalibriergerade des C4 im Serum

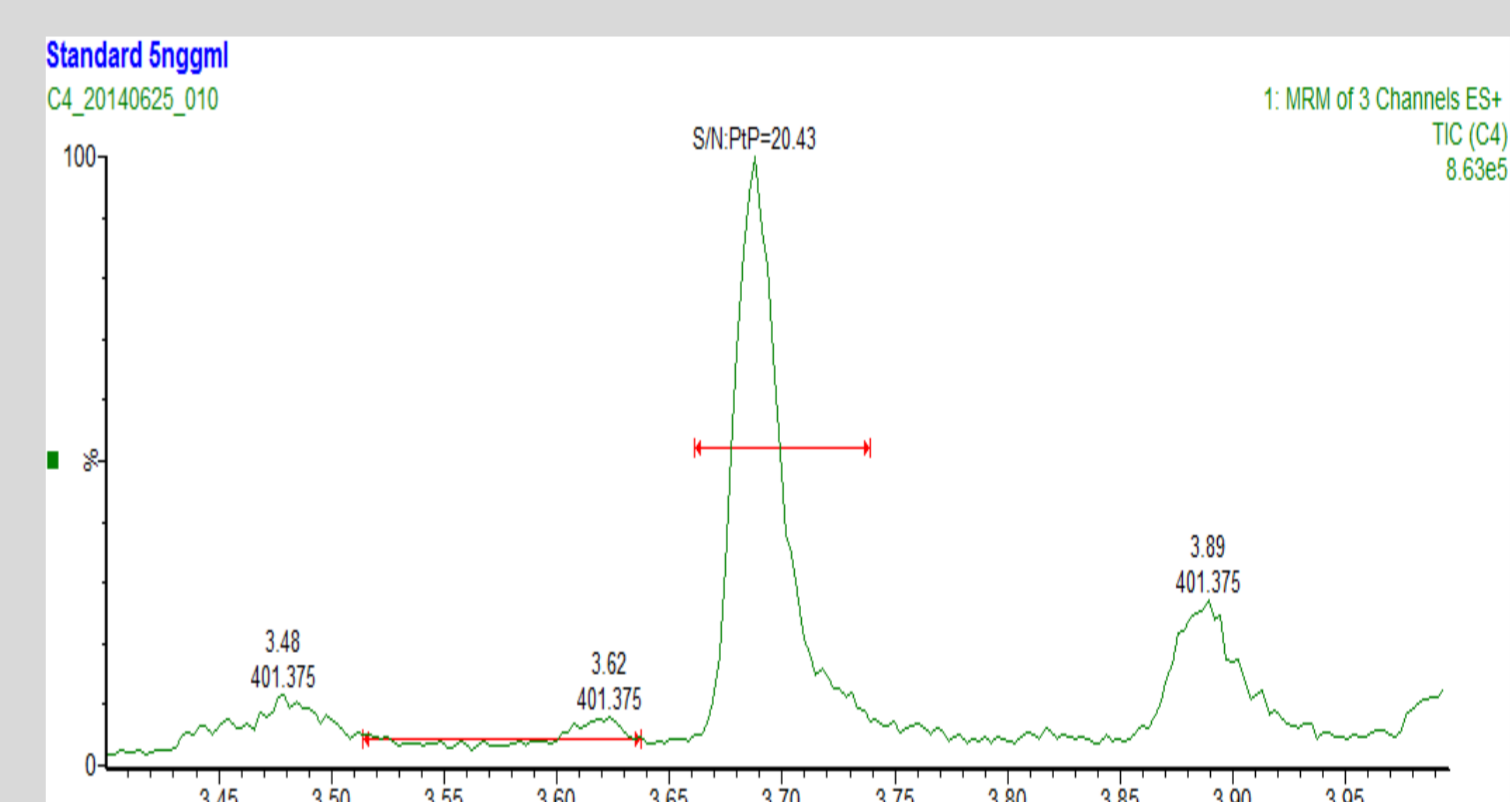


Abb. 5: Spektrum bei 5ng/ml C4 im Serum

## SCHLUSSFOLGERUNG

Vor der Optimierung lag die Bestimmungsgrenze der Methode bei 20ng/ml. Als Ziel wurde für die Bachelor Thesis eine Bestimmungsgrenze von 5ng/ml festgelegt. Durch den Test mit 5ng/ml C4 in Lösemittel und der exakt gleichen Probenvorbereitung wie im Serum wurde ein Signal/Noise von 20.43 erhalten. Dieses Verhältnis ist über der Anforderung an den LLOQ, somit wurde das Ziel erreicht. Mit den AC Platten, sowie der Proteinfällung zuvor, konnte eine einfache und reproduzierbare Probenvorbereitung entwickelt werden. Die Extraktionsausbeute die jeweils um die 50% betrug, lag ebenfalls im Bereich der in der Application Note von Tecan (53%) beschrieben [3].

Die bestimmten Validierungsparameter erfüllten allesamt die Kriterien und somit kann die Methode als erfolgreich teilvalidiert betrachtet werden.

Im Ausblick auf den weiteren Verlauf dieser Methode, sollte die Validierung noch durch eine Präzisionsmessung über mehrere Tage, eine Langzeitstabilität und keine Verdünnungslinearität erweitert werden. Im Anschluss daran, kann die Methode für Forschungszwecke und nach weiterer Validierung für Routinezwecke verwendet werden.

## REFERENZEN

- [1] S. Pattni, Recent advances in the understanding of bile acid malabsorption, 2009
- [2] C. Steiner, Quantification of the 15 major human bile acids and their precursor 7 $\alpha$ -hydroxy-4-cholesten-3-one in serum by lc-ms spectrometry, 2010
- [3] Tecan, Application Note: Tecan AC Extraction Plate, 2014