

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 006 019**

51 Int. Cl.:

G01N 1/40 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 30/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2021** **PCT/EP2021/085832**
87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2022** **WO22129131**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2021** **E 21839887 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2024** **EP 4264223**

54 Título: **Flujo de trabajo de preparación de muestras basado en evaporación para espectrometría de masas**

30 Prioridad:

17.12.2020 EP 20215190

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.03.2025

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.00%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

HOFFMANN, THOMAS;
KUPSER, PETER;
LEINENBACH, ANDREAS;
MITRA, INDRANIL;
NANDANIA, JATIN y
WERNER, CORNELIA

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 3 006 019 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Flujo de trabajo de preparación de muestras basado en evaporación para espectrometría de masas

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar y/o cuantificar un analito en una muestra usando espectrometría de masas. El procedimiento de la invención comprende: extraer el analito de la muestra usando extracción en fase sólida (SPE) para obtener un extracto de SPE que comprende el analito; concentrar el analito, en el que dicha concentración comprende evaporar parcialmente el disolvente del extracto de SPE; y detectar y/o cuantificar el analito en la muestra usando espectrometría de masas.

Antecedentes de la invención

Los sistemas de preparación de muestras automatizados para aplicaciones de CL-EM, así como los sistemas de HPLC, tienen pérdida de volumen de muestra y de analito asociada con volúmenes muertos, dando lugar a una menor sensibilidad. Por ejemplo, se puede producir una pérdida de muestra significativa durante la transferencia de una muestra eluida obtenida a partir de un enriquecimiento de analito por extracción en fase sólida (SPE) desde un recipiente de reacción primario a un recipiente de reacción secundario. Se puede producir otra pérdida de muestra durante el procedimiento de inyección en CL del volumen muerto del vial de muestra o de HPLC y de las inyecciones de bucle completo que usan sobrellenado para garantizar una alta exactitud y reproducibilidad.

La elución de analitos durante la SPE a menudo requiere disolventes orgánicos (por ejemplo, MeOH al 80 %). Sin embargo, es necesario minimizar el contenido de disolventes orgánicos en la muestra antes de la inyección en CL-EM para mantener un rendimiento cromatográfico aceptable, especialmente para los sistemas de μ CL. Por lo tanto, dichos eluidos se diluyen con frecuencia, por ejemplo, por una dilución 1:1 con agua, para reducir las concentraciones de disolvente orgánico (por ejemplo, MeOH al ≤ 30 -40 %). Esta dilución provoca otra pérdida en la sensibilidad de detección de analito.

En consecuencia, existe una gran necesidad de mejorar los flujos de trabajo de preparación de muestras para espectrometría de masas de modo que se minimice la pérdida de analito y se pueda lograr una mayor sensibilidad de detección de analito, especialmente en el contexto de los procedimientos de preparación de muestras que usan técnicas de SPE (por ejemplo, una técnica de SPE basada en partículas magnéticas).

ATSUSHI YAMAMOTO *ET AL.*, "Steroid Hormone Profiles of Urban and Tidal Rivers Using LC/MS/MS Equipped with Electrospray Ionization and Atmospheric Pressure Photoionization Sources", ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY, (20060701), vol. 40, n.º 13, doi:10.1021/es052593p, ISSN 0013-936X, páginas 4132 - 4137, documento XP055030708 [I] 1-12 describe un procedimiento altamente sensible y sencillo para analizar hormonas esteroideas en muestras de agua de río y de estuario que se está desarrollando usando un espectrómetro de masas en tándem con cromatografía de líquidos equipado con una fuente de ionización por electronebulización (ESI) y una fuente de fotoionización a presión atmosférica (APPI).

GENTILI A *ET AL.*, "Analysis of free estrogens and their conjugates in sewage and river waters by solid-phase extraction then liquid chromatography-electrospray-tandem mass-spectrometry", CHROMATOGRAPHIA, VIEWEG UND TEUBNER VERLAG, DE, (20020701), vol. 56, n.º 1/2, doi:10.1007/BF02490242, ISSN 0009-5893, páginas 25 - 32, documento XP003025858 [A] 1-12 describe estrógenos esteroideos "libres" que se identifican como compuestos posiblemente responsables de la perturbación endocrina de la fauna acuática que vive en los ríos en los que las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales (PTAR) descargan sus efluentes. Se desarrolló un procedimiento analítico sensible, sin derivatización, para la identificación y cuantificación de estrógenos conjugados y libres en aguas superficiales y residuales. Las hormonas se extrajeron y fraccionaron, por el uso de cartuchos Carbograph, en fracciones neutras y ácidas que, a continuación, se analizaron por cromatografía de líquidos con espectrometría de masas en tándem. Las recuperaciones estuvieron entre un 66 y un 100 % y los límites de detección (LDD) entre 15,0 y 0,003 ng l⁻¹, dependiendo del compuesto y la matriz de agua. Cuando se aplicó esta metodología a aguas residuales reales y agua de río, fue posible medir los principales estrógenos libres en niveles de ng l⁻¹. Entre los conjugados fue posible observar la presencia de estrona-3-sulfato (en niveles entre 8,0 y 0,5 ng l⁻¹).

El documento US2019324043 A1 describe un procedimiento para analizar compuestos objetivo de una muestra biológica líquida o seca usando un dispositivo de muestra de microfluidos que incluye un cartucho hueco y una unidad de cuerpo absorbente.

El documento EP2003455 A1 describe un procedimiento novedoso de preparación de muestras para análisis por medio de espectrometría de masas, preferentemente CL-EM/EM. En consecuencia, se usan partículas magnéticas funcionalizadas con una superficie hidrófoba para extraer compuestos de bajo peso molecular de muestras biológicas líquidas complejas, tales como plasma, suero, sangre completa o sangre hemolizada. Dicho procedimiento incluye (a) poner en contacto la muestra con una cantidad de partículas magnéticas funcionalizadas

con una superficie hidrófoba, (b) incubar la muestra y las partículas, adsorbiendo de este modo el compuesto hacia la superficie hidrófoba, (c) separar las partículas aplicando un campo magnético y retirar el líquido, (d) opcionalmente lavar las partículas, (e) eluir el compuesto de las partículas.

5 Sumario de la invención

En el presente documento, se proporciona un procedimiento para detectar y/o cuantificar un analito de interés en una muestra usando espectrometría de masas de acuerdo con la reivindicación 1.

10 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar y/o cuantificar un analito de interés en una muestra usando espectrometría de masas, comprendiendo dicho procedimiento:

15 a) extraer el analito de la muestra usando extracción en fase sólida (SPE) para obtener un extracto de SPE que comprende el analito, en el que el extracto de SPE comprende de un 50 % en vol. a un 100 % en vol. de un disolvente orgánico, en el que el analito es un esteroide, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en testosterona y estradiol;

20 b) concentrar el analito, comprendiendo dicha concentración evaporar parcialmente el disolvente del extracto de SPE obtenido en a); en el que el volumen del extracto de SPE sometido a la evaporación parcial se reduce en de un 50 % a un 95 %, preferentemente en de un 60 % a un 90 %, más preferentemente en de un 70 % a un 80%;

25 b1) diluir el analito concentrado obtenido de la etapa b) con un disolvente de dilución para obtener un analito diluido, en el que el analito diluido comprende menos de un 50 % en vol. del disolvente orgánico u otro disolvente orgánico antes de la etapa c); y

c) detectar y/o cuantificar el analito en la muestra usando espectrometría de masas, en el que la espectrometría de masas es espectrometría de masas acoplada a cromatografía de líquidos (CL-EM).

30 Como se demuestra por los ejemplos adjuntos del procedimiento de la invención, los autores de la invención descubrieron sorprendentemente que aplicando evaporación parcial en extractos de SPE que comprenden el analito de interés (por ejemplo, un esteroide y, en particular, un andrógeno o estrógeno), se puede incrementar la recuperación de analito en el flujo de trabajo de preparación de muestras de EM frente a los flujos de trabajo con dilución usados previamente. Además, los autores de la invención demostraron que la evaporación parcial de extractos de SPE es sorprendentemente superior en la recuperación de muestra y, por tanto, en la sensibilidad de detección de analitos (por ejemplo, esteroides y, en particular, andrógenos o estrógenos), en comparación con el uso de evaporación completa hasta sequedad y reconstitución posterior en un volumen definido. Además de esta ventaja de una mayor recuperación de analito y sensibilidad de detección, la evaporación parcial tiene la ventaja de ser mucho más rápida que la evaporación completa. Por tanto, acortando el tiempo de evaporación del disolvente se acorta el tiempo de preparación de muestras global. Los tiempos de preparación de muestras cortos permiten una mayor rotación de muestras y se vuelven de particular importancia cuando se habla de sistemas de preparación y medición de muestras de EM completamente automatizados, que típicamente se requiere que tengan un rendimiento de muestras lo más alto posible.

45 "Concentrar el analito evaporando parcialmente el disolvente del extracto de SPE" quiere decir que el extracto de SPE se somete a evaporación de modo que el volumen se reduce y la concentración del analito en la solución obtenida se incrementa en relación con la concentración del analito en el extracto de SPE.

50 "Evaporación parcial" como se usa en el presente documento quiere decir que el disolvente de una muestra líquida (en el presente documento, el extracto/eluido de SPE) no se evapora hasta total sequedad, pero de modo que permanece una parte del disolvente. En otras palabras, el disolvente de la muestra líquida sometida a evaporación (en el presente documento, el extracto/eluido de SPE) no se evapora completamente.

55 "Evaporar el disolvente" quiere decir que el líquido se evapora de manera que el analito no se evapore. Preferentemente, el analito tampoco precipita durante la evaporación.

60 La evaporación parcial de acuerdo con la invención se configura para incrementar la concentración de analito. Además, la evaporación parcial se configura preferentemente para reducir el contenido de disolventes orgánicos (por ejemplo, disolventes orgánicos volátiles, tales como acetronitrilo o metanol). La reducción del contenido de disolvente(s) orgánico(s) en el extracto de SPE mejora el rendimiento de la CL en CL-EM.

En modos de realización, el procedimiento se realiza en el siguiente orden: a), a continuación, b) y, a continuación, c).

65 En algunos modos de realización, el procedimiento se realiza en el siguiente orden: a), a continuación, b), a

continuación, b1) y, a continuación, c).

En modos de realización, las configuraciones de la evaporación parcial (por ejemplo, ajustes de temperatura y/o vacío) se pueden configurar de modo que los disolventes orgánicos (por ejemplo, acetonitrilo o metanol) se evaporen. En modos de realización, las configuraciones de la evaporación parcial se pueden seleccionar de modo que los disolventes orgánicos se evaporen preferentemente sobre otros disolventes tales como el agua. Los disolventes con mayores presiones de vapor o menores puntos de ebullición (por ejemplo, acetonitrilo y metanol) en mezclas acuosas se evaporan más rápido que el contenido de agua cerca de o por encima del punto de ebullición (combinación de temperatura y presión). De este modo, el contenido orgánico relativo se reduce eficazmente por evaporación.

La etapa de concentración tiene la ventaja de que se incrementa la concentración del analito para el análisis de espectrometría de masas, de modo que se puede mejorar el límite inferior de cuantificación con respecto a la concentración de analito en la muestra. En particular, combinando SPE y la concentración que comprende evaporación parcial, sorprendentemente se pudo lograr un incremento de señal. El incremento en las concentraciones del analito por la etapa de concentración también permite usar menores volúmenes de muestra para un límite de cuantificación dado e incrementa la cantidad de analito sometido a espectrometría de masas en un volumen definido. Además, la concentración de analito usando evaporación parcial del disolvente tiene la ventaja de que se pueden retirar los disolventes volátiles, tales como los disolventes orgánicos comprendidos en el extracto de SPE (por ejemplo, ACN o metanol que se pueden usar para extraer el analito de la fase sólida). Dichos disolventes orgánicos pueden interferir con la cromatografía de líquidos de un flujo de trabajo de CL que comprende espectrometría de masas.

La evaporación o evaporación parcial se puede lograr con diferentes sistemas o cámaras de evaporación conocidos en la técnica. El sistema o cámara de evaporación puede ser parte del sistema de espectrometría de masas. La evaporación se puede llevar a cabo de forma completamente automatizada, es decir, sin etapas de manipulación manual. En modos de realización, se puede emplear un sistema de evaporación que no usa centrifugación. En un modo de realización preferente, el sistema de evaporación puede usar vacío y calentamiento para la evaporación (por ejemplo, concentrador de vacío SpeedVac, ThermoFisher).

El volumen del extracto de SPE sometido a concentración por evaporación se reduce en de un 50 % a un 95 %, en particular, de un 60 % a un 90 % y, en particular, de un 70 % a un 80 % (en relación con el volumen de extracto de SPE sometido a concentración/evaporación). En particular, el extracto de SPE se puede concentrar reduciendo el volumen de disolvente en de un 73 % a un 87 % usando evaporación. Se demuestra en el ejemplo 1 adjunto que usando dicho grado de concentración/evaporación del disolvente del extracto de SPE, se puede lograr una recuperación y sensibilidad de detección de analito incrementadas para el analito en comparación con los flujos de trabajo con dilución y también con los flujos de trabajo con evaporación completa.

Por ejemplo, cuando se lleva a cabo una SPE basada en partículas magnéticas y se obtiene un extracto de SPE total de 150 µl, se pueden granular las partículas magnéticas, 130 µl del extracto de SPE se pueden transferir a un tubo separado y se pueden someter a evaporación. Una reducción del volumen sometido de 130 µl del extracto de SPE hasta un volumen de 20 µl, por ejemplo, corresponde a una reducción del volumen en un 84,6 %.

En modos de realización, el volumen del extracto de SPE sometido a evaporación se puede reducir en al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % por la evaporación.

En modos de realización, el volumen del extracto de SPE sometido a evaporación se puede reducir en como máximo un 50 %, como máximo un 55 %, como máximo un 60 %, como máximo un 65 %, como máximo un 70 %, como máximo un 75 %, como máximo un 80 %, como máximo un 85 %, como máximo un 90 %, como máximo un 95 % o como máximo un 99 % por la evaporación.

En modos de realización, el volumen del extracto de SPE sometido a evaporación se reduce hasta un volumen final de un 5 % a un 50 %, en particular hasta de un 10 % a un 40 %, en particular de un 20 % a un 30 % por evaporación. En particular, el extracto de SPE se puede concentrar por evaporación reduciendo el volumen de disolvente hasta un volumen final de un 13 % a un 27 %.

En modos de realización, el procedimiento puede comprender ajustar el volumen después de la evaporación usando una solución diluyente hasta un volumen final sometido a CL-EM. El volumen final después del ajuste con la solución diluyente puede corresponder a de un 5 % a un 40 %, en un modo de realización, de un 10 % a un 30 %, o en un modo de realización, de un 13 % a un 27 % del volumen de la muestra sometida a la SPE. De forma ejemplar, pero no limitante, un volumen de extracto de SPE de 130 µl se puede someter a la etapa de concentración del analito usando evaporación, el volumen se puede reducir hasta 10 µl por dicha concentración y finalmente el volumen se puede ajustar a 40 µl usando una solución diluyente.

En modos de realización, se puede ajustar el volumen obtenido después de evaporar el disolvente del extracto de

SPE por adición de una solución diluyente de modo que el volumen final obtenido corresponda al volumen de inyección al CL y, opcionalmente, a un volumen muerto del recipiente de reacción en el que está comprendida la solución. Por ejemplo, se puede ajustar el volumen obtenido después de evaporar el disolvente del extracto de SPE por adición de una solución diluyente de modo que sea posible retirar 15-30 µl o, en particular, 20 µl para la inyección al CL del recipiente de reacción usado.

La solución diluyente usada en el contexto de la presente divulgación puede ser, por ejemplo, una solución acuosa o agua. Preferentemente, una solución acuosa usada como solución diluyente comprende concentraciones de disolvente orgánico de un 20 % en volumen o menor, preferentemente, un 10 % en vol. o menor, incluso más preferentemente, un 5 % en vol. o menor y, lo más preferentemente, un 0 % en vol. En algunos modos de realización, la solución diluyente puede ser agua. El uso de bajas concentraciones de disolventes orgánicos o incluso ningún contenido de disolventes orgánicos tiene la ventaja de que el contenido de disolvente orgánico se puede mantener bajo, lo que es ventajoso cuando se somete la solución concentrada a CL-EM. Las concentraciones demasiado altas de disolvente orgánico provocan típicamente un ensanchamiento de pico en la CL, especialmente cuando se usan fases estacionarias de CL hidrófobas, tales como la matriz C18.

El procedimiento de la presente invención es aplicable a diferentes analitos y muestras. El procedimiento puede comprender detectar y/o cuantificar solo el analito de interés o el analito de interés y, además, se pueden detectar otros analitos.

En algunos modos de realización, el analito de interés detectado y/o cuantificado por el procedimiento de la presente invención, puede ser un esteroide, en particular una hormona esteroidea. En particular, el analito puede ser un esteroide seleccionado del grupo que consiste en un andrógeno, un estrógeno, un glucocorticoide, un mineralocorticoide, un gestágeno.

Los ejemplos ejemplares, pero no limitantes de un andrógeno son testosterona, deshidroepiandrosterona (DHEA), sulfato de deshidroepiandrosterona (DHEA-S), androstenodiona (A4), androstenodiol (A5), dihidrotestosterona (DHT) y androsterona.

En modos de realización específicos, el andrógeno es testosterona.

Los ejemplos ejemplares, pero no limitantes de un estrógeno son estrona (E1), estradiol (E2), estriol (E3) y estetrol (E4).

En modos de realización específicos, el estrógeno es estradiol.

Un ejemplo ejemplar, pero no limitante de un glucocorticoide es cortisol.

Un ejemplo ejemplar, pero no limitante de un mineralocorticoide es aldosterona.

Los ejemplos ejemplares, pero no limitantes de un gestágeno son progesterona (P4), 16α-desoxicortona, 17α-desoxicortona, 20α-dihidroprogesterona, 20β-dihidroprogesterona, 5α-dihidroprogesterona, 5β-dihidroprogesterona, 3β-dihidroprogesterona, 11-desoxicorticosterona y dihidrodesoxicorticosterona.

En modos de realización, el analito es un esteroide seleccionado del grupo que consiste en: 11-desoxicortisol, 17-alfa-desoxicortona (17OHP), 21-desoxicortisol, aldosterona, androstenodiona (A4), cortisol, cortisona, deshidroepiandrosterona (DHEA), sulfato de deshidroepiandrosterona (DHEAS), dihidrotestosterona (DHT), estradiol (E2), progesterona, testosterona (T). En modos de realización preferentes, el analito se selecciona de aldosterona, androstenodiona (A4), deshidroepiandrosterona, dihidrotestosterona (DHT), estradiol (E2), progesterona o testosterona (T). En un modo de realización en particular preferente, el analito es testosterona (T) o estradiol (E2).

El procedimiento de la invención usa una muestra obtenida previamente. Por tanto, el procedimiento de la invención es un procedimiento *in vitro*. La muestra puede ser, en particular, una muestra obtenida de un individuo humano.

En principio, cualquier muestra que comprenda o se sospeche que comprende el analito de interés se puede someter al procedimiento de la invención. Si bien es necesario que una muestra sometida a extracción en fase sólida sea líquida, en principio, también se pueden someter muestras sólidas (por ejemplo, manchas de sangre seca) al procedimiento de la invención. Para las muestras sólidas, se incluye una etapa de preparación de muestras adicional antes de la SPE, que comprende reconstituir la mancha de sangre seca en un líquido. Son conocidos en la técnica procedimientos y medios respectivos para reconstituir una muestra sólida en un líquido de modo que los analitos (por ejemplo, esteroides) se recuperen en un líquido (Rossi *et al.*, Clin Chem Lab Med 2011; 49(4):677-684; Kim *et al.*, Ann Lab Med 2015; 35:578-585).

En algunos modos de realización, la muestra puede ser una muestra líquida, por ejemplo, un líquido biológico. En

modos de realización particulares, la muestra puede ser un líquido corporal. Los ejemplos ejemplares, pero no limitantes de líquidos corporales son sangre completa, suero, plasma, orina, semen, líquido folicular (femenino) y saliva. En particular, la muestra puede ser una muestra de sangre seleccionada de sangre completa, suero y plasma. En modos de realización específicos, la muestra puede ser suero o plasma. Dependiendo del tipo de muestra usada, se puede requerir una etapa de preparación de muestras antes de someter la muestra a SPE y puede ser necesario ajustar la cantidad de muestra. Un experto en la técnica sabe cómo llevar a cabo dicha preparación de muestras.

El volumen de muestra sometido a la SPE se puede variar dependiendo del tipo de muestra y del tipo y/o concentración del analito que se va a detectar en la muestra. Los volúmenes de muestra bajos tienen la ventaja de reducir los volúmenes de reactivo para el análisis y el tiempo total de análisis (por ejemplo, reduciendo el tiempo de cromatografía de líquidos, etc.) y ofrecen la oportunidad de someter material de muestra adicional a diferentes análisis. La combinación de la extracción SPE y la etapa de concentración del procedimiento de la presente invención contribuye a una sensibilidad incrementada y, por tanto, a que los volúmenes de muestra se puedan mantener bajos.

Por ejemplo, el volumen de muestra puede ser de 250 µl o menos, en un modo de realización de 200 µl o menos, en un modo de realización de 150 µl o menos, en un modo de realización de 150 µl. En algunos modos de realización, se puede usar un volumen de muestra de 150 µl a 250 µl o, más en particular, de 150 µl a 200 µl. En modos de realización específicos, el volumen de muestra puede ser de 150 µl.

Dependiendo del tipo de muestra y del analito, una fracción del analito puede formar un complejo con una o más proteínas (por ejemplo, un esteroide se puede unir a una proteína de unión a esteroides y/o globulina de unión a hormonas sexuales) u otros constituyentes de la muestra (por ejemplo, constituyentes del suero o albúmina). El procedimiento de la invención puede comprender una etapa de liberación del analito que se va a detectar y/o cuantificar a partir de los compañeros de unión, tales como proteínas (por ejemplo, globulina de unión a hormonas sexuales). La etapa de liberación, en particular, se puede llevar a cabo antes de la SPE. Realizar una etapa de liberación/pretratamiento puede potenciar la disponibilidad de uno o más esteroides para la detección y/o cuantificación. La etapa de pretratamiento puede ser una etapa de "desproteínización", es decir, una etapa que libera parte o la totalidad del uno o más esteroides de una o más proteínas a las que están unidos.

La etapa de pretratamiento/liberación puede comprender añadir un agente liberador (por ejemplo, un agente de desproteínización) a la muestra. Un agente liberador (por ejemplo, agente de desproteínización) es un agente que libera el uno o más esteroides de su(s) compañero(s) de unión en la muestra (proteínas tales como la globulina de unión a hormonas sexuales y/u otros constituyentes de la muestra) cuando se añade a una muestra. En algunos modos de realización, se puede usar una composición liberadora (por ejemplo, una composición de desproteínización). Una composición liberadora (por ejemplo, una composición de desproteínización) es una mezcla de dos o más sustancias que comprenden al menos un agente que desencadena la liberación del uno o más esteroides de su(s) compañero(s) de unión (proteínas tales como la globulina de unión a hormonas sexuales y/u otros constituyentes de la muestra) cuando se añade a la muestra. Los agentes y composiciones de desproteínización, así como las técnicas que usan los mismos, son conocidos en la técnica. En el contexto de la presente divulgación, un agente de liberación (por ejemplo, un agente de desproteínización) puede ser, por ejemplo, un disolvente orgánico tal como, por ejemplo, un disolvente orgánico seleccionado de acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH) y dimetilsulfóxido (DMSO). Las composiciones liberadoras ejemplares, pero no limitantes (por ejemplo, composiciones de desproteínización) incluyen, pero no se limitan a, mezclas que comprenden al menos dos del grupo de acetonitrilo (ACN), metanol (MeOH) y dimetilsulfóxido (DMSO). El volumen del agente liberador (por ejemplo, agente de desproteínización) y/o composición liberadora (por ejemplo, composición de desproteínización) añadido a la muestra se puede ajustar dependiendo del agente y/o composición del agente y el tipo de unión con la que debe interferir. Por ejemplo, se puede añadir ACN a la muestra de modo que se alcance una concentración final de un 1 a un 10 % en vol., en particular, de un 2 a un 5 % en vol. y, en particular, aproximadamente un 2 % en vol. o exactamente un 2 % en vol. Se puede añadir MeOH a la muestra, por ejemplo, en una concentración final de un 2,5-30 % en vol., en particular, de un 5-15 % en vol. y, en particular, de un 7,5 % en vol. Se puede añadir DMSO a la muestra en una concentración final de un 2-20 % en vol., en particular, un 3-10 % en vol. y, en particular, un 5 % en vol. La etapa de pretratamiento en el contexto de la invención puede implicar además o de forma alternativa reducir o incrementar el pH de la muestra. Es conocido en la técnica que un cambio en el pH puede interferir con la unión de esteroides a los constituyentes de la muestra. Por ejemplo, se puede acidificar el pH a un pH de 5 o menor, en particular, 4 o menor, en particular, 3 o menor y, en particular, 2 o menor.

En modos de realización preferentes, el procedimiento de la invención puede comprender una etapa de pretratamiento anterior a la etapa a) que comprende añadir un disolvente orgánico como agente liberador (por ejemplo, a pH neutro). Por ejemplo, el disolvente orgánico acetonitrilo (ACN) se puede añadir a la muestra en una concentración final como se indica anteriormente.

En modos de realización, también se pueden emplear condiciones de pretratamiento como es conocido en la técnica. Se describen ejemplos no limitantes de condiciones de pretratamiento en Gervasoni, J., *et al.* (Clin

Biochem, 2016, 49(13-14): pp. 998-1003).

El procedimiento de la invención comprende la etapa de "extraer el analito de la muestra usando extracción en fase sólida (SPE) para obtener un extracto de SPE que comprende el analito". "Extraer el analito de la muestra" quiere decir que se reduce la complejidad de la muestra, es decir, que el analito se separa o purifica parcial o completamente de otros constituyentes de la muestra. La reducción de la complejidad de la muestra por la extracción facilita los análisis de espectrometría de masas y reduce la señal de fondo. En modos de realización, la etapa de "extraer el analito de la muestra" también se puede denominar "enriquecer el analito de la muestra". "Enriquecimiento" en este contexto quiere decir que se genera un extracto de SPE en el que la(s) cantidad(es) del analito se incrementa(n) en relación con otros constituyentes de la muestra. En modos de realización, se puede incrementar la abundancia del analito en relación con al menos otro constituyente de la muestra.

"Extracción en fase sólida" (SPE), como se usa en el contexto de la presente invención, se refiere a un procedimiento que separa parcial o completamente el analito o un grupo de analitos de otros constituyentes comprendidos en una mezcla y/o muestra líquida. El procedimiento de SPE se basa en una distribución diferencial en fase sólida y fase líquida del/de los analito(s) y uno o más de los otros compuestos comprendidos en una mezcla y/o muestra. En un primer modo de realización de extracción en fase sólida de acuerdo con la presente divulgación, el/los analito(s) puede(n) tener una mayor afinidad de unión a una fase sólida que uno o más de los otros compuestos en una mezcla o muestra. Por la mayor afinidad de unión del/de los analito(s) a la fase sólida, el/los analito(s) se puede(n) separar parcial o completamente, es decir, extraerse, de los otros compuestos de la mezcla y/o muestra. En un segundo modo de realización alternativo, el analito puede tener una afinidad de unión a una fase sólida que es menor que la afinidad de unión de uno o más de otros compuestos comprendidos en la mezcla y/o muestra sometida a SPE sólida. En este modo de realización, el uno o más esteroides permanecen en la fase líquida y uno o más de otros constituyentes de la muestra se retiran por la unión a la fase sólida. En consecuencia, la fase extracción en fase sólida, como se usa en el presente documento, incluye diferentes modos de realización, tales como: (i) retención del/de los analito(s) en una fase sólida que permite la retirada parcial o completa de otros compuestos con la fase líquida (opcionalmente también con una o más etapas de lavado) y (ii) retención de otros compuestos en la fase sólida y extracción del analito en la fase líquida. En los modos de realización (i), la SPE típicamente implica una elución usando una solución de elución adecuada para liberar el/los analito(s) unido(s) de forma reversible de la fase sólida. La solución de elución se puede seleccionar dependiendo del principio de unión de la fase sólida.

La "extracción en fase sólida" como se usa en el contexto de la presente invención incluye, pero no se limita a, técnicas tales como procedimientos de extracción en fase sólida clásicos que usan un cartucho/columna de extracción en fase sólida o una punta de fase sólida. En particular, la frase "extracción en fase sólida" en el contexto de la invención incluye flujos de trabajo basados en partículas, en particular basados en esferas. La frase "extracción en fase sólida" en el contexto de la presente divulgación incluye diferentes principios de separación. En modos de realización, los analitos (es decir, el uno o más esteroides) se pueden retardar por la fase sólida (por ejemplo, esferas) y uno o más de otros constituyentes de la muestra permanecen en la fase líquida. En modos de realización alternativos, los analitos (es decir, el uno o más esteroides) pueden permanecer en la fase líquida y uno o más de otros constituyentes de la muestra se unen a la fase sólida.

La "fase sólida" usada para la extracción en fase sólida en el contexto de la invención incluye, pero no se limita a, una superficie o partículas (por ejemplo, micropartículas tales como microesferas). En un modo de realización particular, la fase sólida pueden ser esferas, en particular microesferas. Las esferas (por ejemplo, las microesferas) pueden ser no magnéticas, magnéticas o paramagnéticas. En un modo de realización en particular preferente, la fase sólida pueden ser microesferas magnéticas. Las esferas (por ejemplo, microesferas, en particular microesferas magnéticas) se pueden hacer de diversos materiales diferentes. Las esferas (por ejemplo, esferas magnéticas) pueden tener diversos tamaños (por ejemplo, en el intervalo de μm) y comprender una superficie con o sin poros.

En un modo de realización particular de la invención, la fase sólida puede ser una fase sólida distribuable; es decir, un material en fase sólida que se puede mantener en suspensión y distribuirse. Los ejemplos no limitantes de dichas fases sólidas distribuibles son partículas, en particular, esferas, más en particular, microesferas e, incluso más en particular, microesferas magnéticas. Una fase sólida distribuable tiene la ventaja de que se puede usar eficazmente en un modo de acceso aleatorio en un analizador automatizado de preparación de muestras y espectrometría de masas, lo que puede requerir usar diferentes fases sólidas para diferentes analitos. Además, la cantidad de un material de fase sólida distribuable se puede ajustar más fácilmente.

La fase sólida (por ejemplo, partículas, en particular, partículas magnéticas, en particular, microesferas magnéticas) se puede recubrir de una manera que permita la unión/captura del analito. Son conocidos en la técnica recubrimientos adecuados para capturar/unir el uno o más esteroides.

En modos de realización, la fase sólida (por ejemplo, partículas, en particular, partículas magnéticas, en particular, microesferas magnéticas) se puede recubrir con anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente al analito. En un modo de realización particular, se pueden emplear inmunoesferas (es decir,

partículas magnéticas, tales como microesferas que tienen anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos fijados a la superficie) que se unen/capturan el analito como fase sólida para la SPE. En otros modos de realización, la fase sólida se puede recubrir con una matriz de polímero poroso que permite el retardo del analito.

5 En modos de realización, se pueden usar partículas como se describe en el documento WO2018189286A1 o el documento WO2019141779A1 para la SPE para capturar el analito (por ejemplo, un esteroide) de la muestra. Estos documentos y, en particular, las partículas o esferas como se describe en los mismos se incorporan en el presente documento en su totalidad.

10 La extracción en fase sólida en el contexto de la invención puede incluir la extracción en fase sólida basada en flujo continuo y la extracción en fase sólida de tipo discontinuo.

La extracción en fase sólida basada en flujo continuo quiere decir que la fase sólida se retiene en un recipiente (por ejemplo, un cartucho) y la muestra (o una muestra pretratada) se aplica a la fase sólida en un proceso de flujo continuo. Opcionalmente, un flujo continuo puede incluir un tiempo de incubación definido en el que la muestra se pone en contacto con la fase sólida mientras el flujo continuo está bloqueado. Por ejemplo, la extracción en fase sólida basada en flujo continuo se puede llevar a cabo con cartuchos/columnas de extracción en fase sólida o con puntas de fase sólida. Una extracción en fase sólida basada en flujo continuo puede comprender una o más etapas de lavado en las que se retira la fase líquida residual.

20 "Extracción en fase sólida de tipo discontinuo", como se usa en el presente documento, se refiere a procedimientos de separación basados en fase sólida que no incluyen una etapa de flujo continuo. La "extracción en fase sólida de tipo discontinuo" incluye: poner la muestra (o muestra pretratada) en contacto con la fase sólida y, opcionalmente, incubar la muestra en presencia de la fase sólida durante un tiempo definido (requerido para la unión del analito o la unión de uno o más de otros constituyentes de la muestra dependiendo del principio de separación); y separar la fase sólida de la fase líquida por medios diferentes al flujo continuo (por ejemplo, granulación). En particular, la extracción en fase sólida de tipo discontinuo incluye un modo de realización en el que la fase sólida se forma por partículas (en particular, partículas magnéticas, tales como esferas) y en la que la separación de la fase sólida de la fase líquida durante la SPE se logra granulando las esferas. La granulación de las esferas se puede lograr por centrifugación u otros medios. En modos de realización específicos, granular las esferas puede no implicar centrifugación. En un modo de realización preferente particular, las esferas pueden ser magnéticas y se pueden granular las esferas por fuerza magnética.

35 En un modo de realización particular, la fase sólida usada en la SPE puede ser una SPE de tipo discontinuo, preferentemente, una SPE de tipo discontinuo que usa (micro)esferas, incluso más preferentemente, una SPE de tipo discontinuo que usa (micro)esferas magnéticas. La SPE de tipo discontinuo se puede basar en unir/capturar el analito en la fase sólida usada en la SPE. En otros modos de realización, otros constituyentes de la muestra se pueden unir a la fase sólida y el analito puede permanecer en la fase líquida.

40 La solución que comprende el analito o la mayor parte del mismo obtenido por SPE se denomina en el presente documento "extracto de SPE". Dependiendo del principio de separación empleado en la SPE (es decir, retardo del analito en la fase sólida o en la fase líquida), el "extracto de SPE" puede corresponder a la fase líquida de la muestra obtenida después de la incubación con la fase sólida (puesto que en estos modos de realización el analito no se une a la fase sólida) o puede corresponder al eluido obtenido por elución de la fase sólida usando un disolvente/solución de elución (en estos modos de realización el analito se une a la fase sólida y, posteriormente, se eluye). En modos de realización particulares, el analito se puede retardar en la fase sólida y el extracto de SPE puede corresponder al eluido obtenido por elución de la fase sólida usando un disolvente de elución.

50 En algunos modos de realización, el extracto de SPE puede comprender de un 50 % en vol. a un 100 % en vol. de un disolvente orgánico. El disolvente orgánico puede ser metanol o acetonitrilo.

En modos de realización particulares, la SPE puede comprender:

- a) unir/capturar el analito en una fase sólida;
- b) opcionalmente, una o más etapas de lavado; y
- c) eluir el analito de la fase sólida, en la que el eluido obtenido se denomina extracto de SPE y comprende el analito.

60 La unión del analito a la fase sólida puede implicar la incubación de la fase sólida con la muestra durante un tiempo predefinido en condiciones que permitan capturar el analito que se va a detectar.

65 En modos de realización en particular preferentes, la SPE puede ser un flujo de trabajo basado en partículas magnéticas. El flujo de trabajo basado en partículas magnéticas puede comprender:

- a) unir/capturar el analito en las partículas magnéticas;
- b) opcionalmente, una o más etapas de lavado; y

5 c) eluir el analito de la fase sólida, en la que el eluido obtenido se denomina extracto de SPE y comprende el analito.

El flujo de trabajo basado en esferas magnéticas puede comprender además:

10 d) separar el extracto de SPE de las esferas.

Esta separación se puede lograr granulando las esferas magnéticas (por ejemplo, por fuerza magnética) en un primer recipiente de reacción y transfiriendo el eluido a otro recipiente de reacción.

15 En consecuencia, en un aspecto particular, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar o cuantificar un analito en una muestra usando espectrometría de masas, en el que dicho procedimiento comprende:

- a) extraer el analito de la muestra usando un flujo de trabajo basado en partículas magnéticas (por ejemplo, como se describe en otra parte en el presente documento) obteniendo un eluido que comprende el analito;
- 20 b) concentrar el analito, en el eluido, comprendiendo dicha concentración evaporar parcialmente el disolvente del eluido obtenido en a); y
- c) 25 detectar y/o cuantificar el analito en la muestra usando espectrometría de masas.

En otras palabras, "extraer el analito de la muestra usando extracción en fase sólida (SPE) para obtener un extracto de SPE que comprende el analito" puede, en modos de realización de la invención, ser "extraer el analito de la muestra usando un flujo de trabajo basado en partículas magnéticas para obtener un eluido que comprende el analito".

30 Un "flujo de trabajo basado en partículas magnéticas" se refiere a un procedimiento en el que se usan partículas magnéticas (por ejemplo, microesferas magnéticas) para extraer el analito de la muestra. La partícula magnética puede unir el analito mientras otros constituyentes de la muestra se retiran parcial o completamente con la fase líquida.

35 En un modo de realización en particular preferente, la presente invención emplea partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno (por ejemplo, múltiples copias de un anticuerpo o fragmento de antígeno) que se unen específicamente al analito. Estas partículas magnéticas también se denominan en el presente documento "inmunoesferas". En consecuencia, en un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar o cuantificar un analito en una muestra usando espectrometría de masas, en el que dicho procedimiento comprende:

- a) 40 purificar el analito de la muestra usando partículas magnéticas recubiertas con un anticuerpo específico de analito (es decir, inmunoesferas) para obtener un eluido que comprende el analito;
- b) 45 concentrar el analito, en el eluido, comprendiendo dicha concentración evaporar parcialmente el disolvente del eluido obtenido en a); y
- c) 50 detectar y/o cuantificar el analito en la muestra usando espectrometría de masas (por ejemplo, CL-EM).

La SPE del procedimiento de la invención puede comprender una o más etapas de lavado usando una solución de lavado. El procedimiento puede comprender, por ejemplo, una o dos etapas de lavado usando una solución de lavado. Las etapas de lavado se pueden llevar a cabo después de unir/capturar el analito a la fase sólida y antes de eluir el analito de la fase sólida.

55 En los modos de realización en los que el analito se une a una fase sólida y necesita eluirse para formar un extracto de SPE, esto se puede lograr con un disolvente de elución. El disolvente de elución se puede añadir a la fase sólida y la fase sólida se puede incubar en presencia del disolvente de elución. El tiempo de incubación se puede ajustar dependiendo de qué fase sólida se usa y dependiendo de qué tan agresivo es el disolvente de elución.

60 La composición del disolvente de elución para SPE (incluyendo también los flujos de trabajo basados en partículas magnéticas) se puede seleccionar dependiendo de la fase sólida, el analito y el principio de interacción entre el analito y la fase sólida.

65 En modos de realización, el disolvente de elución puede comprender acetonitrilo (ACN), en particular, a una concentración de un 40-100 % en vol., en particular, un 45-90 % en vol., en particular, un 50-70 % en vol., en

particular, un 60 % en vol. Los disolventes de elución basados en ACN mencionados anteriormente se pueden emplear especialmente en modos de realización que usan partículas, tales como las partículas magnéticas divulgadas en otra parte en el presente documento. Estos disolventes de elución también se pueden usar en particular cuando se emplean inmunoesferas.

En modos de realización, el disolvente de elución puede comprender metanol, en particular, a una concentración de un 60-100 % en vol., en particular, un 70-90 % en vol., en particular, un 80 % en vol. El disolvente de elución puede ser una mezcla de metanol y agua. Los disolventes de elución basados en metanol mencionados anteriormente se pueden emplear especialmente en modos de realización que usan partículas, tales como las partículas magnéticas divulgadas en otra parte en el presente documento. Estos disolventes de elución también se pueden usar en particular cuando se emplean inmunoesferas.

El procedimiento de la invención puede comprender usar uno o más patrones internos (PI), en particular, patrones internos marcados con isótopos. Los PI se pueden usar para la cuantificación de los analitos. El uno o más patrones internos se añaden preferentemente a la muestra en una cantidad predefinida y conocida antes de la SPE y la etapa de pretratamiento opcional.

Un "patrón interno (PI)" es típicamente un compuesto que presenta propiedades fisicoquímicas similares a las del analito de interés cuando se somete al flujo de trabajo de detección por espectrometría de masas (es decir, incluyendo cualquier etapa de pretratamiento, enriquecimiento y detección real). Además, típicamente se selecciona un PI de modo que no esté presente de forma natural en las muestras que se van a medir en cantidades significativas (por ejemplo, un 1 % o menos de las cantidades del analito). Aunque el PI presenta propiedades químicas similares o idénticas a las del analito de interés, todavía es claramente distinguible del analito de interés por espectrometría de masas. Por ejemplo, durante la separación cromatográfica, tal como cromatografía de gases o de líquidos, el PI tiene aproximadamente el mismo tiempo de retención que el analito de interés de la muestra. Por tanto, tanto el analito como el PI entran en el espectrómetro de masas al mismo tiempo. Sin embargo, el PI presenta una masa molecular diferente a la del analito de interés de la muestra. Esto permite una distinción por espectrometría de masas de los iones del PI y los iones del analito por medio de sus diferentes proporciones masa/carga (m/z). Ambos se someten a fragmentación y proporcionan iones derivados. Estos iones derivados se pueden distinguir entre sí y de los respectivos iones originales por medio de sus proporciones m/z . En consecuencia, se puede realizar una determinación y cuantificación separadas de las señales del PI y del analito. Puesto que el PI se ha añadido en cantidades conocidas, la intensidad de señal del analito de la muestra se puede atribuir a una cantidad cuantitativa específica del analito. Por tanto, la adición de un PI permite una comparación relativa de la cantidad de analito detectado y posibilita la identificación y cuantificación inequívocas del analito de interés presente en la muestra cuando el analito llega al espectrómetro de masas. Típicamente, pero no necesariamente, el PI es una variante marcada isotópicamente (que comprende, por ejemplo, al menos tres de un marcador ^2H , ^{13}C y/o ^{15}N , etc.) del analito de interés.

Un PI ejemplar, pero no limitante para cuantificar testosterona es $^{13}\text{C}_3$ -testosterona (por ejemplo, disponible en Cerilliant). Un PI ejemplar, pero no limitante para cuantificar estradiol es $^{13}\text{C}_3$ -estradiol (por ejemplo, disponible en Cerilliant).

El análisis de espectrometría de masas puede implicar cromatografía de líquidos (CL). En modos de realización en particular preferentes, el análisis de espectrometría de masas puede ser CL-EM o CL-EM-EM.

En modos de realización, la cromatografía de líquidos puede ser cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). La HPLC se puede basar en diferentes materiales de columna conocidos en la técnica. El caudal de la HPLC se puede adaptar dependiendo del analito y las necesidades. En modos de realización específicos, el caudal de la HPLC puede ser de 0,20-1,0 ml/min, en particular, 0,44 ml/min.

En algunos modos de realización, la cromatografía de líquidos del análisis de espectrometría de masas puede ser CL rápida.

En algunos modos de realización, la cromatografía de líquidos del análisis de espectrometría de masas puede ser micro-CL.

En algunos modos de realización, la cromatografía de líquidos del análisis de espectrometría de masas puede ser UHPLC, por ejemplo, UHPLC usando una micro-CL.

En algunos modos de realización, el principio de separación de HPLC puede ser una HPLC de fase inversa (RP-HPLC). La RP-HPLC puede ser, pero no se limita a, una C_{18} -HPLC.

La ionización en el análisis de espectrometría de masas se puede basar en diferentes técnicas como se describe en otra parte en el presente documento. En un modo de realización, ionización por electronebulización (ESI).

El dispositivo de EM usado para el análisis de espectrometría de masas puede ser un espectrómetro de masas en

tándem, en particular, un dispositivo de triple cuadrupolo.

En un modo de realización particular, el procedimiento de la invención puede ser automatizado. "Automatizado" quiere decir que, excepto para la etapa de aplicar la muestra y los reactivos al sistema, se requieren una o menos etapas de manipulación manual, preferentemente ninguna. Las etapas de manipulación manual incluyen, en particular, la adición manual de un reactivo a la muestra y la transferencia de la muestra durante el procesamiento de un dispositivo a otro.

En modos de realización, el procedimiento de la invención puede no comprender una etapa de centrifugación. En particular, la SPE y/o la concentración se puede llevar a cabo sin centrifugación. Evitar una etapa de centrifugación (por ejemplo, usando un flujo de trabajo de SPE basado en esferas magnéticas) tiene la ventaja de que se puede automatizar más fácilmente y de que un sistema de preparación de muestras no requiere una centrifugadora. Además, se puede reducir el tiempo para separar la fase sólida durante la SPE.

En modos de realización, el procedimiento de la invención puede no comprender extracción líquido-líquido, en particular, no en la preparación de muestras. En otras palabras, las etapas de SPE y las de concentración pueden ser las únicas etapas de preparación de muestras antes de la espectrometría de masas (por ejemplo, CL-EM, en particular, CL-EM/EM). Las etapas de extracción líquido-líquido, típicamente, son engorrosas y consumen disolventes orgánicos.

El procedimiento de la invención se puede realizar, en particular, en un modo compatible con acceso aleatorio y usando un sistema compatible con acceso aleatorio. "Acceso aleatorio" quiere decir preferentemente que los reactivos y las configuraciones de sistema de la invención descrita son compatibles con otros ensayos que abordan diferentes analitos sin necesidad de adaptación o equilibrio de sistema, en particular, adaptación o equilibrio de sistema manual (incluyendo cambios en las configuraciones de espectrometría de masas y/o CL).

El análisis de espectrometría de masas del procedimiento de la invención se puede llevar a cabo usando un modo de seguimiento de reacciones múltiples (MRM).

En un aspecto, la presente invención también proporciona un procedimiento para preparar una muestra para un análisis de espectrometría de masas (por ejemplo, CL-EM/EM) que detecta y/o cuantifica un analito, comprendiendo dicho procedimiento:

a) extraer el analito de la muestra usando extracción en fase sólida (SPE) para obtener un extracto de SPE que comprende el analito;

b) concentrar el analito, comprendiendo dicha concentración evaporar el disolvente del extracto de SPE obtenido en a).

Lo que se ha dicho anteriormente con respecto al procedimiento para detectar y/o cuantificar del analito se aplica *mutatis mutandis* al procedimiento para preparar una muestra para un análisis de espectrometría de masas (por ejemplo, CL-EM/EM) detectando o cuantificando el analito.

La frase "espectrometría de masas" ("esp. de masas" o "EM") se refiere a una tecnología analítica usada para identificar compuestos por su masa. La EM es un procedimiento de filtración, detección y medición de iones en base a su proporción de masa con respecto a carga o "m/z". La tecnología de EM incluye, en general, (1) ionizar compuestos para formar compuestos cargados; y (2) detectar la proporción de masa con respecto a carga. Los compuestos se pueden ionizar y detectar por cualquier medio adecuado. Un "espectrómetro de masas" incluye, en general, un ionizador y un detector de iones. En general, se ionizan una o más moléculas de interés y, posteriormente, se introducen los iones en un instrumento espectrográfico de masas donde, debido a una combinación de campos magnéticos y eléctricos, los iones siguen una trayectoria en el espacio que depende de la masa ("m") y la carga ("z"). El término "ionización" o "ionizar" se refiere al procedimiento de generar un ion de analito que tiene una carga eléctrica neta igual a una o más unidades de electrón. Los iones negativos son aquellos que tienen una carga neta negativa de una o más unidades de electrón, mientras que los iones positivos son aquellos que tienen una carga neta positiva de una o más unidades de electrón. El procedimiento de EM se puede realizar en "modo de iones negativos", en el que se generan y detectan iones negativos, o bien en "modo de iones positivos", en el que se generan y detectan iones positivos.

La "espectrometría de masas en tándem" o "EM/EM" implica múltiples etapas de selección y detección por espectrometría de masas, en la que la fragmentación del analito se produce entre las etapas. En un espectrómetro de masas en tándem, los iones se forman en la fuente de iones y se separan por la proporción de masa con respecto a carga en la primera fase de la espectrometría de masas (EM1). Se seleccionan iones de una proporción de masa con respecto a carga particular (iones precursores o iones originales) y se crean iones fragmentados (también denominados iones derivados) por disociación inducida por colisión, reacción ion-molécula y/o fotodisociación. A continuación, los iones resultantes se separan y detectan en una segunda fase de espectrometría de masas (EM2).

Típicamente, para la medición por espectrometría de masas, se realizan las tres etapas siguientes:

(1.) se ioniza una muestra que comprende un analito de interés, normalmente por formación de aductos con cationes, a menudo por protonación a cationes. Las fuentes de ionización incluyen, pero no se limitan a, ionización por electronebulización (ESI) e ionización química a presión atmosférica (IQPA).

(2.) se clasifican y separan los iones de acuerdo con su masa y carga. La espectrometría de movilidad iónica de forma de onda asimétrica de alto campo (FAIMS) se puede usar como filtro de iones.

(3.) se detectan, a continuación, los iones separados, por ejemplo, en modo de reacciones múltiples (MRM) y se muestran los resultados en un gráfico.

El término "ionización por electronebulización" o "ESI" se refiere a procedimientos en los que se hace pasar una solución a lo largo de una corta longitud de un tubo capilar, hasta el extremo del que se aplica un alto potencial eléctrico positivo o negativo. Se vaporiza (nebuliza) una solución que llega al extremo del tubo en un chorro o pulverizador de gotitas muy pequeñas de solución en vapor de disolvente. Esta niebla de gotitas fluye a través de una cámara de evaporación, que se calienta ligeramente para evitar la condensación y para evaporar el disolvente. A medida que las gotitas se hacen más pequeñas, la densidad de carga de superficie eléctrica se incrementa hasta dicho momento en que la repulsión natural entre cargas similares provoca que se liberen iones, así como moléculas neutras.

El término "ionización química a presión atmosférica" o "IQPA" se refiere a procedimientos de espectrometría de masas que son similares a ESI; sin embargo, la IQPA produce iones por reacciones ion-molécula que se producen dentro de un plasma a presión atmosférica. El plasma se mantiene por una descarga eléctrica entre el capilar pulverizador y un contraelectrodo. Los iones se extraen típicamente en el analizador de masas por el uso de un conjunto de fases de filtrado con separador de partículas sólidas (*skimmer*) mediante bombeo diferencial. Se puede usar un contraflujo de gas N₂ seco y precalentado para mejorar la retirada del disolvente. La ionización en fase gaseosa en IQPA puede ser más eficaz que ESI para analizar entidades menos polares.

El "modo de reacciones múltiples" o "MRM" es un modo de detección para un instrumento de EM en el que se detectan y/o cuantifican selectivamente un ion precursor (también denominado ion original) y uno o más iones fragmentados.

Puesto que un espectrómetro de masas separa y detecta iones de masas ligeramente diferentes, distingue fácilmente diferentes isótopos de un elemento dado. Por tanto, la espectrometría de masas es un procedimiento importante para la determinación de masas exacta y la caracterización de analitos, incluyendo, pero sin limitarse a, analitos de bajo peso molecular, péptidos, polipéptidos o proteínas. Sus aplicaciones incluyen la identificación de proteínas y sus modificaciones postraduccionales, la elucidación de complejos proteicos, sus subunidades e interacciones funcionales, así como la medición global de proteínas en proteómica. La secuenciación *de novo* de péptidos o proteínas por espectrometría de masas se puede realizar típicamente sin conocimiento anterior de la secuencia de aminoácidos.

La determinación por espectrometría de masas se puede combinar con procedimientos analíticos adicionales, incluyendo procedimientos cromatográficos, tales como cromatografía de gases (CG), cromatografía de líquidos (CL), en particular HPLC, y/o técnicas de separación basadas en movilidad iónica.

En el contexto de la presente divulgación, la muestra puede ser una muestra derivada de un "individuo" o "sujeto". Típicamente, el sujeto es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, animales domésticos (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos, tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En modos de realización preferentes, la muestra se obtiene de un ser humano.

El término "cromatografía" se refiere a un procedimiento en el que una mezcla química transportada por un líquido o gas se separa en componentes como resultado de la distribución diferencial de las entidades químicas a medida que fluyen alrededor de o sobre, mientras interactúan con, una fase líquida o sólida estacionaria.

El término "cromatografía de líquidos" o "CL" se refiere a un procedimiento de retardo selectivo de uno o más componentes de una solución fluida a medida que el fluido se filtra uniformemente a través de una columna de una sustancia finamente dividida o a través de rutas de paso capilares. El retardo resulta de la distribución de los componentes de la mezcla entre una o más fases estacionarias y el fluido a granel (es decir, la fase móvil), a medida que este fluido se mueve en relación con la(s) fase(s) estacionaria(s). Los procedimientos en los que la fase estacionaria es más polar que la fase móvil (por ejemplo, tolueno como fase móvil, sílice como fase estacionaria) se denominan cromatografía de líquidos en fase normal (NPLC) y los procedimientos en los que la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil (por ejemplo, mezcla de agua-metanol como fase móvil y C18 (octadecilsililo) como fase estacionaria) se denominan cromatografía de líquidos en fase inversa (RPLC).

"Cromatografía de líquidos de alto rendimiento" o "HPLC" se refiere a un procedimiento de cromatografía de líquidos en el que el grado de separación se incrementa forzando la fase móvil bajo presión a través de una fase estacionaria, típicamente una columna de relleno denso. Típicamente, la columna se rellena con una fase estacionaria compuesta por partículas de conformación irregular o esférica, una capa monolítica porosa o una membrana porosa. Históricamente, la HPLC se divide en dos subclases diferentes en base a las polaridades de las fases móvil y estacionaria, a saber, NP-HPLC y RP-HPLC.

Micro-CL se refiere a un procedimiento de HPLC que usa una columna que tiene un diámetro de columna interno estrecho, típicamente inferior a 1 mm, por ejemplo, aproximadamente 0,5 mm. "Cromatografía de líquidos de ultraalto rendimiento" o "UHPLC" se refiere a un procedimiento de HPLC que usa una alta presión de, por ejemplo, 120 MPa (17.405 lbf/in²), o aproximadamente 1200 atmósferas.

CL rápida se refiere a un procedimiento de CL que usa una columna que tiene un diámetro interno como se menciona anteriormente, con una longitud corta <2 cm, por ejemplo, 1 cm, aplicando un caudal como se menciona anteriormente y con una presión como se menciona anteriormente (micro-CL, UHPLC). El protocolo de CL rápida corta incluye una etapa de captura/lavado/elución usando una única columna analítica y realiza la CL en un tiempo muy corto <1 min.

Otros modos de CL bien conocidos incluyen cromatografía de interacción hidrófila (CIH), CL de exclusión por tamaño, CL de intercambio iónico y CL de afinidad.

La separación por CL puede ser CL unicanal o CL multicanal que comprende una pluralidad de canales de CL dispuestos en paralelo. En CL, los analitos se pueden separar de acuerdo con su polaridad o valor de log P, tamaño o afinidad, como es conocido, en general, para el experto en la técnica.

Como se usa en el presente documento, "detección" o "detectar" el analito en una muestra quiere decir al menos determinar si el analito está presente o ausente en la muestra. La detección de un analito puede incluir o no cuantificar dicho analito, es decir, determinar la cantidad absoluta o relativa del analito.

Como se usa en el presente documento, "cuantificación" o "cuantificar" el analito en una muestra quiere decir determinar la presencia y cantidad de dicho analito en la muestra. La cantidad puede ser una cantidad absoluta o relativa del analito en la muestra. La cantidad absoluta puede ser cualquier medida cuantitativa tal como, por ejemplo, una concentración o masa. La cantidad relativa puede ser cualquier medida cuantitativa relativa. Por ejemplo, se puede detectar la cantidad del analito en relación con la cantidad de otro ingrediente de la muestra, un patrón interno añadido a la muestra o una muestra de referencia que comprende el mismo o más analitos.

"Concentración final" como se usa en el presente documento en el contexto de añadir un agente y/o composición a una muestra se refiere a la concentración del agente y/o composición en la mezcla obtenida añadiendo dicho agente y/o composición a la muestra.

El término "disolvente" incluye cualquier disolvente o mezcla de disolventes que mantiene los analitos de interés (por ejemplo, el uno o más esteroides) en solución. Los ejemplos ejemplares, pero no limitantes de disolventes o componentes de mezclas de disolventes son agua, alcoholes (por ejemplo, metanol o etanol) y acetonitrilo.

Los "esteroides" son un grupo de moléculas conocidas en la técnica. Un esteroide es un compuesto con una estructura central de típicamente cuatro anillos, también denominados anillos esteroideos A, B, C y D. La estructura de anillo central de los esteroides está compuesta, típicamente, por diecisiete átomos de carbono, que están enlazados en cuatro anillos condensados: tres anillos de ciclohexano de seis átomos de C (anillos A, B y C) y un anillo de ciclopentano de cinco átomos de C (anillo D). Los esteroides varían por los grupos funcionales fijados a sus cuatro anillos y por el estado de oxidación de los anillos. Algunos esteroides también comprenden cambios en la estructura de anillo, en cuanto a que uno de los cuatro anillos está abierto.

La palabra "comprenden", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas indicados, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

Como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen también los respectivos términos en plural, a menos que el contenido lo indique claramente de otro modo.

Además, como se usa en lo que sigue, las expresiones "en particular", "más en particular", "específicamente", "más específicamente" o expresiones similares (por ejemplo, preferentemente o más preferentemente) se usan junto con rasgos característicos de (un) modo(s) de realización particular(es) o alternativo(s), sin restringir posibilidades alternativas. El procedimiento/sistema divulgado se puede realizar, como lo reconocerá el experto en la técnica, usando rasgos característicos alternativos. De forma similar, los rasgos característicos introducidos por "en un

modo de realización del procedimiento/sistema divulgado", "en modos de realización" o expresiones similares están destinados a ser rasgos característicos adicionales y/o alternativos, sin ninguna restricción con respecto a modos de realización alternativos, sin ninguna restricción con respecto al alcance del procedimiento/sistema divulgado y sin ninguna restricción con respecto a la posibilidad de combinar los rasgos característicos introducidos de dicha manera con otros rasgos característicos opcionales o no opcionales del procedimiento/sistema divulgado.

Los porcentajes, concentraciones, cantidades y otros datos numéricos se pueden expresar o presentar en el presente documento en un formato de "intervalo". En el contexto de la presente divulgación se ha de entender que un formato de intervalo de este tipo se usa simplemente por conveniencia y brevedad y, por tanto, se debe interpretar de forma flexible para incluir no solo los valores numéricos explícitamente citados como los límites del intervalo, sino también para incluir todos los valores numéricos individuales o subintervalos englobados dentro de ese intervalo como si cada valor numérico y subintervalo se citara explícitamente. Como ilustración, se debe interpretar que un intervalo numérico de "de un 4 % a un 20 %" incluye no solo los valores explícitamente citados de un 4 % a un 20 %, sino que también incluye valores individuales y subintervalos dentro del intervalo indicado. Por tanto, en este intervalo numérico se incluyen valores individuales, tales como un 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, ... 18, 19, 20 % y subintervalos, tales como de un 4-10 %, 5-15 %, 10-20 %, etc. Este mismo principio se aplica a los intervalos que citan valores mínimos o máximos. Además, se debe aplicar una interpretación de este tipo con independencia de la amplitud del intervalo o de las características que se describen.

El término "aproximadamente", cuando se usa en conexión con un valor numérico, pretende englobar valores numéricos dentro de un intervalo que tiene un límite inferior que es un 5 % más pequeño que el valor numérico indicado y que tiene un límite superior que es un 5 % más grande que el valor numérico indicado.

En la presente divulgación, la referencia a disolventes y soluciones a veces se hace en %, % (v/v) o % en vol. de un determinado compuesto. Siempre que no se especifique de otro modo, la solución o disolvente es una solución acuosa. Por ejemplo, MeOH al 80 %, MeOH al 80 % (v/v) o al 80 % en vol. se refieren a una mezcla acuosa que comprende 80 por ciento en volumen de MeOH.

Se proporcionan los siguientes ejemplos y figuras para ayudar al entendimiento de la presente invención, de la que su verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

Figura 1: comparación de la señal de analito (A) y la recuperación (B) para el analito testosterona usando flujos de trabajo sin evaporación (dilución simple), con evaporación completa y con evaporación parcial. Se distribuyeron muestras que contenían 60 pg/ml de testosterona en MeOH al 60 % en tres grupos de prueba de alícuotas de 40 µl. Para el primer grupo de prueba, se diluyeron las muestras con 40 µl de H₂O hasta un volumen final total de 80 µl para servir como grupo de prueba de control (recuperación de un 100 %). Para los segundo y tercer grupos de prueba, las muestras se evaporaron hasta total sequedad (evaporación completa) y, a continuación, se reconstituyeron con 40 µl de MeOH al 30 % o bien se evaporaron hasta un volumen de 10 µl (evaporación parcial) y, a continuación, se diluyeron con 30 µl de MeOH al 30% hasta un volumen final total de 40 µl. Todas las muestras contenían la misma cantidad de analito y un contenido orgánico final de MeOH al 30 %.

Figura 2: ilustraciones esquemáticas del flujo de trabajo con dilución estándar (parte superior) y flujos de trabajo con evaporación completa y parcial (parte inferior) optimizados para maximizar la sensibilidad de detección y el rendimiento cromatográfico. También se representa un flujo de trabajo con evaporación completa como se usa en la figura 1 (centro). Todos los flujos de trabajo se desarrollan mezclando 150 µl de muestra y patrón interno, adición de un pretratamiento para liberar los analitos de las proteínas de unión, enriquecimiento de analito por esferas magnéticas recubiertas con anticuerpo y minimización de los componentes de matriz no unidos lavando dos veces con agua. Se liberó el analito usando 60 µl o 150 µl de tampón de elución de MeOH al 80 %, seguido de transferencia de 40 µl o 130 µl de eluido a un recipiente de reacción nuevo para flujos de trabajo estándar y con evaporación, respectivamente. En el flujo de trabajo normal, se diluyen 40 µl de eluido con 67 µl de agua y, para los flujos de trabajo con evaporación, la muestra se evapora hasta total sequedad (evaporación completa) o bien hasta de 20 a 40 µl (evaporación parcial), y la muestra se diluye opcionalmente con agua para proporcionar un volumen final de 40 µl. Para todos los flujos de trabajo, se inyectan 20 µl para el análisis CL-EM.

Figuras 3 y 4: cromatogramas de iones extraídos de 2 pg/ml de estradiol añadidos en UniDil que comparan el flujo de trabajo estándar (figura 3) y el flujo de trabajo con evaporación parcial optimizado (figura 4). El pico cromatográfico de analito se pudo detectar claramente usando el ensayo con evaporación, pero no con el ensayo estándar.

Figuras 5 y 6: las proporciones de área de pico de analito/PI fueron las mismas para el flujo de trabajo estándar y el flujo de trabajo con evaporación optimizado (A), y el ajuste lineal del área de pico de analito y la concentración de analito demostró que el flujo de trabajo con evaporación tiene una mayor pendiente (B) para estradiol añadido en UniDil (figura 5) y testosterona añadida en suero Golden West (figura 6).

Ejemplos**Materiales y procedimientos**5 **Producción de inmunoesferas magnéticas específicas de analito**

Para producir esferas magnéticas recubiertas con anticuerpos específicos de analito (inmunoesferas), se usó una suspensión de esferas de estreptavidina Elecsys® y se recubrieron las esferas con anticuerpos específicos de analito. Para el recubrimiento, se separaron las esferas magnéticas (1 mg/ml) por separación magnética, se lavaron las esferas con tampón PBS y se agitaron en vórtex. El lavado se repitió dos veces. Después de la etapa de lavado final, se retiró el sobrenadante y se añadió a las esferas una solución que comprendía el anticuerpo marcado con biotina dirigido a un analito. Se añadió la respectiva solución de anticuerpo antianalito (50 µg/ml) en un volumen igual al volumen de las esferas y se incubó la mezcla durante la noche a 4 °C. Finalmente, se llevaron a cabo tres etapas de lavado usando PBS para retirar los anticuerpos no unidos. Se resuspendieron las esferas lavadas en un volumen equivalente al volumen original de esferas para garantizar una concentración final de 1 mg/ml.

Para la producción de inmunoesferas magnéticas específicas de testosterona, se acopló a las esferas un anticuerpo monoclonal antitestosterona marcado con biotina. Para la producción de inmunoesferas magnéticas específicas de estradiol, se acopló a las esferas un anticuerpo monoclonal antiestradiol marcado con biotina.

Muestras

En el contexto de la invención se emplearon diferentes muestras. Las muestras incluían específicamente soluciones enriquecidas con cantidades definidas del respectivo analito. En el respectivo ejemplo se especifica en qué matriz se añadió el respectivo analito. Las matrices usadas en los ejemplos incluyeron una solución de MeOH al 60 % en vol., UniDil y suero Golden West (Golden West Diagnostic LLC; núm. cat. MSG4000).

Patrones internos usados para espectrometría de masas cuantitativa

Como patrones internos se usaron isótopos marcados con isotipos pesados de los respectivos analitos. Para la detección de testosterona, se usó ¹³C3-testosterona (de Cerilliant). Para la cuantificación de estradiol, se usó ¹³C3-estradiol (de Cerilliant). A menos que se indique de otro modo, se añadieron 10 µl de una solución de patrón interno de 10 ng/ml en un volumen de muestra de 150 µl antes del pretratamiento y la extracción en fase sólida basada en inmunoesferas.

Pretratamiento de muestras

Los analitos usados en los ejemplos a continuación son esteroides. Los esteroides se pueden unir a proteínas de unión en el contexto de muestras tales como suero o plasma. Por lo tanto, se llevó a cabo un pretratamiento para liberar los esteroides de las proteínas de unión antes del enriquecimiento de los analitos por extracción en fase sólida basada en inmunoesferas. Para el pretratamiento, se añadieron 50 µl de una solución acuosa de MeOH al 30 % en vol. a 150 µl de muestra y se mezcló la muestra por agitación en vórtex.

Extracción de analitos en fase sólida basada en inmunoesferas

Para extraer y/o enriquecer el analito de la muestra se realizó una extracción en fase sólida basada en inmunoesferas. Para este fin, se añadieron las inmunoesferas magnéticas específicas de analito (véase anteriormente) a la muestra pretratada enriquecida con un patrón interno. Específicamente, se añadieron 40 µl de una solución de 1 mg/ml. Se agitó en vórtex la mezcla y se incubó durante 7,5 min a 37 °C para permitir la unión del analito a las esferas. Posteriormente, se lavaron las esferas con 200 µl de agua dos o tres veces. Finalmente, se eluyó el analito de las esferas usando una elución acuosa de metanol al 80 %. Para los experimentos que implicaron una etapa de evaporación posterior (completa o parcial) se usó un volumen de solución de elución de 150 µl. Se usó un volumen de 60 µl de solución de elución para flujos de trabajo sin evaporación. Para la elución, se separaron las esferas magnéticas por fuerza magnética después de la última etapa de lavado, se retiró el sobrenadante, se añadió la solución de elución a las esferas y se agitó en vórtex la mezcla de esferas y solución de elución y se incubó durante 2 min a 37 °C. Finalmente, se separaron las esferas por fuerza magnética y se retiraron 130 µl (flujo de trabajo incluyendo evaporación) o 40 µl (flujo de trabajo sin evaporación) del sobrenadante eluido (también denominado extracto de extracción en fase sólida) que comprendía el analito y se pipetearon en un recipiente nuevo.

Posteriormente, se sometió el eluido recuperado a evaporación (completa o parcial; véase a continuación) o bien, en los flujos de trabajo que no implicaron evaporación, se diluyeron los 40 µl del eluido recuperado hasta un volumen final de 107 µl usando CL-DIL.

Evaporación

Se llevó a cabo la evaporación de un eluido de SPE basada en inmunoesferas o soluciones enriquecidas aplicando vacío y calentando a de 50 a 100 °C usando un dispositivo hecho a medida. El volumen de partida fue, si no se indica de otro modo, de 130 µl.

Para una evaporación completa, se evaporó la muestra hasta sequedad. El sedimento restante se resolvió posteriormente en 40 µl de CL-DIL usando agitación en vórtex.

Para la evaporación parcial, se llevó a cabo la evaporación hasta que quedaba un volumen de disolvente final de 20 a 40 µl. El volumen final antes de someter la muestra a CL-EM se ajustó a 40 µl (si era necesario) usando CL-DIL.

Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) acoplada a EM

La cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) se realizó usando un sistema de CL Agilent 1200 Infinity II (Waldbronn, Alemania) y el sistema de inyección y muestreador automático de CL PAL (Zwingen, Suiza). El instrumento se controló por medio del controlador de dispositivo Analyst de AB Sciex. La separación cromatográfica se realizó usando una columna de HPLC C18 (1,0 o 2,1 mm de d.i. x 50 mm) rellena con partículas de núcleo fusionado de 2,6 µm SunShell de ChromaNik (Osaka, Japón). Los disolventes de CL usados fueron (A) agua y (B) NH₄F 0,2 mM en metanol, y el caudal usado fue de 440 µl/min. El gradiente de CL se estableció aumentando gradualmente de entre un 39 % y un 60 % de solución B a entre un 90 % y un 98 % de solución B dentro de 0,7 a 1,2 min. El volumen inyectado en el sistema de CL-EM fue de 20 µl independientemente del flujo de trabajo de preparación de muestras (con o sin evaporación).

Espectrometría de masas (EM)

La detección por espectrometría de masas se llevó a cabo usando un sistema de CL-EM/EM de triple cuadrupolo 6500+ de AB Sciex (Darmstadt, Alemania) o dispositivos de EM comparables.

Se seleccionó la configuración de EM para la medición de testosterona para que estuviera en modo positivo y se optimizó la configuración de EM para la sensibilidad. Se seleccionó la configuración de EM para la medición de estradiol para que estuviera en modo negativo y también se optimizó para la sensibilidad.

Análisis de datos

Los sistemas de EM usaron una configuración optimizada para los analitos y el programa informático asociado para el control del aparato y el análisis de datos. Los picos cromatográficos de las transiciones de MRM selectivas de analito se integraron por ajustes gaussianos para generar áreas de pico y relación señal-ruido (S/N) para el analito y los patrones internos, que se comparan directamente a partir de diferentes flujos de trabajo (es decir, flujos de trabajo con dilución, con evaporación parcial y con evaporación completa) para comparar la potenciación de sensibilidad o la recuperación. Se usaron proporciones analito/PI para evaluar además la precisión y sensibilidad del procedimiento de CL-EM y comparar los diferentes flujos de trabajo.

Ejemplo 1: concentración de testosterona en una muestra pura usando evaporación completa y parcial

En este ejemplo, se comparan tres flujos de trabajo diferentes de manipulación de muestras enriquecidas antes de someterlas a CL-EM: (1) dilución de la muestra; (2) evaporación completa; y (3) evaporación parcial.

Específicamente, se produjeron muestras que contenían 60 pg/ml de testosterona en MeOH al 60 % en vol. Estas muestras imitan los eluidos/extractos como se obtienen por elución a partir de SPE basada en esferas, especialmente a partir de SPE basada en inmunoesferas, como también se usan en el presente documento a continuación y se describen en los procedimientos anteriores.

Para las muestras sometidas al flujo de trabajo con dilución, se diluyeron las muestras con 40 µl de H₂O hasta un volumen final total de 80 µl. Para las muestras sometidas a evaporación completa, se evaporaron las muestras hasta total sequedad y, a continuación, se reconstituyeron con 40 µl de MeOH al 30 %. Para las muestras usadas para evaporación parcial, se evaporan las muestras hasta 10 µl (evaporación parcial) y, a continuación, se diluyen con 30 µl de MeOH al 30 % hasta un volumen final total de 40 µl. Se garantizó que todas las muestras contuvieran un contenido orgánico final de MeOH al 30 %.

Finalmente, se sometieron las muestras a CL-EM y se midió la intensidad de señal para la testosterona (véase la figura 1A). En base a la configuración de la intensidad para el flujo de trabajo con dilución a un 100 %, se calculó la recuperación de testosterona para los dos flujos de trabajo con evaporación en porcentaje (véase la figura 1B).

Debido a que todas las muestras contenían la misma cantidad de analito, se esperaba que tanto las muestras evaporadas completamente como parcialmente tuvieran una recuperación de analito de un 200 %. Si bien se logró un incremento en la recuperación tanto con evaporación completa como con parcial, la recuperación del analito fue

sorprendentemente significativamente mejor cuando se usó evaporación parcial. Otra ventaja de la evaporación parcial es la duración más corta del procedimiento de evaporación. Acortar el tiempo requerido para la evaporación resulta importante, en particular, en el contexto de la preparación automatizada de muestras y de los sistemas de análisis por CL-EM.

En vista de estos resultados, se seleccionó la evaporación parcial para los experimentos mostrados en los ejemplos adicionales. Siempre que estos ejemplos y las figuras a los que hacen referencia mencionan "evaporación", esto se refiere a "evaporación parcial" como se describe en los procedimientos anteriores.

Ejemplo 2: evaporación parcial frente a dilución de eluidos de inmunoesferas en flujos de trabajo de preparación de muestras de EM para detectar estradiol

Las mediciones por EM diagnósticas no implican, típicamente, muestras puras, sino más bien muestras complejas que comprenden el analito en el contexto de una matriz compleja con otros constituyentes, tales como muestras de sangre (por ejemplo, suero o plasma). Para medir estas muestras, típicamente se usa un flujo de trabajo de preparación de muestras que purifica el analito tanto como sea posible de los constituyentes restantes. Para este fin, se pueden emplear procedimientos tales como SPE. En el presente ejemplo, se usa SPE basada en inmunoesferas que implica la elución del analito a partir de las esferas con soluciones de elución que comprenden un alto contenido de disolvente orgánico (por ejemplo, MeOH o acetonitrilo). Estos disolventes en altas concentraciones pueden interferir con la resolución de CL de un sistema y procedimiento de CL-EM, por ejemplo, por el ensanchamiento de picos. Por lo tanto, los eluidos de SPE típicamente se diluyen antes de la CL-EM para reducir las concentraciones de los disolventes orgánicos antes de la CL. Sin embargo, dicha dilución reduce la concentración de analito y hace que sea más difícil detectar concentraciones bajas en la muestra inicial, especialmente en muestras que comprenden una matriz compleja que muestran típicamente una señal de fondo mayor que las muestras puras.

Para comparar el rendimiento de la evaporación parcial frente a la dilución de la muestra en el contexto de todo un flujo de trabajo de EM, se llevó a cabo un experimento que realizó todo un flujo de trabajo de EM que comprendía (1) adición de un patrón interno, (2) SPE basada en inmunoesferas del analito, (3) evaporación parcial o dilución del eluido de SPE y (4) CL-EM como se describe en la sección Materiales y procedimientos anteriormente.

Las muestras sometidas al flujo de trabajo de EM con dilución y al flujo de trabajo de EM con evaporación fueron 150 µl de UniDil (Elecsys® Diluent Universal) enriquecido con 0,5 pg/ml, 2 pg/ml, 5 pg/ml, 10 pg/ml y 15 pg/ml de estradiol, respectivamente. El flujo de trabajo con dilución y la evaporación parcial usados se representan esquemáticamente en la figura 2.

Los espectros de EM resultantes del flujo de trabajo con dilución y del flujo de trabajo con evaporación parcial para las muestras de 2 pg/ml se muestran en las figuras 3 y 4, respectivamente.

Como es evidente a partir de las figuras 3, usando el flujo de trabajo con dilución, la señal de estradiol no fue detectable en este experimento particular.

Por el contrario, la señal para estradiol fue claramente detectable usando el flujo de trabajo con evaporación parcial (véase la figura 4), lo que indica la sensibilidad incrementada lograda con el flujo de trabajo con evaporación parcial.

En consecuencia, este experimento demuestra que la evaporación parcial puede incrementar la proporción señal-ruido y la sensibilidad de detección de analito (límite inferior de cuantificación), incluso cuando se mide un analito en una matriz más compleja y en el contexto de un flujo de trabajo de preparación de muestras de múltiples etapas para proporcionar una muestra de analito altamente purificada seguida de una separación por CL de alta resolución.

La figura 5B representa la intensidad de señal tanto para el flujo de trabajo con evaporación parcial como para el flujo de trabajo con dilución trazada frente a las concentraciones de analito. Esta figura ilustra que para cada una de las muestras analizadas, la señal (área de pico) para el flujo de trabajo con evaporación parcial se incrementó con respecto al flujo de trabajo con dilución. Además, para ambos flujos de trabajo se logró un intervalo de medición lineal en el intervalo de concentración analizado por encima del LC. Aún, el flujo de trabajo con evaporación parcial muestra una mayor pendiente en la linealidad. La pendiente incrementada es una clara ventaja, puesto que se incrementa la dinámica de señal para una diferencia de concentración dada y, por tanto, se puede incrementar la exactitud.

La figura 5A muestra las proporciones de las señales de analito y el patrón interno (PI) en las concentraciones de analito medidas. Tanto para los flujos de trabajo con dilución como con evaporación parcial, las proporciones son similares y se incrementan linealmente con la misma pendiente en el intervalo de concentración medido.

Ejemplo 3: evaporación parcial frente a dilución de eluidos de inmunoesferas en flujos de trabajo de

preparación de muestras de EM para detectar testosterona

Se repitió una comparación entre el flujo de trabajo con evaporación parcial frente al flujo de trabajo con dilución usando muestras de suero Golden West enriquecidas con el analito testosterona en concentraciones de 25 pg/ml, 150 pg/ml y 250 pg/ml.

Como en el ejemplo 2 anteriormente, se llevó a cabo todo un flujo de trabajo de EM que comprendía (1) adición de un patrón interno, (2) SPE basada en inmunoesferas del analito, (3) evaporación parcial o dilución del eluido de SPE y (4) CL-EM, como se especifica en la sección Materiales y procedimientos anteriormente.

Las muestras sometidas al flujo de trabajo de EM con dilución y al flujo de trabajo de EM con evaporación fueron 150 µl de suero Golden West enriquecido con 25 pg/ml, 150 pg/ml y 250 pg/ml de testosterona, respectivamente. El flujo de trabajo con dilución y la evaporación parcial usados se representan esquemáticamente en la figura 2.

La figura 6B representa la intensidad de señal tanto para el flujo de trabajo con evaporación parcial como para el flujo de trabajo con dilución trazada frente a las concentraciones de analito. Esta figura ilustra que para cada una de las muestras analizadas, la señal (área de pico) para el flujo de trabajo con evaporación parcial se incrementó con respecto al flujo de trabajo con dilución. Además, para ambos flujos de trabajo se logró un intervalo de medición lineal en el intervalo de concentración analizado por encima del límite de cuantificación (LC). Aún, el flujo de trabajo con evaporación parcial muestra una mayor pendiente en la linealidad. La pendiente incrementada es una clara ventaja, puesto que se incrementa la dinámica de señal para una diferencia de concentración dada y, por tanto, se puede incrementar la exactitud.

La figura 6A muestra las proporciones de las señales de analito y el patrón interno (PI) s en las concentraciones de analito medidas. Tanto para el flujo de trabajo con dilución como con evaporación parcial, las proporciones son similares y se incrementan linealmente con la misma pendiente en el intervalo de concentración medido.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar y/o cuantificar un analito en una muestra usando espectrometría de masas, comprendiendo dicho procedimiento:
 - a) extraer el analito de la muestra usando extracción en fase sólida (SPE) para obtener un extracto de SPE que comprende el analito, en el que el extracto de SPE comprende de un 50 % en vol. a un 100 % en vol. de un disolvente orgánico, en el que el analito es un esteroide, preferentemente seleccionado del grupo que consiste en testosterona y estradiol;
 - b) concentrar el analito, comprendiendo dicha concentración evaporar parcialmente el disolvente del extracto de SPE obtenido en a); en el que el volumen del extracto de SPE sometido a la evaporación parcial se reduce en de un 50 % a un 95 %, preferentemente en de un 60 % a un 90 %, más preferentemente en de un 70 % a un 80%;
 - b1) diluir el analito concentrado obtenido de la etapa b) con un disolvente de dilución para obtener un analito diluido, en el que el analito diluido comprende menos de un 50 % en vol. del disolvente orgánico u otro disolvente orgánico antes de la etapa c); y
 - c) detectar y/o cuantificar el analito en la muestra usando espectrometría de masas, en el que la espectrometría de masas es espectrometría de masas acoplada a cromatografía de líquidos (CL-EM).
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además ajustar el volumen después de la evaporación parcial usando una solución diluyente hasta un volumen final correspondiente a de un 5 % a un 40 %, específicamente, a de un 10 % a un 30 % y, más específicamente, a de un 13 % a un 27 % del volumen de la muestra sometida a la SPE en a).
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el volumen de muestra sometido a la SPE en a) es de 250 µl o menos, específicamente, 200 µl o menos, más específicamente, 150 µl o menos e, incluso más específicamente, 150 µl.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el disolvente orgánico se selecciona del grupo que consisten en acetonitrilo y metanol.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra es un líquido, en particular, un líquido biológico, en particular, suero o plasma.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho procedimiento comprende además una etapa de pretratamiento para liberar el analito de una proteína de unión a analito.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la fase sólida usada para la SPE se forma por partículas magnéticas, en particular, microesferas magnéticas.
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la fase sólida de la SPE se forma por partículas que se recubren con un anticuerpo que se une específicamente al analito.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la extracción en fase sólida (SPE) comprende:
 - a) capturar el analito en una fase sólida;
 - b) opcionalmente una o más etapas de lavado de la fase sólida; y
 - c) eluir el analito de la fase sólida para obtener el extracto de SPE que comprende el analito.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el volumen del disolvente de elución añadido corresponde a de un 50 % a un 150 % del volumen de muestra sometido a SPE, específicamente, de un 90 % a un 120 % del volumen de muestra sometido a SPE y, más específicamente, un 100 % del volumen de muestra sometido a SPE.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho procedimiento comprende además añadir un patrón interno (PI) para cuantificación a la muestra antes de la etapa a).
12. El procedimiento de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la cromatografía de líquidos (CL) es HPLC o CL rápida, específicamente, en el que la HPLC es una micro CL (pCL) y/o una cromatografía de líquidos de ultraalto rendimiento (UHPLC).

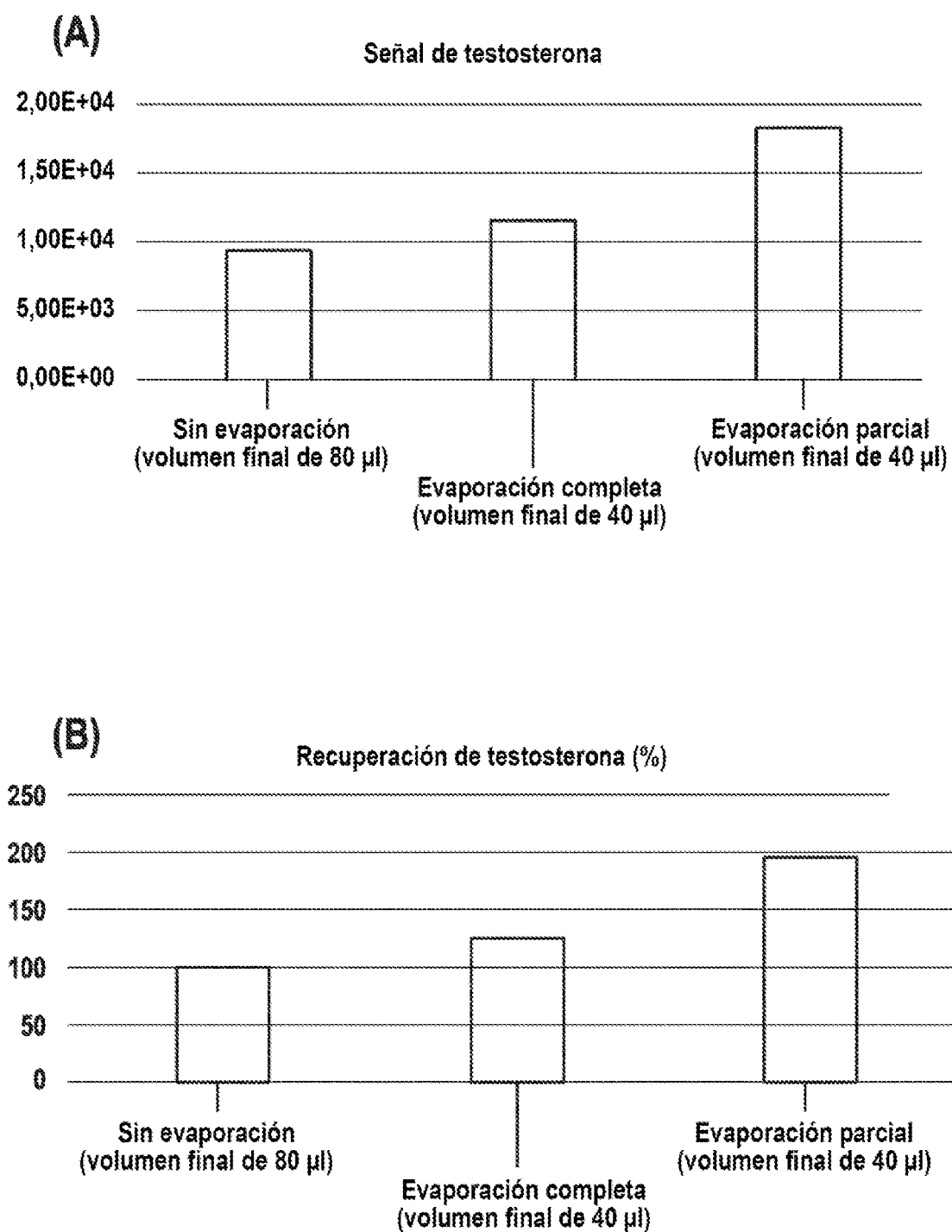
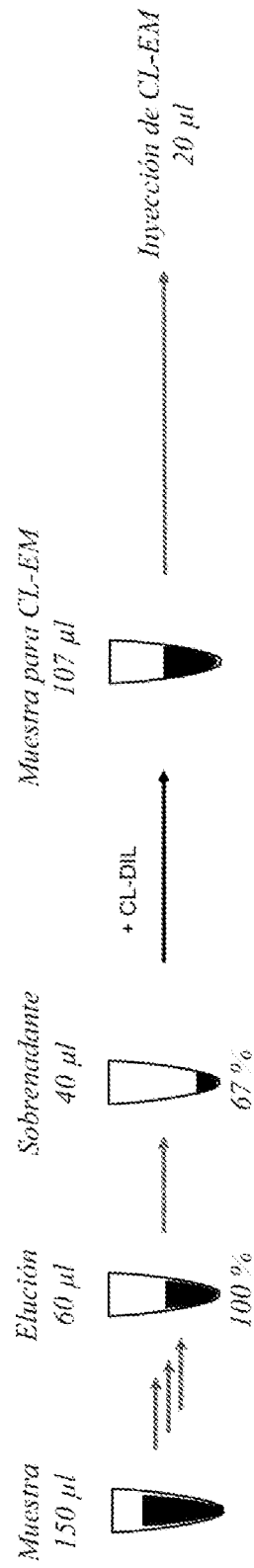
Figura 1

Figura 2

Flujo de trabajo de EM con dilución



Flujos de trabajo de EM con evaporación (parte superior: parcial; parte inferior: evaporación completa)

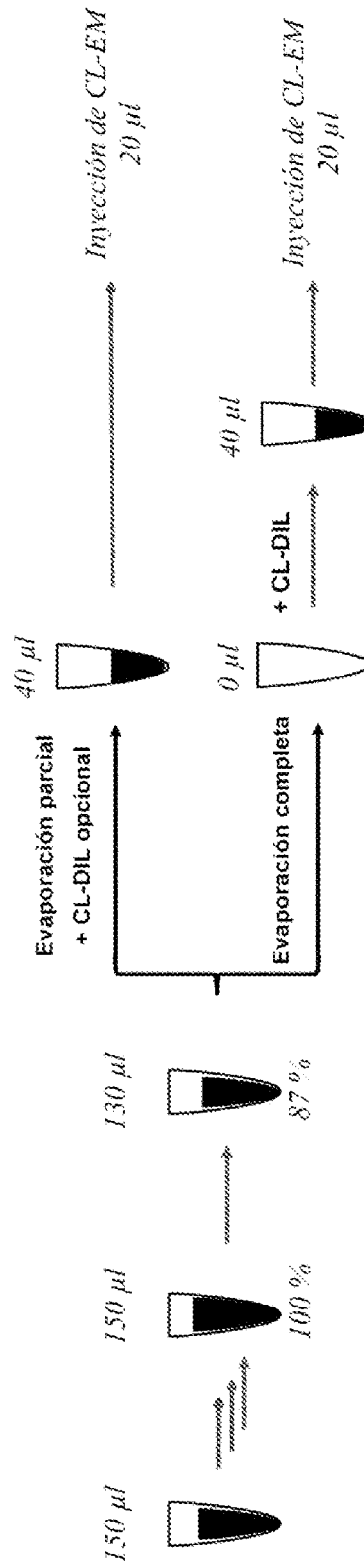


Figura 3

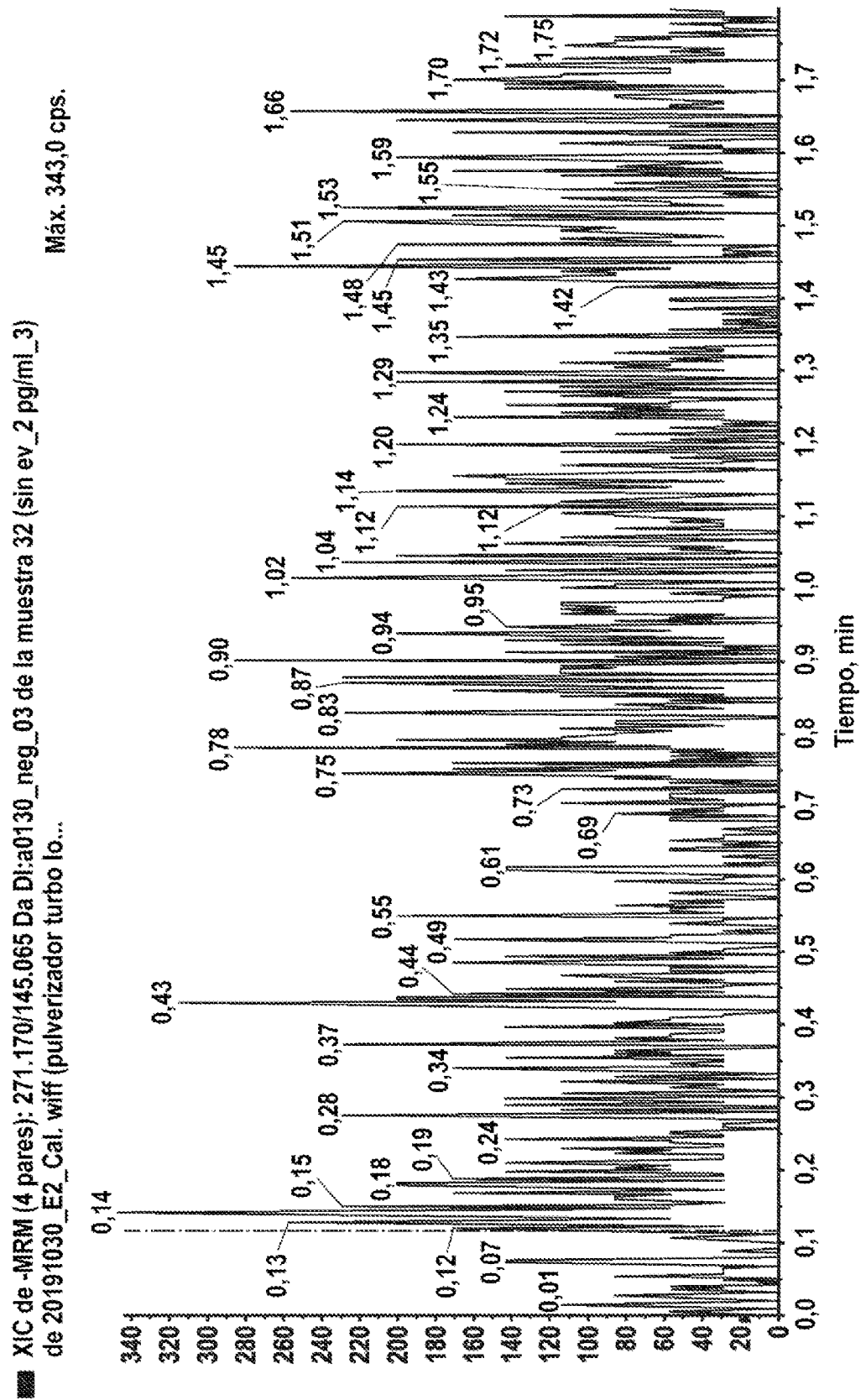


Figura 4

■ XIC de -MRM (4 pares): 271.170/145.065 Da D1:a0130_neg_03 de la muestra 10 (ev_2 pg/ml_2)
de 20191030_E2_Cal_wiff (pulverizador turbo IonDr...

Máx. 771,0 cps.

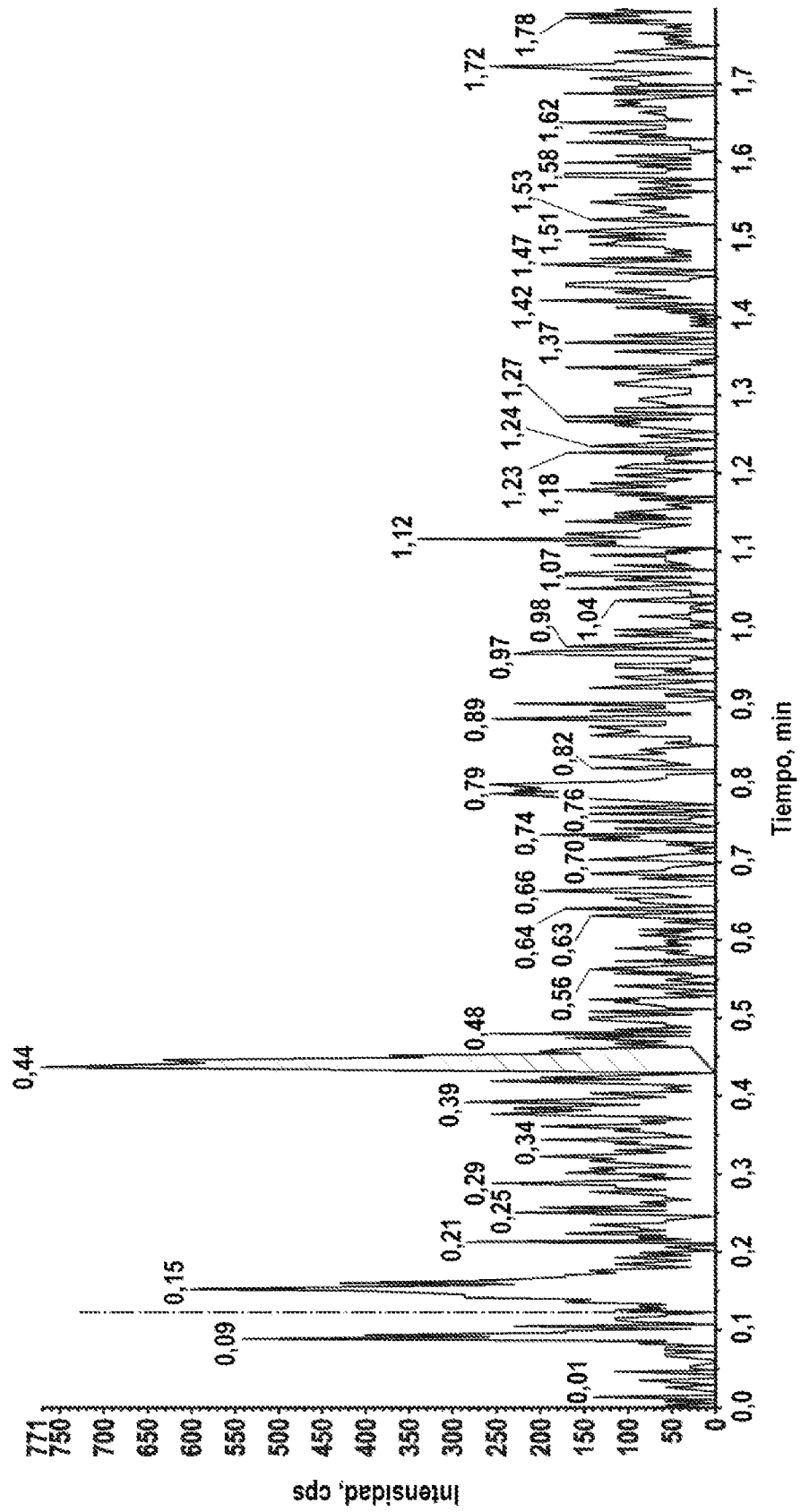


Figura 5

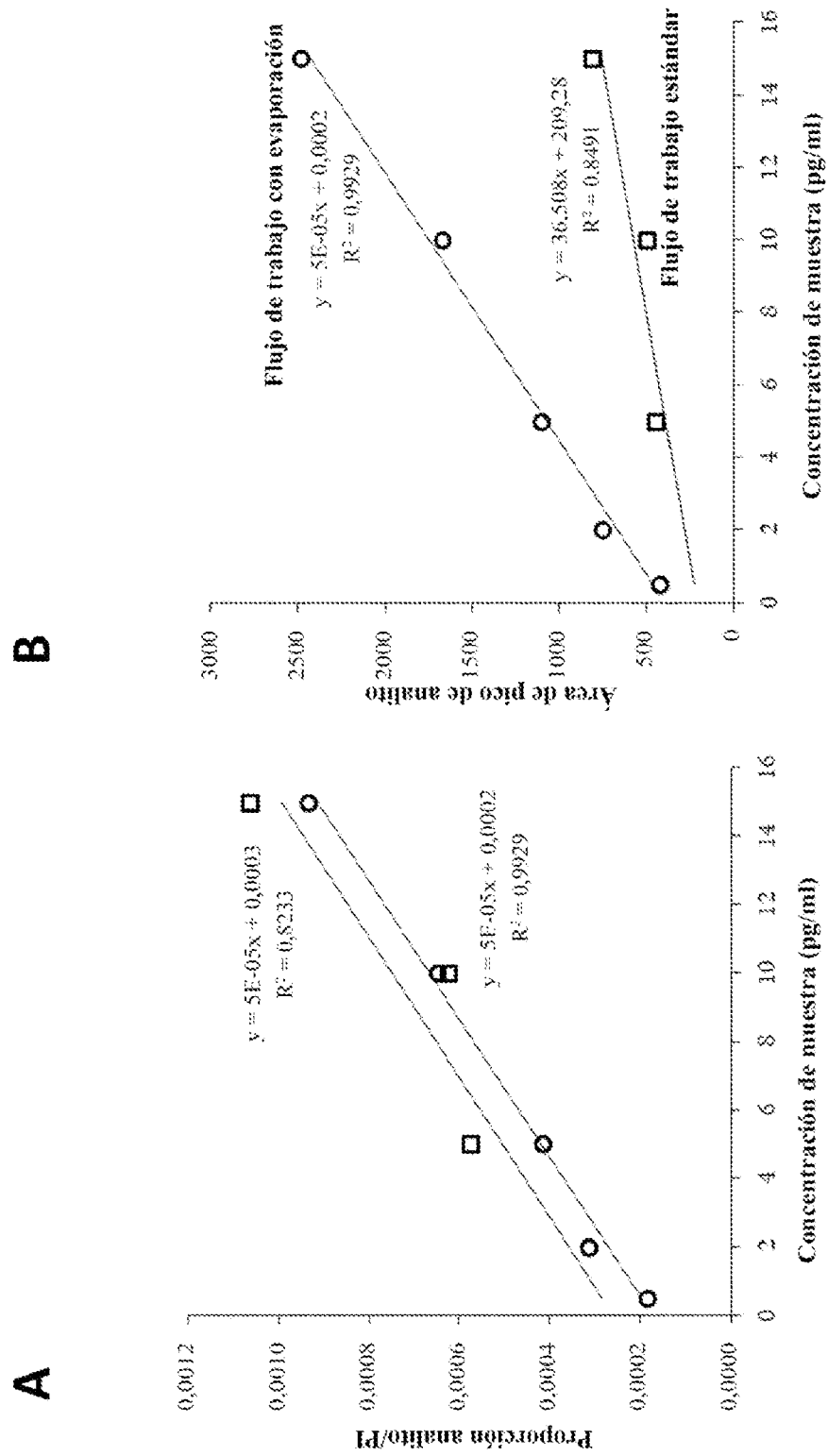


Figura 6

