



Desenvolvimento e validação de um método por CLAE-EM/EM para determinação de PGE₂ e PGD₂ em meio de cultivo celular e avaliação da recuperação das prostaglandinas utilizando diferentes condições na extração em fase sólida

Cleverson Antonio Ferreira Martins¹, Roberto Pontarolo^{1*}

¹ Centro de Estudos em BioFarmácia, Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná – Brasil

RESUMO

Tradicionalmente, estas prostaglandinas são quantificadas por técnicas de imuno-ensaio, que apresentam diversas desvantagens. Estes metabólitos são isômeros estruturais, e dessa forma é necessário o uso de técnicas de detecção seletivas, como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM). Para a extração de prostaglandinas de matrizes complexas, destaca-se a extração em fase sólida (EFS), que otimizada, fornece excelentes taxas de recuperação. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método rápido por CLAE-EM/EM, para análise simultânea de PGE₂ e PGD₂ de meio de cultivo celular e avaliar a eficiência de extração em diferentes condições de EFS, em relação ao método proposto pelo fabricante dos cartuchos. A separação ocorreu com coluna de fase reversa (C18, 150mm x 2.1mm, 5µm) eluída no modo gradiente com acetonitrila e água (0,1% AFO). Dez condições diferentes de EFS foram testadas. O método desenvolvido foi adequado para a análise simultânea de PGE₂ e PGD₂, apresentando resolução de ~1,5 entre os picos e corrida de 11 minutos. LD da ordem de 0,5 ng/mL e LQ de 1,0 ng/mL foram obtidos para ambos os analitos. A linearidade de PGE₂ e PGD₂ apresentou r>0,99. Variações inferiores a 6,51% e 5,93% foram encontradas para repetibilidade e precisão intermediária, respectivamente. Foi possível diminuir perdas durante a EFS e aumentar a recuperação dos analitos. A condição que ofereceu melhor eficiência de extração aumentou o rendimento em 181% para PGE₂ e 323% para PGD₂, em relação ao método proposto pelo fabricante.

Palavras-chave: PGE₂, PGD₂, CLAE-EM/EM, EFS.

INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo patofisiológico controlado e modulado por uma variedade de mediadores químicos dos quais se destacam as prostaglandinas (PG's), cujas principais representantes são a PGE₂ e a PGD₂ (Blewett et al., 2008). Estes metabólitos possuem grande importância farmacológica por serem mediadores-chave das respostas inflamatórias agudas e crônicas (Cuzzocrea, 2005). Além disso, são utilizados como biomarcadores em estudos farmacodinâmicos, sendo empregados na avaliação do mecanismo de ação anti-inflamatório de novas drogas, tanto *in-vivo* quanto *in-vitro* (Yun et al., 2009).

Há mais de 60 anos, estes metabólitos são quantificados através de kits de imunoensaio do tipo ELISA, que apresentam diversas desvantagens como as baixas seletividade e sensibilidade, a impossibilidade de análises de múltiplas moléculas simultaneamente e a limitação imposta pela disponibilidade de kits para somente alguns tipos de prostaglandinas. Tendo em vista que a PGE₂ e PGD₂ são isômeros estruturais (Schmidt et al., 2005), para que uma análise seja confiável é necessário o uso de técnicas de detecção seletivas, como a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLAE-EM/EM). Análises simultâneas destes dois compostos já foram descritas na literatura, porém utilizando tempos de corrida muito longos (Araújo & Froyland, 2006; Nithipatikom et al., 2003) ou através de colunas cromatográficas com partículas de sílica de diâmetro inferior a 3,5 µm (Schmidt et al., 2005; Hishinuma et al., 2007; Cao et al., 2008).

Métodos para a extração de prostaglandinas de fluidos corpóreos, órgãos e meios de cultivo celular descritos na literatura envolvem principalmente partição líquido-líquido e extração em fase sólida (EFS) (Deems et al., 2007). Porém, em função dos baixos rendimentos obtidos pelas partições, a EFS vem sendo a principal alternativa na extração destes metabólitos de matrizes complexas. Além de apresentar elevada precisão, a EFS envolve pouca manipulação da amostra (Cavalcante et al., 2007), o que é uma vantagem importante em função da grande labilidade destes metabólitos por termo e foto degradação e/ou ação enzimática (Maddipati & Zhou,

2011). Atualmente, diversos tipos de fase estacionária para EFS são disponíveis, e dessa forma os processos de extração podem ser otimizados através da escolha de sistemas que melhor se adaptem às características moleculares do analito a ser recuperado e dos interferentes a serem removidos (Cavalcante et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método rápido de quantificação simultânea para PGE₂ e PGD₂ por CLAE-EM/EM utilizando coluna cromatográfica de 5 µm de partícula, e comparar a eficiência na recuperação das prostaglandinas de meio de cultivo celular utilizando diferentes condições durante a EFS.

MATERIAL E MÉTODOS

Reagentes e soluções

Padrões de PGE₂ (99,0%) e PGD₂ (99,0%) foram adquiridos da Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA). Metanol, acetonitrila (ACN), ácido fórmico 88% (AFO) e etanol absoluto foram adquiridos da J. T. Baker Chemicals B.V. (Deventer, Holanda). Ácido acético glacial foi obtido da Panreac (Barcelona, Espanha), e acetato de etila e n-hexano (95%) foram adquiridos da Mallinckrodt (St. Louis, MO, USA). Água ultrapura foi obtida através de um sistema de purificação Milli-Q, da Millipore Corporation (Bedford, USA). Soluções de estoques individuais de PGE₂ e PGD₂ (1 mg/mL) foram preparadas em acetonitrila e armazenadas a -80°C, e soluções de trabalho combinando os dois analitos foram preparadas em água/ACN/AFO (65:35:0,1 v/v/v), em concentrações de acordo com a necessidade.

Instrumentação e condições de análise por CLAE-EM/EM

O CLAE utilizado foi um Agilent 1200 (Santa Clara, CA, USA), constituído por uma bomba binária G1312B, degaseificador G1379B e forno de coluna G1316B. O cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massas API 3200 Triplo Quadrupolo da Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) equipado com fonte de ionização do tipo Electrospray (ESI). O gerenciador de amostras foi um CTC Waters 2777 Sample Manager.

Todo o desenvolvimento do método foi realizado através da injeção de soluções de trabalho de PGE₂ e PGD₂ a 100 ng/mL cada. A separação foi realizada em uma coluna XBridge RP-C18 (150 mm x 2,1 mm, 5 µm) acoplada a uma pré-coluna XBridge RP-C18 (10 mm x 2,1 mm, 5 µm) (Waters Corp., Milford, MA, USA), mantidas a 25°C. A fase móvel foi composta por uma mistura de água (A) e acetonitrila (B), ambos contendo 0,1% de AFO (v/v). O gradiente empregado na separação foi 35% (B) por 5,0 min; 35-50% (B) de 5,0 a 5,1 min; manteve-se 50% (B) de 5,1 a 7,5 min; 50-35% (B) de 7,5 a 7,6 min; manteve-se 35% (B) de 7,6 a 11,0 min para recondição da coluna. O fluxo da fase móvel foi 300 µL/min e o volume de injeção foi 20 µL.

A ionização por ESI foi operada em modo MRM negativo. Os parâmetros da fonte de ionização foram os seguintes: gás de interface (CUR), 10 psi; gás de colisão

(CAD), 4 psi; voltagem do ESI (ISV), -4500 V; gás de nebulização (GS1), 45 psi; gás secante (GS2), 45 psi; temperatura da fonte, 300°C. As transições iônicas e os parâmetros individuais dos compostos, incluindo o potencial de desagregação (DP), potencial de entrada (EP), potencial de entrada na célula de colisão (CEP), energia de colisão (CE), potencial da célula de saída (CXP), são resumidos na Tabela 1. O nitrogênio de alta pureza utilizado no CUR, CAD, GS1 e GS2 foi produzido por um gerador de nitrogênio de alta pureza da PEAK Scientific Instruments (Chicago, IL, USA). Os dados adquiridos foram processados pelo software Analyst[®] versão 1.4.2.

Tabela 1. Parâmetros e transições iônicas utilizadas para avaliação de PGE₂ e PGD₂.

Compostos	Íon Molecular (m/z)	Transição iônica (m/z)	CE (V)	CXP (V)	CEP (V)	DP (V)	EP (V)
PGE ₂ e PGD ₂	351.0	351.0→315.2	-24.0	-4.0	-20.0	-30.0	-5.0
		351.0→271.2	-14.0	-4.0	-20.0	-30.0	-5.0

Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada de acordo com a RE ANVISA N. 899/03 (Brasil, 2003). Os parâmetros avaliados foram limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), linearidade e precisão. O LD e o LQ foram estimados com base na relação sinal/ruído. Para conduzir este estudo, soluções de trabalho de PGE₂ e PGD₂ a 100 ng/mL cada, foram diluídas em água/ACN/AFÓ (65:35:0,1 v/v/v) e injetadas em triplicata, até que picos com uma relação sinal/ruído de 3:1 fossem obtidos para o LD e picos com relação sinal/ruído de 10:1 e precisão (DPR≤10%) fossem obtidos para LQ. A linearidade foi determinada através do método de padronização externa, avaliando soluções de trabalho em triplicata, em sete níveis de concentração (1,0; 5,0; 10,0; 50,0; 100,0; 250,0 e 500,0 ng/mL) para cada analito.

As curvas de calibração foram construídas relacionando a média da área dos picos em cada nível versus a concentração, e o coeficiente de correlação (r) foi obtido através de análises de regressão linear (1/x), sendo admitidos valores de r>0,99. A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade (intracorrída) e precisão intermediária (intercorrídas). A repetibilidade foi investigada através de injeções em triplicata de soluções de trabalho de PGE₂ e PGD₂ nas concentrações de 10,0; 50,0 e 250,0 ng/mL cada.

O ensaio foi realizado pelo mesmo analista, usando o mesmo equipamento e sob idênticas condições, em um intervalo de 6 horas. A precisão intermediária foi determinada por um segundo analista, no mesmo equipamento e nos mesmos níveis de concentração da repetibilidade, sendo as amostras injetadas após um intervalo de dois dias. A precisão foi expressa em termos de desvio padrão relativo (DPR%) entre as áreas e desvio padrão (DP) entre os tempos de retenção dos picos de PGE₂ e PGD₂, obtidos através das diferentes injeções. Para a análise das áreas, foram admitidos valores de DPR≤10%, e para os tempos de retenção, variações de no máximo 0,05 min.

Preparo das amostras para avaliação da eficiência de extração

Em tubos de polipropileno de 2 mL, foram adicionados 1000 µL da matriz meio de cultivo RPMI-1640 completo isento de vermelho de fenol (Himedia, Mumbai,

India), suplementado com 1% de soro fetal bovino -SFB- (*Cripion*, Andradina, SP, Brasil). Estas amostras foram fortificadas com PGE₂ e PGD₂ (10 ng de cada) e em seguida submetidas a diferentes condições de EFS utilizando cartuchos Oasis® HLB (Waters Corp., Milford, MA, USA), de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Condições empregadas nos testes de extração de PGE₂ e PGD₂ de meio de cultivo celular.

Condição	Preparo da amostra	Acondicionamento do cartucho	Lavagem do cartucho	Eluição dos analitos
1*	50 µL AFO	1 mL MeOH; 1 mL água	1 mL 5% MeOH; 1 mL 2% AcOH	2 mL 2% NH ₄ OH em MeOH
2	50 µL AFO; 300 µL EtOH	1 mL MeOH; 1 mL água	1 mL 5% MeOH; 1 mL 2% AcOH	2 mL 2% NH ₄ OH em MeOH
3	-	1 mL MeOH; 1 mL água	1 mL 5% MeOH; 1 mL 2% AcOH	2 mL 2% NH ₄ OH em MeOH
4	50 µL AFO	1 mL água	1 mL 5% MeOH; 1 mL 2% AcOH	2 mL 2% NH ₄ OH em MeOH
5	50 µL AFO	1 mL MeOH; 1 mL água	-	2 mL 2% NH ₄ OH em MeOH
6	50 µL AFO	1 mL MeOH; 1 mL água	1 mL 2% AcOH	2 mL 2% NH ₄ OH em MeOH
7	50 µL AFO	1 mL MeOH; 1 mL água	1 mL 2% AcOH	2 mL AcOEt
8	50 µL AFO	1 mL MeOH; 1 mL água	1 mL 2% AcOH	2 mL hexano
9	50 µL AFO	1 mL MeOH; 1 mL água	1 mL 2% AcOH	1 mL AcOEt; 1 mL Hexano
10	50 µL AFO	1 mL MeOH; 1 mL água	1 mL 2% AcOH	2 mL AcOEt:Hexano (50:50, v/v)

[*] P<0,05; [**] P<0,001, comparado à Condição 1
ND: Não detectado

Após a extração, os solventes orgânicos utilizados na eluição foram evaporados através de fluxo de nitrogênio e o resíduo seco foi ressuspensionado em 100 µL de água/ACN/AFO (65:35:0.1 v/v/v) antes da injeção no CLAE-EM/EM. Todo o procedimento de extração foi realizado em ambiente com baixa incidência de luz.

Avaliação estatística

Os percentuais de recuperação de cada condição foram calculados através da comparação das áreas dos picos de PGE₂ e PGD₂ das amostras submetidas à extração com as áreas dos picos dos mesmos analitos em soluções de trabalho na mesma concentração, injetadas diretamente no CLAE-EM/EM. Os dados foram apresentados como média ± DP das áreas dos picos, em amostras preparadas em sextuplicata. As eficiências de extração nas diferentes condições foram comparadas com o método genérico proposto pelo fabricante dos cartuchos (Condição 1). Diferenças foram testadas através de ANOVA *one-way*, seguida do teste *post-hoc* de Tukey. Valores de P<0,05 foram considerados estatisticamente significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 8.0 (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS

Desenvolvimento do método por CLAE-EM/EM

A Figura 1 mostra o cromatograma representativo do método desenvolvido por CLAE-EM/EM após as otimizações relativas ao tamanho e marca da coluna,

composição e fluxo da fase móvel, volume de injeção e temperatura do forno. Picos afilados e simétricos (*tailing factor* 1,14), com resolução de aproximadamente 1,5 foram obtidos em um tempo total de corrida de 11 minutos.

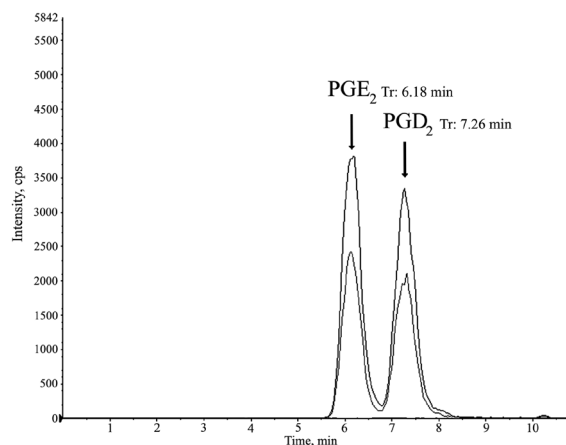


Figura 1. Cromatograma de Íons Totais Extraídos obtidos no modo MRM, representativo da matriz fortificada com padrão de PGE₂ e PGD₂ (100 ng cada).

Validação do método analítico

A alta sensibilidade do método desenvolvido foi demonstrada pelos baixos limites de detecção, estimados em 0,4 ng/mL para PGE₂ e 0,5 ng/mL para PGD₂. Os limites de quantificação encontrados foram de 1,0 ng/mL tanto para PGE₂ (DPR de 3,10%) como para PGD₂

(DPR de 3,19%). As curvas de calibração para PGE₂ e PGD₂ foram consideradas lineares dentro da faixa de concentração avaliada, com coeficientes de correlação de $r = 0,9986$ e $r = 0,9985$, respectivamente. A equação linear foi $y = 3,2.10^3x + 3,82.10^3$ para PGE₂ e $y = 3,15.10^3x + 1,54.10^3$ para PGD₂. Adicionalmente, em todos os níveis de concentração, os erros de precisão e exatidão foram menores que 10% para ambos os compostos. O método também foi considerado preciso, com variações de área inferiores a 6,51% na repetibilidade e inferiores a 5,93% na precisão intermediária; variações no tempo de retenção foram inferiores a 0,03 min (Tabela 3).

Tabela 3. Repetibilidade e precisão intermediária de PGE₂ e PGD₂

Compostos	Concentração (ng/mL)	Áreas dos picos			Tempos de retenção
		Área (média ± DP)	Intra-dia (DPR%)	Inter-dia (DPR%)	Tempo médio ± DP (min)
PGE ₂	10,0	31.226 ± 258	5,03	2,37	6,14 ± 0,02
	50,0	161.597 ± 661	1,43	3,73	6,17 ± 0,01
	250,0	846.652 ± 54.344	6,51	1,99	6,18 ± 0,02
PGD ₂	10,0	27.520 ± 818	2,39	5,27	7,26 ± 0,01
	50,0	145.747 ± 3326	3,25	5,93	7,25 ± 0,03
	250,0	704.792 ± 9910	3,33	1,68	7,26 ± 0,02

Nota: DPR% = desvio padrão relativo; DP = desvio padrão

Avaliação da eficiência de extração por EFS

A eficiência de extração de PGE₂ e PGD₂ nas dez condições avaliadas é mostrada na Figura 2. Todas as condições de extração (de 2 a 10) mostraram diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) quando comparadas ao método genérico proposto pelo fabricante dos cartuchos (Condição 1), o qual mostrou eficiência de extração de $37,68 \pm 2,94\%$ para PGE₂ e $20,20 \pm 2,30\%$ para PGD₂. As diferentes condições de extração foram elaboradas através de variações nas etapas de preparo da amostra, acondicionamento do cartucho, lavagem do cartucho e eluição dos analitos. As condições que resultaram em aumento na eficiência de extração foram aquelas em que houve modificações na lavagem do cartucho (Condição 6), aumentando para $48,19 \pm 1,58\%$ a extração de PGE₂ e para $26,96 \pm 2,68\%$ a extração de PGD₂, e aquelas em que houve alteração na composição do solvente de eluição (Condições 7, 9 e 10), em que a taxa de extração de PGE₂ variou de $53,35 \pm 3,96\%$ a $68,29 \pm 1,69\%$ e de PGD₂ de $48,00 \pm 4,91\%$ a $65,34 \pm 2,63\%$.

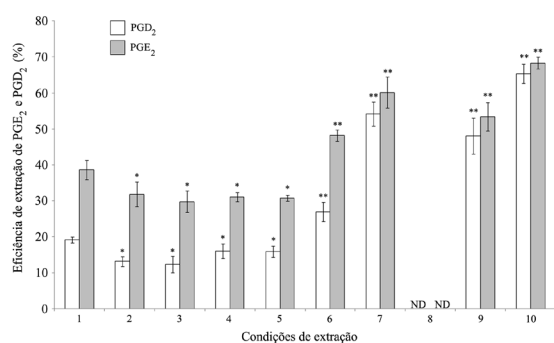


Figura 2. Recuperação de PGE₂ e PGD₂ de meio de cultivo celular através da aplicação de diferentes condições de EFS.

DISCUSSÃO

Desenvolvimento do método por CLAE-EM/EM

A fonte de ionização do tipo Electrospray (ESI) foi escolhida para o desenvolvimento do método em função da sua capacidade de ionização branda, sem promover degradação dos analitos. As análises foram realizadas no modo negativo em função da abundante geração de íons carboxilato [M-H]⁻ pelas prostaglandinas, o que torna a análise mais sensível (Murphy et al., 2005). Os parâmetros do EM e do EM/EM foram otimizados de acordo com as instruções do fabricante, através de infusão direta com soluções de trabalho de PGE₂ e PGD₂ a 200 ng/mL cada. Uma análise por varredura foi realizada (de 200 m/z a 400 m/z) e a concentração dos analitos foi então ajustada até se obter uma intensidade de sinal adequada para a otimização automática dos parâmetros individuais (DP, EP, CEP, CE, e CXP) por monitoramento de reações múltiplas (MRM). Os dois sinais mais intensos de fragmentos de cada composto foram obtidos. A otimização dos parâmetros de fonte (CUR, CAD, IS, GS1, GS2, e temperatura) foi realizada através de análise por injeção em fluxo (FIA), acoplado o cromatógrafo líquido com espectrômetro de massas. Uma fase móvel composta de acetonitrila/água (70:30 v/v) foi empregada, a um fluxo de 200 µL/min.

Como mostra a Figura 3, os espectros de massas por colisão induzida de PGE₂ e PGD₂ revelam que os íons fragmento de ambos os compostos são idênticos, porém, diferem apenas nas quantidades relativas. Dessa forma, dada a impossibilidade de separação destes dois compostos isoméricos utilizando somente métodos espectrométricos (Murphy et al., 2005), foi necessário o desenvolvimento de um método de separação por cromatografia.

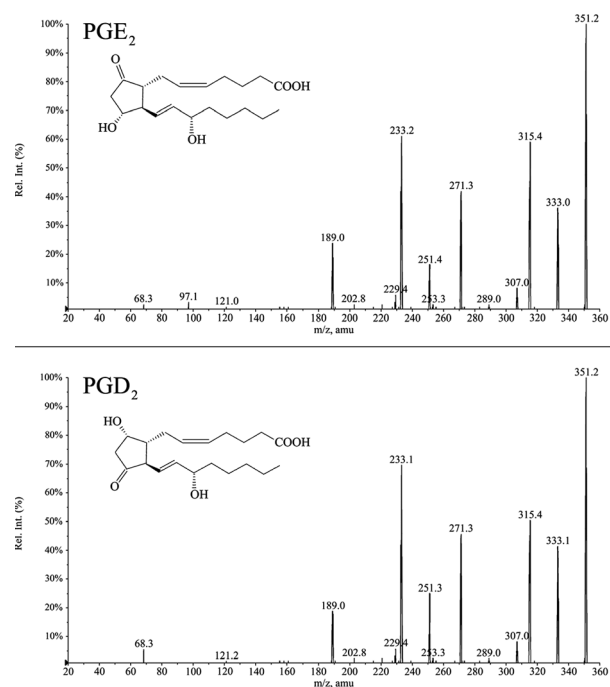


Figura 3. Espectros de massas de PGE₂ e PGD₂ através de dissociação induzida por colisão. Dados obtidos por infusão de soluções de trabalho a 1.000 ng/mL.

No desenvolvimento do método por CLAE-EM/EM, várias combinações de metanol, água e acetonitrila foram testadas para a composição da fase móvel. Ácido fórmico a 0,1% (v/v) foi mantido como aditivo em todas as condições testadas. Embora o uso de solventes ácidos pareça paradoxal com fonte ESI operando no modo negativo, não há relatos de que o ácido reduz a intensidade ou a qualidade do sinal do espectrômetro de massas (Newby & Mallet, 1997). Além disso, as prostaglandinas possuem um pKa de 4,7 (Rinne et al., 2007) e a adição de um ácido na fase móvel é necessário para obter picos com formato adequado (Newby & Mallet, 1997).

Estudos preliminares mostraram que a fase móvel eluída isocraticamente não foi eficiente para resolver os picos de PGE₂ e PGD₂, dada a dificuldade na separação entre as moléculas pela sua similaridade estrutural. Além disso, metanol não ofereceu ionização adequada das substâncias. Deste modo, um gradiente entre acetonitrila e água foi utilizada para a fase móvel. Colunas de marcas e comprimentos diferentes foram também testadas durante o desenvolvimento do método (XBridge™ C18, 2,1 x 100 mm, 5 µm; XBridge™ C18 2,1 x 150 mm, 5 µm, Waters® Corporation; Zorbax Eclipse XDB™ 4,6 x 150 mm, 5 µm, Agilent Technologies®). Entre elas, a XBridge™ RP-C18 (150 mm x 2,1 mm, 5 µm) proporcionou a melhor separação entre os compostos, com uma resolução de ~1,5 entre os picos.

Para evitar termodegradação dos analitos, a coluna foi mantida à temperatura ambiente (25°C) e um excelente formato de pico foi alcançado. Se em estudos anteriores a separação entre PGE₂ e PGD₂ só poderia ser obtida utilizando colunas de tamanho de partículas inferiores a 3,5 µm (Schmidt et al., 2005; Hishinuma et al., 2007; Cao et al., 2008) ou com tempos de corrida extensivamente longos (Araújo & Froyland, 2006; Nithipatikom et al., 2003), aqui, uma excelente separação entre os compostos foi obtida com curto tempo de corrida (11 min), por meio do uso de uma coluna de fase reversa simples de 5 µm de tamanho de partícula, facilmente encontrada em laboratórios analíticos. Dessa forma, o presente método é uma alternativa econômica e de alta sensibilidade e seletividade para monitorar PGE₂ e PGD₂ simultaneamente, em contraste com os tradicionais ensaios do tipo ELISA (Blewett et al., 2008).

Avaliação da eficiência de extração por EFS

Os testes de extração das prostaglandinas de meio de cultivo celular utilizaram cartuchos de EFS modelo Oasis™ HLB (Waters® Corporation), que apresentam uma grande faixa de pH de trabalho (pH 1-14) e adsorvem compostos em uma ampla faixa de polaridade. Estes cartuchos apresentam um sorvente de fase-reversa produzido com uma mistura de copolímeros hidrofílico (N-vinilpirrolidona) e lipofílico (divinilbenzeno) que proporciona capacidade de adsorção de compostos hidrofóbicos três vezes superior, quando comparado com os cartuchos tradicionais de sílica-C18 (Waters Corporation, 2008).

O método de extração, proposto pelo fabricante do cartucho (Condição 1), apresentou uma eficiência de extração de 37,68 ± 2,94% para PGE₂ e 20,20 ± 2,30% para PGD₂. A partir deste método, foram elaboradas as outras

condições de extração através de variações nas etapas de preparo da amostra, acondicionamento do cartucho, lavagem do cartucho e eluição dos analitos. Durante o preparo das amostras, foi avaliada a influência da adição de 300 µL de etanol absoluto (Condição 2) e a ausência de acidificação das amostras (Condição 3). Ao contrário do que relatam estudos anteriores (Mesaros et al, 2009; Maddipati & Zhou, 2011), estas duas modificações foram prejudiciais para a recuperação de PGE₂ e PGD₂ de meio de cultivo celular. Como as prostaglandinas são moléculas ácidas (pKa ~ 4,7), a acidificação da amostra se torna necessária para favorecer a ligação dos analitos com a matriz polimérica do cartucho. Segundo a literatura, o etanol pode favorecer a ruptura de ligações proteicas com determinadas tipos de prostaglandinas, favorecendo a recuperação (Mesaros et al, 2009). Porém, este benefício não foi observado durante a análise de PGE₂ e PGD₂. O acondicionamento do cartucho utilizando somente água (Condição 4) também não favoreceu o aumento no rendimento da extração, sendo portanto necessário o uso de metanol e água consecutivamente nesta fase, como indica o fabricante do cartucho.

A influência dos solventes utilizados durante a lavagem do cartucho também foi avaliada. Enquanto a ausência da etapa de lavagem (Condição 5) reflete em perda na eficiência da extração, a lavagem utilizando somente solvente aquoso com 2% de ácido acético (Condição 6) eleva os índices de recuperação dos dois analitos (48,19 ± 1,58% para PGE₂ e 26,96 ± 2,68 para PGD₂). O uso de metanol 5% durante a lavagem como preconiza o fabricante dos cartuchos mostrou-se prejudicial para a recuperação dos analitos, pois a maior apolaridade oferecida por este solvente faz com que parte do analito preso na matriz do cartucho seja perdida durante a lavagem.

A etapa de eluição mostrou-se bastante crítica para o aumento na recuperação dos analitos. Os solventes utilizados durante esta etapa diferem bastante em polaridade, e a escolha por acetato de etila e/ou hexano (solventes de baixa polaridade) se justifica pelas características moleculares das prostaglandinas, derivadas de ácidos graxos (Blewett et al., 2008). Quando foi utilizado somente acetato de etila durante a eluição (Condição 7), observou-se um expressivo aumento na recuperação tanto de PGE₂ (60,14 ± 4,28%) quanto de PGD₂ (54,12 ± 3,31%). Porém, quando somente hexano foi utilizado (Condição 8), os picos dos analitos não foram detectados nos cromatogramas, mostrando que este solvente não é adequado para a eluição quando utilizado isoladamente. O uso de acetato de etila seguido de hexano (Condição 9) também mostrou melhora na eficiência de extração quando comparado ao método genérico (53,35 ± 3,96% para PGE₂ e 48,00 ± 4,91 para PGD₂), porém os índices de recuperação foram menores do que quando foi utilizado somente o acetato de etila. Quando o solvente de eluição utilizado foi uma mistura 1:1 (v/v) entre acetato de etila e hexano (Condição 10), os melhores índices de recuperação foram de alcançados, com 68,29 ± 1,69% para PGE₂ e 65,34 ± 2,63% para PGD₂. Dessa forma, dentre as condições testadas, a mistura entre estas duas substâncias proporcionou o solvente de polaridade ideal para a eluição dos analitos.

A eficiência de extração obtida com a Condição 10 (~67% para cada analito) foi considerada satisfatória, tendo

em vista que alguns autores relatam dificuldades em obter eficiências de extração superiores a 60% para metabólitos eicosanoides, principalmente em matrizes complexas como meios de cultivo celulares (Kingsley et al., 2005; Deems et al., 2007). O principal fator que dificulta uma maior recuperação é a degradação natural sofrida pelas moléculas através de foto e termo-oxidações, que ocorrem desde o início do processo de extração até a injeção no CLAE-EM/EM. Portanto, o uso de uma técnica de extração rápida como a EFS, aliada a um ambiente com baixa incidência de luz são altamente recomendados para se obter melhores taxas de recuperação. Dessa forma, o aumento na eficiência da extração oferecida pela Condição 10 quando comparada ao método genérico (181% e 323% para PGE₂ e para PGD₂, respectivamente) foi excelente, considerando a simplicidade e a facilidade das alterações propostas durante a EFS neste novo método.

Com base nos resultados alcançados, concluiu-se que o método desenvolvido por CLAE-EM/EM foi capaz de separar os isômeros pró-inflamatórios PGE₂ e PGD₂, utilizando uma coluna comum em laboratórios analíticos (RP-C18, 150 mm x 2.1 mm) com 5 µm de tamanho de partícula de sílica. Em aproximadamente 11 minutos, o método foi capaz de quantificar os dois analitos simultaneamente, sendo economicamente vantajoso em relação aos tradicionais imunoenaios do tipo ELISA, que permitem a análise de apenas um analito por kit, com baixas sensibilidade e seletividade. O método desenvolvido foi validado, apresentando excelente sensibilidade, linearidade e precisão. O processo de EFS foi otimizado através de pequenas modificações tais como acidificação da amostra, acondicionamento do cartucho com metanol e água, lavagem do cartucho com água acidificada e eluição dos analitos com acetato de etila/hexano 1:1 v/v, oferecendo um sensível aumento na eficiência de extração de PGE₂ e PGD₂ de meio de cultivo celular.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de expressar sua gratidão à CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

ABSTRACT

Development and validation of HPLC-MS/MS method to determine PGE₂ and PGD₂ in cell culture medium and assessment of recovery of the prostaglandins by solid phase extraction under various conditions

PGE₂ and PGD₂ are very important pro-inflammatory mediators. Traditionally, these prostaglandins are estimated by immunoassay techniques, which have several disadvantages. Since these metabolites are structural isomers, it is necessary to use selective detection techniques, such as liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). For the extraction of prostaglandins from complex matrices, solid phase extraction (SPE) is an outstanding method that can be optimized to provide excellent recovery. The aim of this study was to develop and validate a rapid method for the simultaneous analysis of

PGE₂ and PGD₂ in cell culture medium by HPLC-MS/MS and to assess the extraction efficiency of SPE under various conditions, compared to the generic method proposed by the manufacturer of the cartridges. The analytes were separated on a reversed-phase column (C18, 150mm x 2.1mm, 5µm), eluted in a gradient of acetonitrile and water (0.1% formic acid). Ten different conditions for SPE were tested. The method was suitable for the simultaneous analysis of PGE₂ and PGD₂, showing a resolution of ~1.5 between the peaks and a run time of 11 minutes. LOD of 0.5 ng/mL and LOQ of 1.0 ng/mL were recorded for both analytes. The linearity of the analytical curves for both PGE₂ and PGD₂ showed r>0.99. Variations of less than 6.51% and 5.93% were found for repeatability and intermediate precision, respectively. It was possible to reduce the losses during SPE and enhance the recovery of the analytes. The condition affording the best extraction efficiency increased the yield by 181% for PGE₂ and 323% for PGD₂, relative to the method proposed by the manufacturer.

Keywords: PGE₂ PGD₂ HPLS-MS/MS. SPE.

REFERÊNCIAS

- Araújo P, Froyland L. Optimization of an extraction method for the determination of prostaglandin E2 in plasma using experimental design and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2006;830(2):212-17.
- Blewett JA, Varma D, Gilles T, Libonati J, Jansen SA. Development and validation of a high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry method for the simultaneous determination of 23 eicosanoids. *J Pharmaceut Biomed*. 2008;46(4):653-66.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. *Diário Oficial da União*, nº 63, 2 de junho de 2003. Seção 1.
- Cao H, Xiao L, Park G, Wang X, Azim A, Christman J. An improved LC–MS/MS method for the quantification of prostaglandins E2 and D2 production in biological fluids. *Anal Biochem*. 2008;372(1):41-51.
- Cavalcante RM, Filho NSM, Viana RB, Oliveira IRN, Nascimento RF, Silveira, ER, Freire, GSS. Utilização da extração em fase sólida (SPE) na determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em matrizes aquosas ambientais. *Quím Nova*. 2007;30(3):560-4.
- Cuzzocrea S. Shock, inflammation and PARP. *Pharmacol Res*. 2005;52(1):72-82.
- Deems R, Buczynski MW, Bowers-Gentry R, Harkewics, R, Dennis EA. Detection and Quantitation of Eicosanoids via High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *Method Enzymol*. 2007;432(1):59-82.
- Hishinuma T, Suzuki K, Masayoshi S, Yamaguchi H, Suzuki N, Yoshihisa T, Kaneko I, Ono, M, Goto J.

- Simultaneous quantification of seven prostanoids using liquid chromatography/tandem mass spectrometry: The effects of arachidonic acid on prostanoid production in mouse bone marrow-derived mast cells. *Prostag Leukotr Ess*. 2007;76(6):321-9.
- Kingsley PJ, Rouzer CA, Saleh S, Marnett LJ. Simultaneous analysis of prostaglandin glyceryl esters and prostaglandins by electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2005;343(2):203-11.
- Maddipati KR, Zhou SL. Stability and analysis of eicosanoids and docosanoids in tissue culture media. *Prostag Oth Lipid M*. 2011;95(1-2):59-72
- Mesaros C, Lee SH, Blair IA. Targeted quantitative analysis of eicosanoid lipids in biological samples using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2009;877(1):2736–45.
- Murphy RC, Barkley RM, Zemski Berry K, Hankin J, Harrison K, Johnson C, Krank J, McAnoy A, Uhlson C, Zarini S. Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids. *Anal Biochem*. 2005;346(1):1-42.
- Nithipatikom K, Laabs ND, Isbell MA, Campbell WB. Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of cyclooxygenase metabolites of arachidonic acid in cultured cells. *J Chromatogr B*. 2003;785(1):135-45.
- Newby CS, Mallet AI. Rapid Simultaneous Analysis of Prostaglandin E₂, 12-Hydroxyeicosatetraenoic Acid and Arachidonic Acid Using High Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass SP*. 1997;11(15):1723-27.
- Schmidt R, Coste O, Geisslinger G. LC–MS/MS-analysis of prostaglandin E₂ and D₂ in microdialysis samples of rats. *J Chromatogr B*. 2005;826(1-2):188-97.
- Yun KJ, Shin JS, Choi JH, Back NI, Chung HG, Lee KT. Quaternary alkaloid, pseudocoptisine isolated from tubers of *Corydalis turtchaninovi* inhibits LPS-induced nitric oxide, PGE₂, and pro-inflammatory cytokines production via the down-regulation of NF-κB in RAW 264.7 murine macrophage cells. *Inter Immunopharmacol*. 2009;9(11):1323-31.
- Waters Corporation. The Science of What's Possible. Care and use manual for Oasis HLB disks [Internet]. Milford: Waters Corporation; 2008. 5 p. Disponível em: <http://www.waters.com/webassets/cms/category/docs/720002816EN%20care%20and%20use%20manual.pdf>

Recebido em 04 de dezembro de 2012

Aceito para publicação em 06 de fevereiro de 2013

