

アプリケーションノート

アンチ・ドーピング分析のためのミックスモード SPE および UPLC-MS/MS による利尿薬および β 遮断薬の同時分析

Jonathan P. Danaceau, Michelle Wood, Lisa J. Calton

Waters Corporation



法中毒学目的のみに使用してください。

要約

この試験の目標は、尿サンプル中の禁止されている利尿薬およびβ遮断薬を同時に同定してアンチ・ドーピングラボをサポートすることです。

ミックスモード SPE および ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S micro システムを使用することにより、アンチ・ドーピング目的での、尿中の利尿薬およびβ遮断薬のきれいで迅速かつ効率的な抽出および分析が可能になりました。Oasis MAX μElution プレートにより、20種のβ遮断薬と20種の利尿性化合物の抽出が可能になりました。希釈済みサンプルと比較して、マトリックス効果が大幅に低減していました。Xevo TQ-S micro は、すべての分析種を4分以内に正確に同定する速度および感度を備えており、MRPLの20%というWADAの厳格なイオン比基準も満たしています。スキャン間の極性切り替えを迅速に行える機能により、1回の注入での分析が可能になり、陽イオン性化合物と陰イオン性化合物の連続注入と比較して、時間を節約し、装置の摩耗を削減することができます。これにより、UPLC-MS/MS システムをよりきれいに維持できると同時に、これらの化合物を迅速かつ正確に分析できるようになります。

アプリケーションのメリット

固相抽出および迅速な極性切り替えにより、禁止されている利尿薬およびβ遮断薬のきれいで迅速かつ効率的な分析が可能になります。

はじめに

利尿薬とβ遮断薬はいずれも、世界アンチ・ドーピング機構（WADA）によって禁止されています¹。これら2種類のクラスの分子は化学的に異なるにもかかわらず、多くのアンチ・ドーピングラボでは、ワークフローの都合で、これらの分子を一緒に分析することが好まれています²⁻⁴。β遮断薬はポジティブエレクトロスプレーイオン化（ESI）条件でイオン化する塩基性化合物であり、利尿薬は主にネガティブESI条件でイオン化する酸性化合物です。これには多くの場合、ポジティブモードに続くネガティブモードのLC-MSによる順次分析が必要です。さらに、これらの化学的な違いによりSPE吸着剤が広範囲の極性とケモタイプに対応できる必要があるため、同時抽出が難しくなります。

結果および考察

上記の課題は、Oasis MAX μElution プレートを使用することで解決され、尿サンプルから利尿薬とβ遮断薬を効率的かつきれいに抽出できるようになりました。これに続いて、Waters ACQUITY UPLC I-Class システムと Xevo TQ-S

micro 質量分析計を使用して、UPLC-MS/MS 分析を行いました。分離は Waters ACQUITY UPLC CSH C₁₈ カラム (1.7 μm、2.1 × 100 mm) で行いました。移動相は 0.01% ギ酸 (MPA) とアセトニトリル (MPB) で構成しました。

化合物およびそれらの保持時間を表 1 に示します。すべての化合物が 4 分以内に溶出し、UPLC サイクル全体にかかった時間は 5 分でした (図 1)。すべての化合物について、2 ~ 3 の MRM トランジションを取り込みました。Xevo TQ-S micro の迅速な極性切り替えにより、24 種の陽イオン性化合物と 18 種の陰イオン性化合物を同時分析しながらも、このような高速で効率的なクロマトグラフィーが可能になりました。

	ESI+			ESI-	
	名前	R.T.		名前	R.T.
1	ソタロール	0.56	24	アセタゾラミド	1.13
2	アテノロール	0.58	25	クロロチアジド	1.22
3	アミロライド	0.57	26	ヒドロクロロチアジド	1.31
4	カルテオロール	0.93	27	ヒドロフルメチアジド	1.66
5	ピンドロール	0.94	28	ジクロルフェナミド	1.90
6	ナドロール	0.97	29	クロルタリドン	1.94
7	トリアムテリン	1.01	30	トリクロルメチアジド	2.22
8	チモロール	1.20	31	メチクロチアジド	2.33
9	アセプトロール	1.23	32	メトラゾン	2.53
10	メトプロロール	1.24	33	フロセミド	2.67
	メトプロロール-d7 (IS)	1.24		フロセミド-d5 (IS)	2.66
11	レボブノロール	1.30	34	インダパミド	2.73
12	エスモロール	1.37	35	ベンズチアジド	2.77
13	セリプロロール	1.47	36	シクロチアジド	2.84
14	オクスプレノロール	1.48	37	ベンドロフルメチアジド	2.94
15	ラベトロール	1.57	38	ブメタニド	3.33
16	ビソプロロール	1.58	39	プロベネシド	3.52
17	メチプラノロール	1.68	40	エタクリン酸	3.64
18	プロプラノロール	1.69			
19	アルプレノロール	1.73			
20	ベタキシノロール	1.79			
21	クロパミド	2.21			
22	カルベジロール	2.08			
23	カンレノン	3.50			

表 1. イオン化モードで並べ替えた β 遮断薬および利尿薬の名前と保持時間

Oasis MAX μ Elution プレートを使用して、固相抽出を次のように行いました：50 μ L の尿サンプルを 5% 強アンモニア (1: 1) で前処理、次に SPE プレートにロード、5: 95 メタノール：水で洗浄、2% ギ酸含有の 75: 25 メタノール

：アセトニトリル 50 μL で溶出後、200 μL の水で希釈。すべての化合物について、回収は効率的でした。図 2 に、別々の 12 ロットの尿からの平均回収率を示します。アミロライド、クロパミド、カンレノンは、ポジティブ ESI によってイオン化する塩基性化合物であるため、 β 遮断薬に分類しました。 β 遮断薬（および塩基性利尿薬）の平均回収率は 85% で、1 種を除いてすべて 80% 以上であり、%RSD はすべて 20% 以内でした。利尿薬の回収率は 65 ~ 94% で、アセタゾラミドを除き %RSD はすべて 20% 以内でした。Oasis MAX $\mu\text{Elution}$ プレートを使用したことで、シンプルなサンプル希釈に関連するマトリックス効果が大幅に低減しました。図 3 からわかるように、マトリックス効果（特にイオン化抑制）は、1: 10 希釈でさえも、多くの β 遮断薬についてほとんど無視できるレベルから最大 60% を超えるまで増大し、多くの利尿薬については 20 ~ 40% から最大 60 ~ 90% まで増大していました。1 因子 ANOVA 分析により、アセプトロール、メトラゾン、ブメタニド、プロベネシド、エタクリン酸以外のすべての化合物で、マトリックス効果が大幅に増大していることが明らかになりました。

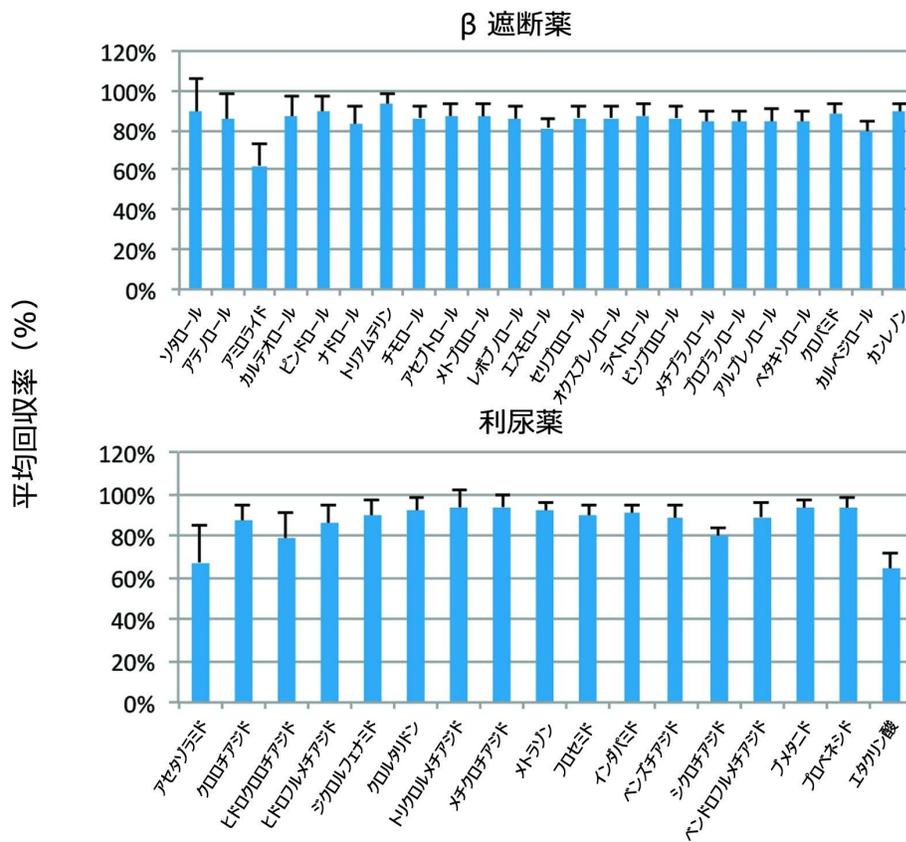


図 2. 別々の 12 ロットの尿マトリックスからの β 遮断薬および利尿薬の平均回収率。β 遮断薬の回収率は平均 85% で、%RSD はすべて 20% 未満でした。利尿薬（ネガティブ ESI）の回収率は 64 ~ 94% の範囲でした。アセタゾラミド（26%）の例外を除き、%RSD はすべて 20% 未満でした。バーおよびエラーバーは、平均 +/- S.D. (N = 12) を表します。

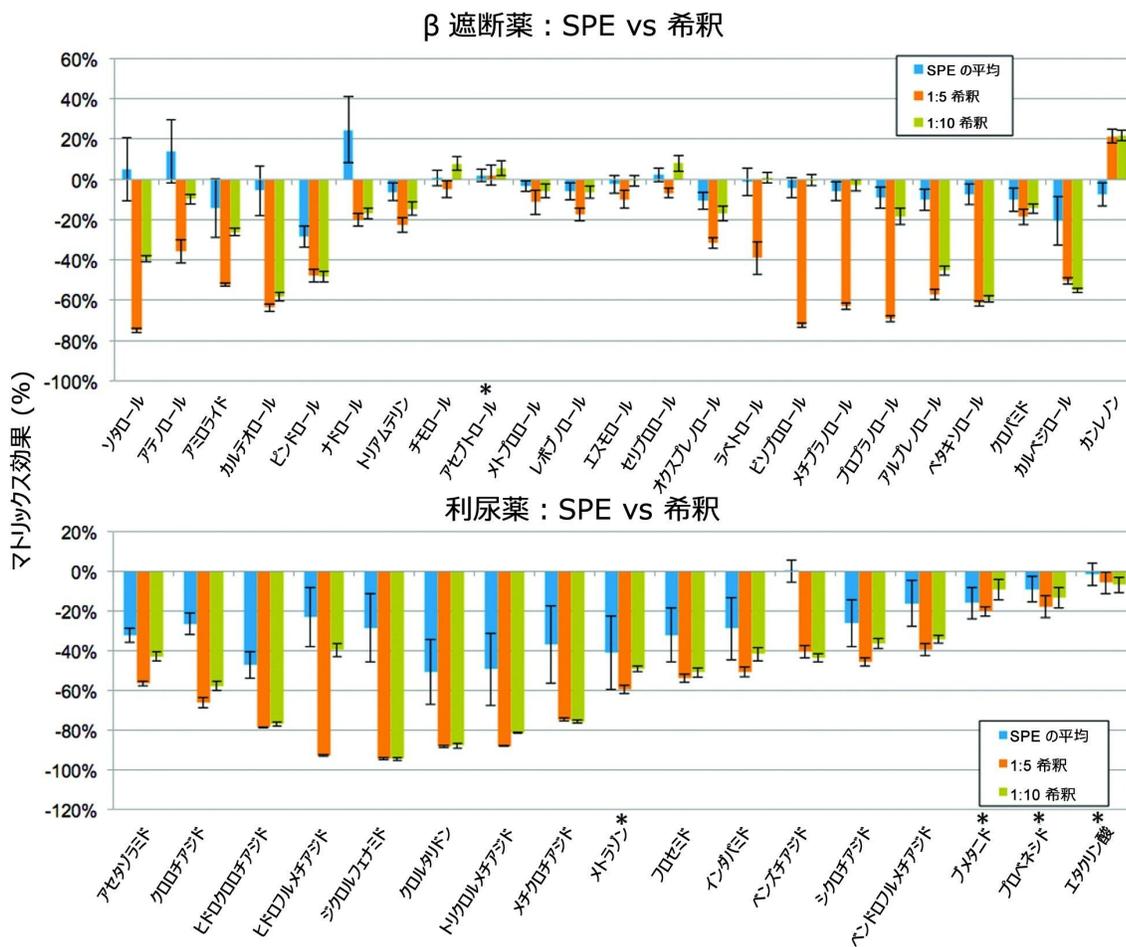


図 3. β 遮断薬および利尿薬のマトリックス効果。12 ロットの尿の平均マトリックス効果を、97: 2: 1 水: アセトニトリル: ギ酸で 1: 5 希釈および 1: 10 希釈した、プールした空白尿のマトリックス効果と比較しました。イオン化抑制は、1: 10 希釈でも、MAX μ Elution プレートで SPE によって前処理した場合と比較して、希釈したサンプルで大幅に増大していました（マトリックス効果は SPE では $N = 12$ 、希釈サンプルでは $N = 4$ の平均）。アスタリスク (*) は、SPE で前処理済みのサンプルと希釈サンプルの間でマトリックス効果に差がなかった化合物を示します。

すべての化合物で、WADA の最小要求性能限界レベル (MRPL) の 20% (β 遮断薬の場合 100 ng/mL、利尿性化合物の場合 200 ng/mL) であっても、容易に検出できました⁵。保持時間の許容誤差も十分 WADA の要件の範囲内でした⁵。分析スピードおよび極性切り替えの必要性があるにもかかわらず、MRPL の 20% であっても、すべての化合物について、確認における WADA のイオン比の基準が満たされていました⁶。

結論

ミックスモード SPE および ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-S micro システムを使用することにより、アンチ・ドーピング目的での、尿中の利尿薬および β 遮断薬のきれいで迅速かつ効率的な抽出および分析が可能になりました。Oasis MAX μ Elution プレートにより、20 種の β 遮断薬と 20 種の利尿性化合物の抽出が可能になりました。希釈済みサンプルと比較して、マトリックス効果が大幅に低減していました。Xevo TQ-S micro は、すべての分析種を 4 分以内に正確に同定する速度および感度を備えており、MRPL の 20% という WADA の厳格なイオン比基準も満たしています。スキャン間の極性切り替えを迅速に行える機能により、1 回の注入での分析が可能になり、陽イオン性化合物と陰イオン性化合物の連続注入と比較して、時間を節約し、装置の摩耗を削減することができます。これにより、UPLC-MS/MS システムをよりきれいに維持できると同時に、これらの化合物を迅速かつ正確に分析できるようになります。

参考文献

1. World Anti-Doping Agency, The World Anti-Doping Code: WADA Prohibited List 2019, 2019, WADA: Montreal, Canada. Available at: <http://www.wada-ama.org>
2. Musenga, A and Cowan, D. Use of ultra-high pressure liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for fast screening in high throughput doping control. *Journal of Chromatography A*.1288: p. 82-95.2013.
3. Murray, G and Danaceau, J. Simultaneous extraction and screening of diuretics, beta-blockers, selected stimulants and steroids in human urine by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS. *Journal of Chromatography B* .877(30): p. 3857-3864.2009.
4. Deventer, K, Van Eenoo, P and Delbeke, F. Simultaneous determination of beta-blocking agents and diuretics in doping analysis by liquid chromatography/mass spectrometry with scan-to-scan polarity switching. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*.19(2): p. 90-98.2005.
5. World Anti-Doping Agency, The World Anti-Doping Code: *WADA Technical Document TD2018MRPL*, World Anti-Doping Agency, Montreal, Canada, 2018, Available at: <http://www.wada-ama.org>.
6. World Anti-Doping Agency, The World Anti-Doping Code: *WADA Technical Document TD2015ICR*, World Anti-Doping Agency, Montreal, Canada, 2015, Available at: <http://www.wada-ama.org>.

ソリューション提供製品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS システム <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S micro タンデム四重極質量分析計 <<https://www.waters.com/134798856>>

オンラインで購入可能

ACQUITY UPLC CSH C18 カラム、130Å、1.7 μm、2.1 mm × 100 mm <

<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186005297>>

Oasis HLB 96 ウェル μElution プレート、1 ウェルあたりの吸着剤 2 mg、粒子径 30 μm <

<https://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=186001828BA>>

720006516JA、2019 年 3 月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[利用規約](#) [プライバシーポリシー](#) [商標](#) [キャリア](#) [法的通知](#)および[プライバシー通知](#) [Cookies](#)

[Cookie 環境設定](#)