

アプリケーションノート

ドーピング薬物の UPC²-MS/MS 分析

Jonathan P. Danaceau, Ivana Gavrilovi[☒], Peter Christensen, Michelle Wood

Waters Corporation, Drug Control Centre, King' s College London



法中毒学目的のみに使用してください。

本書はアプリケーションブリーフであり、詳細な実験方法のセクションは含まれていません。

要約

UPC²-MS/MS は GC および LC に直交的なクロマトグラフィー手法です。UPC²-MS/MS 分析法は様々なドーピング

薬物の検査用に開発されました。メルドニウム、アミロリド、エチルグルクロニドなどの極性が非常に高い化合物がよく保持され、その他の化合物の大半で優れたクロマトグラフィー性能が示されました。すべての化合物について、バッチ内およびバッチ間で保持時間が安定しており、%RSDは<0.6%でした。この分析法には、すべての化合物を世界アンチ・ドーピング機構（WADA）の最小要求性能限界レベル（MRPL）以下の濃度で正確に検出できる分析感度および選択性がありました。GCおよびLCに加えてこの手法を用いることで、クロマトグラフィー範囲をより完全にカバーできるため、アンチ・ドーピング分析における付加価値が高まります。

アプリケーションのメリット

- 直交的な選択性および保持により、GCまたはLCでのパフォーマンスが悪い化合物でも適切な保持を実現
- 多様なドーピング薬物について、頑健かつ再現性の高いクロマトグラフィーを実現
- ドーピング薬物の最小要求性能限界レベル（MRPL）を満たす分析感度

はじめに

世界アンチ・ドーピング機構（WADA）の禁止リスト [WADA, 2021] には現在、特別に禁止されている物質が数百種含まれています。また、名前が特に決まっていない運動能力強化薬物で、禁止薬物のクラスに属しているものも含まれています。分析検査を要する化合物の物理化学的多様性が、アンチ・ドーピングを取り扱うラボの最大の課題の1つとなっています。現在、これらの課題の多くは、LC-MS（LC-HRMSおよびLC-MS/MS）やGC-MS（GC-HRMSおよびGC-MS/MS）により対処されています。一方、現在の手法では信頼性の高い同定および確認が困難な物質が多く残されています。これらの物質の多くは極性が高く、従来のクロマトグラフィープラットフォームでの保持が非常に悪く、また化学的性質により良好なピーク形状が得られないなどの問題があります。UPC²-MS/MSは、GCおよびLCの両方に直交的な分離手法であり、多くの場合、他のクロマトグラフィー手法では達成できないような分離能と選択性が得られます [Nováková, 2015; Losacco, 2020]。このアプリケーションブリーフでは、多様な物理化学的特性を有する広範な禁止物質のUPC²-MS/MSクロマトグラフィー分析法開発および分析について詳しく説明しています。これらの禁止物質には、刺激薬、ステロイド、乱用薬物、グルココルチコイド、利尿薬、β遮断薬などの物質およびその他の禁止物質が含まれます。UPC²-MS/MS分析法を使用することで、メルドニウム、アミロリド、エチルグルクロニドおよびその他の多数の検査対象化合物など、他のクロマトグラフィー手法では分析が困難な化合物の保持および分離が可能になりました。1,000名分の匿名アンチ・ドーピングのサンプルでは、違反の分析所見はありませんでした。すべての分析種で保持時間がバッチ内およびバッチ間で安定していました。また、この分析法は分析感度が高く、すべての化合物をWADAの最小要求性能限界レベル（MRPL）で正確に検出できました[WADA, 2019]。

実験方法

試料

すべての分析種の標準物質および内部標準は、Drug Control Centre (DCC、英国キングス・カレッジ・ロンドン) のご厚意により無料で提供頂きました。カラムの初期スクリーニングおよび分析法開発に 8 種の化合物を使用しました。これらを表 1 に、使用した化合物と特定の MS 条件とともに示します。

研究の 2 段階目では、大規模な化合物群 (これもキングス・カレッジ・ロンドンの DCC より提供されたもの) を調査しました (付録を参照)。個々の標準物質を組み合わせ、2 つの混合溶液 (QC1 および QC2) を作りしました。これらの混合溶液は、分析法開発および保持時間の検証のためにメタノールで調製され、また真正品サンプルのバッチを分析する際はスパイクしたレファレンスサンプルとして、ブランクの尿中で調製されました。付録には、化合物、関連する濃度、保持時間、特定の MS 条件のリストを示します。

内部標準 (IS) 溶液にはメフルシド、エフェドリン-d₃、およびサルブタモール-d₃ (濃度 10 µg/mL) が含まれています。

真正品サンプル

1,000 名分の真正の匿名アンチ・ドーピング尿サンプルが DCC の厚意により提供され、リストに記載された最終条件で分析しました。

サンプル前処理

サンプル前処理は Nováková らの方法を適用しました [Nováková, 2015]。200 µL の尿を 790 µL のアセトニトリルと 10 µL の内部標準の混合液中に希釈し (10 µg/mL)、5,000 rcf で 10 分間遠心分離して得られた上清 2 µL をカラムに注入しました。

LC 条件

UPC²-MS/MS

LC システム:	ACQUITY UPC ² システム
検出:	Xevo TQ-XS
カラム:	Torus Diol (OH) カラム、130 Å、1.7 µm、3.0 × 100 mm
カラム温度:	35 °C
サンプル温度:	10 °C

UPC²-MS/MS

注入量: 2 μ L
流速: 1.2 mL/分
移動相 A: CO₂
移動相 B: 0.1% 強アンモニア含有メタノール
メイクアップ流速: メタノール 0.2 mL/分

グラジエントテーブル

時間 (分)	流速 (mL/分)	%A	%B	曲線
初期状態	1.2	90	10	6
1.0	1.2	90	10	6
4.0	1.2	50	50	6
4.5	1.0	43.3	56.7	6
5.0	1.0	43.3	56.7	6
5.1	1.2	90	10	6
7.0	1.2	90	10	6

MS 条件

MS システム: Xevo TQ-XS
イオン化モード: ESI+ および ESI-
キャピラリー電圧: 2.0 kV (-2.0 kV)

コリジョンエネルギー (CE) : 化合物による (付録参照)

コーン電圧 (CV) : 化合物による (付録参照)

初期カラム試験条件

最適な条件を得るため、有機モディファイヤー組成およびカラムケミストリーという2つのクロマトグラフィー次元についてスクリーニングを行いました。また、移動相 B (MPB) のモディファイヤーとして、モディファイヤーなし、0.1% ギ酸、0.1% 強アンモニア、10 mM ギ酸アンモニウムをスクリーニングしました。それぞれをメタノールに添加し、MPB として使用しました。

同じ寸法および粒子サイズ (130 Å、1.7 μm、3.0 × 100 mm) の4本のカラムもスクリーニングしました。固定相には Viridis BEH 2-エチルピリジン (2-EP)、Torus 2-PIC、Torus 1-AA、Torus Diol (OH) カラムを含めました。すべてのカラムで最終的な分析法に記載した溶媒ランプを使用しました。ただし、Diol カラム以外のすべてのカラムでの流速は 1.5 mL/分にしました。

化合物	保持時間 (分)	イオン化モード	CV (v)	[M+H] ⁺ / [M-H] ⁻	定量イオン (m/z)	定性イオン (m/z)	CE1 (eV)	CE2 (eV)
ダナゾール	1.46	ポジティブ	20	338.2	303.3	321.3	15	15
プロピオン酸フルチカゾン	1.77	ポジティブ	20	501.2	293.2	313.1	20	15
プロベネシド	3.25	ネガティブ	20	284.1	240.1	140.1	20	20
GW 1516	3.33	ポジティブ	20	454.2	188.1	256.1	45	45
ブメタニド	4.10	ネガティブ	20	363.1	207.1	80.0	20	20
メルドニウム	4.26	ポジティブ	25	147.1	59.1	132.1	20	15
エチルグルクロニド (ETG)	4.62	ネガティブ	25	221.1	85.0	75.0	15	15
3'OH スタノゾロールグルクロニド	5.28	ネガティブ	20	519.3	343.2	175.1	40	20

表 1. 初期 UPC² 試験に使用した化合物

結果および考察

カラムおよびモディファイヤーの試験

UPC² カラムおよび4種のモディファイヤーについて、限られた化合物の試験混合液を用いて初期評価を行いました。Viridis 2-EP カラムを使用した初期試験では、0.1% 強アンモニアを使用した場合に、0.1% ギ酸、10 mM ギ酸アンモニウム、あるいはモディファイヤーを使用しなかった場合と比較して、優れたピーク形状および保持が得られることが分かりました。追加のカラムによる試験により、特に 3-OH スタノゾロールグルクロニドおよびメルドニウムについては、保持、ピーク形状、テーリングの減少、分析感度などの点で Torus Diol カラムの性能がその他

の3種のカラムよりも優れていることが示されました。Diol カラムのクロマトグラフィーの例を図1に示します。試験した最初の8種のドーピング化合物では、優れたクロマトグラフィー性能が得られました。逆相 LC または GC では保持が困難なエチルグルクロニドおよびメルドニウムの両方とも、この試験でよく保持されて非常に良好なピーク形状が得られ、テーリングは最小限に抑えられました。その他の化合物でも、化学的特性が多様であるにも関わらず、良好な保持および対称のピーク形状が得られました。そのため、Diol カラムを大規模なドーピング物質のパネルおよび1,000件の真正の匿名アスリートのサンプルの分析に使用しました。

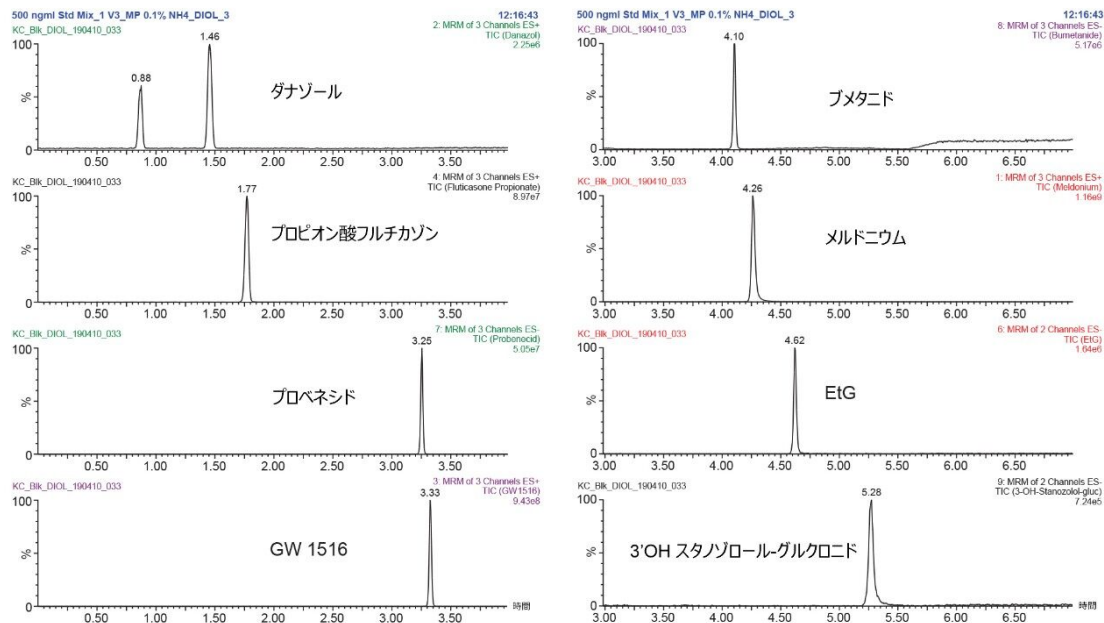


図1. 初期スクリーニング実験でのドーピング化合物の最終的なクロマトグラフィー。Torus Diol (OH) カラム (130 Å、1.7 μm、3.0 × 100 mm) でこの分離を達成できました。分析種の濃度はすべて 500 ng/mL でした。

真正サンプルの分析

付録に記載している化合物の拡張パネルを使用して、1,000件のアンチ・ドーピング真正サンプルのスクリーニングを行いました。この物質のリストはアンチ・ドーピング分析を行うラボの科学者が作成したものです。化合物は、WADA 禁止リストの主な薬物クラスを代表するものを選択しました。これらの化合物のクロマトグラムを図2に示します。化合物の大半では、保持、ピーク形状、選択性の面で良好なクロマトグラフィー性能が得られました。例えばニケタミドは早期に溶出しましたが、ピーク形状は良好でした。また、Losaccoら.[2020]は、BEHカラムおよびギ酸アンモニウムを移動相モディファイヤーとして使用した場合に保持時間の安定性に問題があると報告していましたが、今回は保持時間は安定していました。その他のピークの多くも、優れたクロマトグラフィー特性を示しました。例外として、フェンタニルなどの化合物では一貫してピークがダブルレットになっていました。オクトパミンでは顕著なテーリングが見られ、オキシモルフォンおよびカチンでは軽微なテーリングが見られました。硫酸化ステロイドの多くは、共溶出するか、構造類縁体と完全にはベースライン分離しませんでした。それでもなお

、広範なケモタイプを代表する化合物の大半で優れたクロマトグラフィー性能が得られました。

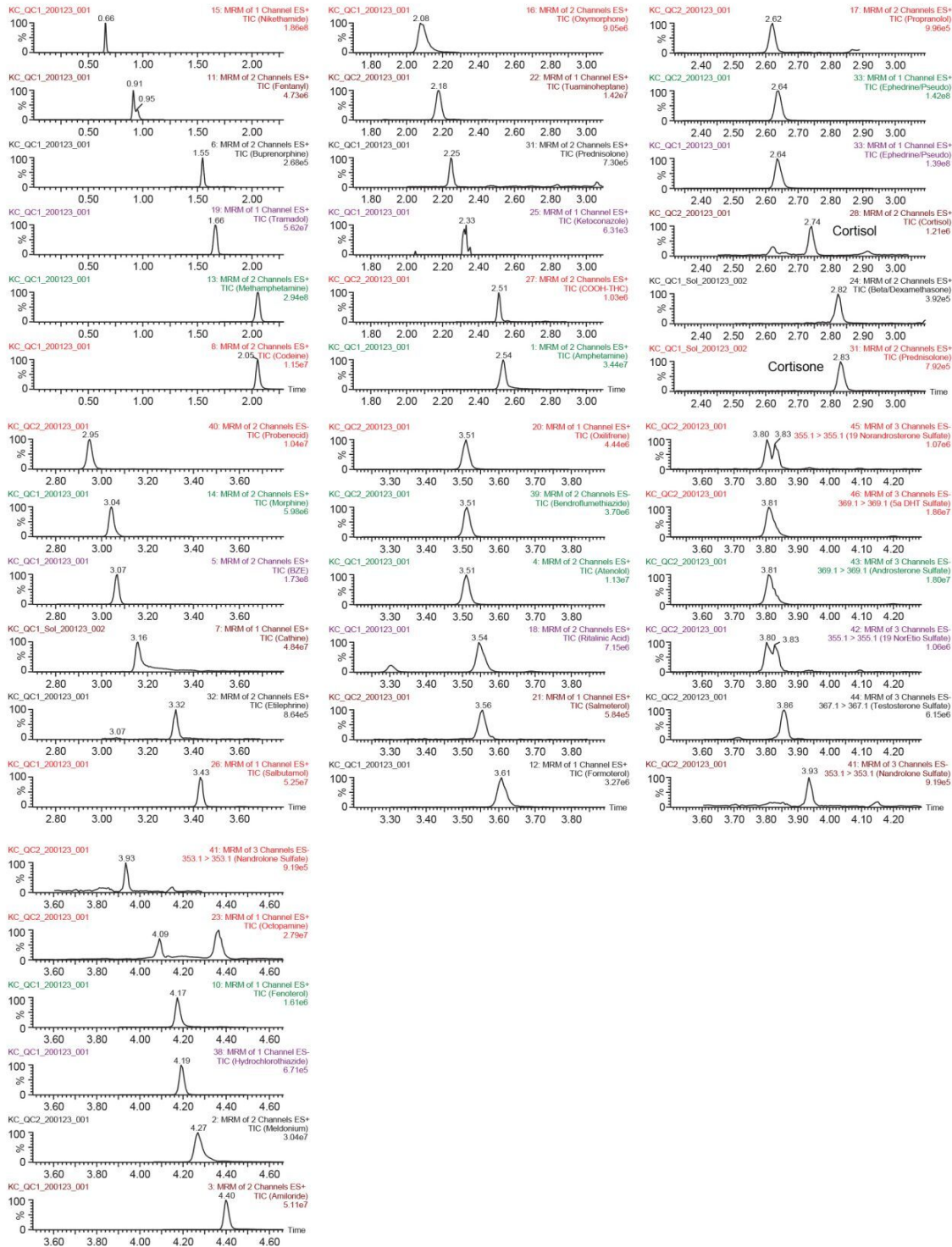


図 2. 実験の 2 段階目で使用した拡張パネルの化合物のクロマトグラフィー。コルチゾールは 2.74 分に特別にラベル付けされ、コルチゾン、プレドニゾロンの MRM チャンネル中で、2.83 分にラベル付けされています。その他は PC の主な成分として、その他の名前が付けられていない。その特定の毒性が表内録に記載されています。

チルグルクロニド、アミロリド、メルドニウムなど、極性が非常に高い化合物の保持および選択性において認められます。モルヒネ、サルメテロール、エチレフリン、アンフェタミンなど、その他の極性化合物や中程度の極性化合物でも非常に優れた保持と分離が見られ、UPC²とLCの間でオーバーラップが見られます。この広範な代替の選択性により、UPC²が重要な補完的分析法となり、LCおよびGCなどの従来のクロマトグラフィー分析法で達成できる範囲が拡大し、代替クロマトグラフィー手法による確認を行うことができます。

保持時間の安定性

レファレンス標準試料（QC1 および QC2）を各バッチの最初、途中、最後に注入したところ、すべての分析種において保持時間が安定していることがわかりました。すべての化合物のバッチ間での保持時間の %RSD は <0.6% でした。大半の化合物の %RSD は 0.5% 未満で、そのうちの 63% は 0.3% でした。これは、陽性確認のための WADA の保持時間の基準を十分に満たしています [WADA, 2015]。更に、各サンプルに含まれている内部標準をモニターしたところ、バッチ内のすべての保持時間の %RSD は <0.3% であることがわかりました。

感度

WADA では、分析のしきい値を最小要求性能限界レベル（MRPL）と定義しています。これらの値は付録のリストに記載されており、尿の QC 標準試料（QC1 および QC2）で使用されている濃度です（ただし、ヒドロクロロチアジド、プロプラノロール、ベンドロフルメチアジドについては MRPL の 50% でスパイクしました）。ケトコナゾールおよびトラマドールには確立された MRPL がなく、付録のリストに示された濃度でスパイクしました。ケトコナゾール以外の化合物は、すべて記載された濃度で本システムにより容易に同定されました。ケトコナゾールのレスポンスは検出限界 50 ng/mL の近くでしたが、それでも 23 バッチすべてのスパイクした QC サンプルで検出されました。ブプレノルフィン は 5 ng/mL で容易に検出され、フェンタニル は 2 ng/mL で検出されました。

結論

Xevo TQ-XS を使用した Waters UPC²-MS/MS システムは、GC および LC-MS アッセイの直交的な代替法として信頼性が高く、特に、他のクロマトグラフィー手法では十分保持されない極性の高い化合物について有効であることが実証されました。すべての分析種において、保持時間は 23 のバッチにわたって（1,200 回を超える注入）安定していました。分析法開発により、調査した方法のうち、Torus Diol カラムと 0.1% 強アンモニアの移動相モディファイヤーを併用した場合、ほぼすべての化合物について最良のクロマトグラフィーが得られることがわかりました。単純な希釈および注入法を使用した場合でも、このシステムには高い感度と選択性があり、MRPL でスパイクしたすべての化合物を明確に同定することができました。また、多くの場合、ポジティブおよびネガティブ ESI の両方で、50% MRPL でも同定することができました。

参考文献

1. World Anti-Doping Agency (WADA) The 2021 Prohibited List.2021 Montreal https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021list_en.pdf <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2021list_en.pdf> .(Accessed 8 Jan, 2021).
2. World Anti-Doping Agency, TD2019MRPL (WADA) Minimum Required Performance Levels for Identification of Non-Threshold Substances.2019, Montreal, https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2019mrpl_eng.pdf <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2019mrpl_eng.pdf> .(Accessed 8 Jan, 2021).
3. World Anti-Doping Agency.TD2015IDCR.Minimum Criteria for Chromatographic-Mass Spectrometric Confirmation of the Identity of Analytes for Doping Control Purposes.2015. Montreal, <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2015idcr> <<https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2015idcr>> .(Accessed 8 Jan, 2021).
4. Nováková, L, Rentsch M, Grand-Guillaume Perrenoud, A, Nicoli, R., Saugy, M., Veuthey, J, Guillarme, D. Ultra High Performance Supercritical Fluid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry for Screening of Doping Agents.II: Analysis of Biological Samples.Analytica Chimica Acta 2015 (853); 647–659.
5. Losacco, G, Rentsch, M, Plachká, K, Monteau, F, Bichon, E, LeBizec, B, Nováková, L, Nicoli, R, Kuورانne, T, Veuthey, J, Guillarme, D. Ultra High Performance Supercritical Fluid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry for Antidoping Analyses: Assessment of the Inter-Laboratory Reproducibility with Urine Samples.Analytical Science Advances 2020; 1–8.

謝辞

Jonathan P. Daneaceu、Peter Christensen および Michelle Wood - ウォーターズコーポレーション
Ivana Gavrilovič - Drug Control Centre、King's College London

付録. すべての分析種の保持時間 (RT)、濃度および MS 条件

化合物	RT (min)	濃度 (ng/mL)	イオン化モード	[M+H] ⁺ / [M-H] ⁻	CV (V)	定量イオン (m/z)	定性イオン (m/z)	CE1 (eV)	CE2 (eV)
アンフェタミン	4.40	100	ポジティブ	230.0	4	171.0	116.1	18	30
アミロライド	2.54	100	ポジティブ	136.1	10	91.1	119.0	10	10
19 ノルアンドロステロン硫酸塩	3.81	50	ネガティブ	355.1	30	355.1	231.1	25	40
19 ノルエチコロン硫酸塩	3.83	50	ネガティブ	355.2	30	355.2	231.1	25	40
5a-DHT-硫酸塩	3.81	50	ネガティブ	369.2	30	369.1	285.2	25	40
アンドロステロン硫酸塩	3.81	200	ネガティブ	369.2	30	369.2	259.1	25	40
アテノロール	3.51	100	ポジティブ	267.2	10	116.0	190.2	18	20
ベンドロフルメチアジド	3.51	100	ネガティブ	420.1	56	289.0	328.2	22	30
ベンゾイルエゴニン	3.07	100	ポジティブ	290.2	2	168.1	105.1	30	18
ベタメタゾン	2.82	30	ポジティブ	393.2	20	355.0	279.0	20	20
ブプレノフィン	1.55	5	ポジティブ	468.3	58	414.2	55.0	32	4
カチン	3.16	100	ポジティブ	134.1	44	117.1		25	
コデイン	2.05	50	ポジティブ	300.1	28	215.1	165.0	24	38
コルチゾール	2.74	30	ポジティブ	363.2	25	121.1	91.1	22	50
コルチゾン	2.83	30	ポジティブ	361.2	25	343.2	325.2		
デキサメタゾン	2.79	30	ポジティブ	393.2	20	355.0	279.0	20	20
DHEA 硫酸塩	3.81	200	ネガティブ	369.2	30	369.1	285.2	25	40
エフェドリン-d3 (IS)	2.65	100	ポジティブ	169.1	2	151.1	115.1	10	25
エフェドリン	2.64	100	ポジティブ	166.1	2	148.1		10	
エチレプリン	3.32	100	ポジティブ	182.1	20	135.0	164.1	12	30
フェノテロール	4.17	20	ポジティブ	304.2	38	135.1		16	
フェンタニル	0.92	2	ポジティブ	337.2	30	188.2	105.1	20	35
フォルモテロール	3.61	20	ポジティブ	345.1	10	149.1		18	
ヒドロクロロアジド	4.19	100	ネガティブ	295.9	62	269.0		20	
ケトコナゾール	2.33	50	ポジティブ	531.3	20	489.0		20	
メフルシド (IS)	2.21	100	ポジティブ	383.3	20	285.0	190.0	10	25
メルドニウム	4.26	200	ポジティブ	147.1	25	59.1	132.2	20	15
メタンフェタミン	2.05	100	ポジティブ	150.1	18	91.1	119.1	16	9
モルヒネ	3.04	50	ポジティブ	286.1	25	201.1	165.1	25	35
ナンドロロン硫酸塩	3.94	50	ネガティブ	353.2	30	353.1	271.1	25	40
ニケタミド	0.66	100	ポジティブ	179.1	44	108.1		18	
オクトパミン	4.09	1000	ポジティブ	136.0	40	91.1		16	
オキシリプリン	3.51	100	ポジティブ	182.0	20	105.0		20	
オキシモルフォン	2.08	50	ポジティブ	302.1	34	227.1	242.1	25	25
フレドニゾン	2.25	30	ポジティブ	361.2	25	343.2	325.2	20	20
プロベネシド	2.95	100	ネガティブ	284.1	50	240.1	139.9	16	24
プロプラノロール	2.62	50	ポジティブ	260.2	10	116.1	183.2	16	16
プソイドエフェドリン	2.64	100	ポジティブ	166.1	2	148.1		10	
リタリン酸	3.54	100	ポジティブ	220.1	25	84.0	56.0	40	40
サルブタモール-d3 (IS)	3.43	500	ポジティブ	243.2	20	225.1	151.1	7	25
サルブタモール	3.43	500	ポジティブ	240.1	20	222.0	166.0	7	10
サルメテロール	3.56	20	ポジティブ	416.2	50	380.2		18	
エピテストステロン硫酸塩	3.87	50	ネガティブ	367.2	30	367.2	351.1	25	30
テストステロン硫酸塩	3.90	50	ネガティブ	367.2	30	367.2	351.1	25	30
THC-COOH	2.51	150	ポジティブ	345.2	25	193.0	299.2	25	25
トラマドール	1.67	50	ポジティブ	264.2	25	58.0		15	
ツァミノヘプタン	2.18	100	ポジティブ	116.0	18	57.1		10	

ソリューション提供製品

ACQUITY UPC2 システム <<https://www.waters.com/134658367>>

Xevo TQ-XS タンデム四重極型質量分析計 <<https://www.waters.com/134889751>>

MassLynx MS ソフトウェア <<https://www.waters.com/513662>>

720007172JA、2021 年 2 月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.