

반도핑 관리를 위한 AssayMAP Bravo 시료 전처리 플랫폼을 사용한 반자동 GC/Q-TOF 스크리닝 소개



저자

Wim Van Gansbeke,
Aðalheiður Dóra Albertsdóttir,
Michaël Polet, and
Peter Van Eenoo
DoCoLab, 벨기에 겐트 소재
겐트 대학교

Sofia Nieto
Agilent Technologies, Inc.

개요

도핑 관리에서는 회고분석 가능성을 제공하는 분석 방법의 높은 감도와 필요한 처리량을 갖춘 스크리닝 접근 방식에 대한 요구가 지속적으로 증가하고 있습니다. 고감도 분석 장비를 선택하는 것 외에도 자동화된 고체상 추출(SPE)을 포함한 분석법의 후속 개선을 통해 검출한계(LOD)를 더욱 줄일 수 있습니다. 이 응용 자료에서는 Agilent AssayMAP Bravo 시료 전처리 플랫폼과 GC Quadrupole Time-of-Flight(GC/Q-TOF) 질량 분석기(MS)를 사용하여 기존에 사용되는 GC Triple Quadrupole(GC/TQ) MS 시스템을 보완하는 자동화된 시료 전처리를 결합한 워크플로에 대해 설명합니다. 이 조합은 도핑 관리 실험실 분석가에게 회고분석을 수행할 수 있는 가능성과 함께 결과에 대한 탁월한 효율성과 확신을 제공합니다.

서론

세계반도핑기구(WADA) 인증을 유지하기 위해 도핑 관리 실험실은 높은 감도, 선택성, 재현성뿐만 아니라 분석 방법의 정량적 기능을 달성하기 위해 노력합니다. 또한 쉽게 회고분석을 가능하게 하는 신뢰할 수 있는 스크리닝 접근 방식에 대한 수요가 계속 증가하고 있습니다.¹

WADA의 금지약물 및 분석법 목록에는 내인성 물질과 외인성 물질이 모두 포함되어 있습니다. 내인성 물질(주로 내인성 남성 호르몬 동화 작용 스테로이드(EAAS))은 매우 낮은 농도(<1ppb)에서 매우 높은 농도(>10ppm)까지 정량되어야 합니다. 외인성 물질은(외인성) 남성 호르몬 동화 작용 스테로이드(AAS), 동화제제, 펩타이드, 성장 인자, 베타-2 작용제, 호르몬 및 대사 조절제, 이뇨제 및 기타 마스킹 제, 흥분제, 마약, 칸나비노이드, 베타 차단제와 같은 다양한 종류의 화합물을 나타냅니다. 이 금지약물 목록은 매년 증가하기 때문에 더 많은 화합물을 스크리닝할 수 있도록 분석 방법을 항상 업데이트해야 합니다.

모든 화합물 등급(때로는 개별 물질)에 대해 WADA는 최소 요구 성능 수준(MRPL)을 설정했습니다. 스크리닝 분석법 또는 초기 테스트 절차(ITP)는 일반적으로 해마다 감소하는 MRPL의 절반 수준에서 이러한 외인성 물질을 검출할 수 있어야 합니다.

GC/MS는 LC/MS 기술을 보완하는 도핑 제어의 필수 도구이며 소변에서 검사된 약 600개 화합물 중 최대 400개 이상의 화합물을 다룰 수 있습니다.

LC/MS 기술은 많은 AAS 대사산물에 대한 이온화 효율이 부족하고 도핑제의 많은 입체이성질체를 분리하기에 충분한 크로마토그래피 분해능을 제공하지

않습니다. 따라서 내인성 스테로이드 프로파일의 정량을 위해 WADA는 현재 GC/MS에만 의존하고 있으며, 여기서 GC ITP 분석법은 낮은 ng/ml 범위뿐만 아니라 10ppm 이상의 농도에서 EAAS를 정확하게 정량할 수 있어야 합니다. GC Triple Quadrupole 시스템은 도핑 분석 응용 분야에 광범위하게 사용되며 탁월한 감도와 넓은 측정 범위로 인해 높은 평가를 받고 있어 표적 분석 및 정량 분석에 적합한 장비입니다.² 그러나 최신 GC/TQ 장비를 사용하더라도 분석법에서 실제로 분석할 수 있는 화합물의 수에는 제한이 있습니다. 시료 수가 증가하면 과학자들은 보다 빠른 크로마토그래피 방법론을 개발해야 한다는 압력을 받게 되며, 이는 또한 분석할 수 있는 화합물의 수에도 압력을 가하게 됩니다. 더욱이, 많은 AAS 대사산물은 티 소스에서 매우 강한 조각화를 겪으므로 MS/MS에 적합하지 않습니다. 이와 대조적으로, 고분해능 accurate mass time-of-flight(TOF) 기기는 단일 실행에서 모니터링되는 화합물 수에 제한이 없으며 복잡한 매트릭스에서도 높은 감도와 넓은 측정 범위를 제공하며 회고분석이 가능합니다.

따라서 두 가지 GC ITP 분석법의 조합이 제안됩니다. 첫 번째는 대용량 주입을 위해 PTV 주입기가 장착된 GC/TQ를 사용하는 것(가장 까다로운 AAS 및 매우 낮은 MRPL의 몇 가지 다른 화합물의 경우)이고, 두 번째는 고해상도 GC/Q-TOF를 활용하여 MRPL이 더 높은 다양한 화합물(예: 흥분제, 마약, 베타 작용제, 호르몬 조절제, 이뇨제)뿐만 아니라 고도로 조각화된 스펙트럼을 가진 일부 AAS에 사용하는 것입니다.

WADA 통계에 따르면 AAS는 지난 수십 년 동안 가장 많이 검출된 도핑 물질 중 하나로 남아 있습니다(전체 발견의 약 50%). 지난

몇 년 동안 AAS의 여러 "장기 대사산물"이 발견되었습니다. 이러한 대사산물은 훨씬 오랜 시간에 걸쳐 체내에서 배설되며, 고전적인 대사산물보다 낮은 농도로 존재하곤 합니다.

황산화는 이러한 장기 대사산물의 형성에 중요한 역할을 하며, 최근까지 LC/MS/MS는 AAS의 황산화 대사산물을 검출하는 유일한 기술로 간주되었습니다. 최근에는 고온 주입기에서 황산염 그룹을 분리하여 이러한 황산염을 GC/MS로 검출하는 방법도 입증되었습니다.^{4,5} 이는 황산염 그룹의 손실만 검출할 수 있는 LC/MS/MS에 비해 더 높은 분해능과 추가적인 구조 정보를 제공합니다.

GC/MS 기반 접근 방식의 과제는 시료 전처리이며, 이는 에틸 아세테이트를 사용한 액체-액체 추출(LLE) 또는 고체상 추출(SPE)을 사용하여 수행할 수 있습니다. SPE는 추출 회수율이 더 높고, 적절한 행굼 절차를 통해 더욱 깨끗한 추출물을 얻을 수 있습니다. 또한 SPE는 자동화에 더 적합합니다. 자동화된 SPE 기반 시료 전처리를 위한 강력한 플랫폼 중 하나는 Agilent AssayMAP Bravo 시스템입니다. AssayMAP Bravo는 다양한 계면 화학 물질과 함께 사용할 수 있는 충전된 수지 베드 카트리지를 사용하여 1~96개의 시료를 동시에 처리할 수 있는 마이크로 크로마토그래피 기반 시스템입니다. AssayMAP Bravo 시스템은 일반적으로 단백질 시료 전처리 플랫폼으로 사용되지만, 이 연구에서는 황산화 대사산물뿐만 아니라 거의 모든 극성 화합물이 LLE 분석법에 비해 훨씬 더 높은 회수율로 추출된다는 것을 보여줍니다. 공정이 소형화되면 폐기물의 양이 줄어들고 환경에 미치는 영향도 줄어듭니다.

GC/TQ, GC/Q-TOF 및 AssayMAP Bravo 시료 전처리 플랫폼을 사용하는 통합 접근 방식은 도핑 응용 분야에서 시간 효율적인 방식으로 신뢰할 수 있는 스크리닝 결과를 얻는 데 도움이 되도록 제안됩니다. 장기간 마커 역할을 할 수 있는 스테로이드의 가수분해되지 않은 황산염 대사산물의 검출 또한 설명되어 있습니다.

실험

시료

시료에는 스테로이드 제거 소변의 6개 검량기(내인성 스테로이드 프로파일에 대한 검량선), 스테로이드 제거 소변의 4가지 농도에서의 4개의 품질 관리(QC) 시료, 물 바탕 시료 1개, 음성 대조 소변 1개, 실제 소변 시료 84개가 포함되었습니다.

가수분해

시료 전처리는 96-well 플레이트 형식으로 수행되었습니다. 0.5mL의 소변에 중수소로 치환된 내부 표준물질(IS) 혼합물을 첨가하고 pH 7의 인산염 완충액에서 *E. coli* β -glucuronidase와 함께 56°C에서 최소 1시간 동안 배양했습니다.

AssayMAP Bravo 시료 전처리 플랫폼과 함께 자동 SPE를 사용한 시료 추출

자동 SPE는 AssayMAP Bravo에서 수정된 버전의 Peptide Cleanup 애플리케이션을 사용하여 Agilent AssayMAP 25 μ L 역상 (RP-S) 카트리지(G5496-60023)로 수행되었습니다(그림 1). RPS 카트리지는 300 μ L/분의 속도로 250 μ L MeOH로 프라이밍한 후 25 μ L/분의 속도로 100 μ L 20% MeOH로 평형화했습니다. 1mL 시료는 25 μ L/분의 속도로 카트리지에 로드했습니다. 그런 다음 카트리지를 25 μ L/분의 속도로 250 μ L 20% MeOH로 세척했습니다. 2개의 순차적 용리액 (첫 번째는 7.5 μ L/분에서 75 μ L MeOH, 두 번째는 7.5 μ L/분에서 75 μ L ACN)을 수집하고 결합했습니다.

에틸아세테이트를 통한 액체-액체 추출을 이용한 시료 추출

스크류캡이 있는 개별 유리관을 사용하는 것을 제외하고 "가수분해" 섹션에 설명된 대로 가수분해를 수행했습니다. 시료를 알칼리 조건(pH 9.5)에서 20분 동안 에틸아세테이트로 추출하고 유기층을 수집했습니다.

추출물을 질소 스트림 하에 40°C에서 건조시키고, MSTFA:NH₄l:ethanethiol 혼합물 50 μ L를 사용하여 80°C에서 30분 동안 유도체화했습니다.

데이터 수집 및 데이터 처리

GC/MS 분석은 Agilent 7250 GC/Q-TOF와 Agilent 7000C GC/TQ라는 두 개의 GC/MS 시스템을 사용하여 수행되었습니다. 기기 파라미터는 표 1에 정리되어 있습니다.

표 1. 데이터 수집 파라미터.

MS	Agilent 7250 Q-TOF	Agilent 7000C TQ
GC	Agilent 7890 GC	
주입구 및 라이너	SSL, 유리솜 포함 4mm UI 라이너 싱글 테이퍼	PTV, 멀티 배플 PTV 라이너
주입구 온도	275°C	120°C에서 0.05분 동안 360°C까지 12°C/초
주입량	1.4 μ L	7 μ L
주입 모드	비분할	용매 배출
컬럼	Agilent J&W HP-1 ms Ultra Inert, (2m + 10m) x 0.25mm, 0.25 μ m	Agilent J&W DB-35MS Ultra Inert, 15m x 0.25mm, 0.25 μ m
오븐 온도 프로그램	110°C에서 0.1분; 0.15분 동안 125°C까지 70°C/min, 0.15분 동안 186°C까지 35°C/min, 204°C까지 2.2°C/min, 245°C까지 20°C/min, 270°C까지 50°C/min, 320°C까지 75°C/min, 1.1분 유지	0.25분 동안 110°C; 185°C까지 60°C/min, 220°C까지 15°C/min, 250°C까지 5°C/min, 0.25분 유지, 330°C까지 55°C/min, 1.4분 유지
분석 시간	14.85분	12.94분
운반 가스	헬륨	헬륨
컬럼 유속	컬럼 1: 1mL/min, 컬럼 2: 1.2mL/min	1mL/min
백플러시 조건	2분(분석 후), 320°C(오븐), 10psi(보조 EPC 압력), 2psi(주입구 압력)	-
이송 라인 온도	310°C	310°C
사중극자 온도	150°C	150°C
이온화원 온도	230°C	280°C
이온화 모드	EI	EI
전자 에너지	70eV	70eV
방출 전류	5 μ A	35 μ A
충돌 셀 가스 유속	질소 1mL/min, 헬륨 4mL/min	질소 1.5mL/min, 헬륨 2.25mL/min
질량 범위	50~750m/z	dMRM

결과 및 토의

AssayMAP Bravo 시료 전처리 플랫폼을 이용한 도핑 관리에서의 자동화 시료 전처리의 장점

에틸 아세테이트를 사용한 수동 시료 추출은 AssayMAP Bravo 시스템을 사용한 자동 시료 전처리에 비해 훨씬 더 많은 시간이 소요되고 효율성이 떨어집니다. 5mL의 에틸 아세테이트를 증발시키는 데 약 45분이 소요되는 반면, 150µL MeOH:ACN의 경우 단 10분만 소요됩니다. 또한 LLE에는 30분이 더 소요되는 추가 시료 이동이 필요합니다. 또한 자동화는 시료 전처리 중에 무인으로 AssayMAP Bravo를 실행할 수 있기 때문에 작업 시간을 크게 줄이는 반면, 수동 분석법은 거의 연속적인 주의가 필요합니다.

자동화된 시료 전처리를 사용하면 오류 위험도 크게 줄어듭니다. 또한 많은 휘발성 화합물(주로 흥분제)이 에틸 아세테이트와 함께 증발하며 자동 SPE에 비해 추출 회수율이 매우 낮습니다. 또한, 유도체화 시약을 첨가한 후 추가 시료 이동 단계를 수행하면 추가 손실이 발생합니다.

AssayMAP Bravo 고체상 추출 프로토콜과 LLE 절차(에틸 아세테이트 사용)의 검출 한계 비교는 GC/Q-TOF 및 GC/TQ 기기를 모두 사용하여 수행되었으며 그림 2에 설명되어 있습니다. 비극성 화합물(예: 스테로이드)의 경우 AssayMAP Bravo 시료 전처리 플랫폼을 사용할 때 LOD 개선은 불과 몇 퍼센트에서 최대 약 4배까지로 그다지 중요하지 않았습니다. 4배의 LOD 개선은

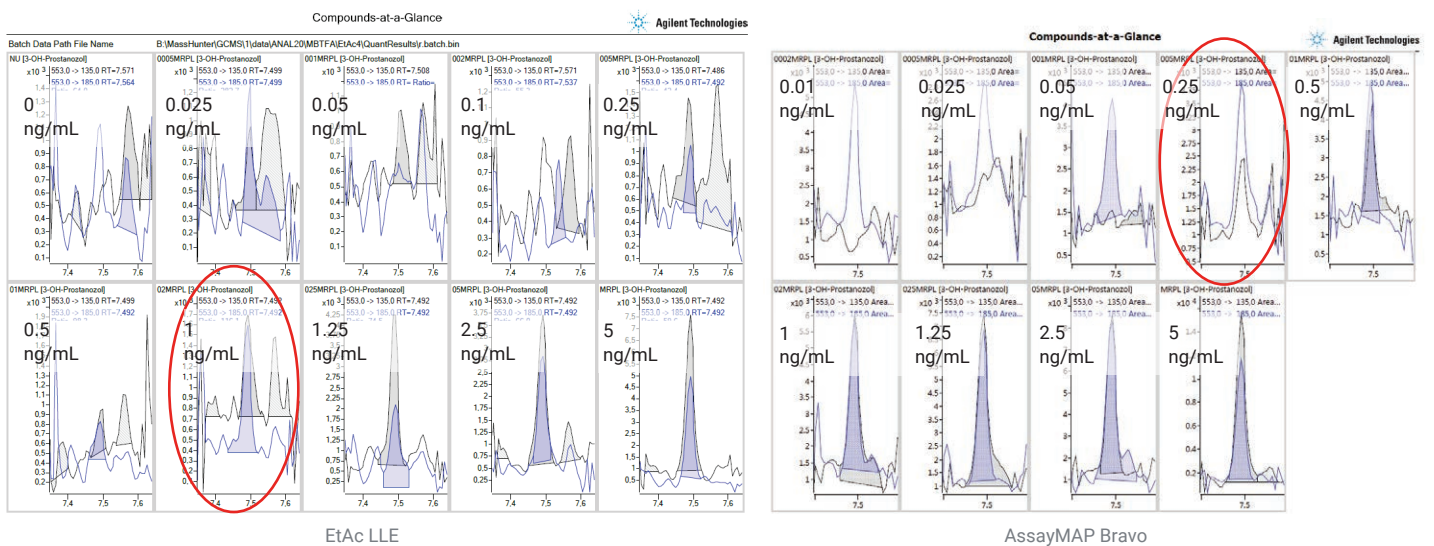
AssayMAP 추출을 통해 백그라운드가 상당히 낮아졌기 때문입니다.

더 극성인 화합물(예: 새로운 LOD가 0.4ng/mL 미만인 푸로세מיד)의 경우 AssayMAP Bravo 추출 분석법은 이전 LLE 추출 분석법에 비해 감도를 200배 이상 향상시키고 새로운 WADA MRPL을 검출하는 데 도움이 되었습니다(그림 3).



그림 1. AssayMAP Bravo 시료 전처리 플랫폼.

A 3-OH-prostanazol: 최소 LOD 1.25ng/mL



B Isometheptene: 최소 LOD 50ng/mL

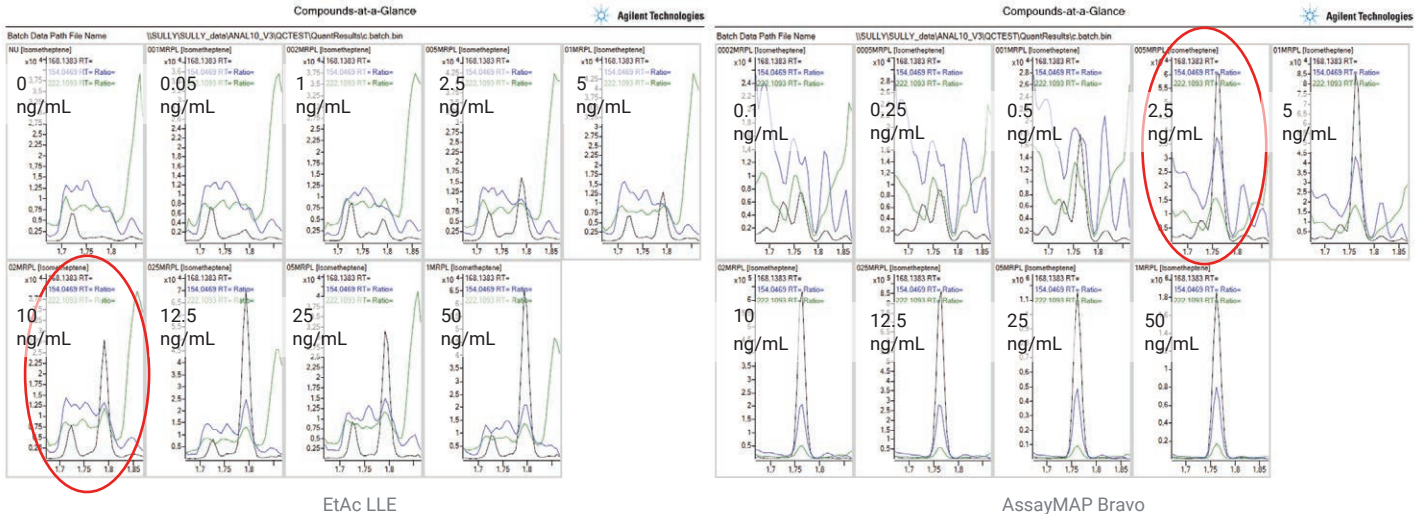


그림 2. GC/TQ로 분석한 3-OH-prostanozol에 대해(A), GC/Q-TOF로 분석한 isometheptene에 대해(B) 에틸 아세테이트(왼쪽) 및 AssayMAP Bravo(오른쪽) 추출과 함께 LLE를 사용할 때의 LOD 비교. 각 추출 기술에 대한 LOD는 빨간색 원으로 표시됩니다.

Furoseimide: 최소 LOD 20ng/mL

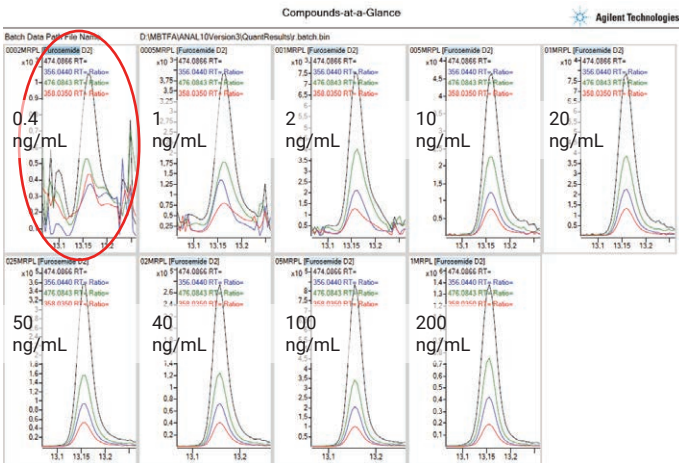


그림 3. Furoseimide에 대해 AssayMAP Bravo를 통한 추출을 사용할 때 GC/Q-TOF LOD. LOD는 빨간색 원으로 표시됩니다.

일상적인 반도핑 분석을 위한 새로운 반자동 GC/Q-TOF 스크리닝 접근 방식
GC/MS 분석을 위해 대부분의 도핑 관리 실험실에서는 triple quadrupole 기기를 사용합니다. 다중 반응 모니터링(MRM) 모드의 최적 조건에서 작동할 때 GC/TQ 시스템은 표적 화합물에 대해 매우 높은

감도를 제공할 수 있습니다. Time-of-flight 측정의 근본적인 차이로 인해 GC/Q-TOF 기반 접근 방식은 GC/TQ에 비해 가능한 범위를 확장할 수 있습니다. 데이터가 비표적 방식으로 수집되므로 모든 표적 화합물에 대해 최적화가 필요하지 않아 분석법 개발이 크게 단순화됩니다. 또한 비표적

데이터 수집을 통해 회고적 데이터 분석이 가능하므로 시료 분석 시 알려지지 않은 경우에도 추가적인 표적을 찾을 수 있습니다. 전체 스캔 수집은 또한 많은 화합물이 동시에 용리될 수 있는 크로마토그램 위치에서 MRM 분석법³에 나타날 수 있는 듀티 사이클 관련 문제를 방지합니다.

GC/Q-TOF를 스크리닝 접근 방식에 통합하기 위해 GC/Q-TOF의 정량적 범위를 먼저 평가하고 GC/TQ의 정량적 범위와 비교했습니다(그림 4). 동화 작용 스테로이드는 낮은 MRPL과 내인성 간섭으로 인해 분석이 가장 어려운 화합물 중 하나입니다. 따라서 WADA에 따라 정량이 필요한 스테로이드에 중점을 두고 각각 20개의 소변 시료로 구성된 총 5개 배치를 평가했습니다. 두 시스템 간의 직선성의 만족스러운 상관관계가 관찰되었습니다.

GC/Q-TOF를 사용하여 스테로이드에 대한 광범위한 정량 범위를 보여주는 검량의 추가 예를 그림 5에 나타냈습니다. 평가된 모든 스테로이드의 검량선에 대한 상관 계수 (R^2)는 0.997을 초과했으며 표 2에 요약되어 있습니다.

표 2. 정량이 필요한 스테로이드의 검량선에 대한 상관 계수.

물질	소변에서의 검량 농도(ng/mL)	측정 계수(R^2)
Testosterone	1-3-10-30-100-400	0.9995
Epitestosterone	1-3-10-30-100-400	0.9997
Androsterone	24-72-240-720-2,400-9,600	0.9993
Etiocolanolone	24-72-240-720-2,400-9,600	0.9987
Dihydrotestosterone	0.5-1.5-5-15-50-200	0.9986
Dehydroepiandrosterone	2-6-20-60-200-800	0.9993
4-Androstene-3,17-dione	0.5-1.5-5-15-50-200	0.9988
5 α -Androstane-3 α ,17 β -diol	2-6-20-60-200-800	0.9997
5 β -Androstane-3 α ,17 β -diol	2-6-20-60-200-800	0.9995
5 α -Androstane-3,17-dione	0.5-1.5-5-15-50-200	0.9987
5 β -Androstane-3,17-dione	0.5-1.5-5-15-50-200	0.9986
6 α OH-androstenedione	0.25-0.75-2.5-7.5-25-100	0.9988
4OH-androstenedione	0.25-0.75-2.5-7.5-25-100	0.9986
5 β -Pregnanediol	2-6-20-60-200-800	0.9971

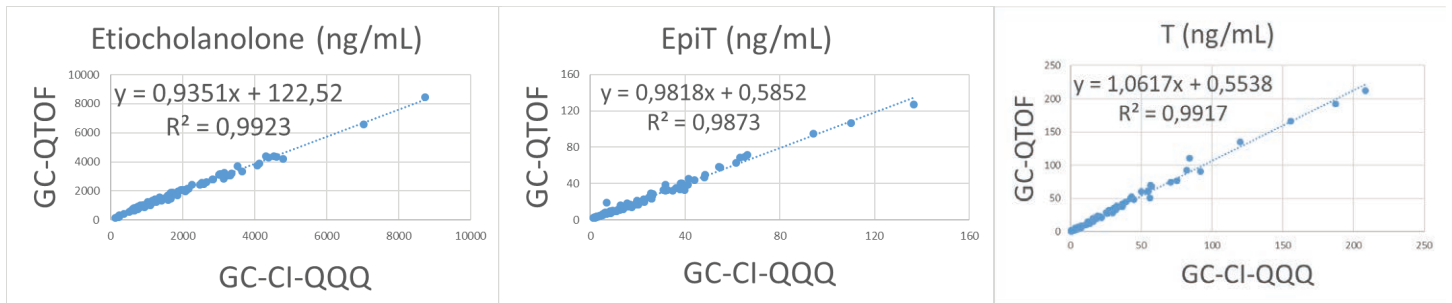


그림 4. GC/TQ 대 GC/Q-TOF의 스테로이드 프로파일링.

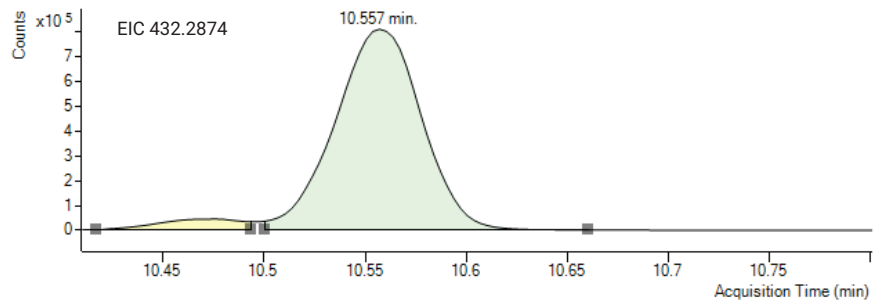
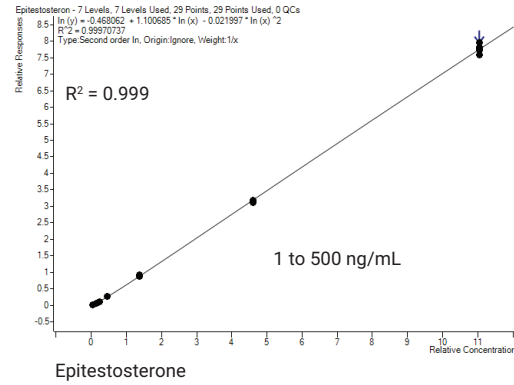
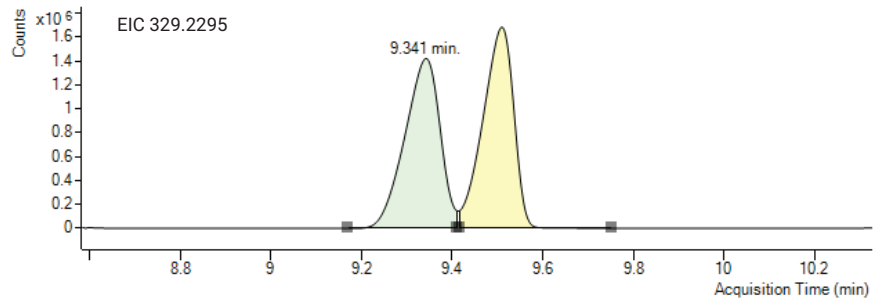
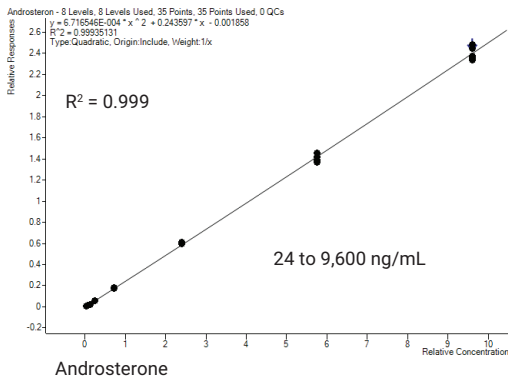
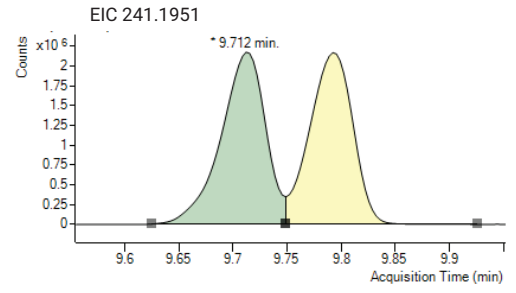
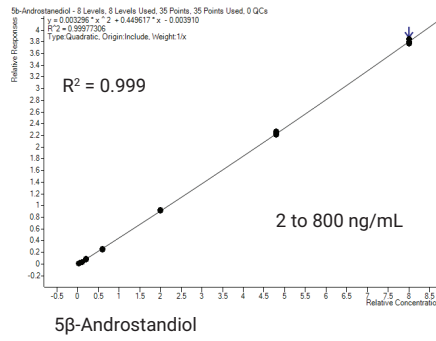
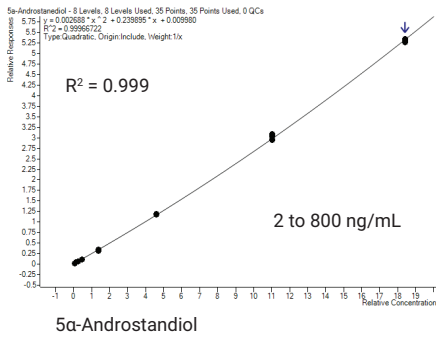


그림 5. 스테로이드에 대한 GC/Q-TOF 검량선의 예와 표적 이온에 대한 accurate mass 추출 이온 크로마토그램(EIC)(검량 범위의 가장 높은 지점).

GC/Q-TOF의 질량 측 안정성은 200회 주입 과정에서 평가되었으며 처음 100회 주입 (또는 약 24시간) 동안 질량 검량이 수행되지 않았습니다. 이후 100회 주입의 경우, 순서대로 활성화된 시스템의 자동 검량이 5개의 시료마다 수행되었습니다(그림 6).

자동 검량이 수행되면 검량에 추가 시간이 소요되지 않습니다. 이는 GC 주기의 오픈 냉각 부분에서 수행되기 때문입니다. 질량 측 드리프트를 검출하기 위해 4개 표적 이온의 m/z 가 모니터링되었습니다. 이후 100회의 주입 동안 크게 보정된 처음 100번의 주입

동안 작은 양의 편향이 관찰되었습니다. 질량 이동의 진폭은 $\pm 1.5\text{ppm}$ 미만이었으며 질량 검량 없이 절대 드리프트는 최대 약 4ppm 이었습니다.

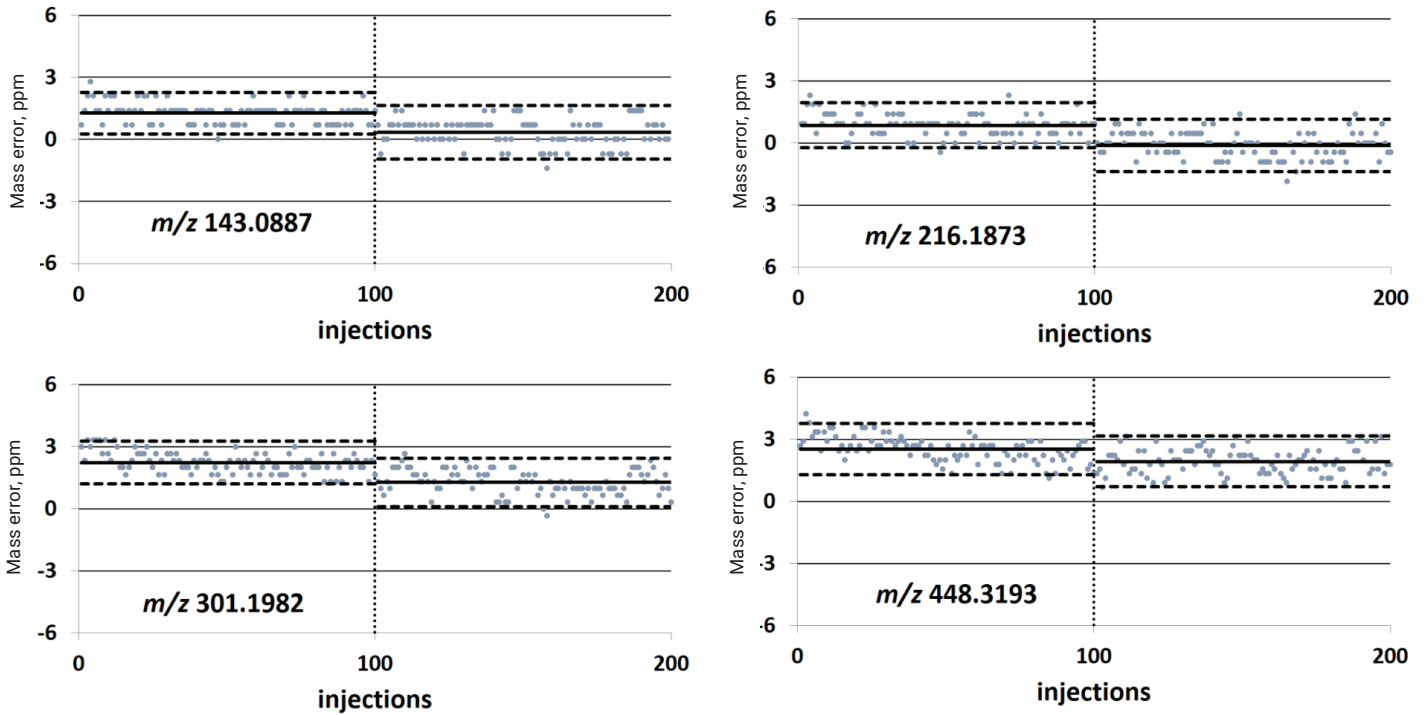


그림 6. 7250 GC/Q-TOF의 질량 측 안정성. 0~100회 주입이 검량 없이 수행되었습니다. 100~200회 주입의 경우 시스템은 5회 실행마다 자동으로 검량되었습니다.

따라서 7250 GC/Q-TOF 시스템은 도핑 관리 분석에 필요한 질량 정확도와 정량적 성능 측면에서 고품질 데이터를 제공할 수 있습니다. 현재 데이터 처리를 위한 일반적인 접근 방식에는 데이터 분석 및 보고서 생성이 포함되며, 이어서 두 명의 독립적인 과학자가 수행하는 시간이 많이 소요되는 수동 검토가 이루어집니다. 신뢰할 수 있는 방식으로 데이터 검토 프로세스를 자동화하면 사람의 개입 필요성이 대폭 감소하여 시간 효율성, 일관성 및 비편향성이 개선되는 등 여러 가지 중요한 이점을 얻을 수 있습니다.

표적 정량 또한 포함하는 새로운 GC/Q-TOF 추정물질 스크리닝 워크플로는 전적으로 MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어에서 수행되며 accurate mass 라이브러리를 기반으로 합니다. 이는 농약 및 환경 오염물질 스크리닝에 널리 사용되어 왔지만, 원칙적으로 도핑 관리와 같은 다른 응용 분야에도 적용될 수 있습니다. 그림 7에 요약된 바와 같이, accurate mass 라이브러리 스펙트럼에서 스크리너 분석법을 자동으로 생성한 후

GC/Q-TOF 스크리너의 2단계 알고리즘은 첫 번째 단계에서 이상치(질량 정확도, 신호 대 잡음비 등)를 기반으로 각 quantifier 및 qualifier 이온의 유효성을 검증합니다. 두 번째 단계에서는 화합물이 "확인"(존재), "거부"(존재하지 않음) 또는 추가 검토가 필요한지(존재할 수 있음) 여부를 결정합니다. 이 두 번째 단계에서는 라이브러리 매치 스코어, 정성 이온 수 등 화합물 수준에서 다양한 기준이 평가됩니다.

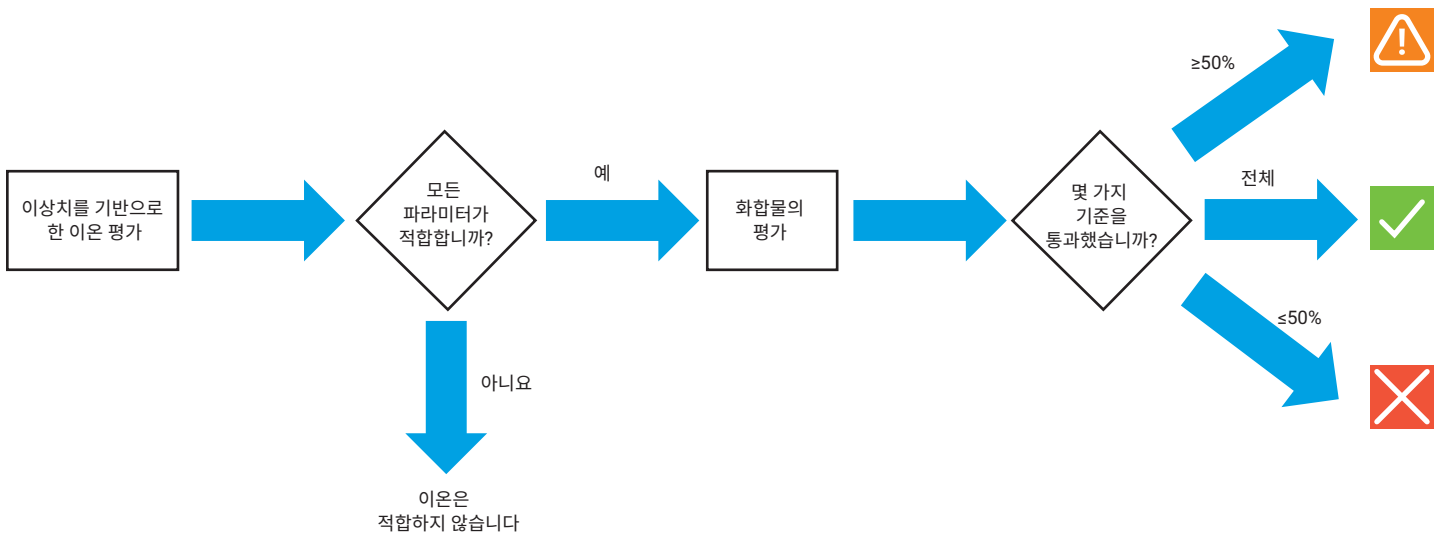


그림 7. GC/Q-TOF 스크리너의 자동 화합물 확인. 통과하지 못한 특정 화합물 기준에 따라 화합물은 거부되거나 잠정적으로 확인됩니다.

스크리너 설정은 필요한 경우 각 화합물에 대해 기준을 개별적으로 맞춤화할 수 있는 높은 수준의 사용자 유연성을 제공합니다. 스크리너 결과 요약 창은 그림 8에 나타냈습니다.

새로운 GC/Q-TOF 스크리너를 사용하면 의심스러운 화합물만 검토할 수 있어 기존의 표적 접근 방식에 비해 훨씬 더 시간 효율적입니다.

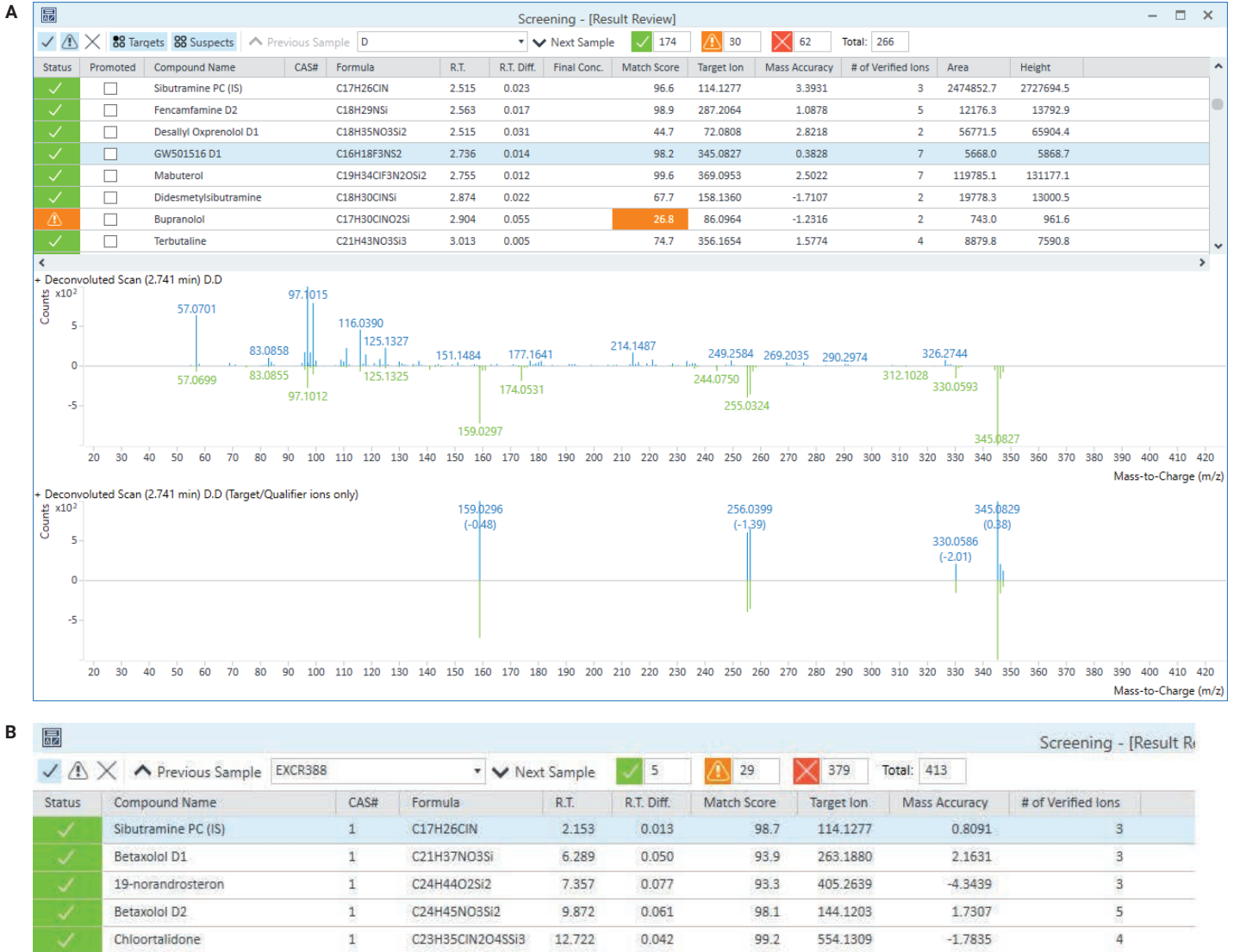


그림 8. 스크리너 결과. (A) 요약 창을 통해 사용자는 추가적인 주의가 필요한 의심스러운 검색 결과를 신속하게 검토할 수 있습니다. (B) Betaxolol(베타 차단제), chlorthalidone(이뇨제) 및 19-norandrosteron을 포함하는 EQAS 시료에 대한 요약 보고서. Sibutramine은 내부 표준물질입니다.

스테로이드의 가수분해 글루크론산화 및 비가수분해 황산염 대사산물 검출

남성 호르몬 동화 작용 스테로이드(AAS)는 스포츠 도핑 테스트에서 가장 자주 검출되는 화합물입니다.^{4,5} AAS의 장기 황산화 대사산물을 식별하는 것은 도핑 관리에 중요한 역할을 합니다. 왜냐하면 이러한 대사산물은 대체 마커로 사용될 수 있고 잠재적으로 일부 AAS의 검출 시간을 연장할 수 있기 때문입니다.⁷⁻⁹ 가수분해되지 않은 황산염을 식별하기 위해 mesterolone과 metenolone의 배출 연구가 수행되었습니다.^{10,11} 이들 스테로이드의 가수분해된 글루크론산화 대사산물과 황산화 대사산물의 특징적 이온은 표 3에 나열되어 있습니다.

동일한 개체의 metenolone 황산염 대사산물 S1(S-Met-1)을 포함하는 크로마토그램의 예는 그림 9에 나와 있습니다.

2일째에는 대사산물이 여전히 선명하게 보이지만 10일째에는 사라졌습니다.

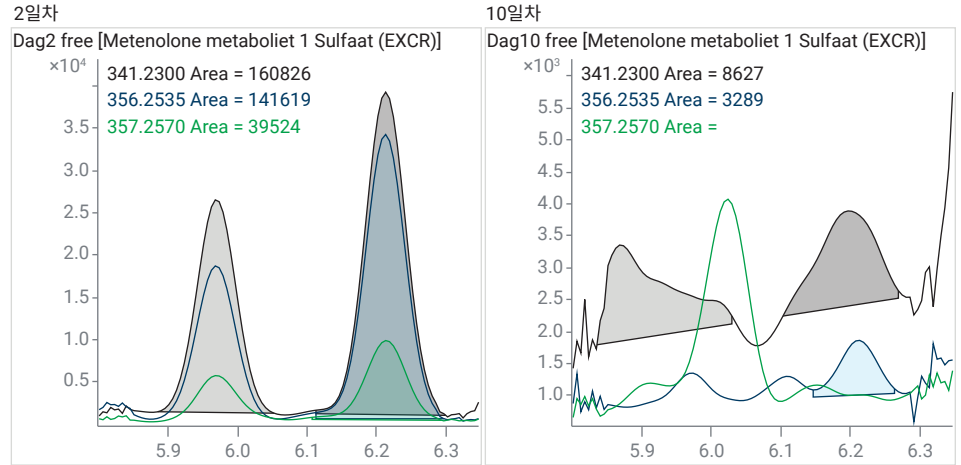


그림 9. 다양한 소변 시료의 metenolone 대사산물 S-Met-1.

표 3. Metenolone과 mesterolone의 황산화 대사산물에 대해 식별된 이온 목록.

마커 라벨	마커 이름	GC-EI-QTOF-MS			
		RT(분)	이온 1(m/z)	이온 2(m/z)	이온 3(m/z)
Metenolone					
Met-PC	Metenolone (17β-hydroxy-1-methyl-5α-androst-1-en-3-one)	11.75	446.3031	208.1278	-
Met-1	3α-Hydroxy-1-methylene-5α-androstan-17-one	10.19	446.3031	447.3050	-
Met-2	16ζ-Hydroxy-1-methyl-5α-androst-1-ene-3,17-dione	12.83	532.3219	517.2975	-
S-Met-PC	Monosulfated metenolone	7.52	356.253	266.2029	-
S-Met-1	1-Methylene-5α-androstan-17-one-3α-sulfate	6.2	356.2535	357.2571	341.2300
S-Met-2	1-Methyl-5α-androst-1-ene-3,17-dione-16ζ-sulfate	11.54	444.2874	445.2913	429.264
S-Met-3	1β-Methyl-5α-androstan-17-one-3ζ-sulfate	6.68	358.2686	359.2726	
Mesterolone					
Mest-1	3α-Hydroxy-1α-methyl-5α-androstan-17-one	10.34	448.3187	449.3900	-
Mest-2	3,6,16-Trihydroxy-1α-methyl-5α-androstan-17-one	12.98	624.3880	610.3684	609.3650
S-Mest-4	1α-Methyl-5α-androstan-17-one-3α-sulfate and 1α-Methyl-5α-androstan-17-one-3β-sulfate	5.81	358.2696	359.2726	-
S-Mest-5	Mono-sulfate form of 3β,16ζ-dihydroxy-1α-methyl-5α-androstan-17-one	9.64	446.3031	447.3045	-
S-Mest-6	Mono-sulfate form of 17ζ,4ζ-dihydroxy-1α-methyl-5α-androstan-3-one	10.21	446.3031	447.3045	-

가수분해되지 않은 mesterolone의 황산화 대사산물 중 하나의 accurate mass GC/Q-TOF 스펙트럼의 예는 그림 10에 나와 있습니다. 전체 데이터 수집 모드의 높은 감도와 정확한 질량 및 높은 분해능의 이점으로 인해 GC/Q-TOF는 이러한 대사산물을 검색하는 데 이상적인 도구입니다. 모든 대사산물은 한 번의 실행으로 쉽게 추적할 수 있습니다.

GC/Q-TOF 기반 접근 방식의 또 다른 이점은 모든 데이터가 전체 스펙트럼 수집 모드에서 수집되었기 때문에 새로운 대사산물이 발견되면 언제든지 회고적으로 검색할 수 있다는 것입니다.

Mesterolone의 배출 연구에 따르면 가수분해되지 않은 황산화 대사산물인 S-Mest-4 및 5는 기존의 가수분해된 마커에 비해 검출 시간이 크게 향상된 것으로 나타났습니다(그림 11). 이는 필요한 경우 최고의 감도를 위해 GC/TQ 기반 분석법을 포함하여 일상적인 도핑 관리 분석법에 비가수분해된 황산화 대사산물을 추가하는 것의 이점을 강력히 시사합니다.

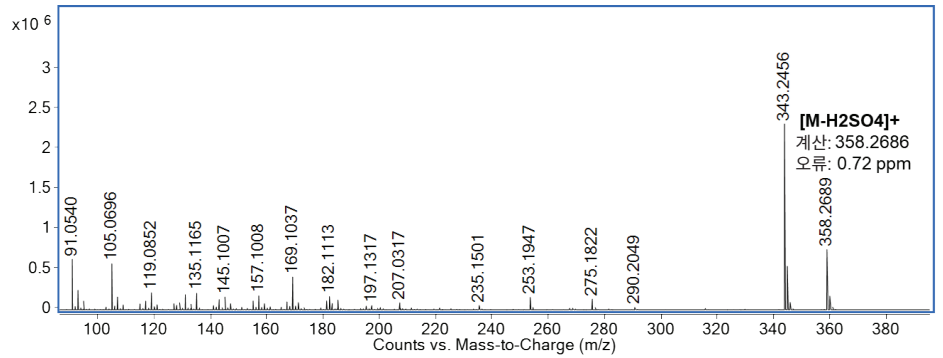


그림 10. 가수분해되지 않은 mesterolone의 황산화 대사산물(S-Mest-4)의 accurate mass 고분해능 스펙트럼.

Mesterolone

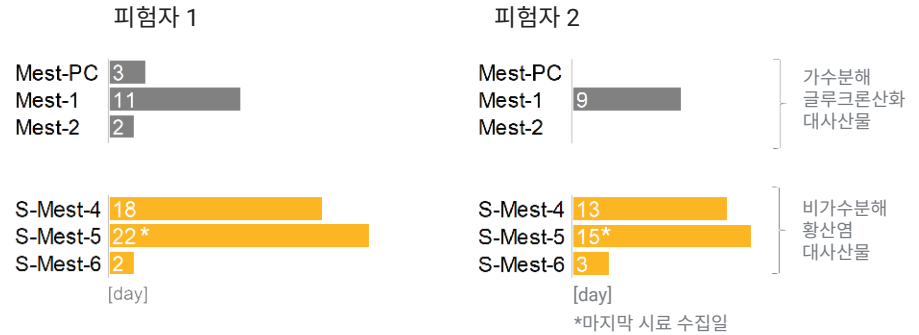


그림 11. GC/Q-TOF로 분석된 mesterolone의 두 배출 연구 결과.

결론

WADA 금지 약물 목록과 새로운 WADA 규정이 지속적으로 증가함에 따라 업데이트된 WADA 요구 사항을 충족하기 위해 도핑 관리에 새로운 워크플로 솔루션이 필요합니다. 이 응용 자료는 도핑 관리 실험실의 생산성과 효율성을 새로운 수준으로 끌어올릴 수 있는 새로운 워크플로를 설명합니다. 여기에 제안된 전체 솔루션은 회고적 잠재력을 지닌 고감도 정량 및 정성 분석에 중점을 두고 있으며 Agilent AssayMAP Bravo 시스템을 사용한 시료 전처리와 결합된 GC/Q-TOF 및 GC/TQ 기기를 포함합니다. 이 솔루션은 처리량을 크게 향상시킬 수 있으며(연간 20,000 개의 시료 달성) Agilent MassHunter 소프트웨어의 GC 스크리너 기능을 통해 시간이 많이 걸리는 데이터 검토 프로세스를 자동화할 수 있습니다. 또한, 일상적인 도핑 스크리닝 분석법에 동화 스테로이드의 황산화 대사산물을 포함시키는 것의 식별 및 이점도 여기에서 논의되었습니다.

www.agilent.com

법과학 용도.

RA45170.5273842593

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2023
2023년 9월 12일, 한국에서 발행
5994-6702KO

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

참고 문헌

1. Polet, M.; Van Gansbeke, W.; Van Eenoo, P. Development and Validation of an Open Screening Method for Doping Substances in Urine by Gas Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* **2018**, *1042*, 52-59. DOI: 10.1016/j.aca.2018.08.050
2. Van Gansbeke, W. *et al.* Improved Sensitivity by Use of Gas Chromatography-Positive Chemical Ionization Triple Quadrupole Mass Spectrometry for the Analysis of Drug Related Substances. *J. Chromatogr. B.* **2015**, *1001*, 221-40. DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.07.052
3. Stone, P. *et al.* New Dynamic MRM Mode Improves Data Quality and Triple Quad Quantification in Complex Analyses. *Agilent Technologies technical overview*, publication number 5990-3595EN, **2009**.
4. Balcells, G. *et al.* Detection and Characterization of Clostebol Sulfate Metabolites in Caucasian Population. *J. Chromatogr. B.* **2016**, *1022*, 54-63. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.03.028
5. Albertsdóttir, A. D. *et al.* Searching for New Long-Term Urinary Metabolites of Metenolone and Drostanolone Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry with a Focus on Non-Hydrolysed Sulfates. *Drug Test Anal.* **2020**, *12(8)*, 1041-1053. DOI: 10.1002/dta.2818
6. Nieto, S. *et al.* 고분해능 GC/Q-TOF와 확장된 농약 및 환경 오염물질 Accurate Mass 라이브러리를 이용한 오염물질 스크리닝. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-1346KO, **2019**.
7. 세계 반도핑 기구. **2020**. 2020 반도핑 테스트 수치. *세계 반도핑 기구*. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2020_anti-doping_testing_figures_en.pdf
8. 세계 반도핑 기구. **2019**. 2019 반도핑 테스트 수치. *세계 반도핑 기구*. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2019_anti-doping_testing_figures_en.pdf
9. 세계 반도핑 기구. **2018**. 2018 반도핑 테스트 수치. *세계 반도핑 기구*. https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2018_testing_figures_report.pdf
10. Polet, M. *et al.* Identification and Characterization of Novel Long-Term Metabolites of Oxymesterone and Mesterolone in Human Urine by Application of Selected Reaction Monitoring GC-MS/MS. *Drug Test Anal.* **2017**, *9(11-12)*, 1673-1684. DOI: 10.1002/dta.2183
11. Polet, M. *et al.* Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Non-Hydrolyzed Sulfated Steroids by Degradation Product Formation. *Drug Test Anal.* **2019**, *11(11-12)*, 1656-1665. DOI: 10.1002/dta.2606