

## AssayMAP Bravo Sample Prep Platform によるアンチドーピング管理用の半自動 GC/Q-TOF スクリーニング



### 著者

Wim Van Gansbeke,  
Aðalheiður Dóra Albertsdóttir,  
Michaël Polet, and  
Peter Van Eenoo  
DoCoLab, Ghent University,  
Ghent, Belgium

Sofia Nieto  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

ドーピング管理においては、高感度の分析メソッドと必要なスループットを備えたスクリーニングアプローチに対する要求がますます高まっています。これらによりレトロスペクティブ分析への可能性が開けるためです。高感度分析機器の選択とは別に、自動固相抽出 (SPE) など、メソッドのその後の改良により、検出下限 (LOD) をさらに下げることができます。このアプリケーションノートでは、Agilent AssayMAP Bravo Sample Prep Platform を使用した自動サンプル前処理と GC 四重極飛行時間型 (GC/Q-TOF) 質量分析計 (MS) を組み合わせて、従来から使用されている GC トリプル四重極 (GC/TQ) MS システムを補完するワークフローについて説明します。この組み合わせにより、ドーピング管理ラボの分析で優れた効率と信頼性の高い結果を得られるとともに、レトロスペクティブ分析も可能になります。

## はじめに

世界アンチドーピング機構 (WADA) の認定を維持するために、ドーピング管理ラボは、分析メソッドの感度、選択性、再現性、および定量能力を高めるべく取り組んでいます。さらに、レトロスペクティブ分析を容易に実施できる、信頼性の高いスクリーニングアプローチも、これまで以上に求められています。<sup>1</sup>

禁止薬物とそのメソッドに関する WADA のリストには、内因性物質と外因性物質の両方が記載されています。内因性物質 (主に、内因性雄性アナボリックステロイド (EAAS)) は、非常に低濃度 (< 1 ppb) から高濃度 (> 10 ppm) の範囲で定量できる必要があります。外因性物質はさまざまな化合物種を表しており、その中には特に、(外因性) 雄性アナボリックステロイド (AAS)、同化剤、ペプチド、成長因子、β-2 作動薬、ホルモン調節薬と代謝調節薬、利尿剤と他のマスキング剤、刺激剤、麻薬、カンナビノイド、ベータブロッカーなどがあります。この禁止薬物リストへの登録は年々増加しているため、より多くの化合物をスクリーニングできるよう、分析メソッドを常に更新する必要があります。

WADA は、すべての化合物種 (さらに場合によっては、個々の物質) に対して、最低限必要な性能レベル (MRPL) を規定しています。スクリーニングメソッドまたは初期検査手順 (ITP) は、こういった外因性物質を MRPL の半分の濃度で検出できるものでなければならず、概してこのレベルは年々、低くなっています。

GC/MS は、LC/MS 手法を補完する、ドーピング管理に不可欠なツールであり、尿中のスクリーニング対象となる約 600 種類の化合物のうち、最大 400 種類の化合物を検出できます。

LC/MS 手法では、多くの AAS 代謝物でイオン化効率が低く、ドーピング剤の立体異性体の多くを分離するのに十分なクロマトグ

ラフィー分離能が得られません。そのため、WADA は現在、内因性ステロイドプロファイルの定量については GC/MS に依存しています。GC ITP メソッドでは、10 ppm を超える濃度の EAAS だけではなく、低 ng/mL 範囲でも正確に定量できる必要があります。GC トリプル四重極システムは、ドーピング分析アプリケーションで広く使用されています。その卓越した感度と広いダイナミックレンジが非常に高く評価され、ターゲット分析や定量に最適な機器となっています。<sup>2</sup> ただし、最新の GC/TQ 機器の場合でも、1 つのメソッドで実際に分析できる化合物の数には限度があります。サンプル数が増加すると、科学者はより高速なクロマトグラフィー手法の開発を迫られることになり、分析可能な化合物の数も圧迫されることとなります。さらに、AAS 代謝物の多くは、EI イオン源で非常に強力なフラグメンテーションを受けるため、MS/MS にはあまり適していません。対照的に、高分解能の精密質量飛行時間型 (TOF) 機器では、1 回の分析でモニターする化合物の数に制限がなく、複雑なマトリックスにおいて高い感度と広いダイナミックレンジが実現でき、レトロスペクティブ分析も可能です。

したがって、今回、2 つの GC ITP メソッドを組み合わせることを提案します。1 つは、PTV サインジェクタを搭載した GC/TQ を使用して大容量注入を実施するメソッド (最も要求の厳しい AAS、および MRPL が非常に低い他のいくつかの化合物向け)、もう 1 つは、高分解能 GC/Q-TOF の利点を活かした、MRPL のより高い、より幅広い化合物 (刺激剤、麻薬、β-作動薬、ホルモン調節薬、利尿剤など) およびスペクトルのフラグメント化が進んだいくつかの AAS 向けのメソッドです。

WADA の統計によると、AAS は過去数十年にわたり、最も多く検出されたドーピング物質のうちの 1 つであり続けています (全検出物質の約 50%)。ここ数年の間では、AAS の

「長期代謝物」がいくつか発見されています。こういった代謝物は、体内から排出されるまでの時間がかかり長く、多くの場合、従来の代謝物よりも低濃度で存在しています。

硫酸化は、このような長期代謝物の形成に重要な役割を果たしており、最近まで、LC/MS/MS は AAS の硫酸化代謝物を検出する唯一の手法だと考えられていました。最近では、ホットインジェクタで硫酸基を切断することが可能になったため、これらの硫酸塩が GC/MS で検出されることも実証されています。<sup>4,5</sup> これにより、硫酸基の損失のみが検出できる LC/MS/MS と比較してより分解能が高くなり、さらに追加の構造情報も得られます。

GC/MS ベースのアプローチで課題となるのはサンプル前処理です。これは酢酸エチルによる液液抽出 (LLE) で実施するか、または固相抽出 (SPE) で実施します。SPE は抽出回収率が高く、洗浄手順が適切であれば、よりクリーンな抽出物も得られます。さらに、SPE は自動化に適しています。自動 SPE ベースのサンプル前処理用の強力なプラットフォームに、Agilent AssayMAP Bravo システムがあります。AssayMAP Bravo は、マイクロクロマトグラフィーベースのシステムです。さまざまな表面ケミストリで使用できる樹脂充填剤カートリッジを使用することにより、1 ~ 96 サンプルを並行して処理できます。AssayMAP Bravo システムは通常、タンパク質サンプル前処理プラットフォームとして使用されます。しかし本実験では、硫酸化代謝物だけではなく、事実上すべての極性化合物が、LLE メソッドと比較して非常に高い回収率で抽出されることを示します。プロセスが小型化することによって、廃棄物の量は減少し、環境への影響も低減します。

GC/TQ、GC/Q-TOF、および AssayMAP Bravo Sample Prep Platform を用いた統合アプローチにより、ドーピングアプリケーションにおいて、時間効率の高い方法で信頼性の高いスクリーニング結果を得ることができると考えられます。長期マーカーとして機能する、ステロイドの非加水分解硫酸化代謝物の検出についても説明します。

## 実験手法

### サンプル

サンプルには、ステロイドを除去した尿中の 6 種類のキャリブレータ（内因性ステロイドプロファイルの検量線）、ステロイドを除去した尿中の異なる 4 濃度での 4 種類の品質管理 (QC) サンプル、1 種類のブランク水サンプル、1 種類の陰性対照尿、84 種類の真正尿サンプルを含めました。

### 加水分解

サンプル前処理は、96 ウェルプレートフォーマットで実施しました。0.5 mL の尿に重水素化内部標準 (IS) 混合物をスパイクし、pH 7 のリン酸緩衝液中で大腸菌 β-グルクロニダーゼとともに、56 °C で最低でも 1 時間反応させました。

### 自動 SPE と AssayMAP Bravo Sample Prep Platform を用いたサンプル抽出

自動 SPE は、Agilent AssayMAP 25 µL 逆相 (RP-S) カートリッジ (G5496-60023) を用いて、AssayMAP Bravo でペプチド精製アプリケーションの改良版により実施しました (図 1)。RPS カートリッジは 250 µL の MeOH を用いて 300 µL/min でプライミングしてから、100 µL の 20 % MeOH を用いて 25 µL/min で平衡化しました。1 mL サンプルは、25 µL/min でカートリッジにロードしました。次に、カートリッジを 250 µL の 20 % MeOH を用いて 25 µL/min で洗浄しました。2 つの連続溶出液（最初の溶出液は 75 µL の MeOH を用いて 7.5 µL/min で溶出、2 番目の溶出液は 75 µL の ACN を用いて 7.5 µL/min で溶出）を収集して一緒にしました。

### 酢酸エチルによる液液抽出を用いたサンプル抽出

加水分解は、スクリーキャップ付きの個別のガラスチューブを使用する以外は、「加水分解」のセクションの説明に従って実施しました。サンプルを、アルカリ性条件 (pH 9.5) で酢酸エチルにより 20 分間抽出し、有機層を収集しました。

抽出物を窒素流下の 40 °C で乾燥させ、50 µL の MSTFA:NH<sub>4</sub>l: エタンチオールの混合物を用いて、80 °C で 30 分間誘導体化しました。

### データ取り込みとデータ処理

Agilent 7250 GC/Q-TOF および Agilent 7000C GC/TQ の 2 つの GC/MS システムを用いて、GC/MS 分析を実施しました。機器パラメータを表 1 に示します。

表 1. データ取り込みパラメータ

MS	Agilent 7250 Q-TOF	Agilent 7000C TQ
<b>GC</b>	<b>Agilent 7890 GC</b>	
注入口とライナ	SSL、4 mm UI ライナシングルテーパー、ウール付き	PTV、マルチパッフル PTV ライナ
注入口温度	275 °C	120 °C で 0.05 分間 12 °C/sec で 360 °C まで昇温
注入量	1.4 µL	7 µL
注入モード	スプリットレス	溶媒バント
カラム	Agilent J&W HP-1 ms ウルトライナート、 (2 m + 10 m) × 0.25 mm、0.25 µm	Agilent J&W DB-35MS ウルトライナート、 15 m × 0.25 mm、0.25 µm
オープン温度プログラム	110 °C で 0.1 分間、 70 °C/min で 125 °C まで昇温して 0.15 分間、 35 °C/min で 186 °C まで昇温して 0.15 分間、 2.2 °C/min で 204 °C まで昇温、20 °C/min で 245 °C まで昇温、50 °C/min で 270 °C まで昇温、 75 °C/min で 320 °C まで昇温、1.1 分間保持	110 °C で 0.25 分間、 60 °C/min で 185 °C まで昇温、 15 °C/min で 220 °C まで昇温、 5 °C/min で 250 °C まで昇温して 0.25 分間保持、 55 °C/min で 330 °C まで昇温、1.4 分間保持
分析時間	14.85 分	12.94 分
キャリアガス	ヘリウム	ヘリウム
カラム流量	カラム 1 : 1 mL/min、 カラム 2 : 1.2 mL/min	1 mL/min
バックフラッシュ条件	2 分 (ポストラン)、 320 °C (オープン)、 10 psi (AUX EPC 圧力)、 2 psi (注入口圧力)	-
トランスファライン温度	310 °C	310 °C
四重極温度	150 °C	150 °C
イオン源温度	230 °C	280 °C
イオン化モード	EI	EI
イオン化エネルギー	70 eV	70 eV
イオン化電流	5 µA	35 µA
コリジョンセルガスフロー	窒素 1 mL/min、 ヘリウム 4 mL/min	窒素 1.5 mL/min、 ヘリウム 2.25 mL/min
質量範囲	50 ~ 750 m/z	dMRM

## 結果と考察

### AssayMAP Bravo Sample Prep Platform を用いた、ドーピング管理における自動サンプル前処理の利点

AssayMAP Bravo システムを用いた自動サンプル前処理と比較して、酢酸エチルによる手動サンプル抽出は大幅に時間がかかり、効率的ではありません。5 mL の酢酸エチルを蒸発させるのに約 45 分かかるとに対して、150  $\mu$ L の MeOH:ACN では 10 分しかかかりません。LLE ではさらに、追加のサンプル移送にもう 30 分かかります。自動化により、手動によるメソッドではほとんど絶え間なく注意を払う必要があるサンプル前処理中に、AssayMAP Bravo から離れることができるため、作業時間も大幅に短縮されます。

自動化サンプル前処理を使用すると、エラーのリスクも大幅に低減します。また、酢酸エチルとともに多くの揮発性化合物（主に刺激剤）が蒸発するため、抽出回収率は自動化された SPE のほうで大幅に向上します。誘導体化試薬の添加後に追加のサンプル移送ステップを実施することで、さらなる損失も発生します。

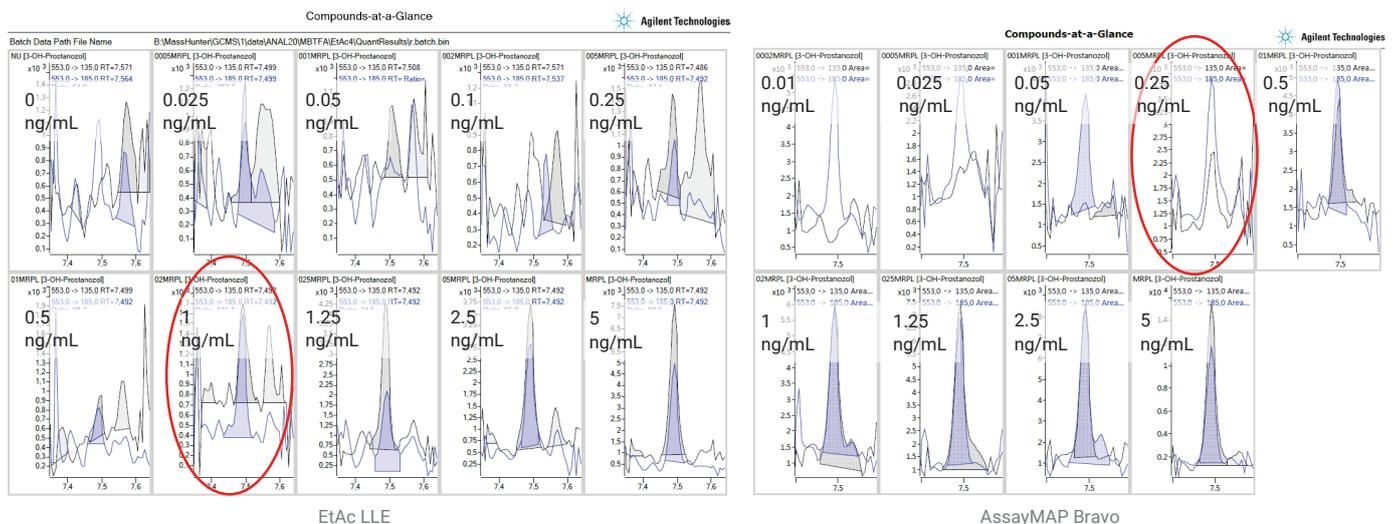
LLE 手順（酢酸エチルを使用）と AssayMAP Bravo の固相抽出プロトコルの検出下限を、GC/Q-TOF と GC/TQ の両方の機器を使用して比較したものを、図 2 に示します。非極性化合物（ステロイドなど）の場合、AssayMAP Bravo Sample Prep Platform を使用した際の LOD の改善程度は、わずかに数パーセントから最大約 4 倍であり、あまり高くはありませんでした。LOD が 4 倍改善されたのは、AssayMAP 抽出によりバックグラウンドが大幅に低下したためでした。

より極性の高い化合物（新しい LOD が 0.4 ng/mL 未満であるフロセמידなど）の場合、AssayMAP Bravo 抽出メソッドは、以前の LLE 抽出メソッドと比較して感度を 200 倍超も向上させ、新しい WADA MRPL での検出に役立ちました（図 3）。



図 1. AssayMAP Bravo Sample Prep Platform

### A 3-OH-プロスタノゾール：最小 LOD 1.25 ng/mL



**B** イソメテブテン：最小 LOD 50 ng/mL

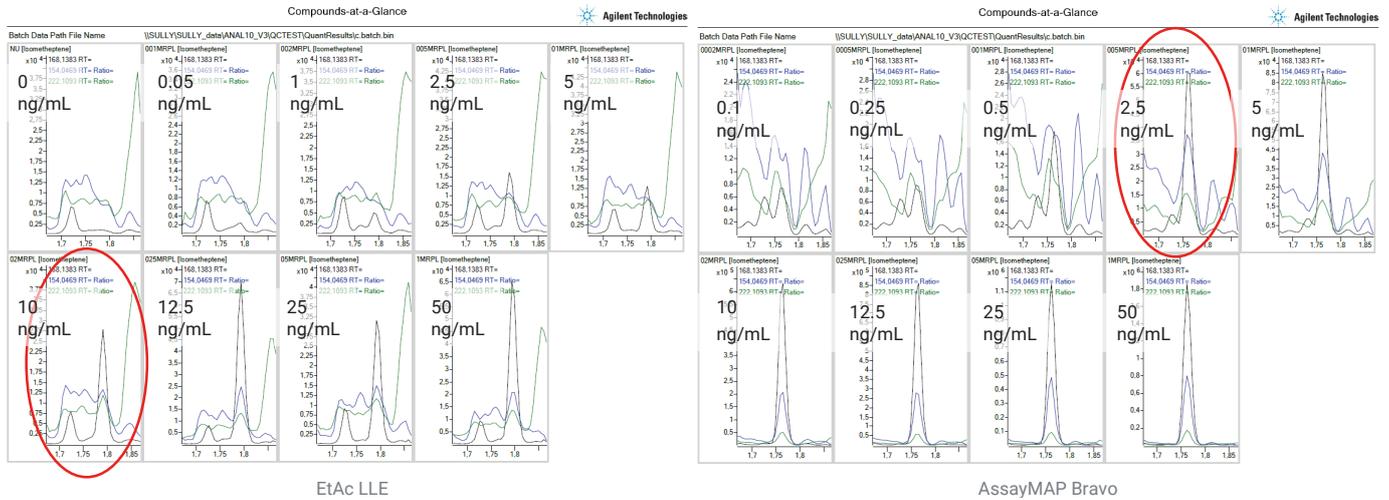


図 2. GC/TQ で分析した 3-OH-プロスタノール (A) と GC/Q-TOF で分析したイソメテブテン (B) の酢酸エチルによる LLE (左) 抽出および AssayMAP Bravo (右) 抽出を使用した際の LOD の比較。各抽出手法の LOD を赤丸部分で示しています。

フロセמיד：最小 LOD 20 ng/mL

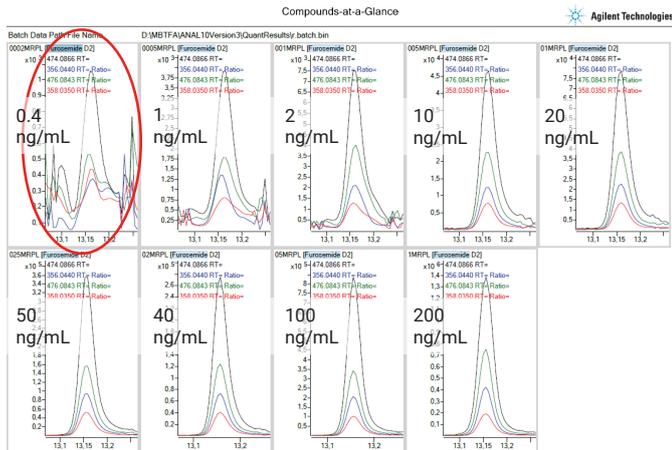


図 3. フロセמידに AssayMAP Bravo による抽出を使用した際の GC/Q-TOF の LOD。LOD を赤丸部分で示しています。

**ルーチンアンチドーピング分析向けの新しい半自動 GC/Q-TOF スクリーニングアプローチ**

大部分のドーピング管理ラボでは、GC/MS 分析にトリプル四重極機器を使用しています。GC/TQ システムは、マルチプルリアクションモニタリング (MRM) モードにおいて最適な条件で動作させることにより、ターゲット化合物に対してきわめて高い感度を実現できます。

GC/Q-TOF ベースのアプローチでは、飛行時間型測定における根本的な相違点により、GC/TQ と比較して実施可能な処理の範囲を広げることができます。データはノンターゲット方式で収集されるため、すべてのターゲット化合物に対して最適化を実施する必要はなく、メソッド開発が大幅に簡素化されます。また、ノンターゲットのデータ収集により、レトロスペクティブなデータ解析が実施できるようになり、

サンプル分析時にターゲットが不明の場合ですら追加のターゲットを探すことが可能です。フルスキャン収集により、多くの化合物が共溶出する可能性のあるクロマトグラムの部分において、MRM メソッド<sup>3</sup>でのデューティサイクルに関連する懸念も回避できます。

GC/Q-TOF をスクリーニングアプローチに組み込むために、最初に GC/Q-TOF の定量範囲を評価して、GC/TQ の定量範囲と比較しました (図 4)。アナボリックステロイドは、MRPL が低く内因性干渉が存在するため、特に分析が難しい化合物の 1 つです。そのため、WADA に従って定量が必要なステロイドに注目し、合計 5 バッチ (各 20) の尿サンプルを評価しました。2 つのシステムの直線性について、優れた相関関係が認められました。

GC/Q-TOF を用いてステロイドの定量範囲を拡大したことを示すキャリブレーションの別の例を、図 5 に示します。評価したすべてのステロイドの検量線の相関係数 ( $R^2$ ) は 0.997 を超えていましたが、その結果を表 2 に示します。

表 2. 定量が必要なステロイドの検量線の相関係数

物質	尿のキャリブレーションレベル (ng/mL)	決定係数 ( $R^2$ )
テストステロン	1-3-10-30-100-400	0.9995
エピテストステロン	1-3-10-30-100-400	0.9997
アンドロステロン	24-72-240-720-2,400-9,600	0.9993
エチオコラノロン	24-72-240-720-2,400-9,600	0.9987
ジヒドロテストステロン	0.5-1.5-5-15-50-200	0.9986
デヒドロエピアンドロステロン	2-6-20-60-200-800	0.9993
4-アンドロステン-3,17-ジオン	0.5-1.5-5-15-50-200	0.9988
5 $\alpha$ -アンドロスタン-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -ジオール	2-6-20-60-200-800	0.9997
5 $\beta$ -アンドロスタン-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -ジオール	2-6-20-60-200-800	0.9995
5 $\alpha$ -アンドロスタン-3,17-ジオン	0.5-1.5-5-15-50-200	0.9987
5 $\beta$ -アンドロスタン-3,17-ジオン	0.5-1.5-5-15-50-200	0.9986
6 $\alpha$ OH-アンドロステンジオン	0.25-0.75-2.5-7.5-25-100	0.9988
40H-アンドロステンジオン	0.25-0.75-2.5-7.5-25-100	0.9986
5 $\beta$ -プレグナジオール	2-6-20-60-200-800	0.9971

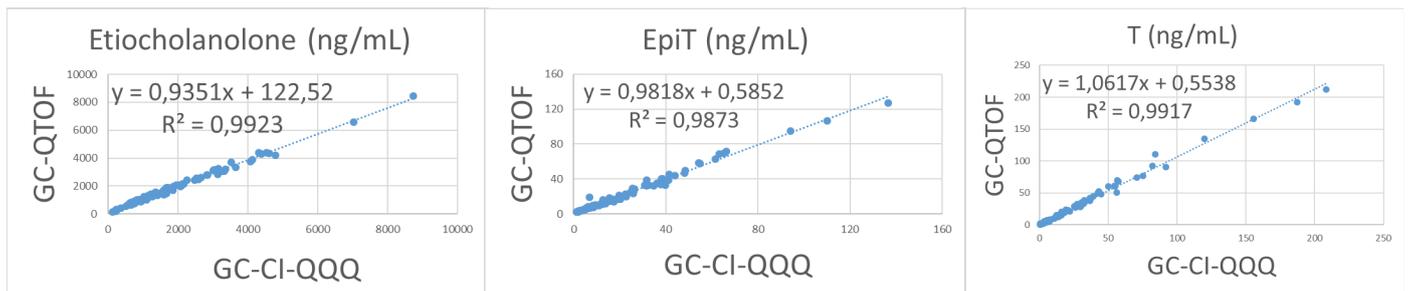


図 4. GC/TQ 対 GC/Q-TOF のステロイドのプロファイル

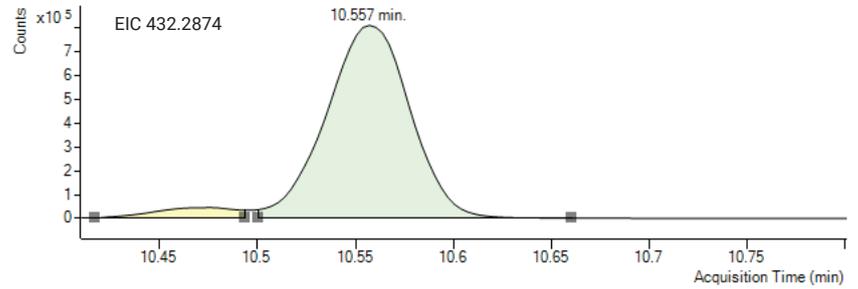
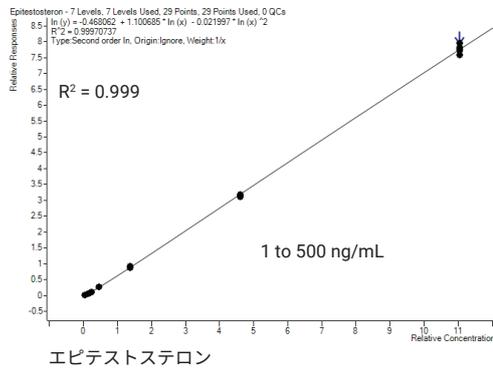
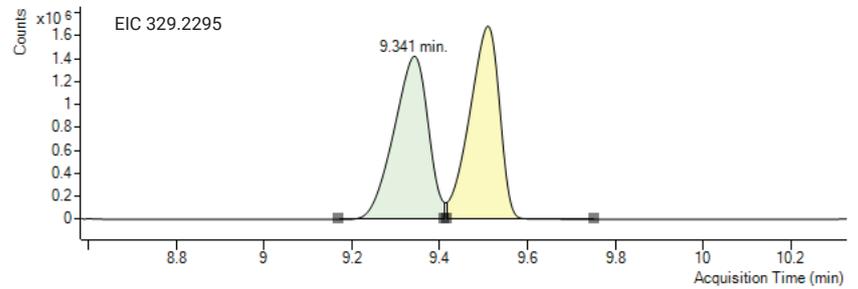
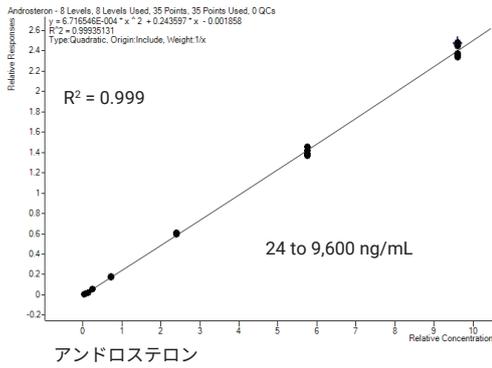
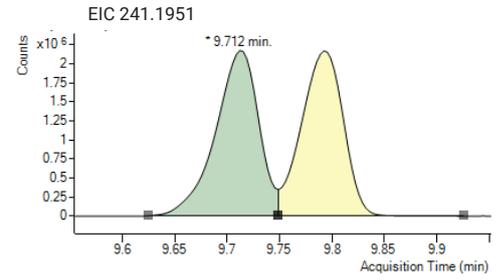
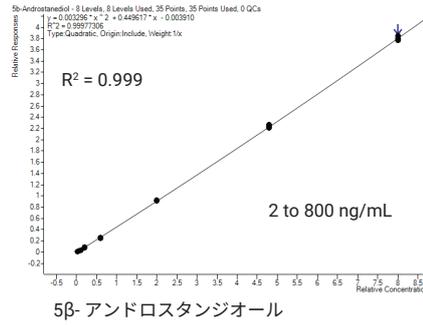
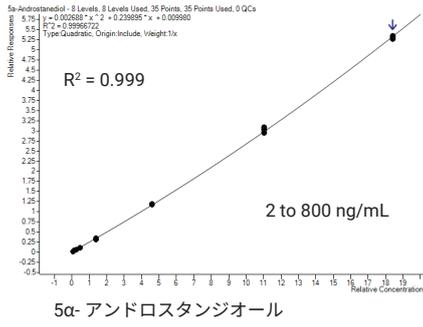


図 5. ステロイドの GC/Q-TOF 検量線、およびターゲットイオンの精密質量抽出イオンクロマトグラム (EIC) (キャリブレーション範囲の最高点) の例

200回の注入の間、GC/Q-TOFの質量軸安定性を評価しましたが、最初の100回の注入の間（約24時間）は、質量補正を実施しませんでした。その後の100回の注入では、シーケンスで有効にされている、システムの自動キャリブレーションを5サンプルごとに実施しました（図6）。ここで注目すべきことは、自動

キャリブレーションはGCサイクルのオープン冷却時に実施されるため、キャリブレーションに余計な時間がかからない点です。4種類のターゲットイオンの $m/z$ をモニターして、質量軸のドリフトを検出しました。最初の100回の注入時には小さい正バイアスが観察されましたが、その後の100回の注入時にはほぼ補正

されました。質量シフトの振幅は $\pm 1.5$  ppm未満であり、質量補正しない場合の絶対ドリフト量は最大約4 ppmでした。

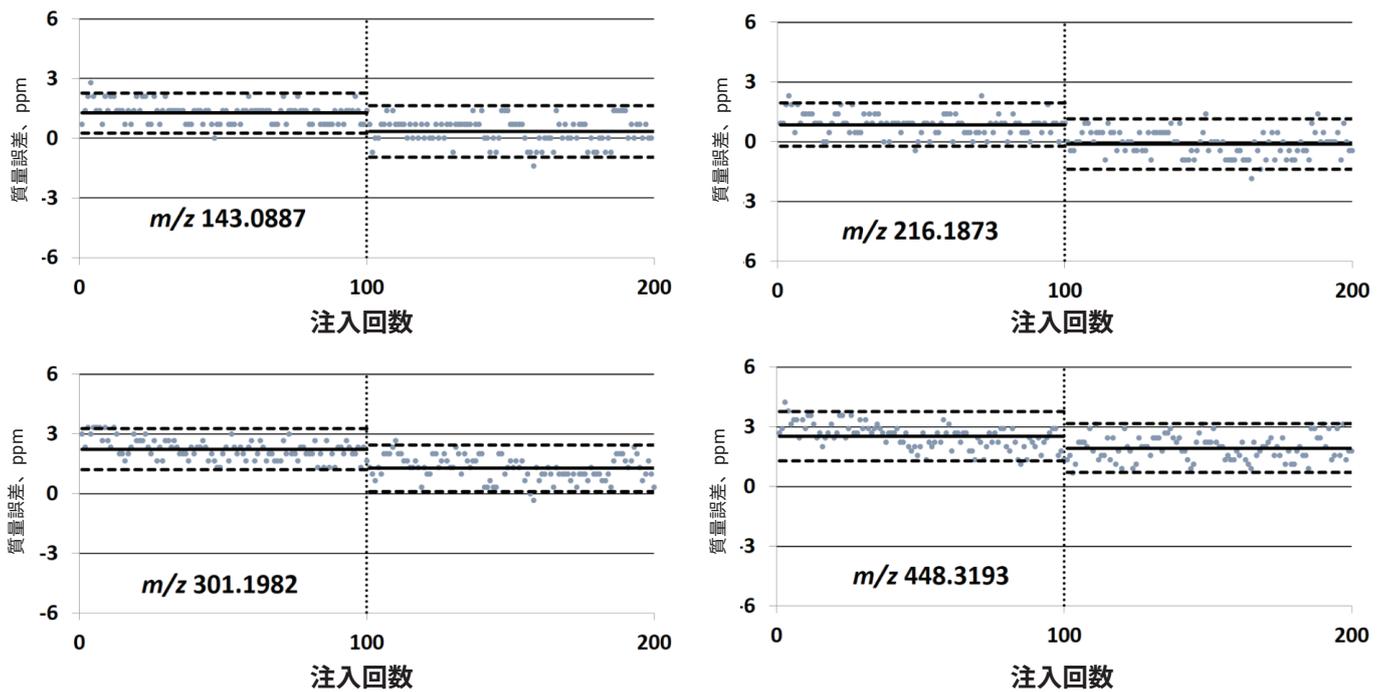


図6. 7250 GC/Q-TOFの質量軸安定性。0～100回の注入は、キャリブレーションなしで実施しました。100～200回の注入では、5サンプルごとにシステムを自動的にキャリブレーションしました。

このように、ドーピング管理分析に必要な質量精度と定量能力の両方に関して、7250 GC/Q-TOF システムは高品質のデータを提供できます。現在、データ処理の代表的なアプローチでは、データ解析とレポート作成後、別の2人の科学者が時間をかけて手作業で確認しています。信頼性の高い方法でデータ確認プロセスを自動化すれば、作業者の関与の必要性が大幅に低減するため、時間効率の改善、一貫性の向上、不偏性の実現など、多くの重要な利点が得られます。

ターゲット定量も含む、新しい GC/Q-TOF サスペクトスクリーニングのワークフローは、精密質量ライブラリをベースに、MassHunter Quantitative Analysis ソフトウェアで完全に実施できます。このワークフローは、農業や環境汚染物質のスクリーニングに広く使用されていますが<sup>6</sup>、原理的には、ドーピング管理などの他のアプリケーションにも適用できます。図7に示すように、精密質量ライブラリのスペクトルからスクリーナメソッドを自動作成した後、GC/Q-TOF Screener の2段階アルゴリ

ズムにより、第1段階での外れ値（質量精度、S/N比など）に基づいて、各定量イオンと確認イオンをバリデーションします。第2段階では、化合物が、「確認済み」（存在する）、「不合格」（存在しない）、または追加確認が必要（存在する可能性がある）のいずれであるのかが判別されます。また、それと同時に、ライブラリ一致スコアや確認済みイオンの数など、さまざまな基準が化合物レベルで評価されます。

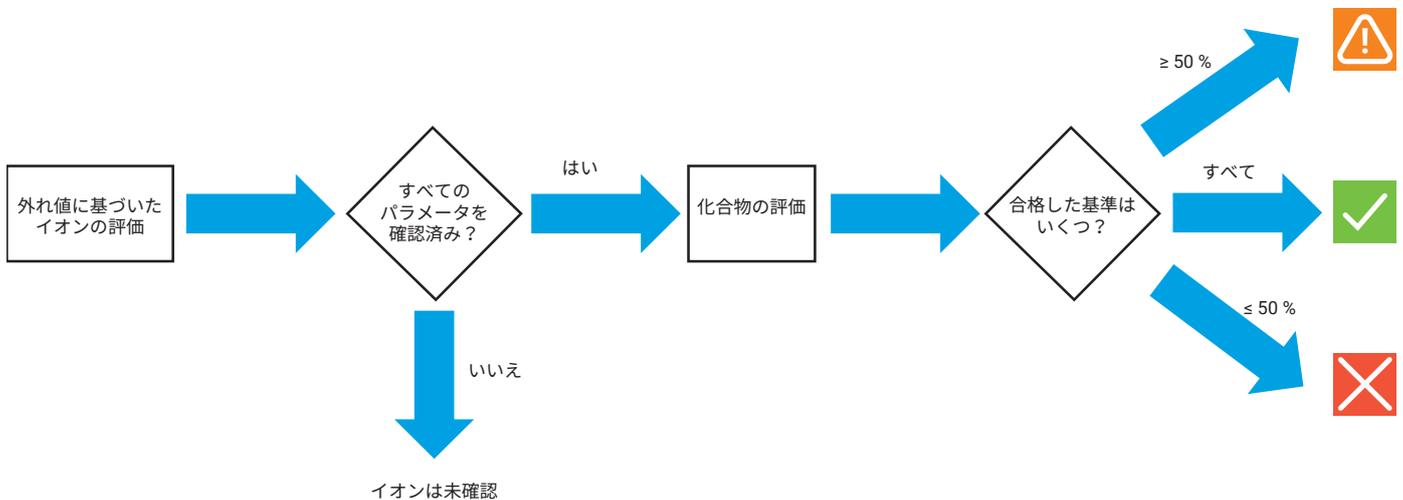


図7. GC/Q-TOF Screener での化合物確認の自動化。特定の化合物基準に従って、化合物は合格あるいは不合格にされるか、または暫定的に確認されます。

Screener の設定には、必要に応じて化合物ごとに個別に基準をカスタマイズできる、高い柔軟性があります。Screener の結果サマリウィンドウを図 8 に示します。

新しい GC/Q-TOF Screener を使用する場合は、問題のある化合物のみを確認すればよい  
ため、従来のターゲットアプローチと比較して、  
時間効率が大幅に高くなります。

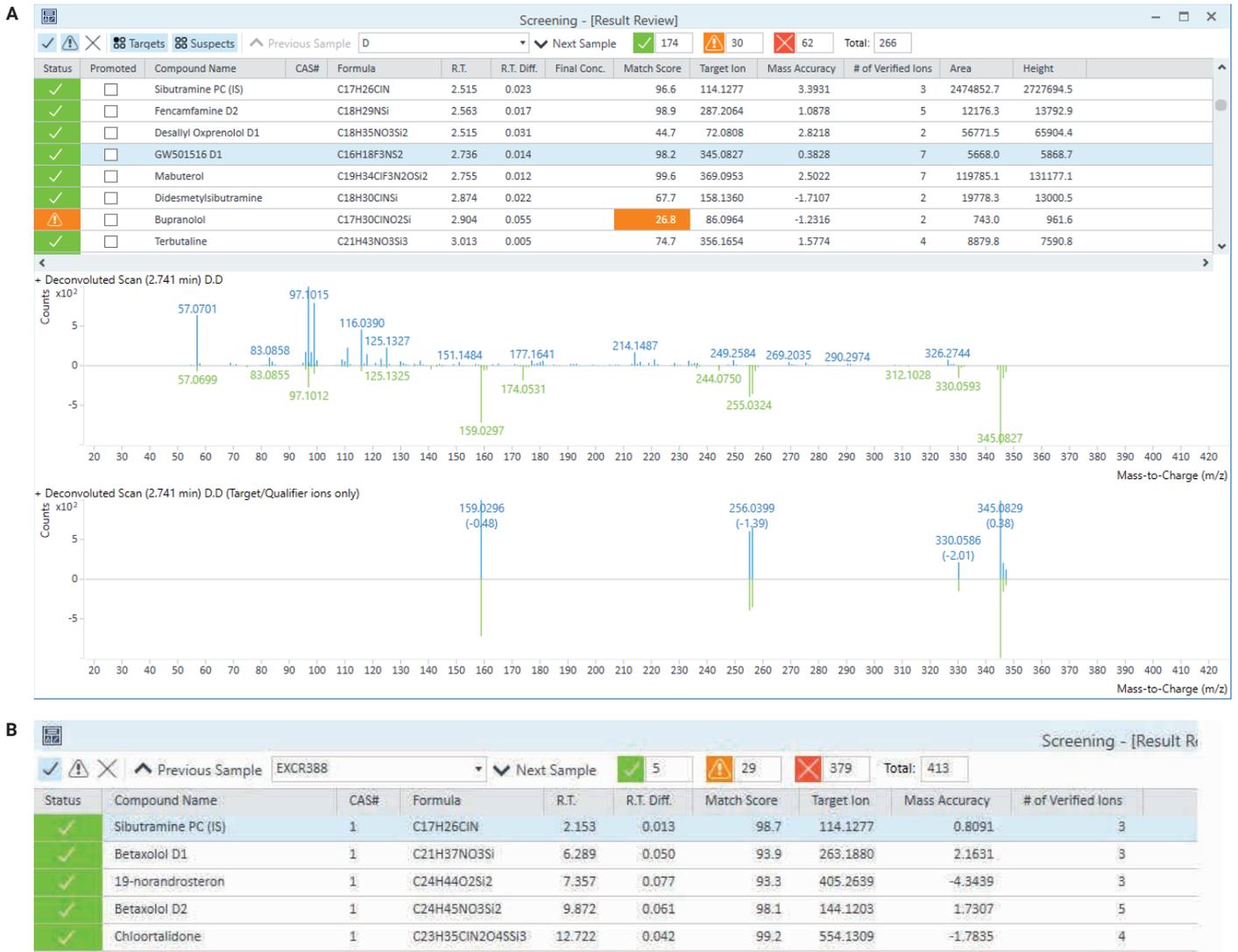


図 8. Screener の結果。(A) サマリウィンドウ。特に注意が必要な問題のあるヒットを即座に確認できます。(B) EQAS サンプルのサマリレポート。ベタキソロール (ベータブロッカー)、クロルタリドン (利尿剤)、19-ノルアンドロステロンを含みます。シブトラミンは内部標準です。

## ステロイドの加水分解グルクロン酸化代謝物および非加水分解硫酸化代謝物の検出

アナボリック男性ステロイド (AAS) は、スポーツのドーピング検査で特に頻りに検出される化合物です。<sup>4, 5</sup> AAS の長期硫酸化代謝物の同定は、ドーピング管理において重要な役割を果たしています。その理由は、これらの代謝物は代替マーカーとして使用することができ、一部の AAS の検出時間を延長できる可能性があるためです。<sup>7~9</sup> 非加水分解硫酸塩を同定するために、メステロンとメテノロンの排出実験を実施しました。<sup>10, 11</sup> これらのステロイドの加水分解グルクロン酸化代謝物と硫酸化代謝物の特徴的なイオンを表 3 に示します。

同じ個体からのメテノロン硫酸化代謝物 S1 (S-Met-1) を含むクロマトグラムの例を図 9 に示します。

2 日目ではまだ代謝物が明確に確認できますが、10 日目では消えています。

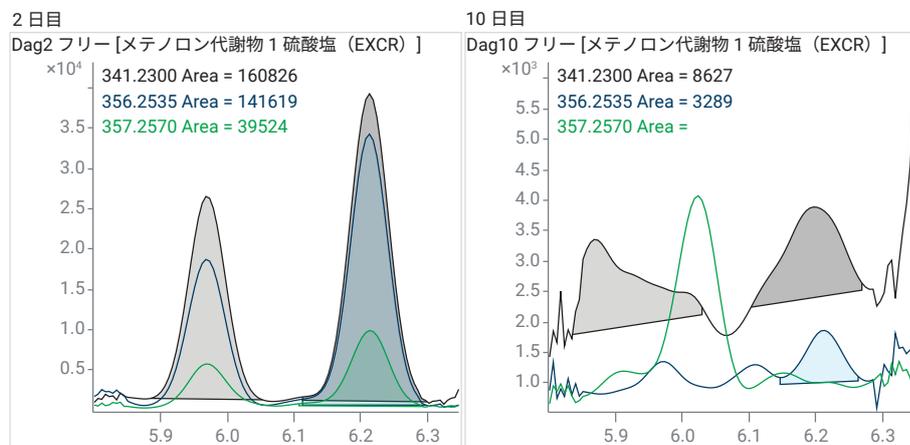


図 9. 異なる尿サンプル中のメテノロン代謝物 S-Met-1

表 3. メテノロンおよびメステロロンの硫酸化代謝物で同定したイオンのリスト

マーカーのラベル	マーカーの名前	GC-EI-QTOF-MS			
		RT (分)	イオン 1 (m/z)	イオン 2 (m/z)	イオン 3 (m/z)
<b>メテノロン</b>					
Met-PC	メテノロン (17β-ヒドロキシ-1-メチル-5α-アンドロスト-1-エン-3-オン)	11.75	446.3031	208.1278	-
Met-1	3α-ヒドロキシ-1-メチレン-5α-アンドロスタン-17-オン	10.19	446.3031	447.3050	-
Met-2	16ζ-ヒドロキシ-1-メチル-5α-アンドロスト-1-エン-3,17-ジオン	12.83	532.3219	517.2975	-
S-Met-PC	一硫酸化メテノロン	7.52	356.253	266.2029	-
S-Met-1	1-メチレン-5α-アンドロスタン-17-オン-3α-硫酸塩	6.2	356.2535	357.2571	341.2300
S-Met-2	1-メチル-5α-アンドロスト-1-エン-3,17-ジオン-16ζ-硫酸塩	11.54	444.2874	445.2913	429.264
S-Met-3	1β-メチル-5α-アンドロスタン-17-オン-3ζ-硫酸塩	6.68	358.2686	359.2726	
<b>メステロン</b>					
Mest-1	3α-ヒドロキシ-1α-メチル-5α-アンドロスタン-17-オン	10.34	448.3187	449.3900	-
Mest-2	3,6,16-トリヒドロキシ-1α-メチル-5α-アンドロスタン-17-オン	12.98	624.3880	610.3684	609.3650
S-Mest-4	1α-メチル-5α-アンドロスタン-17-オン-3α-硫酸塩および 1α-メチル-5α-アンドロスタン-17-オン-3β-硫酸塩	5.81	358.2696	359.2726	-
S-Mest-5	3β,16ζ-ジヒドロキシ-1α-メチル-5α-アンドロスタン-17-オンの一硫酸塩形態	9.64	446.3031	447.3045	-
S-Mest-6	17ζ,4ζ-ジヒドロキシ-1α-メチル-5α-アンドロスタン-3-オンの一硫酸塩形態	10.21	446.3031	447.3045	-

メステロロンの非加水分解硫酸化代謝物のうち、1つの精密質量 GC/Q-TOF スペクトルの例を図 10 に示します。GC/Q-TOF は、フルデータ取り込みモードでの高感度や、精密質量と高分解能といった利点があるため、このような代謝物を探索するための理想的なツールです。すべての代謝物を、1回の分析で簡単に追跡できます。

GC/Q-TOF ベースのアプローチには、別の利点もあります。すべてのデータがフルスペクトル取り込みモードで収集されるため、新しい代謝物が発見された場合、その代謝物をいつでもレトロスペクティブに探索できることです。

メステロロンの排出実験から、その非加水分解硫酸化代謝物である S-Mest-4 および 5 は、従来の加水分解マーカーと比較して、検出時間が大幅に改善されることが示されました (図 11)。このことは、GC/TQ ベースのメソッドを含む、ドーピング管理のルーチンメソッドに、必要に応じて非加水分解硫酸化代謝物を追加することで、きわめて優れた感度が得られることを強く示唆しています。

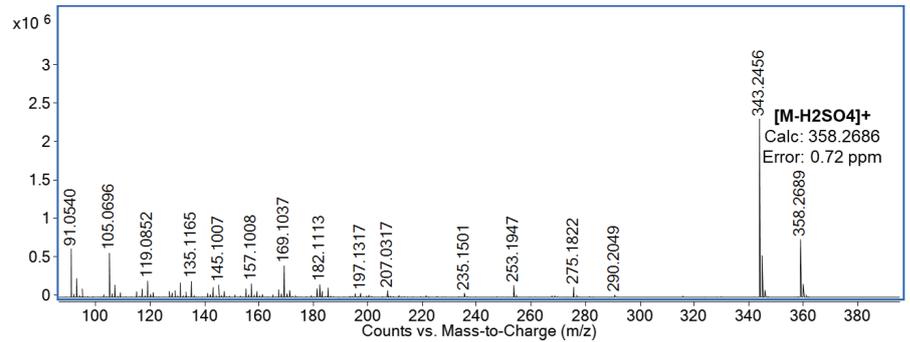


図 10. メステロロンの非加水分解硫酸化代謝物 (S-Mest-4) の精密質量高分解能スペクトル

## メステロロン

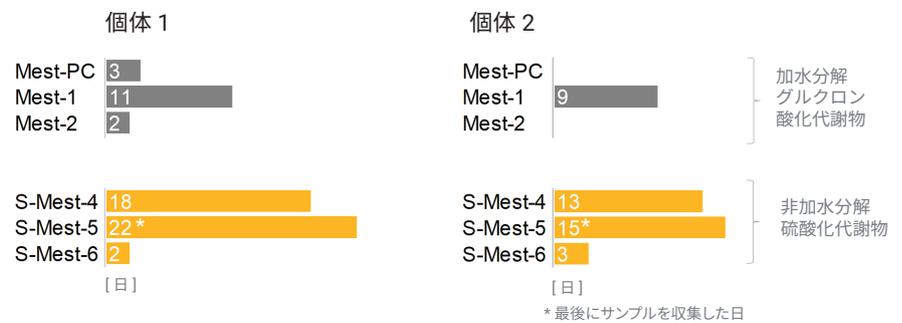


図 11. GC/Q-TOF で分析したメステロロンの 2 つの排出実験の結果

## 結論

WADA の禁止薬物と新しい WADA 規制のリストが長大化し続ける中、WADA 要件の更新に対応するために、ドーピング管理における新しいワークフローソリューションが必要とされています。このアプリケーションノートでは、ドーピング管理ラボの生産性と効率を新たなレベルに引き上げる、新しいワークフローについて説明しました。ここで提案しているソリューションは、レトロスペクティブな分析が可能な高感度の定量および定性分析に重点を置き、GC/Q-TOF および GC/TQ 機器と、Agilent AssayMAP Bravo システムを使用したサンプル前処理を組み合わせました。このソリューションは、スループットを大幅に向上させることができ（年間 20,000 サンプルを達成）、Agilent MassHunter ソフトウェアの GC スクリーナ機能により、時間のかかるデータ確認プロセスの自動化も可能です。さらに、アナボリックステロイドの硫酸代謝物をルーチンのドーピングスクリーニングメソッドに含めることによる同定とその利点についても説明しました。

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

RA45170.5273842593

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2023

Printed in Japan, September 12, 2023

5994-6702JAJP

## 参考文献

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. 高分解能 GC/Q-TOF と農業および環境汚染物質の精密質量ライブラリによる汚染物質のスクリーニング。アジレント・テクノロジーアプリケーションノート, 資料番号 5994-1346JAJP, **2019**.
7. World Anti-Doping Agency. **2020**. 2020 Anti-Doping Testing Figures. World Anti-Doping Agency. [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2020\\_anti-doping\\_testing\\_figures\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/2022-01/2020_anti-doping_testing_figures_en.pdf)
8. World Anti-Doping Agency. **2019**. 2019 Anti-Doping Testing Figures. World Anti-Doping Agency. [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2019\\_anti-doping\\_testing\\_figures\\_en.pdf](https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2019_anti-doping_testing_figures_en.pdf)
9. World Anti-Doping Agency. **2018**. 2018 Anti-Doping Testing Figures. World Anti-Doping Agency. [https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2018\\_testing\\_figures\\_report.pdf](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-Cl-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