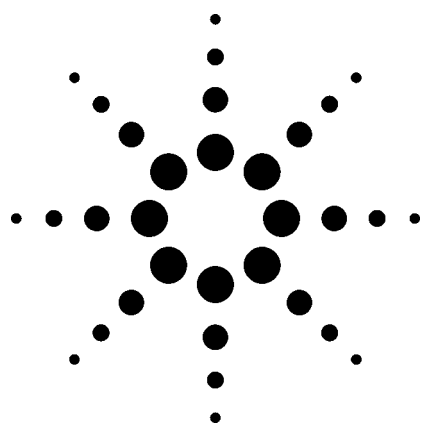


精密質量 LC/MS を使用したタンパク同化剤の スクリーニングと確認分析 アプリケーション



法科学

著者

Chad Borges, Matthew Slawson, James Taccogno,
and Dennis Crouch
Center for Human Toxicology
University of Utah
Salt Lake City, UT
USA

John M. Hughes
Agilent Technologies, Inc.
Pleasanton, CA
USA

要旨

直交軸飛行時間型 (oa-TOF) 質量分析計に、大気圧化学イオン化インターフェースを装備した Agilent LC/MSD TOF を使用して、1 ~ 2 ng/mL 濃度の尿抽出物に含まれる 4 種類のタンパク同化剤および 1 種類の内部標準を分析した。TOF 装置の高い質量正確さ (2 ppm 以下) により、組成式による優れた確認と抽出イオンクロマトグラム (EIC) を使用した定量の両方が可能になる。LC/MSD TOF の精密質量測定能力により、大部分のケミカルノイズの影響を排除した十分に狭い質量幅の EIC を生成できる。クロマトグラフ分離能および分析スピードの向上のため、粒子径 1.8 ミクロンの C18 カラムを使用した。

はじめに

スポーツの競技能力を強化するためタンパク同化剤を使用することにより、大きな注目が集められている [1、3]。それらの使用は、いくつかのプロスポーツで公然となった問題であり、高校や大学の運動選手で顕在化しつつある問題である。そしてドーピングのこの分野では新化合物が次々と登場している (米国 BALCO 社の THG 事件や、栄養補助食品に関する問題など)。尿中のタンパク同化剤および関連物質の標準的なドーピングコントロール分析では、ガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) によるスクリーニング [2] の後、EI モードの高分解能磁場型 GC/MS を使用してそのスクリーニング結果を確認する [4]。高分解能磁場型 GC/MS の初期導入コストとランニングコストが高いため、スクリーニング結果を確認するための代替技術が求められている [5]。

タンデム型 GC/MS は高分解能磁場型 GC/MS に代替可能である。これはタンデム型 GC/MS が薬物確認の分野で確立した技術であり、そしてイオン比計算を伴う選択反応モニタリング (SRM) および複数反応モニタリング (MRM) の取込により、同定に高い信頼性が得られるためである。液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC/MS) もまた代替の確認技術として使用されてきた。これは、異なるモードのクロマトグラフ分離や、異なるイオン化技術を使用できる利点がある [6]。



Agilent Technologies

精密質量 API LC/MS により、同位体比およびヘテロ原子の存在などの以前のメソッドと同じスペクトル情報を与えるだけでなく、開裂していない分子イオンを特異的に検出して、組成式の確認も可能になるため、この技術には強力な利点がある。約 40 種類のタンパク同化剤が現在ドーピングコントロールで検査の対象にされており、その多くは GC/MS を使用しても容易には検出または確認できないが、LC/MS では検出が容易である[7]。これらの化合物の多くの分析は、尿中濃度の 2 -ng/mL 以下で検出および確認する必要があるため、さらに複雑である [世界アンチドーピング機構 (WADA) プログラムにおける検査機関の必要最低要件基準 (MRPL)]。本アプリケーションノートでは、WADA MRPL で分析の困難な多数のタンパク同化剤を検出および確認するために Agilent LC/MSD TOF 装置を使用した結果を説明する。

この研究で分析の対象としたタンパク同化剤とそれらの分子構造を図 1 に示す。

内部標準 (ISTD) を含むこれら分析対象化合物の大部分は、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) よりも APCI を使用して良好な感度が得られた。このことは、塩基性官能基を含まない、やや無極性の分析対象化合物で予想できる。APCI は、共溶出する内因性物質からのイオンサプレッションの影響も受けにくく、ESI よりシンプルなスペクトル (Na^+ や K^+ などの複雑な付加体のない) を示す傾向がある。

APCI の厄介な問題の 1 つとして、気化室での熱的な影響か APCI のコロナ放電によるイオン化のどちらかにより、初期に形成されたプロトン化分子からの水脱離の可能性がある。化合物によっては、マイルドな条件の ESI

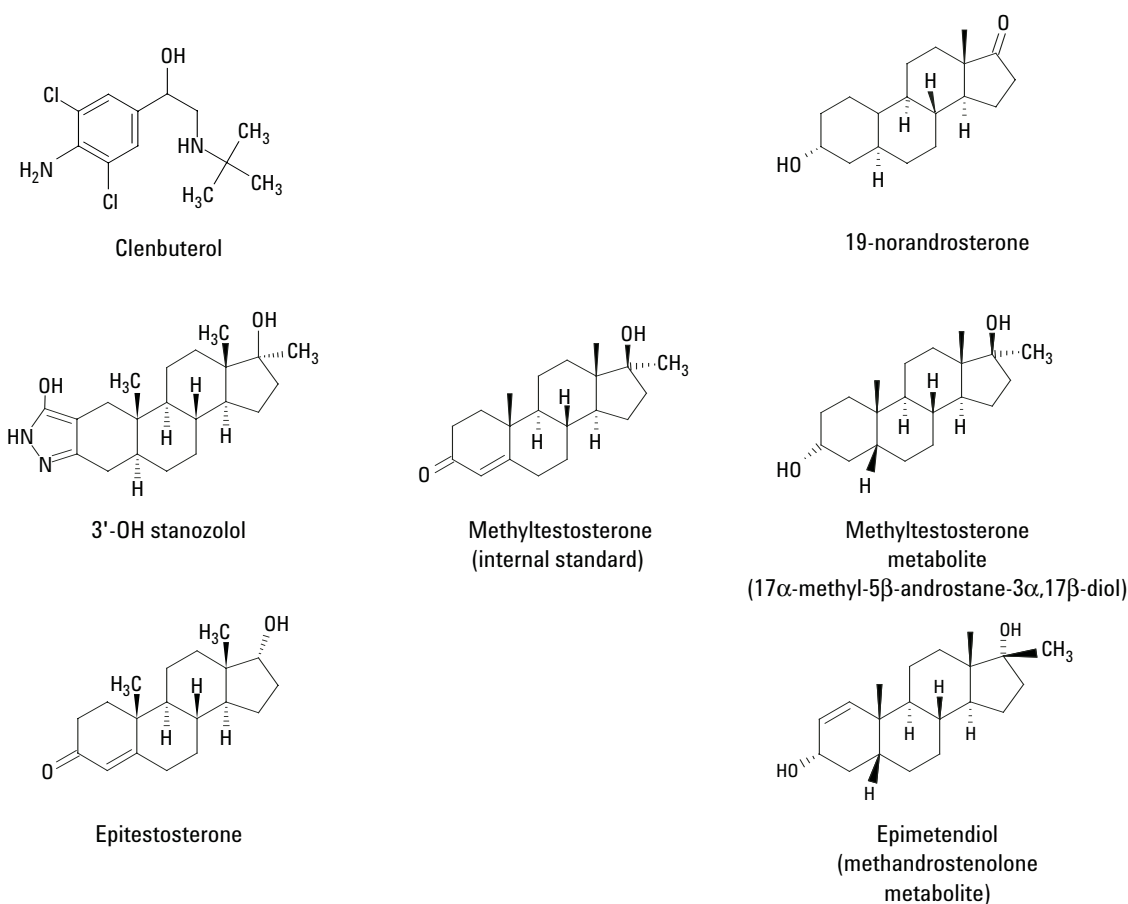


図1. 分析した化合物

モードでも水脱離が観察され、その中には液相の中で熱に殆ど接触しない化合物も含まれる。しかしながら、水を脱離したイオンの質量測定はその質量正確さや $[M+H]^+$ のイオン比を保持したままであるし、生成する水を脱離したイオンはこのシステムで再現性を持っている。より極性の高い早く溶出する化合物よりも、遅れて溶出するステロイド類でより多くの水脱離が起きていることは興味深い。

実験

サンプル調製

本研究で使用したサンプル調製法は、GC/MS による尿中ステロイドのスクリーニング用に the Center for Human Toxicology, Sports Medicine Research and Testing Laboratory で開発されたものを用いた。LC/MS 分析においても、誘導体化が不要なことを除き、GC/MS 分析と同じサンプル調製方法になっている。尿 3 mL に、内部標準 (10 ng/ μ L のメチルテストステロン溶液 20 μ L) を加え、さらに 0.15 M の酢酸ナトリウム 1 mL を加えて pH 5 にした。この溶液をボルテックスミキサーで混合し、Extrelut-3 カラム (Merck 製、VMR カタログ番号 48219-494、100 本入り) に移した。このカラムには、硫酸ナトリウム 1 g を含むアミノ SPE カラム (J.T.Baker 製、VMR カタログ番号 JH7088-3、50 本入り) がインラインで接続されている。8 分間静置後、一連のカラムをジエチルエーテル 9 mL で溶出し 13 x 100 mm のシラン処理コニカルチューブに受けた。LC/MS 分析用の最終抽出物は 40 °C の窒素気流下で蒸発乾涸した。このチューブにキャップをして夜間便で Agilent laboratory (Pleasanton, CA) に送付し、そこで分析まで -10 °C で保管した。この乾涸物は、分析の直前に 100 μ L の LC 初期移動相で再溶解した。

LC/MS メソッドの詳細

API-TOF システムは、Agilent 1100 LC システム (デガッサ、バイナリポンプ、ウェルプレートオートサンブラ、カラム恒温槽、およびダイオードアレイ UV-VIS 検出器) に G1969A LC/MSD TOF 質量分析計を接続して構成した。この質量分析計は、オーソゴナル ESI または APCI イオン源のどちらかで操作した。この装置は、内蔵のキャリブレーション溶液自動供給システムおよび Agilent が開発したキャリブレーション化合物を使用して毎週オートチューンされている。質量軸は、同じキャリブレーションミックスおよび自動キャリブレーションルーチンを使用して毎日キャリブレーションされ

ている。スペクトルは、それぞれ m/z 121.050873 および 922.009798 の対象質量範囲を挟み込むための 2 つの既知化合物 (プリンおよびキャリブレーション化合物 HP-921) を含む自動導入リファレンスマス溶液を使用して、リアルタイムで内部的に質量補正されている。最適化された LC、MS、および APCI 条件を表 1 に示す。

表1. 尿中タンパク同化剤分析に使用した LC/MS 条件

LC条件	
カラム:	Agilent ZORBAX RRHT SB-C18 2.1 × 50 mm、1.8 μ m (Agilent 部品番号 822700-902)
移動相:	A = 0.1% ギ酸/水 B = メタノール
流量:	0.4 mL/min
カラム温度:	55 °C
グラジエント:	55% B、5分保持 55% から 75% Bまで (5 から 9分まで)
分析時間:	14分
ポストタイム:	5分
注入量:	4 μ L
MS 条件	
イオン化モード:	ポジティブ APCI (最終メソッド)
キャピラリー電圧:	3,500 V
ベーパーライザー温度:	450 °C
コロナ電流:	4 μ A
ネブライザ圧力:	60 psig
乾燥ガス流量:	5 L/min
乾燥ガス温度:	350 °C
スキャン:	m/z 100 ~ 1000、10,000 トランジェント/ スキャン (0.89 秒/スキャン)
リファレンスマス:	121と922 (5 μ L/min、10 μ M 溶液をポスト カラム点に追加)
フラグメンター:	150 V [衝突誘起イオン化 (CID) なし]
スキマー:	60 V (デフォルト)
オクタポール RF:	250 V (デフォルト)

結果および考察

精密質量 API-TOF LC/MS は、一般的に自然存在分子および合成分子組成式決定および確証に使用される。ここで使用した装置は、四重極 GC/MS や LC/MS と同等に使いやすく、これは自動チューニングと自動キャリブレーション、自動リファレンスマス補正、機械的および電子回路設計による装置安定性の改善などの機能が生かされたものである。この装置は、タンパク同化剤の m/z 範囲で約 7,000 の質量分解能、ルーチンでの質量正確さで 2 ppm 以下、そしてフルスキャンモードでの操作が可能である。フルスキャンには、ターゲット分析取込でない場合の MRM-MS/MS を超える利点がある。そのため、取込メソッドを変更したり、化合物固有の MS/MS パラメータを開発/最適化せずに追加化合物を検出できる。

これらの化合物とその他のステロイドを含む標準品試料（抽出操作なし）を ESI で分析した最初の研究では、ルーチンの無人運転により 2 ppm 以下の質量正確さで

$[M+H]^+$ イオンの m/z を測定できることが確かめられた。しかしながら、この研究で対象とする化合物には APCI を使用して良好な感度を持つものが含まれる。検査する薬物は相対的に非極性で、その多くは容易にイオン化する官能基を含まないため、理屈の上では APCI がより適したイオン化モードになりえるかもしれない。また、APCI は共溶出する内因性物質からのイオン化抑制の影響も受けにくく、一般に ESI よりシンプルなスペクトル (Na^+ や K^+ などの複雑な付加体のない) が得られる。

図 2 に、標準品試料のベースピーククロマトグラム (3 mL の尿検体から抽出した場合 16 ng/mL に相当) を示す。このメソッド開発の目的は、15 分以内で全てのターゲット化合物を分離することである。この目的は達成されたが、クレンプテロールからエピメテンジオールまでの幅広い極性範囲のため、メソッドの開発は予想外に困難であった。今後の研究では、他の分析カラムを評価/検討して、妥当な分析時間内にエピテストステロンと内部標準の分離を向上する予定である。

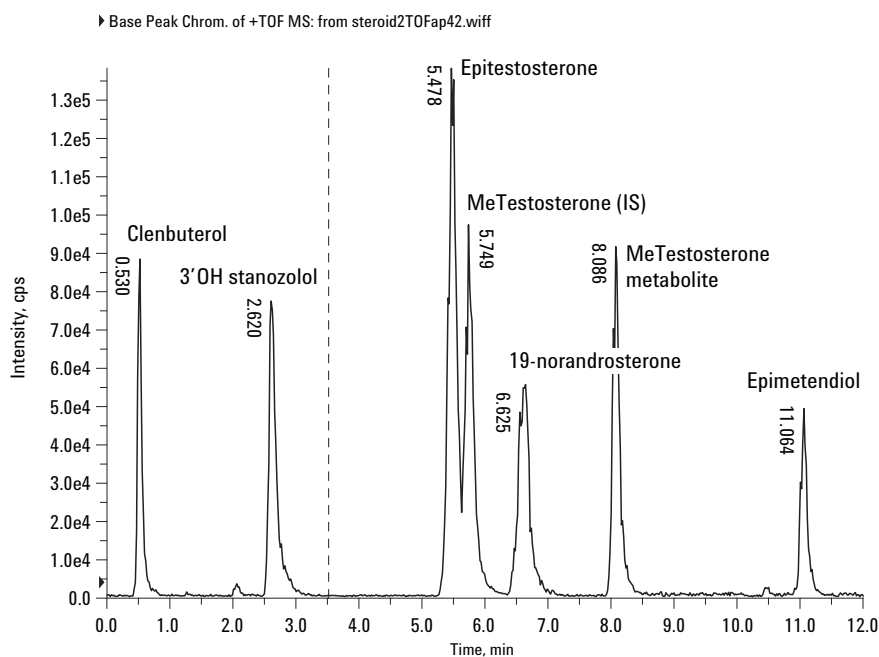


図2. タンパク同化剤混合物のベースピーククロマトグラム (尿中 16 ng/mL 相当の標準品サンプル (抽出操作なし))

ベーパーライザー温度およびコロナ電流は、分析対象化合物のすべてにわたり最高の感度が得られるように最適化した。今回は、イオン源内での衝突誘起解離 (CID) は使用しなかったが、イオン源内での CID はイオン比計算に使用できるイオンの生成メカニズムとして、今後の研究で評価する予定である。各クロマトグラフピークを正確に表現するに十分なスキャン数を維持しながら、スキャンあたりのトランジェント数を最適化することで、これら化合物の検出下限も改善された。さらに、光電子増倍管電圧を 50V 上げるだけで、バックグラウンドノイズをそれほど増やすことなく、検出下限が改善された。

エピテストステロンに関する LC/MSD TOF の代表的な性能の例を図3に示す。この APCI スペクトルには、 $[M+H]^+$ プロトン化分子とアバンダンスの小さい

$[M+H-18]^+$ 水脱離イオンの両方が含まれている。図に示されるとおり、組成式から計算される質量正確さは、 $[M+H]^+$ イオンの測定において -1.04 ppm の質量誤差である。

図3の挿入図には、 $[M+H]^+$ で測定された 6,890 の質量分解能と、 $[M+H]^+$ イオンと m/z 290 にある ^{13}C 同位体ピークとが大きく分離していることも示す。

m/z 289.2159 の分解能(R)は、その m/z 値を半値全幅 (FWHMまたは $w_{1/2}$ 、単位 Da) で割ると計算できる。つまり、 $R = M/w_{1/2}$ で、ここで $M = 289.2159$ 、 ΔM は最大値の半分 (強度の半分高さ) の質量ピーク幅である。この場合 $w_{1/2} = 0.042$ Da であり、 $R = 289.2159/0.042 = 6890$ となる。精密質量および ^{13}C ピークのイオン比は、正しく帰属するために、 $[M+H]^+$ から計算される組成式とも一致しなければならない。

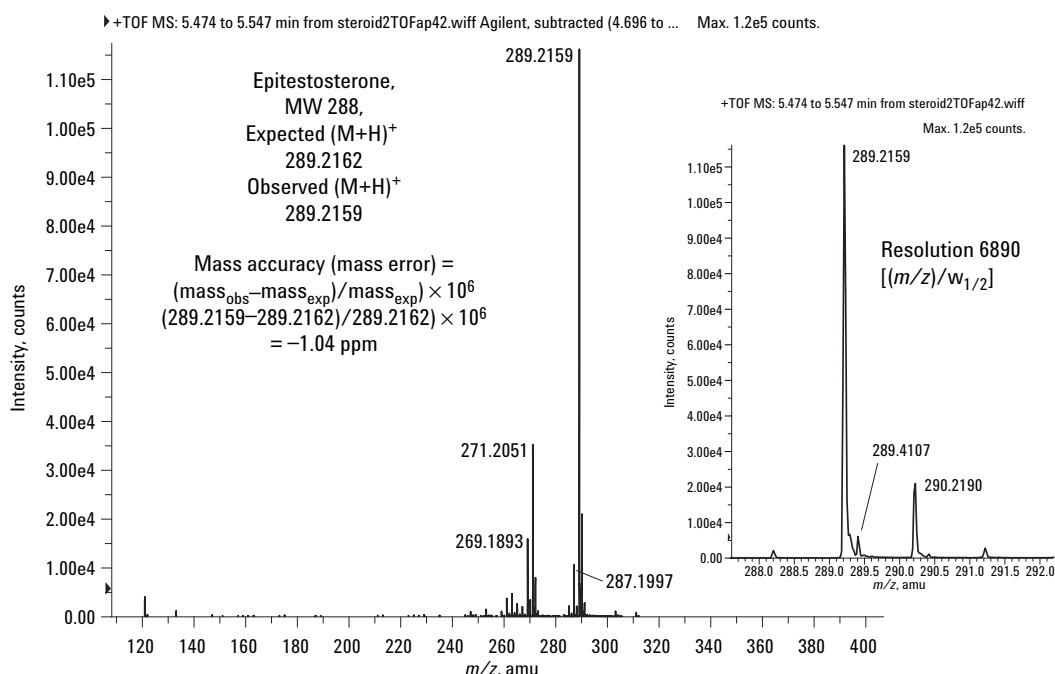


図3. エピテストステロンの代表的な APCI スペクトルおよび TOF 性能、 $[M+H]^+ = 289.2162$ 。 m/z 271.2051 には水脱離フラグメントが示されている。

エピテストステロン (m/z 271 イオン) のスペクトルでは若干の水脱離が観察されたが、19- ノルアンドロステロンのスペクトル [図4] で最も顕著なイオンは m/z 259.2049 と 241.1949 である。これらは、それぞれプロトン化分子から 1 つまたは 2 つの水分子が脱離したものである。水脱離はステロイドに特有のもので、ESI を使用しても、または電圧および移動相溶媒気化パラメータなどのイオン源条件を調整しても完全に抑えることはできなかった。

図 4 では、測定中の質量正確さを維持するために、スキャン毎の質量軸キャリブレーションに使用される 121

と 922 のリファレンスマスイオンの存在にも注目いただきたい。これらのイオンは希釈液として、別の LC ポンプとゼロデッドボリウム混合 T 字管を使用して、カラム溶離後の MS システムの導入フィルタに自動的に加えられた 2 つの化合物である。この場合、化合物はプリンと HP-921 (Agilent API キャリブレーション化合物シリーズの番号) で、リファレンスマスキットとして LC/MSD TOF に付属して支給される。リアルタイムで各スペクトルを自動的にキャリブレーションするには、これらのリファレンスマスの強度は数千カウントのみでよい。何れかのリファレンスマスの検出に失敗すると、装置は画面上とログファイルに自動的にそれらを報告する。

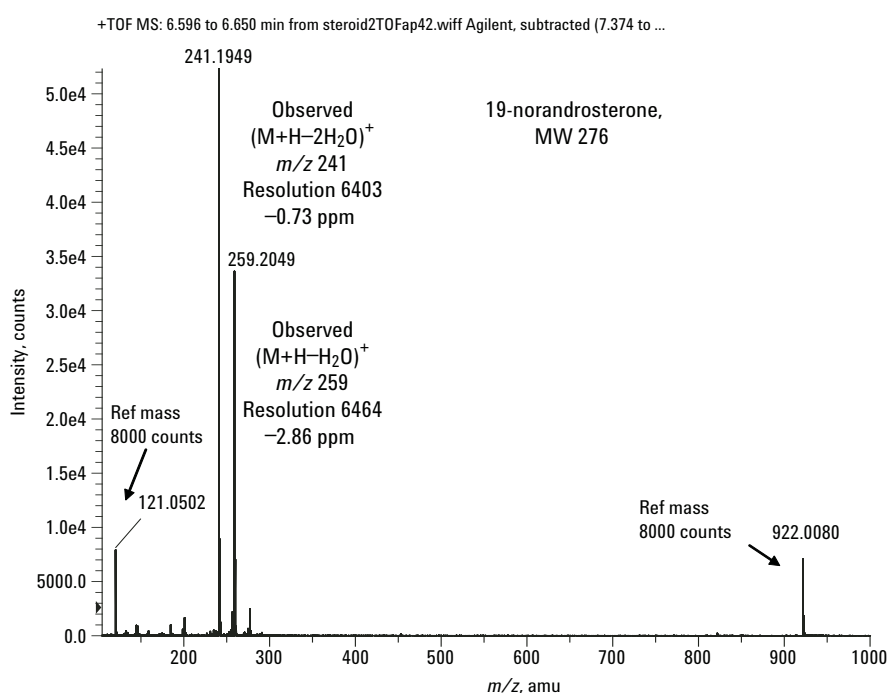


図4. 19- ノルアンドロステロン、分子量276の代表的なスペクトル。2つの水脱離イオンが示されている。 m/z リファレンスマスは 121 および 922 に示されている。

ステロイドを含まない対照尿に、エピテストステロン、19-ノルアンドロステロン、メチルテストステロン代謝物、およびエピメテンジオールをそれぞれ 50 ng/mL およびメチルテストステロン ISTD 66 ng/mL 添加して抽出したサンプルのベースピーククロマトグラムを図5に示す。クレンプテノールおよび 3'-ハイドロキシスタノゾロールは、メソッド開発のこの段階で使用された抽出手法では回収率が低かったため、図には示されていない。回収率が低いため、これらの化合物は以降の図でも示されていない。エピテストステロンおよび内部標準は、ベースピーククロマトグラムではクロマトグラフィーとして分離されていないように見えるが、それぞれの抽出イオンクロマトグラム (EIC) として分離されている。

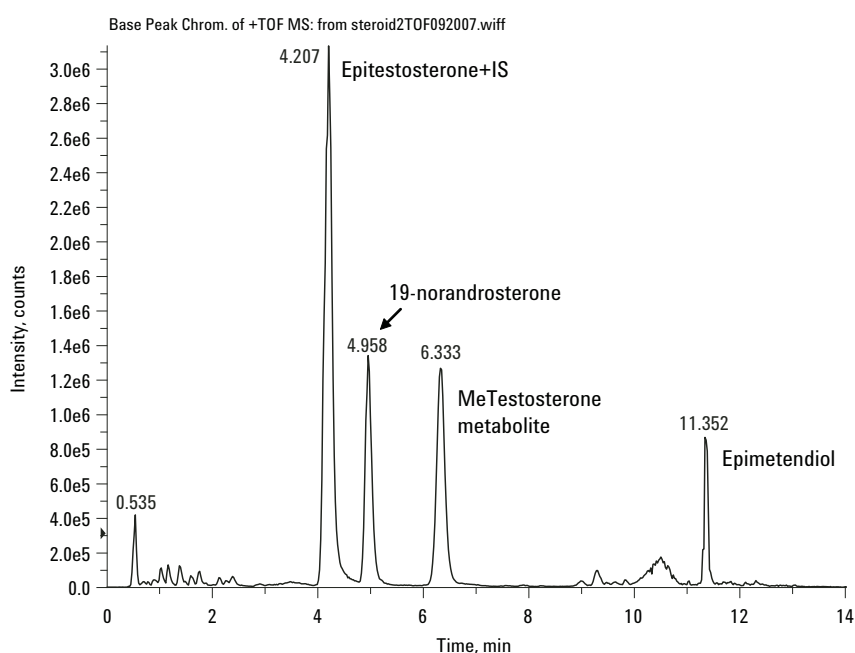


図5. 尿中 50 ng/mLを含む抽出物。分析対象化合物がベースピーククロマトグラム上に認められる。

ステロイドを含まない対照尿に、エピテストステロン、メチルテストステロン代謝物、エピメテンジオールをそれぞれ 2 ng/mL および 19- ノルアンドロステロン 1 ng/mL (MRPL) 添加して抽出したサンプルの EIC を図 6 に示す。図に見られるとおり、この EIC は 50,000 ~ 100,000 カウントの強度および優れた S/N 比を持ち、これによりピークの検出とスペクトルの同定が容易になる。定量に関しては、EIC の質量幅を狭く指定することで、TOF の高い質量正確さを上手く利用できる。本研究では、EIC に対して 1 mDa (~3 ppm) の質量幅を使用した。たとえば、19- ノルアンドロステロン検出には、241.1949 の $[M+H - 2H_2O]^+$ イオンを選択し、EIC 質量ウィンドウは 241.1944 ~ 241.1954 にした。TOF の高い質量分解能を選択性として利用することにより、ケミカルノイズの大半が除去され、S/N 比が大幅に改善された。

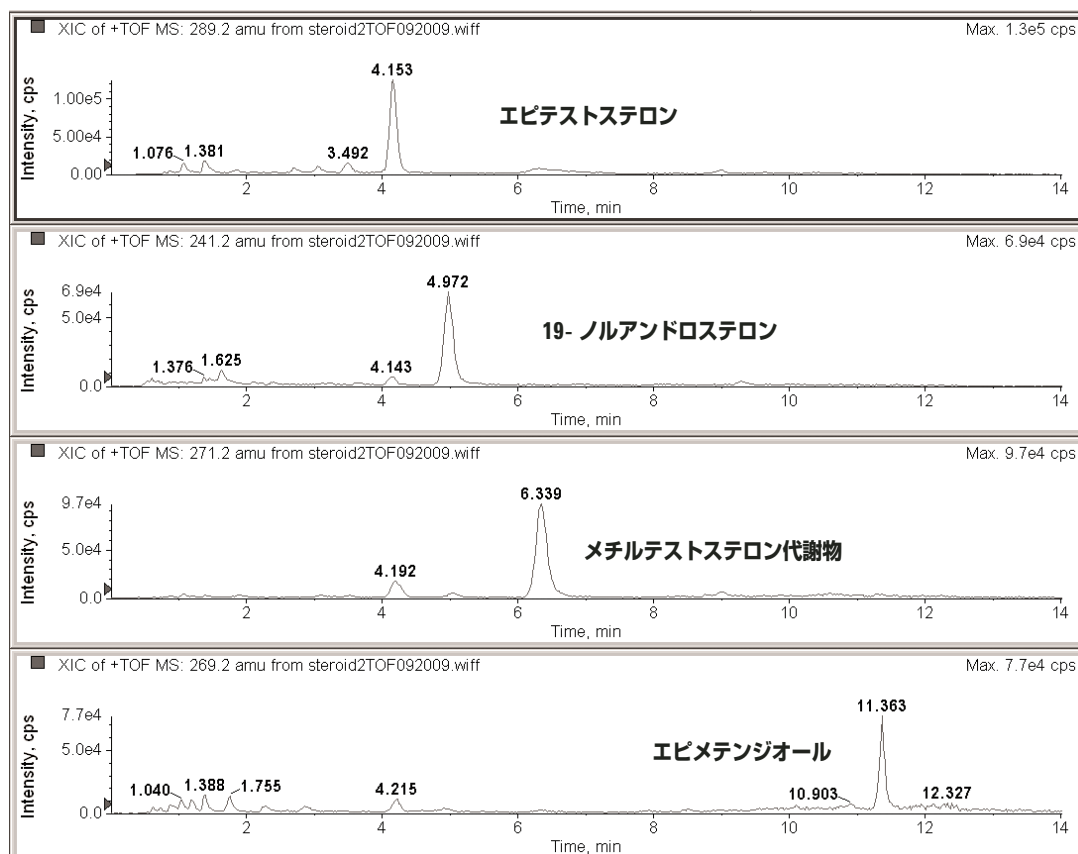


図6. 尿中 2 ng/mLを含む抽出物(19- ノルアンドロステロン1 ng/mL)。分析対象化合物は精密質量 EIC (1 mDa 幅) を使用して検出されている。

図 6 に示した抽出化合物に対応するスペクトルを図 7 に示す。TOF のデータ解析メソッドにより自動的に計算された質量正確さの結果に注目されたい。これらのスペクトルは、回収率を 100% と仮定して、各化合物のカラムへの導入量約 240 pg から得られたものである(19- ノルアンドロステロンについては 120 pg)。このような低濃度で尿から抽出されたものであっても、質量正確さは各分析対象化合物について 2 ppm より優れた値である。これにより、シンプルな高速クロマトグラフィーの条件でも質量測定においてマトリックス干渉のないことが明らかである。

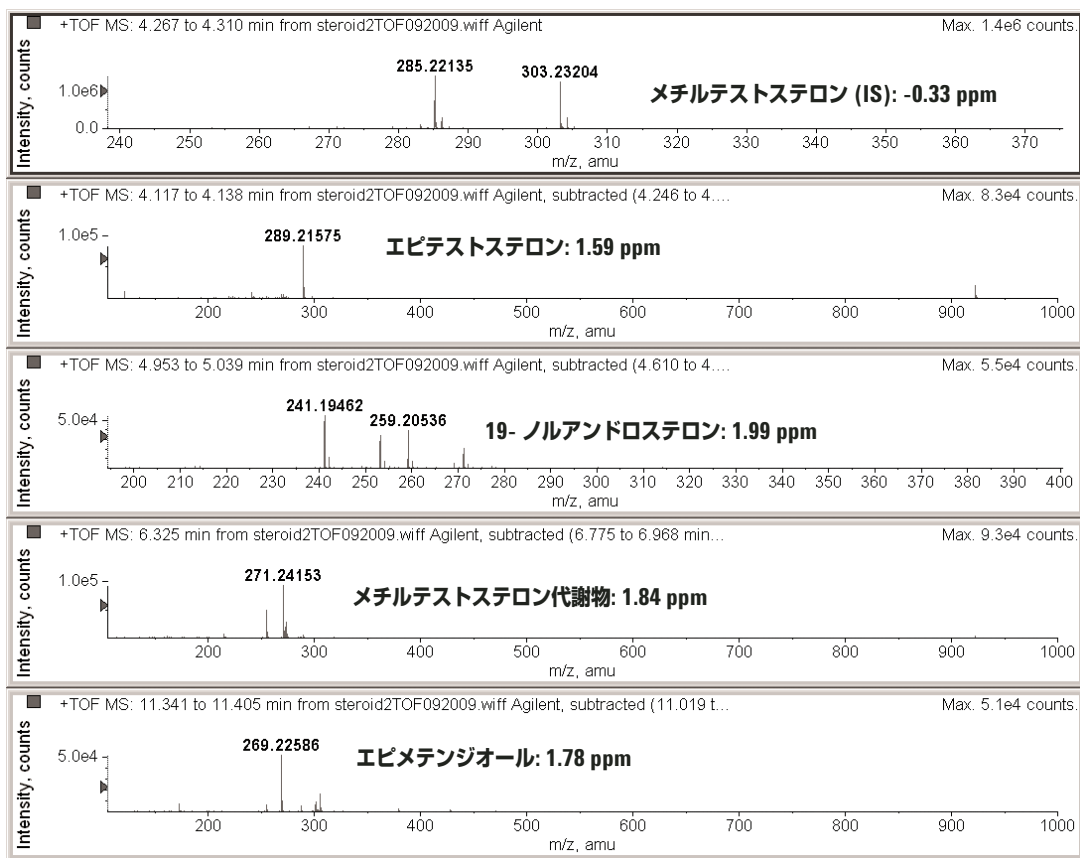


図7. 尿中 2 ng/mL 抽出物からのスペクトル (19- ノルアンドロステロン1 ng/mL) (カラムへの導入量 240/120 pg) [図6を参照]

本報告の最後の実験では、開発された LC/MSD TOF メソッドを使用して、内部標準、エピテストステロン、19- ノルアンドロステロン、メチルテストステロン代謝物、およびエピメテンジオールの検出下限を推定した。尿からの抽出操作を含まない標準品サンプルを、(尿3 mL から抽出して 0.16 ng/mL に相当する濃度) まで連続希釈法により調製して、それらを分析した。カラムへの導入量で 20 pg に相当する 4 μ L を注入し分析した。その精密質量 (1 mDa 幅) EIC を図8 に示す。このような低濃度であっても優れた S/N 比が得られている。

本研究で使用した 1.8 - μ m 粒子径のカラムよりも、3.5 - μ m 粒子径のカラムを使用することで、注入量を大きくでき、メソッドをさらに改良できるかもしれない。このようなカラムの選択は、大容量の注入による感度向上が必要であるかどうかによるが、1.8 - μ m カラムで得られるスピードと分離能は諦めざるを得ないだろう。

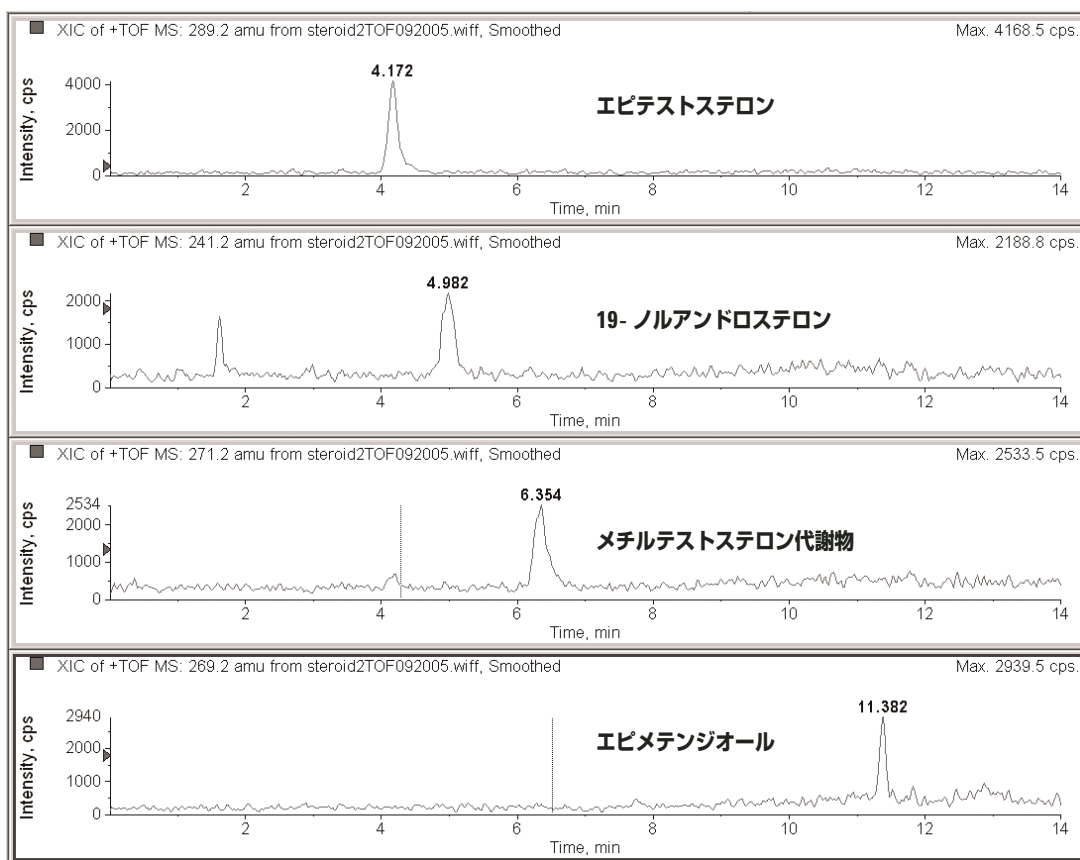


図8. 抽出操作なし標準品サンプル 0.16 ng/mL (カラムへの導入量 20 pg) からの精密質量 EIC (1 mDa幅)

結論

GC/MS スクリーニング用に開発された標準的なサンプル調製法 (ただし誘導体化しない) を使用した、使い易いベンチトップ API-TOF 装置用の LC/MS メソッドにより、尿中 1 ~ 2 ng/mL 濃度の代表的なタンパク同化剤グループを迅速に検出した。この感度は LC/MSD TOF の高い分解能を活用することで達成され、正確な質量の分析、極端に狭い質量ウィンドウでの EIC クロマトグラム、S/N 比の大幅な改善が可能である。この分析では、再溶解した尿抽出物 100 μ L から 4 μ L だけを注入するため、1回の抽出から再分析、繰り返し分析、または別の手法による分析が可能になる。“精密質量 EIC” (m/z 幅で 1 mDa の EIC) を使用することで、複雑なサンプルに含まれる目的ステロイドの特異的な検出が可能である。これら低 ng/mL 濃度で取得したスペクトルはすべて 2 ppm 未満の質量誤差であった。

参考文献

1. A. Leinonen, T. Kuuranne, T. Kotiaho, and R. Kostiainen, Screening of unconjugated anabolic steroids in urine by liquid chromatography/mass spectrometry. In W. Schanzer, H. Geyer, A. Gotzmann, and U. Mareck, *Recent advances in doping analysis*. (2003) Sport und Buch Straub, Koln, **11**, 163.
2. H. Pereira, M. Marques, I. Talhas, and F. Neto, Analysis of androgenic steroids, beta-2-agonists and other substances by GC-MS-ITD. In W. Schanzer, H. Geyer, A. Gotzmann and U. Mareck, *Recent advances in doping analysis*. (2003) Sport und Buch Straub, Koln, **11**, 259.
3. T. Huynh, G. Trout, and R. Kazlauskas, The detection of low level anabolic agents in bovine and human urine using LC-ESI-MS-MS. In *Recent advances in doping analysis*. (2003) Sport und Buch Straub, Koln, **11**, 271.
4. G. Trout, S. Soo, and R. Kazlauskas, Single screen for steroids using HRMS. In *Recent advances in doping analysis*, (2003) Sport und Buch Straub, Koln, **11**, 249.
5. I. Ojanpera, A. Pelander, S. Laks, M. Gergov, E. Vouri and M. Witt, Application of accurate mass measurement to urine drug screening. (2005) *J Anal Tox*, **29**, 34.
6. L. Politi, A. Groppi, and A. Poletti, Application of liquid chromatography-mass spectrometry in doping control. (2005) *J Anal Tox*, **29**, 1.
7. M. Gergov, I. Ojanpera and E. Vuori, Simultaneous screening for 238 drugs in blood by liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring. (2003) *J Chrom B*, **795**, 41.

このアプリケーションノートの詳細に関しては、Agilent Technologies, Inc.、John Hughesにお問い合わせください。

詳細

Agilent の製品およびサービスの詳細情報に関しては、弊社ウェブサイトをご覧ください (www.agilent.com/chem/jp)。

Agilent は、本資料に誤りが発見された場合、また、本資料の使用により付随的または間接的に損害が発生する事態が発生した場合も一切免責とさせていただきます。

本資料に記載の情報、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。
また、本資料掲載の機器類は薬事法に基づく登録を行っておりません。

アジレント・テクノロジー株式会社

コールセンター：0120-477-111

© Agilent Technologies, Inc. 2006

Printed in Japan
March 20, 2006
5989-4738.JA.JP



Agilent Technologies