

높은 신뢰성과 고감도로 소변 내 동화작용제 스크리닝이 가능한 Agilent 7000 Triple Quadrupole GC/MS 분석법

응용 자료

법의학/약물 도핑

저자

Lorena Garrostras, Óscar J. Pozo,
Rosa Ventura, Jordi Segura,
Josep Marcos
Bioanalysis Research Group
IMIM, Hospital del Mar
Barcelona
Spain

Miguel A. Delgadillo,
Benjamín Velasco
National Laboratory of Prevention
and Doping Control Mexico
Comisión Nacional de Cultura
Física y Deporte
Mexico City
Mexico

개요

Agilent 7000 시리즈 Triple Quadrupole GC/MS 시스템과 연결된 Agilent 7890 시리즈 GC를 사용하여 소변에 함유된 일부 동화작용제를 스크리닝할 수 있는 분석법을 개발하였습니다[1]. 개발한 분석법을 세계반도핑기구(WADA)가 정한 최소 요구 성능 한계에서 확인한 후, XVI PanAmerican Games 도핑 검사의 일부로 수집된 시료 1,367개를 분석하였습니다. 80개 이상의 분석 배치에 걸쳐 높은 분석 감도가 유지되는 결과를 확인하여 분석법의 신뢰성을 입증하였습니다.

소개

세계반도핑기구(WADA)는 선수의 경기력 향상을 위한 약물 남용을 규제하고 있습니다. WADA는 매년 1회 금지약물 목록을 발표하여[2] 금지약물별 최소 요구 성능 한계(MRPL)를 규정하고 있습니다[3]. 목록에는 11개 범주에 속하는 수백 종의 화합물이 수록되어 있습니다. 1998년 설립된 이후 WADA의 지속적인 노력에도 불구하고 동화작용제 양성 반응 사례가 증가하고 있습니다. 소변 시료에는 매우 다양한 내인성 및 외인성 안드로젠(androgenic) 동화 대사산물이 존재할 수 있어, 이러한 금지약물을 검출하는 것은 어려운 분석 과제입니다.



Agilent Technologies

WADA 공인 실험실은 시료에 MRPL 수준으로 존재하는 금지약물을 스크리닝할 수 있는 역량을 입증해야 하므로, 모든 관련 실험실은 자체적인 분석 전략을 수립해야 합니다. 오늘날 사용되는 반도핑 전략은 보통 single quadrupole 질량 분석기(MS)와 연결된 GC나 triple quadrupole MS와 연결된 LC가 가장 보편적으로 사용됩니다.

그러나 7000 시리즈 Triple Quadrupole GC/MS 시스템을 활용하면 SRM 모드에서 고감도로 도핑 약물을 검출할 수 있으며, 다양한 분석법 개발이 가능합니다. 이러한 기기 플랫폼에서 특정 스테로이드(methenol과 dehydrochloromethyltestosterone 대사산물)를 장기간에 걸쳐 검출할 수 있으며[4] 광범위한 도핑 약물 150 여종을 8 분 이내에 검출할 수 있는 분석법을 개발하였습니다[5].

실용적인 측면에서 Triple Quadrupole GC/MS 스크리닝 방법은 다음 두 요건을 충족해야 합니다.

1. MRPL 수준에서 다른 GC/MS나 LC/MS/MS 접근법으로 검출되지 않는 화합물을 검출할 수 있어야 합니다. 예를 들어 methyltestosterone 대사산물인 17 α -methyl-5 β -androstane-3 α ,17 β -diol을 2ng/mL 농도에서 검출 가능합니다.
2. 가장 까다로운 조건에서 분석 성능의 신뢰성이 입증되었습니다.

이 응용 자료에서는 7000 시리즈 Triple Quadrupole GC/MS 시스템을 사용하여 동화작용제 7종을 7.3분 내에 스크리닝할 수 있는 분석법을 개발하고 확인하였습니다[1]. 17 α -methyl-5 β -androstane-3 α ,17 β -diol을 포함해, 기본 GC/MS 및 LC/MS/MS 접근법과 비교하여 Triple Quadrupole GC/MS/MS로 분석하였을 때 추가 정보를 얻을 수 있는 동화작용제를 분석 대상으로 선정하였습니다. XVI PanAmerican Games 기간 도핑 검사의 일부로 2주에 걸쳐 시료 1,367개를 분석하여 견고성을 입증하였습니다.

실험

표준물질 및 시약

Methyltestosterone을 내부 표준물질로 사용하였으며 clenbuterol은 Sigma(St. Louis, MO, US) 제품입니다. 17 α -methyl-5 β -androstane-3 α ,17 β -diol, 3 α -hydroxystanozolol, 16 α -hydroxyfurazabol, epimethendiol, 19-norandrosterone, 19-noretiocholanolone은 National Measurement Institute(Pybble, Australia)에서 구입하였습니다. β -glucuronidase 제제(*E. Coli* K12 형)는 Roche Diagnostics GmbH(Mannheim, Germany) 제품을 사용하였습니다. Di-sodium hydrogen phosphate, sodium hydrogen phosphate, tert-butylmethylether, potassium hydroxide, ammonium iodide, ethanethiol, methanol은 모두 분석 등급을 사용하였으며,

Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입하였습니다. N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide(MSTFA)는 Macherey-Nagel(Germany)에서 구입하였습니다. Milli Q 초순수는 Millipore Milli-Q Integral A 10 정수 시스템으로 생산하였습니다.

기기

분할/비분할 캐필러리 주입구가 장착된 7890 시리즈 GC를 7000 시리즈 Triple Quadrupole GC/MS 시스템과 연결하여 사용하였으며, 선택 반응 모니터링(SRM) 모드에서 데이터를 수집하였습니다. 기기 조건은 표 1과 같습니다.

시료 전처리

표 1. Agilent 7890/ 7000 가스 크로마토그래피와 질량 분석기 조건

GC 분석 조건

분석 컬럼	Agilent J&W HP- Ultra 1 Inert 25m x 0.2mm, 0.11 μ m film(p/n 19091A-002)
주입 방법	2 μ L; 분할 모드 1:10
운반 가스	Helium, constant flow, 1 mL/min
컬럼 온도 프로그램	185°C 30°C/min to 230°C 15°C/min to 290°C 70°C/min to 310°C(1.5minutes hold)
이송 라인 온도	280°C
용매 지연	2minutes

MS 조건

Tune	Autotune
EMV 계인	20
데이터 수집 파라미터	El, selected reaction monitoring
충돌 가스 유속	N ₂ collision gas: 1.5mL/min
Quenching 가스 유속	Helium, 2.25mL/min
MS 온도	Source 220°C; Quad 180°C

인산염 완충액(1M, pH 7) 1mL를 첨가한 후, 소변 시료(2.5mL)를 β -glucuronidase 제제(25 μ L)와 55°C에서 1시간 동안 반응하였습니다. 실온으로 냉각하고 KOH(5M) 용액 135 μ L를 추가하여 pH를 9.5로 조정한 다음 tert-butylmethylether(5mL)를 첨가하여 액체-액체 추출을 수행하였습니다. 원심분리 후 유기물 층을 증발시켜 제거하고, MSTFA-NH₄I-ethanethiol(50 μ L, 100:2:6, v/w/v)로 60°C에서 30분 동안 유도체화한 후 시료를 주입 바이알에 옮겨 담았습니다.

데이터 수집 파라미터

분석에 사용된 애질런트 Triple Quadrupole GC/MS 시스템 파라미터는 표 2에 정리되었습니다.

결과

분석법 개발

두 단계로 나누어 질량 분석기 조건을 최적화하였습니다. 첫 번째 단계에서는 각 유도체화된 표준물질을 full-scan 모드로 분석하였습니다. Full-scan 스펙트럼에서 충돌 에너지를 5단계로 변경하며 주요 전구이온의 생성이온 스펙트럼을 얻었습니다. 이 연구에서 전구이온과 생성이온

후보는 모두 선택 반응 모니터링(SRM) 모드에서 결정하였습니다. 최종 최적화 단계에서는 소변 바탕시료와 최소 요구 성능 한계(MRPL)보다 5배 높은 농도로 첨가한 소변 시료 추출물을 분석하였습니다. 후보 전구이온은 첫 번째 단계에서 얻은 가장 좋은 충돌 에너지 값을 5단계로 변화하며 조각화를 반복하였습니다. 매트릭스와 내인성 스테로이드 백그라운드가 분석 결과에 상당한 영향을 미칠 수 있으므로, 절대 반응보다는 신호대 잡음비가 가장 높은 조건을 선택하였습니다. 분석법의 식별 기능을 향상하기 위해 화합물별로 SRM transition 2개를 최적화하였습니다. 화합물별 최적화 조건을 표 2에 요약하였습니다.

표 2. Agilent 7000 시리즈 Triple Quadrupole GC/MS/MS 데이터 수집 파라미터

화합물	유도체	RT(min)	전구이온	생성이온	CE(V)
Methyltestosterone (ISTD)	Bis-O-TMS	5.00	446	301	20
		5.00	446	169	30
Clenbuterol	N-TMS,O-TMS	2.45	335	300	10
		2.45	335	227	15
19-norandrosterone (nandrolone 대사산물)	Bis-O-TMS	3.68	405	315	15
		3.68	405	169	20
19-noretiocholanolone (nandrolone 대사산물)	Bis-O-TMS	3.85	405	315	15
		3.85	405	169	20
Epimethendiol (methandienone 대사산물)	Bis-O-TMS	3.73	358	301	20
		3.73	358	196	5
17 α -methyl-5 β -androstane-3 α ,17 β -diol (methyltestosterone 대사산물)	Bis-O-TMS	4.38	435	345	10
		4.38	435	255	20
3'-hydroxystanozolol (stanozolol 대사산물)	Bis-O-TMS, N-TMS	6.65	545	455	40
		6.65	545	147	30
16 α -hydroxyfurazabol (furazabol 대사산물)	Mono-O-TMS	6.57	490	231	15
		6.57	490	143	35

RT: 머무름 시간
CE: 충돌 에너지

분석법 밸리데이션

정성 스크리닝 분석법의 밸리데이션 프로토콜은 정량적 측정정보보다 요구사항이 적습니다[6]. 한 세트의 소변 바탕시료를 분석하고, 신호대 잡음비가 3 이상이며 간섭이 없는 상태에서 선택성을 평가하였습니다. 이를 위해 어떤 금지약물도 복용하지 않은 자원봉사자들로부터 소변 시료 6개를 채취하여 분석하였습니다.

금지약물별로 WADA가 정한 MRPL 수준에서 재현성을 평가하였습니다. 검출 대상 화합물을 함유한 품질관리용 시료(화합물당 동일한 시료 6개) 한 세트를 준비하고 기술한 방법으로 분석하였습니다. 분석물질과 내부 표준물질에 해당하는 주요 transition 피크 면적비의 상대 표준 편차(RSD)로 재현성을 평가하였습니다. 결과는 표 3에 요약하였습니다.

표 3. 분석법 밸리데이션 결과

화합물	MRPL (ng/mL)	농도 (ng/mL)	재현성 (RSD, %)
Clenbuterol	2	0.1	4.9
19-norandrosterone (nandrolone 대사산물)	2	1	10.2
19-noretiocholanolone (nandrolone 대사산물)	10	5	7.8
17 β -methyl-5 β -androst-1-ene-3 α , 17 α -diol (methandienone 대사산물)	2	1	13.4
17 α -methyl-5 β -androstane-3 α , 17 β -diol (methyltestosterone 대사산물)	2	1	9.4
3'-hydroxystanozolol (stanozolol 대사산물)	2	1	9.2
16 α -hydroxyfurazabol (furazabol 대사산물)	10	5	7.0

MRPL: 최소 요구 성능 한계

RSD: 상대 표준 편차

실제 시료에 적용

XVI PanAmerican Games 기간 참가 선수들의 소변 시료 1,367개를 수집하여 CONADE(멕시코 국가체육위원회) 시설에서 분석하였습니다. 모든 시료는 금지약물 스크리닝 전략의 일부로 앞서 기술한 방법을 사용하여 분석하였습니다. 분석 배치마다 분석물질을 MRPL 수준으로 첨가한 양성대조군과 음성대조군을 포함하였습니다.

화합물별로 모니터링한 두 transition 피크의 면적비를 식별 기준으로 사용하였으며, 82개 배치를 분석하는 동안 일정하였습니다(RSD 7% 미만). 화합물별 transition 2개의 감도를 그림 1에서 확인할 수 있습니다.

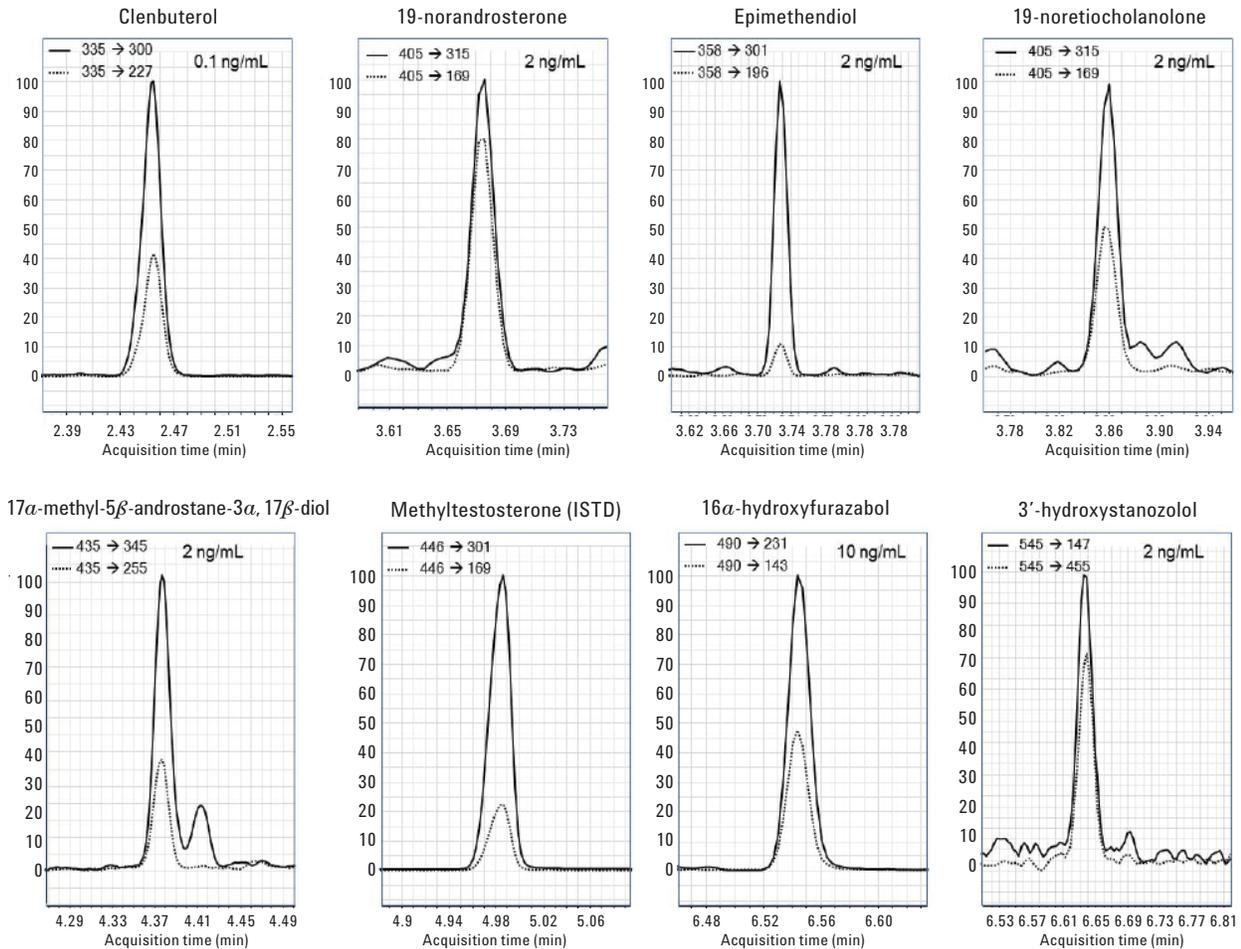


그림 1. 최소 요구 성능 한계에서 모니터링한 대표적인 SRM transition 크로마토그램

또한, 그림 2에 보이대로 양성 대조 시료에서 화합물별 특성화 transition의 S/N은 전체 분석 기간에 걸쳐 일정하게 유지되었습니다.

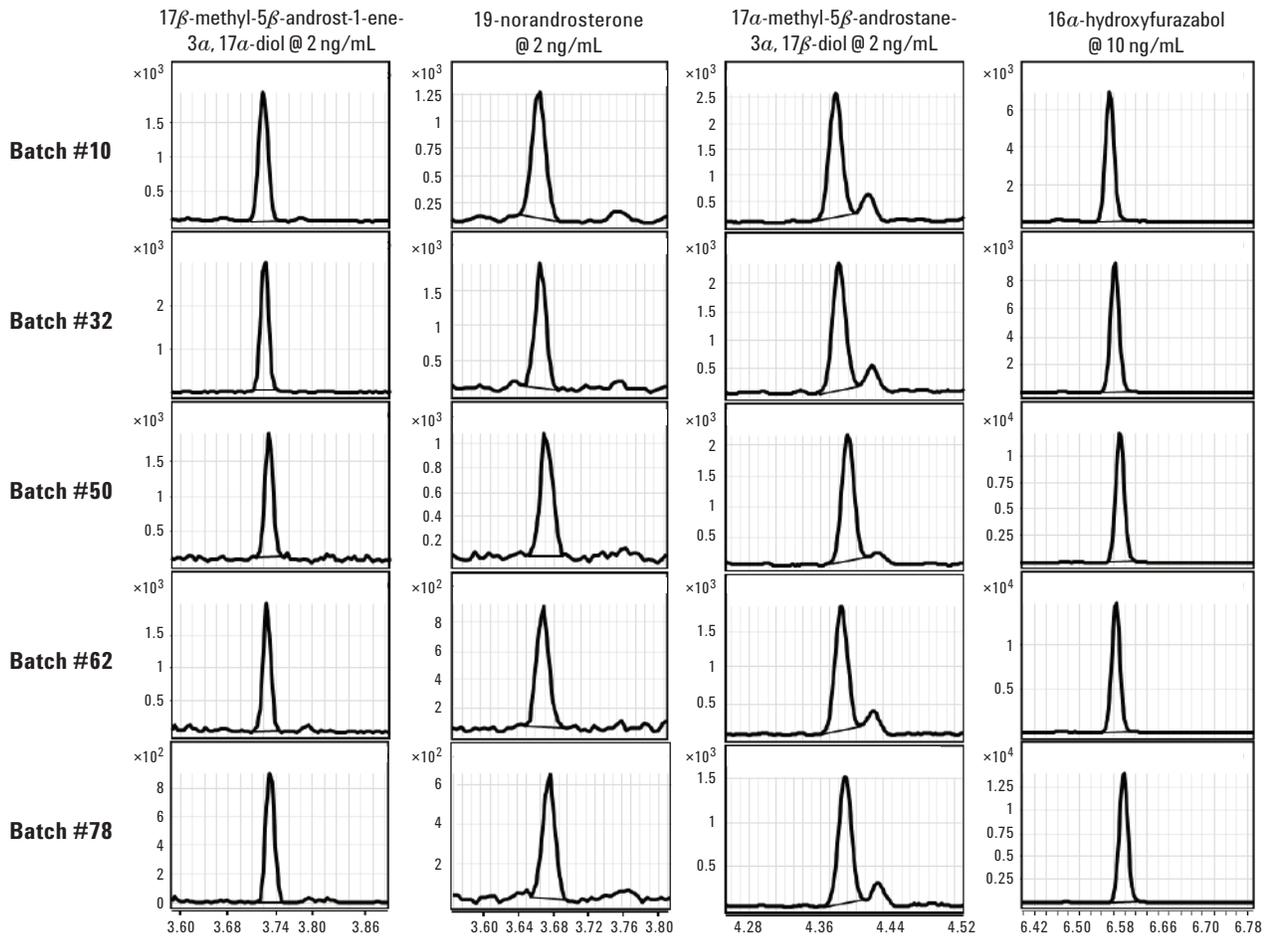


그림 2. PanAmerican Games 기간 중 품질관리에 사용된 양성 대조 시료에 존재하는 대표적인 스테로이드에 대한 SRM transition의 S/N 안정성 (총 78개 배치)

결론

7000 시리즈 Triple Quadrupole GC/MS 시스템을 사용하여 WADA가 정한 MRPL 요건을 충족하고, 빠르고 견고성 높은 동화작용제 분석법을 개발 및 확인하고, XVI PanAmerican Games 기간 수집한 1,300개 이상 시료를 분석하였습니다. 7000 시리즈 Triple Quadrupole GC/MS 시스템으로 장기간에 걸쳐 동화작용 스테로이드제를 검출할 수 있을 뿐 아니라 광범위한 도핑 약물 스크리닝도 가능하므로[4,5] 모든 도핑 관련 실험실에 이상적인 솔루션입니다.

참고문헌

1. M.A. Delgadillo, L. Garrosta, O.J. Pozo, R. Ventura, B. Velasco, J. Segura, J. Marcos. "Sensitive and robust method for anabolic agents in human urine by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry" J. of Chromatogr. B. 2012 Apr 1 [Epub ahead of print].
2. WADA. The 2011 Prohibited List. International Standard. <http://www.wada-ama.org>
3. WADA. TD2010MRPL. <http://www.wada-ama.org>
4. S. Baumann "Longterm Detection of Anabolic Steroid Metabolites in Urine". Agilent Technologies Application Note 5990-5748EN.
5. P. Van Eenoo, W. Van Gansbeke, N. De Brabanter, K. Deventer, F. T. Delbeke. "A fast, comprehensive screening method for doping agents in urine by gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry" J. Chromatogr. A. 1218, 3306-3316 (2011).
6. International Conference on Harmonization. ICH Topic Q2B. Validation of Analytical Procedures: Methodology. ICH: Geneva, 1996.

자세한 정보

이러한 데이터는 일반적인 결과를 나타냅니다. 애질런트 제품 및 서비스에 대한 자세한 내용은 애질런트 웹사이트 (www.agilent.com/chem)를 참조하십시오.

www.agilent.com/chem

애질런트는 이 문서에 포함된 오류나 이 문서의 제공, 이행 또는 사용과 관련하여 발생한 부수적인 또는 결과적인 손해에 대해 책임을 지지 않습니다.

본 발행물의 정보, 설명 및 사양은 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2012
2012년 6월 21일, 한국에서 인쇄
5991-0414KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부
고객지원센터 080-004-5090 www.agilent.co.kr



Agilent Technologies