

Selektywna, czuła i wiarygodna analiza ilościowa sterydów anabolicznych w moczu dzięki połączeniu spektrometrii mas wysokiej rozdzielczości (HR-MS/MS) z metodami fragmentacji EAD i CID

Anna Lenartowicz¹, Julia Mironenka¹, Adrian Soboń^{1,2}, Rafał Szewczyk^{1,2}, Katarzyna Krupczyńska-Stopa^{1,2}, Maciej Stopa², Andrzej Kwaśnica³

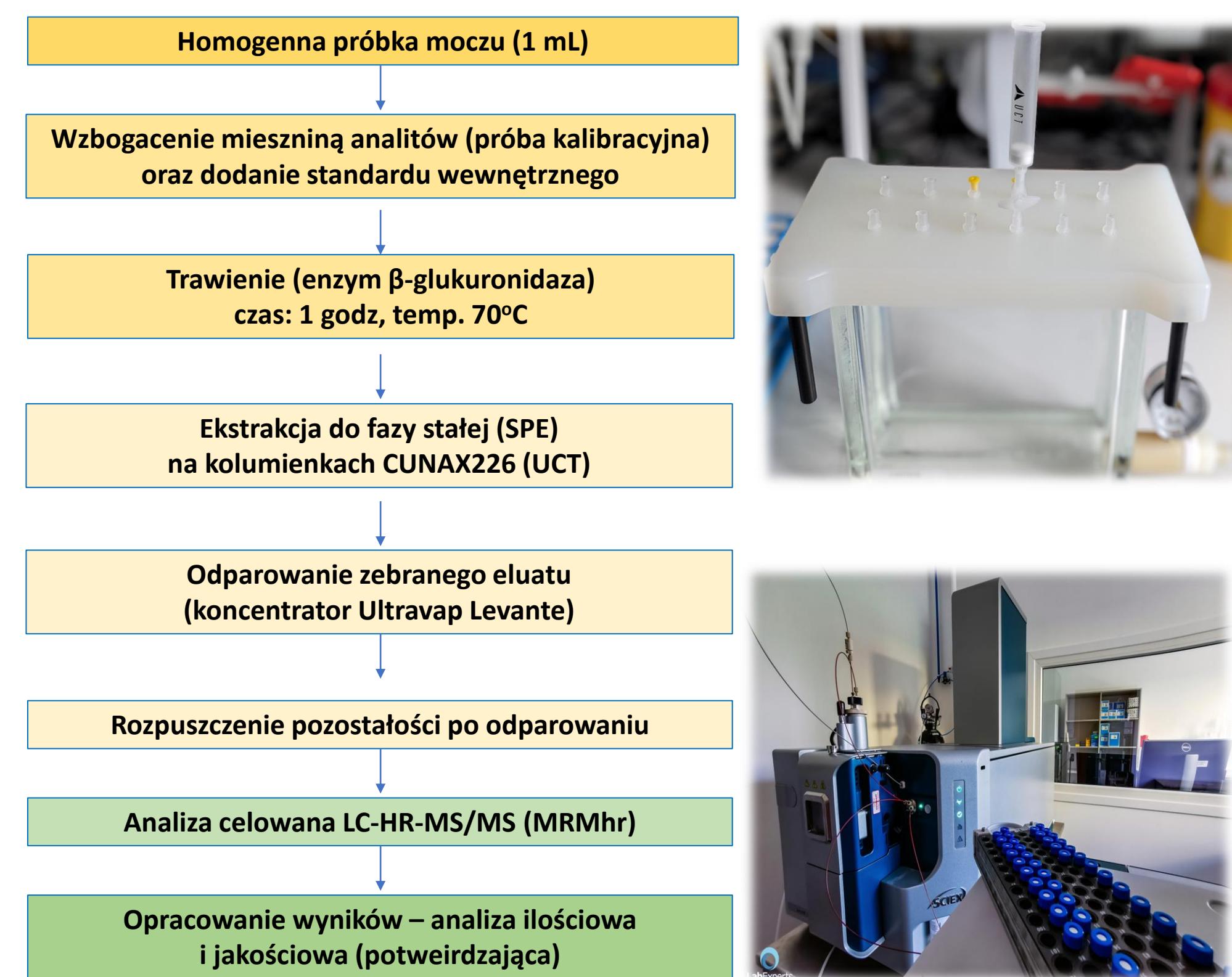
1 - LabExperts sp. z o. o., Gdańsk; 2 – Bioanalytic sp. z o. o., Gdańsk; 3 – Lab4Tox sp. z o. o., Wrocław

Wstęp

Sterydy anaboliczno-androgenne (SAA), to grupa naturalnych i syntetycznych związków, które naśladują działanie endogenego testosteronu. Pobudzają receptory androgenowe, przyczyniając się z jednej strony do wzrostu masy i siły mięśniowej, a z drugiej do redukcji tkanki tłuszczowej. Choć stosowanie SAA w sporcie jest zakazane, nadal są one najbardziej nadużywaną klasą środków dopingujących. Materiałem do badań, pod kątem obecności SAA jest mocza – wykazujący silne efekty matrycowe, które mogą prowadzić do zafałszowania wyników. W celu przezwyciężenia problemów wynikających z niewystarczającą specyficznością analiz na urządzeniach niskiej rozdzielczości, do opracowania czułej i selektywnej metody oznaczenia 28 SAA w moczu wykorzystano spektrometr mas wysokiej rozdzielczości ZenoTOF 7600.

Materiały i metody

Schemat postępowania z próbkami badanymi przedstawiono na rysunku (Rysunek 1). Próby analizowano z wykorzystaniem spektrometru mas ZenoTOF 7600 (Sciex) sprzężonego z chromatografem ciekłym ExionAC (Sciex). Parametry metody LC-MS/MS przedstawiono w tabeli 1.



Rysunek 1. Schemat przedstawiający sposób postępowania z próbkami moczu

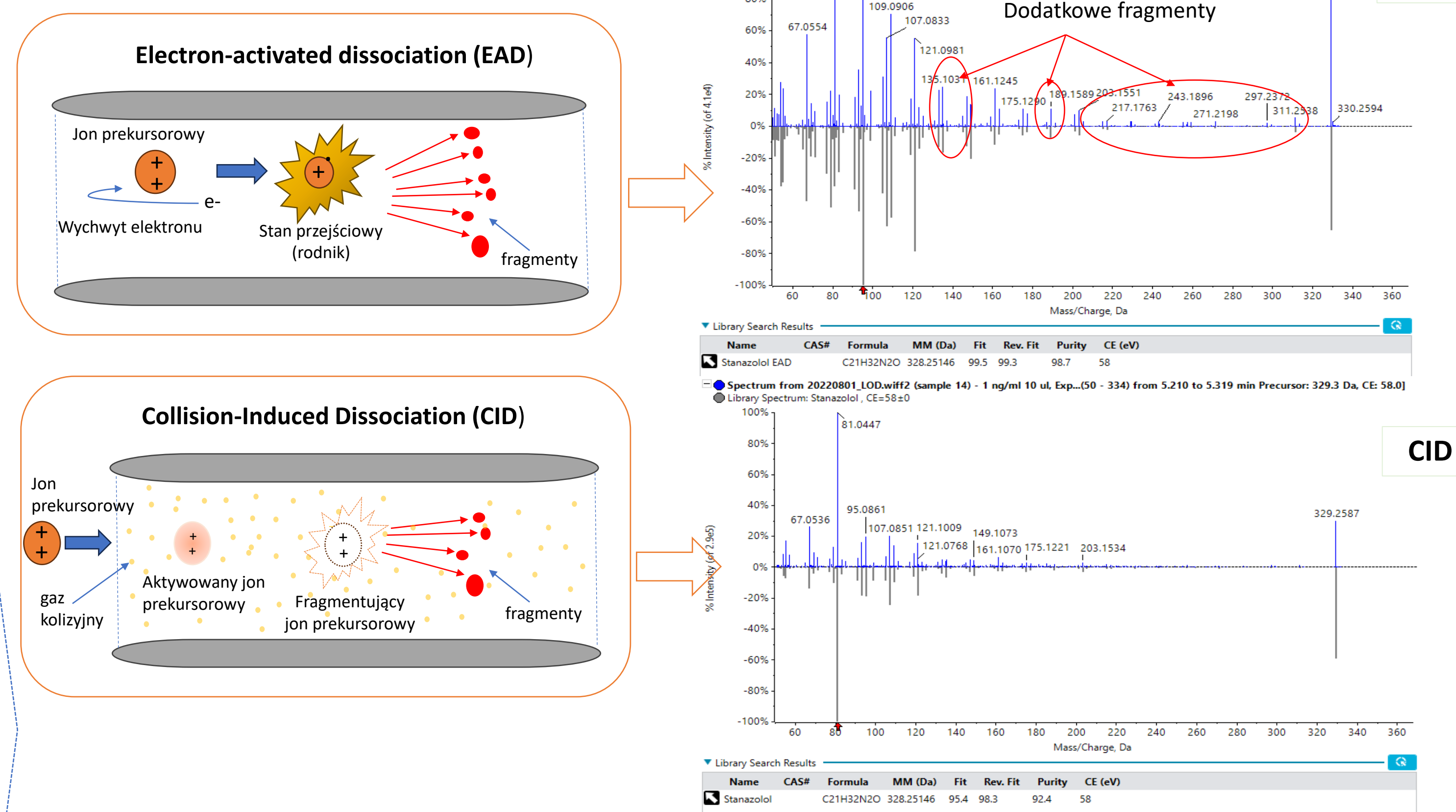
Tabela 1. Parametry metody LC-MS/MS.

Parametr metody	Zastosowana wartość
Chromatograf ciekowy	ExionAC (Sciex)
Kolumna chromatograficzna	Kinetex 2.6 μm XB-C18 100 A
Fazy ruchome	A: H ₂ O B: ACN/MetOH (1:1 v/v)
Objętość nastrzyku	10 μL
Czas trwania analizy	12 min
Spektrometr mas	ZenoTOF 7600 (Sciex)
Źródło jonów	Turbo V™ Ion Source (ESI)
Jonizacja	Dodatnia
Tryb skanowania	MRMhr
Tryb fragmentacji	CID oraz EAD

Wyniki

W metodzie MS/MS zastosowano dwa tryby fragmentacji:

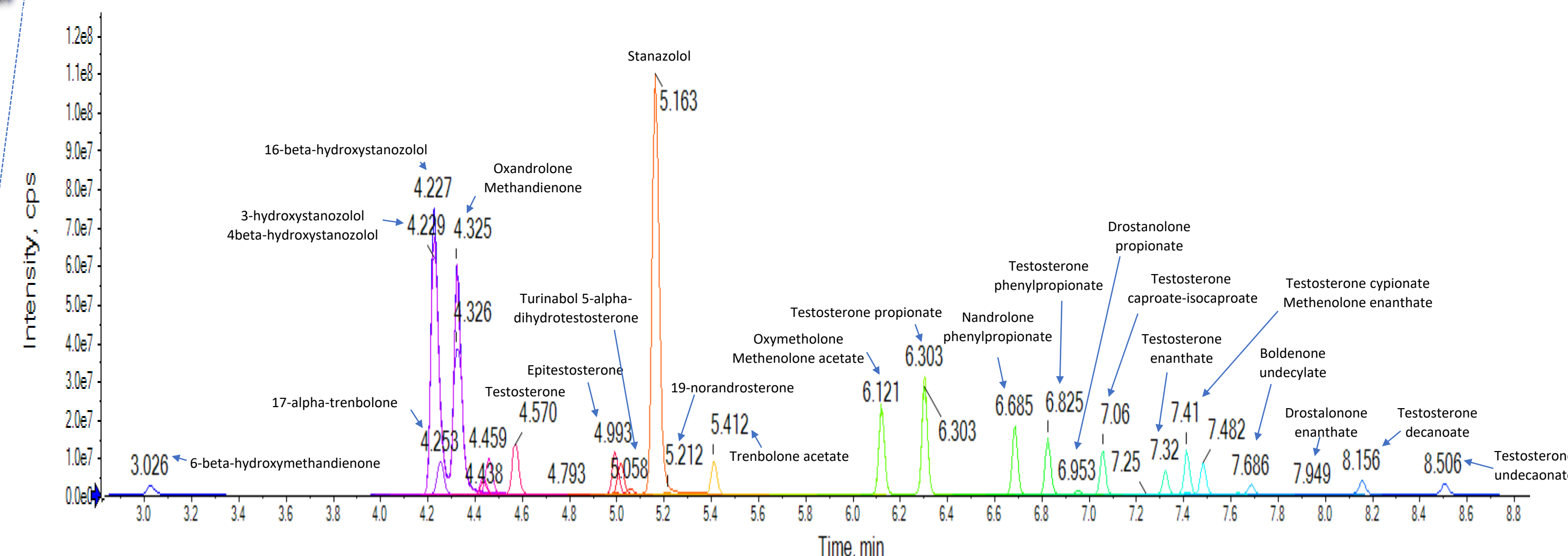
- **CID** (Collision-induced dissociation) – powszechnie stosowana technika fragmentacji
- **EAD** (Electron activated dissociation) – alternatywny sposób fragmentacji umożliwiający uzyskanie bardziej rozbudowanego widma fragmentacyjnego, a tym samym dostarczającego unikalnych jonów fragmentacyjnych zwiększających specyficzność metody.



Rysunek 2. Schemat przedstawiający mechanizm fragmentacji techniką CID i EAD oraz widmo MS/MS uzyskane przy wykorzystaniu obu rodzajów fragmentacji na przykładzie Stanozololu.

Index	Sample Name	Sample T...	Component Name	Actual Concentr...	Expected RT	Area	Retent. Time	Retent. Time D...	U...	Formula	Precursor Mass	Mass Error...	Frag. Mass...	RT Conf...	Isotope Conf...	Library Conf...	Found At Mass	Mass Error L...	Found At Fra...	Library Hit	Library Score	Comb... Score	Isotope Ratio...
13	5 ng/ml	Standard	Stanozolol	5.00	5.16	1.913e5	5.17	0.01	☑	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O	329.259	-0.3	329.2586	✓	✓	✓	329.2584	-1.0	95.0751	Stanozolol EAD	97.7	86.841	1.9
42	10 ng/ml	Standard	Stanozolol	10.00	5.16	3.135e5	5.17	0.00	☑	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O	329.259	-0.3	329.2586	✓	✓	✓	329.2586	-0.3	95.0764	Stanozolol EAD	98.9	94.867	0.7
71	blank mocza (2x woda)	Unknown	Stanozolol	N/A	5.16	1.358e5	5.25	0.09	☑	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O	329.259	-1.44.8	329.2111	✓	✓	✗	329.2111	-144.8	95.0836	No Match	0.0	4.584	Infinity
100	mocza 10 ng/ml (2x woda)	Unknown	Stanozolol	N/A	5.16	1.936e5	5.16	0.00	☑	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O	329.259	-0.4	329.2588	✓	✓	✓	329.2588	-0.4	95.0758	Stanozolol EAD	98.7	95.654	5.5
129	mocza 10 ng/ml (1x woda 1...)	Unknown	Stanozolol	N/A	5.16	2.280e5	5.16	0.01	☑	C ₂₁ H ₃₂ N ₂ O	329.259	-0.4	329.2586	✓	✓	✓	329.2586	-0.4	95.0750	Stanozolol EAD	98.7	87.069	3.5

Rysunek 3. Potwierdzenie tożsamości analitu w roztworach oraz próbce matrycowej na przykładzie Stanozololu.



Rysunek 4. Chromatogram prezentujący rozdział 28 sterydów anabolicznych [stężenie 50 ng/mL] w metodzie LC-MS/MS z wykorzystaniem systemu ZenoTOF 7600.

Apply	Qualitative Rule	Acceptable Difference	Marginal Difference	Unacceptable Difference	Combined Score Weight (%)
<input checked="" type="checkbox"/>	Mass Error (ppm)	< 5	< 10	>= 10	20
<input checked="" type="checkbox"/>	Fragment Mass Error (ppm)	< 10	< 20	>= 20	20
<input checked="" type="checkbox"/>	Error in Retention Time	< 2.5	< 20	>= 20	5
<input checked="" type="checkbox"/>	% Difference Isotope Ratio	< 10	< 20	>= 20	5
<input checked="" type="checkbox"/>	Library Hit Score	> 70	> 50	<= 50	50
<input type="checkbox"/>	Formula Finder Score	> 50	> 20	<= 20	20

Rysunek 5. Parametry składające się na wielopoziomowe potwierdzenie obecności analitu w próbce. Na końcowy wynik jakościowy (combined score) wpływa 5 kryteriów o różnych wagach decyzyjnych – kluczowym parametrem w prezentowanej metodzie jest uzyskanie widma fragmentacyjnego, które odpowiada za 50% uzyskanych punktów.

Tabela 2 Limit detekcji uzyskany dla poszczególnych analitów w próbach matrycowych.

Analit	Limit detekcji [ng/mL]	Stosunek sygnału do szumu [S/N]
6-hydroxymethandienone	5.00	26.2
3-hydroxystanozolol	0.05	33.5
4beta-hydroxystanozolol	0.01	6.3
17-alpha-trenbolone	5.00	68
16-beta-hydroxystanozolol	0.01	16.3
Oxandrolone	5.00	42.3
Methandienone	0.50	20.8
Testosterone*	-	-
Epitestosterone*	-	-
Turinabol	0.01	7.4
5-alpha-dihydrotestosterone*	-	-
Stanozolol	0.01	13.2
19-norandrosterone	1.00	4.7
Trenbolone acetate	1.00	9.3
Oxymetholone	50.00	45.8
Methenolone acetate	0.01	15.6
Testosterone propionate	0.01	7.2
Nandrolone phenylpropionate	0.05	5.9
Testosterone phenylpropionate	0.10	19.5
Drostanolone propionate	0.10	9.2
Testosterone caproate-isocaproate	0.05	68.4
Testosterone enanthate	0.05	5.9
Testosterone cypionate	0.05	39.9
Methenolone enanthate	0.10	9.8
Boldenone undecylate	0.05	7.1
Drostanolone enanthate	0.50	8.5
Testosterone decanoate	0.10	17.8
Testosterone undecanoate	0.50	14.9

*związki endogenne, brak możliwości wyznaczenia rzeczywistego LOD przy zastosowanej matrycy

Podsumowanie

Opracowana metoda LC-MS/MS charakteryzuje się nie tylko wysoką czułością, ale poprzez zastosowanie urządzenia HR-MS/MS oferuje dodatkowe elementy potwierdzające obecność związku, takie jak defekt masy dla jonów prekursorowych i fragmentacyjnych, rozkład izotopowy czy porównanie badanego widma MS/MS z biblioteką widm MS/MS.