

# Application News

## No. C142

LC/MS  
Liquid Chromatography Mass Spectrometry

### 2DLC/MS/MS を用いた 尿中高極性ドーピング禁止物質のスクリーニング

Screening Analysis of Highly Polar Doping Agents in Urine Using 2DLC/MS/MS

スポーツ界では選手の健康を守るため、化学物質や不正手段によって競技力を向上させるドーピングを禁止しており、世界的レベルで厳しい検査が行われています。瞬発力を増強する興奮剤を用いた古典的なドーピング、近年ではヒト体内に存在する内因性ホルモンなどの天然型生理活性物質を用いるなど、様々なドーピング手法が存在します。そのため新たなドーピングに対する検査方法の開発は健全なスポーツの発展には必要不可欠となっています。

本アプリケーションニュースでは、2016年に世界反ドーピング機関（WADA）の禁止リストに追加された抗虚血効果を有するとされる Meldonium や興奮薬およびその類似物の Synephrine, Norfenefrine, Etilefrine, Oxilofrine, Octopamine などの極性化合物について、2DLC/MS/MS を用いた 6 化合物の一斉分析例をご紹介します。

T. Minohata T. Tanigawa

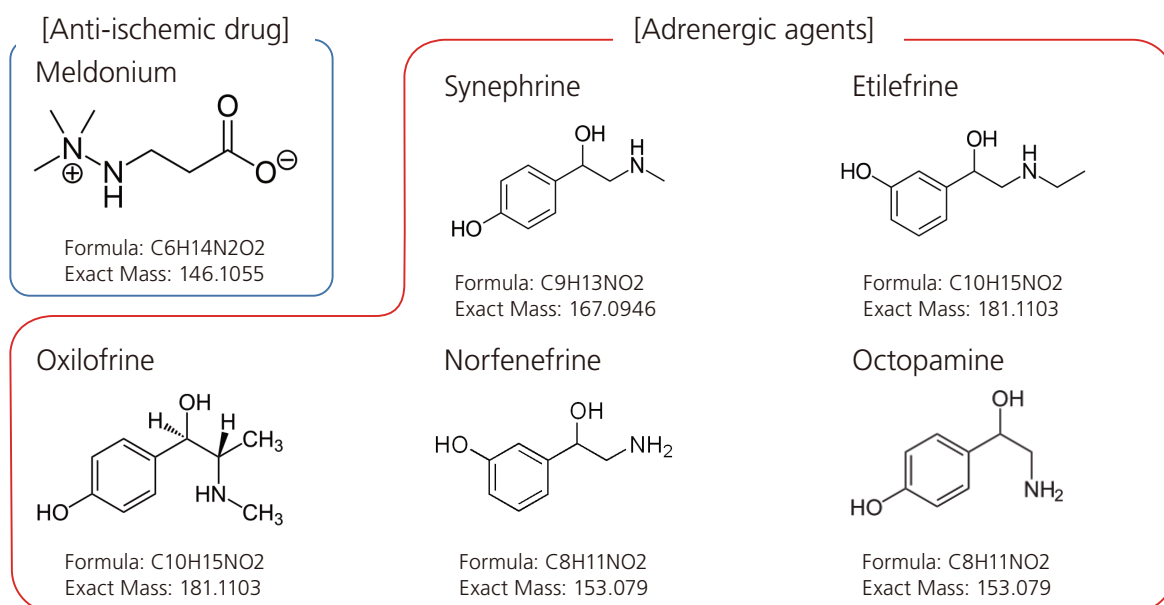


Fig. 1 6 化合物の構造式  
Structures of 6 Compounds

Table 1 分析条件  
Analytical Conditions

[LC] NexeraX2 System	[MS] LCMS-8060
Analytical Column : Nucleodur HILIC (100 mm L. × 2 mm I.D., 1.8 μm)	Ionization : ESI (+/-)
Trapping Column : Nucleodur HILIC (20 mm L. × 2 mm I.D., 3 μm)	Nebulizing Gas Flow : 3.0 L/min.
Mobile Phase : A: H <sub>2</sub> O + 5 % buffer,	Drying Gas Flow : 15.0 L/min.
B: Acetonitrile + 5 % buffer,	Heating Gas Flow : 15.0 L/min.
C: Acetonitrile + 5 % buffer	HB Temp. : 500 °C
(buffer: 200 mM Ammonium Acetate + 0.15 % glacial acetic acid)	DL Temp. : 300 °C
Column Oven Temp. : 40 °C	Interface Temp. : 400 °C
Injection Volume : 30 μL	

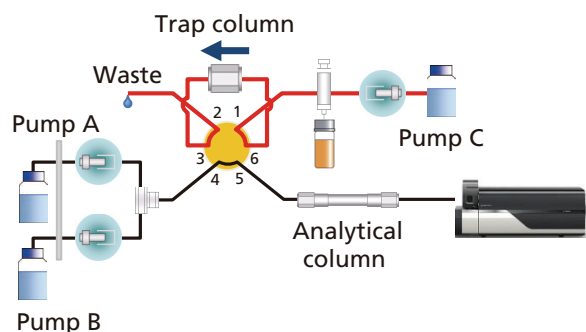
MRM parameter:

#	Name	Polarity	Q1	Q3 Qualifier 1	Q3 Qualifier 2	Ret. Time (min)	CE Qualifier 1	CE Qualifier 1
1	Meldonium	+	147.20	58.25	59.25	8.18	-27	-18
2	Etilefrine	+	182.30	135.25	91.25	5.34	-20	-27
3	Norfenefrine	+	154.20	91.25	65.25	6.01	-21	-35
4	Octopamine	+	154.20	91.25	119.20	6.00	-21	-15
5	Oxilofrine	+	182.30	149.25	105.25	5.69	-20	-22
6	Synefrine	+	168.20	135.20	107.25	5.87	-20	-31
7	Meldonium-d3	+	150.20	62.25	60.25	8.18	-18	-30
8	Etilefrine sulphate	+	262.20	164.15		5.19	-19	
9	Synefrine sulphate	+	248.20	150.25	135.20	5.68	-15	-30
10	Norfenefrine sulphate	+	234.20	136.20	91.20	5.62	-18	-35
11	Etilefrine sulphate_neg	-	260.20	180.20	121.10	5.19	18	39
12	Oxilofrine sulphate_neg	-	260.20	77.10	178.20	5.49	26	12
13	Synefrine sulphate_neg	-	246.20	148.20	106.10	5.70	20	30
14	Norfenefrine sulphate_neg	-	232.20	152.20	121.15	5.69	17	36
15	Octopamine sulphate_neg	-	232.20	134.15	107.10	5.81	22	30

#7 : 内部標準  
#8~15 : 硫酸抱合体の確認

MRM では未変化体および硫酸抱合体のパラメータを登録しました。さらに硫酸抱合体ではポジティブだけでなくネガティブモードで検出できる成分を登録することで、対象化合物の同定精度を向上させることが可能となります。

Trap



Analysis

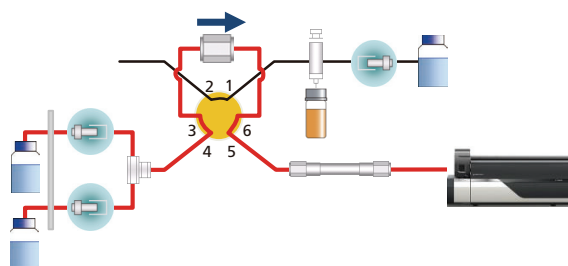


Fig. 2 2D-HILIC 概要図  
Flow Diagram of 2D-HILIC System

親水性相互クロマトグラフィー (HILIC) は親水性化合物の分離分析に有効です。今回、トラップカラムおよび分析カラムに HILIC を用いた 2D-HILIC システムを採用しました。トラップカラムにより尿中のマトリクスと対象となる 6 化合物を分離し、分析カラムにより十分なクロマトグラフィー分離が可能となります。

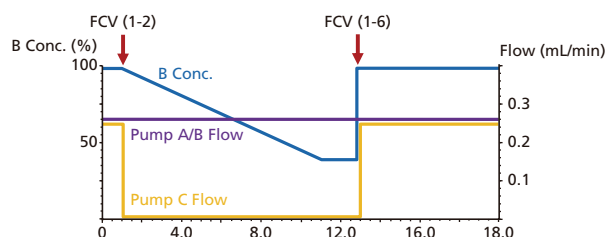


Fig. 3 流速およびグラジエント条件  
Flow Rate and Gradient Program

尿検体の前処理

Sample Preparation of Urine Sample

前処理は下記の方法で行いました。

1. 尿を 3,000 rpm で 10 分間遠心する。
2. 遠心後, 60 μL を分取し, 内部標準溶液 (\*) 10 μL とアセトニトリル 140 μL を添加し, ボルテックスミキサーで攪拌する。
3. 13,000 rpm で 5 分間遠心後, 上清 (180 μL) をサンプルバイアルに分注する。

(\*) Meldonium-d3 in 200 mM Ammonium Acetate

## ■ 検量線

### Calibration Curves

尿中に添加した6種類の化合物についての検量線結果を Fig. 4 に示します。2016年9月30日以降、WADAはMeldoniumの許容濃度を「尿中で100 ng/mL」としています。今回の結果から、尿中で1 ng/mLまで検出できることを確認し、1~200 ng/mLで良好な直線性を示しました。また、その他5成分についても1~200または2~200 ng/mLで良好な直線性が得られました。

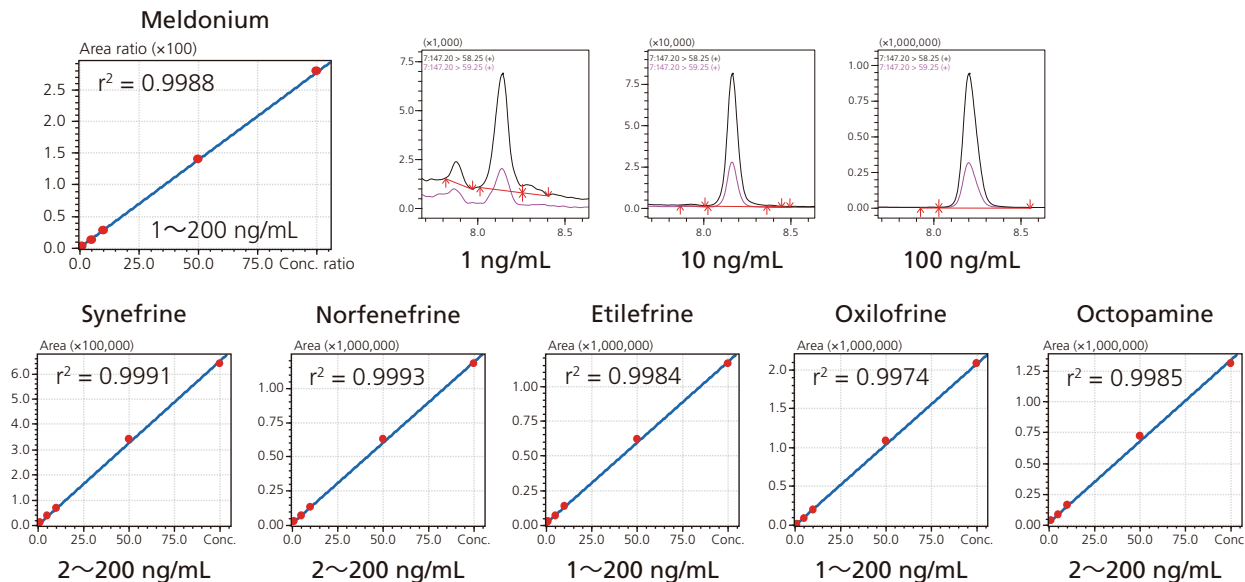


Fig. 4 6成分の検量線とMRMクロマトグラム  
Calibration Curves and MRM Chromatograms of 6 Compounds

## ■ 尿検体の分析

### Analysis of Synephrine, Etilefrine and Oxilofrine in Urine

Synephrine, Etilefrine, Oxilofrine, Norfenefrine, Octopamine について、実際に服用した尿検体の分析を行いました。すべての検体において未変化体または硫酸抱合体が含まれていることを確認しました。

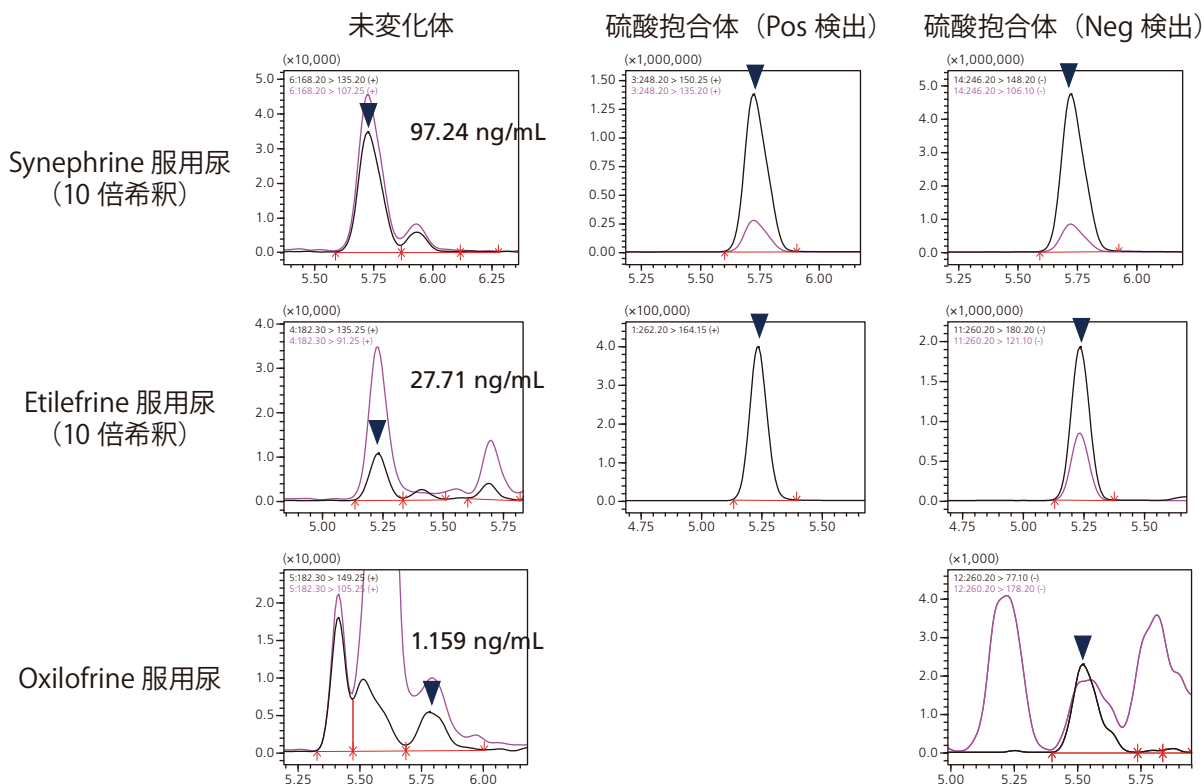


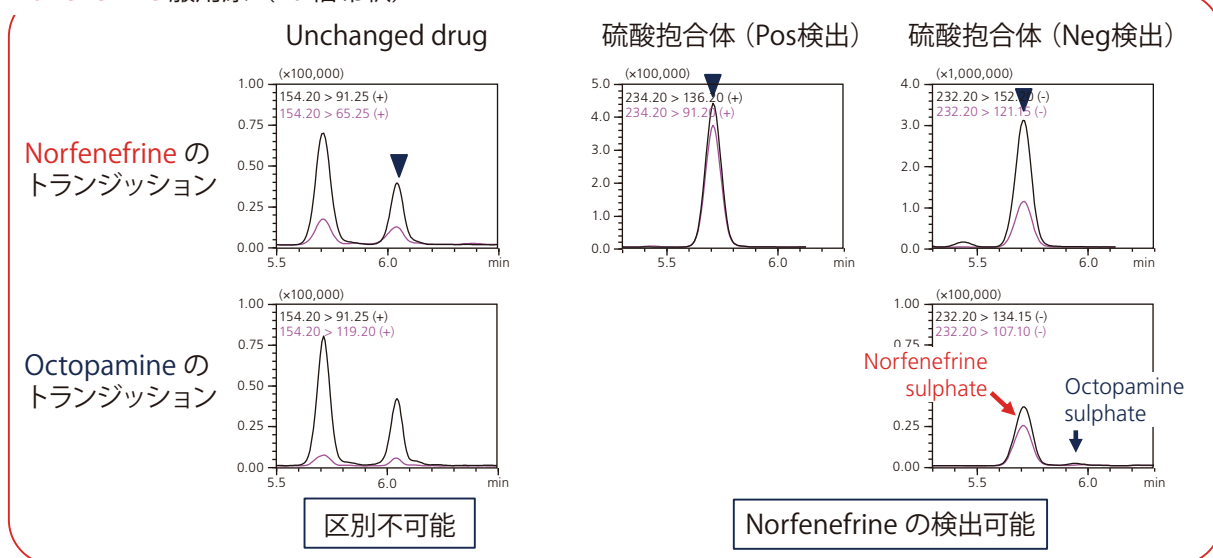
Fig. 5 Synephrine, Etilefrine, Oxilofrine 服用尿の分析結果  
Results of Urine Dosed with Synephrine, Etilefrine and Oxilofrine

## ■ Norfenefrine と Octopamine の比較検討

Distinguishing Norfenefrine and Octopamine in Urine

Norfenefrine と Octopamine は位置異性体のため、未変化体では同一の保持時間、MRM トランジションとなり、区別するのは困難です。2 化合物の硫酸抱合体は保持時間が異なり、さらに MRM トランジションで異なる挙動を示すことから、区別可能であることを確認しました。

### Norfenefrine 服用尿 (10 倍希釈)



### Octopamine 服用尿 (10 倍希釈)

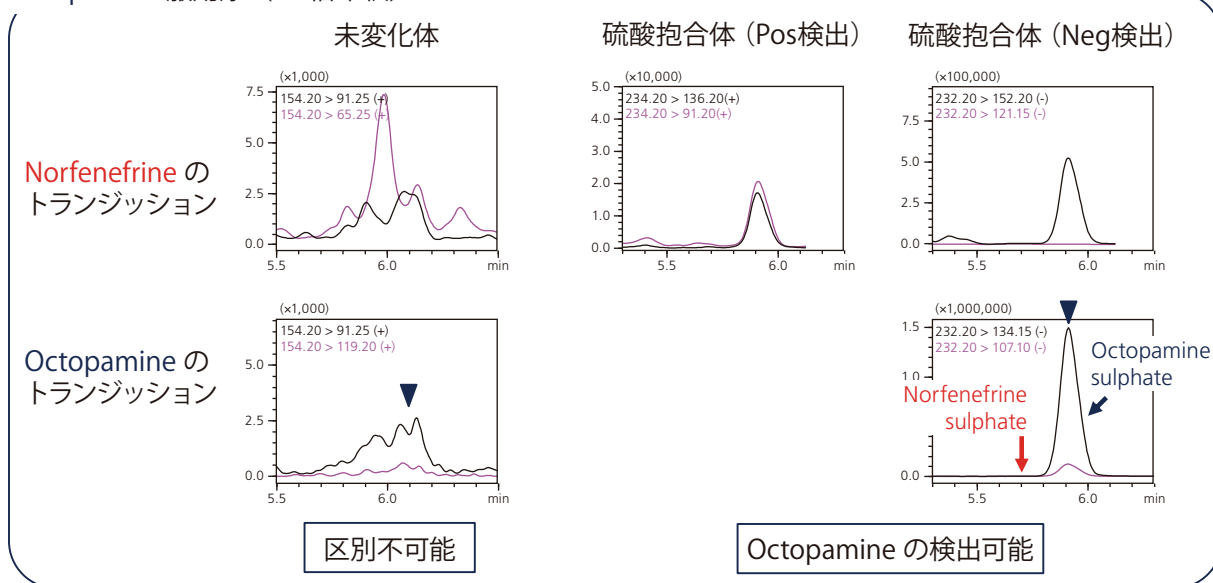


Fig. 6 Norfenefrine および Octopamine 服用尿の分析結果  
Results of Urine Dosed with Norfenefrine and Octopamine

本アプリケーションニュースで用いた試料は株式会社 LSI メディエンス アンチドーピングラボラトリー様より提供頂きました。  
(参考文献) : Anal Bioanal Chem. (2015), 407, 5365-5379  
Drug Test. Analysis (2015), 7, 973-979  
注) 本文中に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器として承認・認証等を受けておりません。  
治療診断目的およびその手続き上での使用はできません。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部  
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2016年12月

島津コールセンター ☎ 0120-131691  
(075)813-1691