ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΑΡΩΣΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΙΚΗ RPLC-qTOF/MS ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΕΠΤΙΔΙΩΝ ΜΙΚΡΟΥ ΜΟΡΙΑΚΟΥ ΒΑΡΟΥΣ ΣΕ ΑΘΛΗΤΕΣ

Αλεξανδρή Γεωργία[1,2], Γεωργοπάνου Ευτυχία[1,2], Αγγελής Ιωάννης[2], Φραγκάκη Αργυρώ[2], Κιούση Πολυξένη[2], Τσίβου Μαρία[2], Ειρήνη Παντερή[1]

[1]Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Email: irenepanderi@gmail.com
[2]Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ, ΟΑΚΑ, Αθήνα

Περίληψη

Το παγκόσμιο πρόγραμμα αντι-ντόπινγκ περιλαμβάνει όλα εκείνα τα στοιχεία που απαιτούνται ώστε να διασφαλιστεί η βέλτιστη εναρμόνιση και εφαρμογή των παγκόσμιων και εθνικών προγραμμάτων αντι-ντόπινγκ. Τα τελευταία χρόνια η Λίστα Απαγορευμένων Ουσιών διευρύνεται και πλέον περιλαμβάνει πεπτιδικές ορμόνες και αυξητικούς παράγοντες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα πεπτίδια απελευθέρωσης αυξητικής ορμόνης (GHRPs) και τα πεπτίδια που απελευθερώνουν γοναδοτροπίνη (GNRHs) και είναι πεπτίδια μικρού μοριακού βάρους. Οι αναλυτικές διαδικασίες σάρωσης που εφαρμόζονται από τα εργαστήρια ελέγχου-ντόπινγκ για την ανίχνευση απαγορευμένων ουσιών σε αθλητές διαφοροποιούνται ανάλογα με τη χημική δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των εξεταζόμενων μορίων και ανάλογα με την έκταση του μεταβολισμού τους στον ανθρώπινο οργανισμό περιλαμβάνουν ανίχνευση της μητρικής ουσίας ή /και των προϊόντων μεταβολισμού αυτής. Οι διαδικασίες σάρωσης περιλαμβάνουν την απομόνωση των ελεύθερων μορίων των ουσιών από το υπόστρωμα των ούρων με εφαρμογή εκχυλιστικής διαδικασίας, με την οποία επιτυγχάνεται ταυτόχρονα και συμπύκνωση των δειγμάτων και την ανάλυση των κατεργασμένων δειγμάτων με υψηλής ευαισθησίας μεθόδους πολλαπλής ανίχνευσης όπως είναι η συνδυαστική τεχνική της υγροχρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών.

Σκοπός της εργασίας είναι η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου σάρωσης πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους (< 2kDa) όπως είναι τα Anamorelin, Capromorelin, GHRP-2, GHRP-6_FREE ACID, GHRP-3, Ibutamoren και τα Histrelin, Goserelin, Gonadorelin, Buserelin, LHRH (2-10), Narfarelin (5-10), Triptorelin, και Leuprorelin. Για την ανίχνευση των παραπάνω πεπτιδίων σε ούρα αθλητών χρησιμοποιείται η συνδιαστική τεχνική LC-qTOF/MS. Η προεργασία των βιολογικών δειγμάτων πραγματοποιείται με την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης με χρήση φυσιγγίων Oasis WCX (ασθενής κατιοντοανταλλάκτης). Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητάς της που περιλαμβάνουν τους εξής ελέγχους: ικανότητα προσδιορισμού (Identification Capability), ειδικότητα (Specificity), ανθεκτικότητα (Robustness), επιμόλυνση εκ μεταφοράς (Carry Over), παρεμποδίσεις υποστρώματος (Matrix Interferences) και επίδραση υποστρώματος (Matrix Effect).

Λέξεις-Κλειδιά: *Έλεγχος ντόπινγκ, πεπτίδια, RP-HPLC, διαδικασία σάρωσης, επικύρωση*

Abstract
The World Anti-Doping Program includes all the documents that harmonize anti-doping policies, rules and regulations within sport organizations and among public authorities around the world. In recent years, the Prohibited List of Substances is widening and today it includes Peptide Hormones and Growth Factors. This category includes Growth Hormone Releasing Peptides (GHRPs) and Gonadotropin Releasing Hormones (GnRHs). These are peptides with small molecular weight. Analytical screening methods which are used from Doping Control Laboratories in order to detect prohibited substances in athletes differ according to the chemical structure and the physical and chemical properties of the molecule and its metabolic path in humans and they include the detection of the parent substance or/and its products. Scanning techniques include isolation of the free molecules from urine matrix using an extraction process which also condenses the samples and then follows the analysis of the samples using methods with high sensitivity and multiple detection such as LC-MS.
In this work the main purpose was the development and validation of a screening method for peptides with small molecular weight (<2kDa). These peptides are Anamorelin, Capromorelin, GHRP-2, GHRP-6_FREE ACID, GHRP-3, Ibutamoren and Histrelin, Goserelin, Gonadorelin, Buserelin, LHRH (2-10), Narfarelin (5-10), Triptorelin, Leuprorelin. The technique that is used for the detection of these peptides in athlete's urine is combining LC-qTOF/MS. The pretreatment of the biological samples takes place using Solid Phase Extraction with WCX micro columns (weak cation exchange). The method was validated for its main characteristics which are Identification Capability, Specificity, Robustness, Carry Over, Matrix Interferences and Matrix Effect.

Keywords: *Doping Control, peptides, RP-HPLC, screening method, validation*

1. Εισαγωγή

Οι συνεχείς βελτιώσεις των αναλυτικών μεθόδων στα εργαστήρια ντόπινγκ, αναγκάζουν τους αθλητές να αναζητούν και να στρέφονται σε νέες στρατηγικές για να βελτιώσουν τις επιδόσεις τους. Η χρήση των πεπτιδίων έκκρισης της αυξητικής ορμόνης (GHRPs) και των πεπτιδίων έκκρισης γοναδοτροπινών (GnRHs) είναι μια συγκριτικά νέα κατηγορία ουσιών που χρησιμοποιούνται από αθλητές για τη βελτίωση των επιδόσεων τους Thomas (2011), Thomas (2012) και Cuervo (2017). Η πλειοψηφία των ενώσεων αυτών ανήκει στις κατηγορίες S0 (μη εγκεκριμένες ουσίες), S2 (πεπτιδικές ορμόνες, αυξητικοί παράγοντες, σχετικές ουσίες και μιμητικά), S4 (ορμονικοί και μεταβολικοί τροποποιητές) και S5 (διουρητικά και παράγοντες συγκάλυψης) της Απαγορευμένης Λίστας WADA. Σύμφωνα με τον Κατάλογο Απαγορευμένων Ουσιών του Παγκόσμιου Οργανισμού Αντι-Ντόπινγκ (WADA), το 2016, απαγορεύεται η χρήση ενός αριθμού πεπτιδικών ορμονών και συναφών ουσιών, οι περισσότερες εκ των οποίων εμφανίζονται ενδογενώς στον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς μπορεί να έχουν άμεσες και έμμεσες επιπτώσεις στην ανάπτυξη των μυών.
Μεταξύ αυτών, τα πεπτίδια που απελευθερώνουν αυξητική ορμόνη (GHRPs) είναι συνθετικά, μικρά πεπτίδια που αποτελούνται από 4-7 υπολείμματα αμινοξέων και έχουν την ικανότητα να αυξάνουν τα επίπεδα της ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης (human Growth Hormone, hGH). Η ανθρώπινη αυξητική ορμόνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη που εκκρίνεται από τον αδένα του προσθίου λοβού της υπόφυσης. Επιταχύνει την ανάπτυξη ιστού σε παιδια ενώ μετα την εφηβεία είναι κατά κύριο λόγο μια μεταβολική ορμόνη.

Όσον αφορά το ντόπινγκ έχει ως αποτέλεσμα την επιτάχυνση της ανάρρωσης από αθλητικούς τραυματισμούς και διεγείρει την ανάπτυξη μυών.
Η εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπίνων (GnRH) και τα ανάλογα της (GnRHs) υποστηρίζεται ότι αυξάνουν την ενδογενή ωχρινοποιητική ορμόνη (LH), την ωοθυλακιοτρόπο ορμόνη (FSH) και τα επίπεδα τεστοστερόνης, μεταξύ άλλων πιθανών οφελειών για σκόπους ντόπινγκ Η GnRH γνωστή ως γοναδορελίνη είναι ζωτικής σημασίας για την αναπαραγωγή των θηλαστικών και απελευθερώνεται από τους νευρώνες του υποθαλάμου. Είναι υπεύθυνη για την έκκριση των γοναδοτροπινών από τους αδένες της υπόφυσης. Οι γοναδοτροπίνες οι οποίες είναι απαγορευμένες μόνο στους άνδρες είναι η ωχρινοτρόπος ορμόνη (Luteinizing Hormone, LH) και η ανθρώπινη χοριακή γοναδοτροπίνη (human Corionic Gonadotrophin, hCG).
Οι προαναφερόμενες ουσίες μπορούν να ληφθούν από το στόμα και να προκαλέσουν μια μεγάλη παραγωγή από ενδογενή αυξητική ορμόνη. Αυτή η αυξημένη παραγωγή και απελευθέρωση της ενδογενούς GH είναι αδύνατον να ανιχνευτεί με την καθιερωμένη διαδικασία αντι-ντόπινγκ που στοχεύει σε διαφορετικές φυσικές ισομορφές της GH. Έτσι, όταν ο καθιερωμένος έλεγχος για αυξητική ορμόνη αποτύχει, η κακή χρήση αυτών των απαγορευμένων ουσιών παραμένει μη αναγνωρίσιμη. Εκτός απ' αυτό ενισχύοντας την ενδογενή παραγωγή GH, δυνητικά, επικαλύπτεται η διάγνωση για το λόγο των μορφών της (20/22 kDa) μετά από την παράνομη εφαρμογή της ανασυνδιασμένης GH.
Ο μεταβολισμός των βιοδραστικών πεπτιδίων στο ανθρώπινο σώμα λαμβάνει χώρα στο ήπαρ, η δε απομάκρυνσή τους από τους νεφρούς. Λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα τους, ο χρόνος ημιζωής του πλάσματος των πεπτιδικών ουσιών είναι συνήθως μόνο λίγα λεπτά. Οι κύριες μεταβολικές οδοί δεν περιλαμβάνουν μόνο τα ηπατικά ένζυμα (πχ κυτόχρωμα P450) αλλά και την υποβάθμιση μέσω σπειραματικής διήθησης στο νεφρό. Έτσι, μία αποτελεσματική στρατηγική για την παράταση της ημιζωής στο πλάσμα, είναι να αλλάξει η σύνθεση των αμινοξέων, εισάγοντας τεχνητά υπολείμματα στο μόριο και τροποποιημένα N- ή C- άκρα. Αυτό διευκολύνει τη διαφοροποίηση από ενδογενείς παρεμβολές και προσδιορίζει ξεκάθαρα την ξενοβιοτική προέλευση των αναλυτών.
Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μία ολοκληρωμένη αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό σε ούρα 14 πεπτιδίων που υπόκεινται σε ελέγχους ντοπινγκ χρησιμοποιώντας την τεχνική της Υγροχρωματογραφίας / Φασματομετρίας Μαζών Χρόνου Πτήσης LC/qTOF-MS μετά από Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE) για αρχικές διαδικασίες σάρωσης (screening) και επιβεβαιωτικές, αντίστοιχα. Αυτές οι ουσίες περιελάμβαναν πεπτίδια απελευθέρωσης αυξητικής ορμόνης (GHRPs : Anamorelin, Capromorelin, GHRP-2, GHRP-6_FREE ACID, GHRP-3, Ibutamoren) και πεπτίδια που απελευθερώνουν γοναδοτροπίνη (GNRHs : Histrelin, Goserelin, Gonadorelin, Buserelin, LHRH (2-10), Narfarelin (5-10), Triptorelin, και Leuprorelin), με μικρά μοριακά βάρη που δεν ξεπερνούν τα 2000 Da.

1. Μεθοδολογία

1.1. Πειραματική Πορεία

Σε ένα πρώτο στάδιο εφαρμόστηκαν αναλυτικές διαδικασίες σάρωσης (screening) με στόχο την ανάδειξη των ύποπτων δειγμάτων και το διαχωρισμό των αρνητικών δειγμάτων. Σε ένα δεύτερο στάδιο, τα ύποπτα δείγματα που προέκυψαν από τις αναλύσεις σάρωσης επαναναλύονται με επιβεβαιωτικές διαδικασίες, εξειδικευμένες για την ανίχνευση της ύποπτης ουσίας. Για το σκοπό αυτό εφαρμόζεται χρωματογραφικός διαχωρισμός και

ανίχνευση της ουσίας με φασματομετρία μαζών, καθώς ο συνδυασμός τους προσφέρει υψηλή εξειδίκευση και εκλεκτικότητα. Η αντιστοιχία των φασμάτων μαζών μιας ουσίας στο ύποπτο δείγμα και στο δείγμα αναφοράς είναι σημείο-κλειδί στη διαδικασία της ταυτοποίησης. Η αντιστοιχία των φασμάτων εκφράζεται μέσω τουλάχιστον τριών ιόντων με διαγνωστική αξία και της αναλογίας τους που πρέπει να κείται εντός των ορίων που έχει θέσει η WADA. Επιπλέον, αντιστοιχία πρέπει να υπάρχει και στο χρωματογραφικό χρόνο ανάσχεσης για την τελική ταυτοποίηση. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με τα αποτελέσματα της ανάλυσης προτύπου δείγματος εμβολιασμένου με την ουσία και ελέγχεται αν πληρούνται τα κριτήρια που έχουν θέσει οι αρμόδιες αρχές για την ταυτοποίηση απαγορευμένων ουσιών.
Οι βέλτιστες πειραματικές συνθήκες καθορίστηκαν μετά από διερεύνηση διαφόρων παραμέτρων που αφορούσαν την προκατεργασία των δειγμάτων και τη μέθοδο ανάλυσης. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με διαφορετικά πληρωτικά υλικά SPE, πειράματα με διαφορετικές αναλογίες διαλυτών έκπλυσης / έκλουσης, στήλες HPLC, χρωματογραφικές και φασματομετρικές συνθήκες και αξιολογήθηκαν κατά την ανάπτυξη της μεθόδου.
Η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης με χρήση φυσιγγίων Oasis WCX (ασθενής κατιοντοανταλλάκτης) ακολουθούμενη από υγροχρωματογραφία υπερ υψηλής απόδοσης – φασματομετρία μαζών με χρωματογραφική στήλη C18 παρείχε την απαιτούμενη ευαισθησία και ειδικότητα για όλα τα πεπτίδια.

2. Οργανολογία

Σύστημα UHPLC-QTOF/MS (Agilent), αποτελούμενο από αυτόματο δειγματολήπτη και ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών με τετραπολικό αναλυτή μαζών συζευγμένο με αναλυτή χρόνου πτήσης. Για τον έλεγχο της λειτουργίας του οργάνου και την επεξεργασία των δεδομένων χρησιμοποιείται το λογισμικό Agilent Mass Hunter. Για τη χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η αναλυτική στήλη Zorbax Eclipse Plus C18 (100 x 2.1 mm i.d., 1.8 μm, Agilent Technologies). Για την κατεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε συσκευή εκχύλισης στερεάς φάσης.

3. Επικύρωση - Αποτελέσματα

Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητάς της που περιλαμβάνουν τους εξής ελέγχους: ικανότητα προσδιορισμού, ειδικότητα, ανθεκτικότητα, επιμόλυνση εκ μεταφοράς, παρεμποδίσεις υποστρώματος και επίδραση υποστρώματος.
Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται συνόπτικά τα χαρακτηριστικά επικύρωσης της μεθόδου για την ανίχνευση των πεπτιδίων μικρού μοριακού βάρους.

Πίνακας 1: Συνοπτική παρουσίαση αποτελεσμάτων

ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ	Η μέθοδος εμφανίζεται ικανή να ανιχνεύει τα υπό εξέταση πεπτίδια σε ≤ 1ng/mL.
Ειδικότητα	Η μέθοδος κρίνεται ειδική για την ανίχνευση των υπό εξέταση ουσιών.
Ανθεκτικότητα της μεθόδου	Η μέθοδος κρίνεται ανθεκτική για το σύνολο των ουσιών
Επιμόλυνση	Δεν παρατηρείται επιμόλυνση με το συγκεκριμένο χρωματογραφικό σύστημα

Παρεμποδίσεις Υποστρώματος	Δεν παρατηρούνται παρεμποδίσεις υποστρώματος για τις υπό εξέταση ουσίες
Επίδραση Μήτρας	Διακυμάνσεις μεταξύ: από -24% έως 91,6 %
Όριο Ανίχνευσης	Το όριο ανίχνευσης των υπό εξέταση ουσιών είναι ≤ 1ng/mL

4. Συμπεράσματα

Η υγροχρωματογραφία σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών είναι η καλύτερη τεχνική για τον προσδιορισμό των πεπτιδίων σε βιολογικά υγρά. Η χρήση της φασματομετρίας μαζών υψηλής ανάλυσης και υψηλής ακρίβειας, επιτρέπει το χαρακτηρισμό ουσιών με έναν άκρως εξελιγμένο τρόπο και προσφέρει πληροφορίες για άγνωστες ουσίες ή άγνωστους μεταβολίτες. Η μέθοδος που χρησιμοποιείται δίνει τη δυνατότητα της αναδρομικής αξιολόγησης των αποκτηθέντων δεδομένων για άγνωστους μεταβολίτες με τη βοήθεια της μη στοχευμένης προσέγγισης υψηλής ανάλυσης και υψηλής ακρίβειας με λειτουργία πλήρους σάρωσης με φασματομετρία μαζών και επιπρόσθετα πειράματα χρήσης υψηλότερης ενέργειας σύγκρουσης.

5. Βιβλιογραφία

1. Thomas A., Hopner S., Geyer H., Schanzer W., Petrou M., Kwiatkowska D., Pokrywka A., Thevis M., "Determination of growth hormone releasing peptides (GHRP) and their major metabolites in human urine for doping controls by means of liquid chromatography mass spectrometry", Anal. Bioanal. Chem. 40, p.p. 507-516, 2011, Γερμανία.
2. Thomas A., Walpurgis K., Krug O., Schanzer W. and Thevis M., "Determination of prohibited, small peptides in urine for sports drug testing by means of nano-liquid chromatography/benchtop quadrupole orbitrap tandem-mass spectrometry", J. Chromatogr. A 1259, p.p. 251-257, 2012, Γερμανία.
3. Cuervo D., Loli C., Fernandez-Alvarez M., Munoz G., Carreras D., "Determination of Doping Peptides via Solid-Phase Microelution and Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight LC–MS", J. Chromatogr. B, 1065-1066, p.p. 134-144, 2017**,** Ισπανία.