

AMBIENTNÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE PRO ANALÝZU SELEKTIVNÍCH MODULÁTORŮ ANDROGENNÍHO RECEPTORU

JANA KNYTLOVÁ^a, ALŽBĚTA NEMEŠKALOVÁ^{a,b}
a MICHAEL VOLNÝ^{a,b}

^a Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika, ^b Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 00 Praha 4, Česká republika
knytlovj@vscht.cz

Klíčová slova: ambientní ionizace, hmotnostní spektrometrie, selektivní modulátory androgenního receptoru

● <https://doi.org/10.54779/ccsss20250007>

Úvod

Selektivní modulátory androgenního receptoru (SARM) jsou nízkomolekulární látky vyvíjené od 90. let 20. století jako alternativa k testosteronové terapii¹. Navzdory slibným anabolickým účinkům však tyto látky neprokázaly dostatečný přínos v léčbě a jsou spojovány s riziky jako potlačení přirozené produkce testosteronu nebo zvýšené riziko kardiovaskulárních onemocnění². Pro své hormonální účinky jsou navíc zakázány Světovou antidopingovou agenturou a jejich prodej a distribuce je v mnoha státech, včetně České republiky, nezákonná. I přesto jsou SARM často zneužívány neprofesionálními sportovci³, zejména díky jejich snadné dostupnosti v nelegálních internetových obchodech, kde se prodávají jako potravinové doplňky ve formě tablet nebo kapslí.

Předkládaná práce se zabývá vývojem rychlé kvalitativní a semikvantitativní metody pro analýzu SARM v těchto preparátech pomocí hmotnostní spektrometrie s ambientní ionizací (AMS). Tato metoda umožňuje měření za atmosférického tlaku, často s minimální přípravou vzorku, a umožňuje tak rychlou detekci nelegálních látek⁴. Ve spojení s vhodným analyzátozem by pak metoda mohla být využita v přenosných zařízeních, například policií nebo celními orgány přímo v místě záchytu. Cílem práce je optimalizovat podmínky analýzy pomocí ionizace dielektrickým bariérovým polem a výsledky porovnat s tradiční LC-UV-MS analýzou.

Experimentální část

V práci byly analyzovány vybrané látky ze skupiny SARM, konkrétně ostarin, ligandrol, cardarin, YK-11, ibutamoren, andarin a radarin; jako vnitřní standardy byly

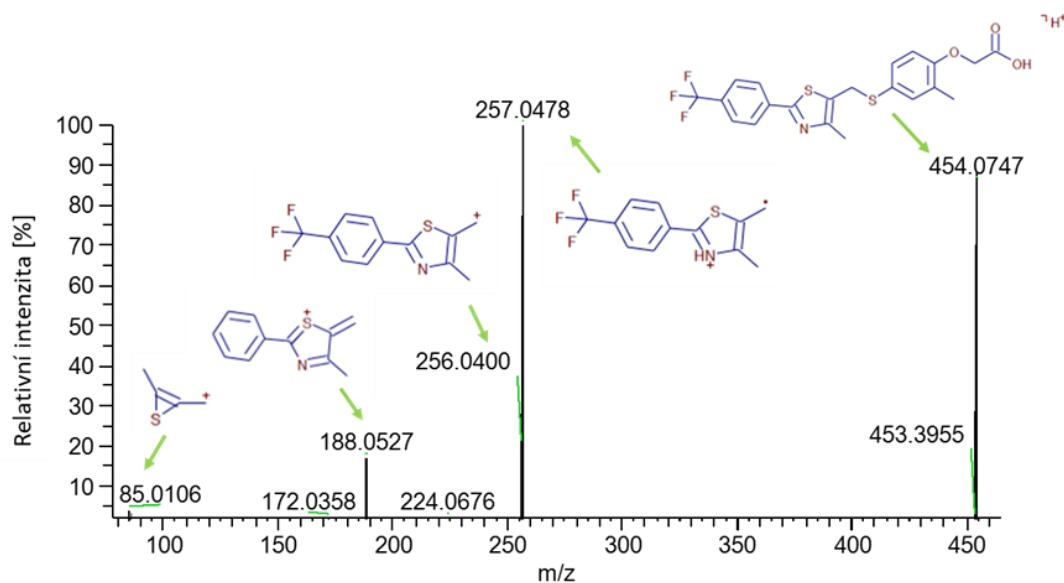
použity ostarin-*d*₄ a propranolol. Nejprve byla zaznamenána MS¹ a MS² spektra všech analytů, poté byl optimalizován postup při zavedení vzorku do ambientního iontového zdroje. Funkčnost metody byla poté ověřena s pomocí dvanácti potravinových doplňků s deklarovaným obsahem SARM. Příprava vzorku zahrnovala rozpuštění tablety nebo obsahu tobolky v methanolu, filtraci a ředění ultračistou vodou s přidavkem ostarinu-*d*₄. Obdobným způsobem byla připravena externí kalibrační řada s použitím stearanu hořečnatého jako reprezentativní matrice. Výsledné roztoky byly nejprve analyzovány pomocí LC-UV-MS, poté byly obohaceny o další vnitřní standard propranolol a analyzovány pomocí AMS.

LC-UV-MS analýza byla provedena pomocí kapalinového chromatografu s UV detektorem a hmotnostním spektrometrem typu trojitý kvadrupól, pracujícím v MRM módu. Separace byla provedena na koloně Poroshell 120 EC-C18 a použita byla gradientová eluce s dobou trvání 12 min. Pro AMS analýzu byl použit ambientní iontový zdroj Sicit®[®], vybavený modulem pro mikroextrakci na tuhé fázi (GC/SPME) a spojený s hmotnostním spektrometrem Orbitrap Exploris 120. Dávkování vzorku probíhalo pomocí mikrostříkačky, která byla krátce ponořena do roztoku vzorku a poté vložena na dobu přibližně 5 s do GC/SPME modulu, ohřívaného a neustále proplachovaného dusíkem. Po tuto dobu byl zaznamenáván celkový signál iontů (angl. total ion chromatogram, TIC). Fragmentační mechanismy zkoumaných látek byly ověřovány programem Mass Frontier 8.0.

Výsledky a diskuse

Cílem předkládané práce je vývoj rychlé metody ambientní ionizace, která nevyžaduje chromatografickou separaci a která by mohla být využita i ve spojení s přenosným hmotnostním spektrometrem, např. typu iontové pasti. Pro účely identifikace byla vytvořena interní knihovna MS² spekter (obr. 1), kde byly zaznamenány typické fragmenty jednotlivých SARM, na základě kterých by bylo možné látku identifikovat i s použitím analyzátoru s nízkým rozlišením.

Následovala analýza připravených roztoků. Nejprve byla provedena kvalitativní analýza dat pomocí AMS. Ze získaných dat TIC byly extrahovány záznamy pro specifické *m/z* jednotlivých analytů s přesností 5 ppm. Přítomnost analytu byla hodnocena jako pozitivní v případě, kdy byl v okamžiku dávkování vzorku zaznamenán pik o šířce přibližně 5 s, která odpovídala době dávkování vzorku do zdroje (obr. 2, vlevo). Získané kvalitativní výsledky byly porovnány s měřením pomocí LC-UV-MS, ve kterých byla přítomnost analytu hodnocena na základě retenčních

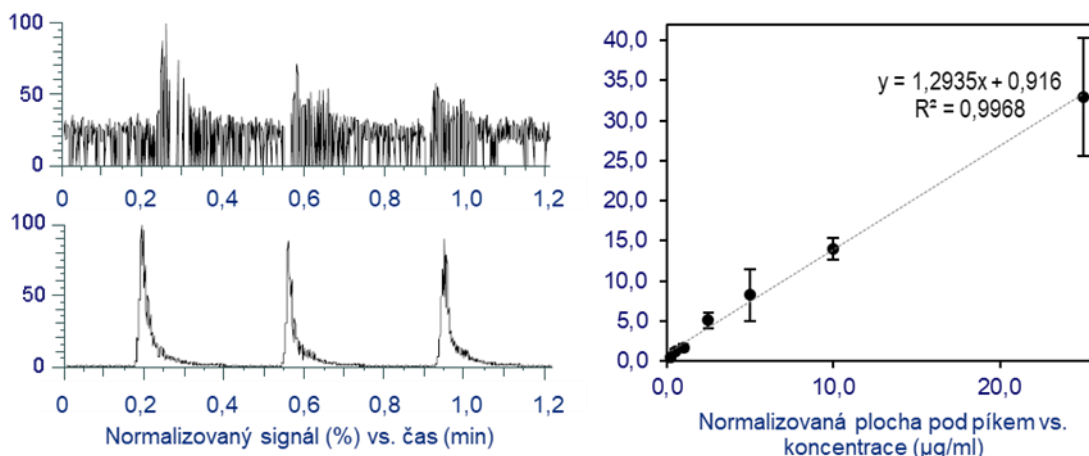


Obr. 1. MS² spektrum protonované molekuly cardarinu ($m/z = 454$) s navrhovanými strukturami charakteristických fragmentů. Měřeno v pozitivním módu, rozsah skenu 50–600 m/z , normalizovaná kolizní energie v HCD cele NCE = 30, rozlišení 120 000 pro hypotetickou hodnotu m/z 200. Charakteristickými fragmenty cardarinu jsou ionty o $m/z = 257$, 256, 188 a 85

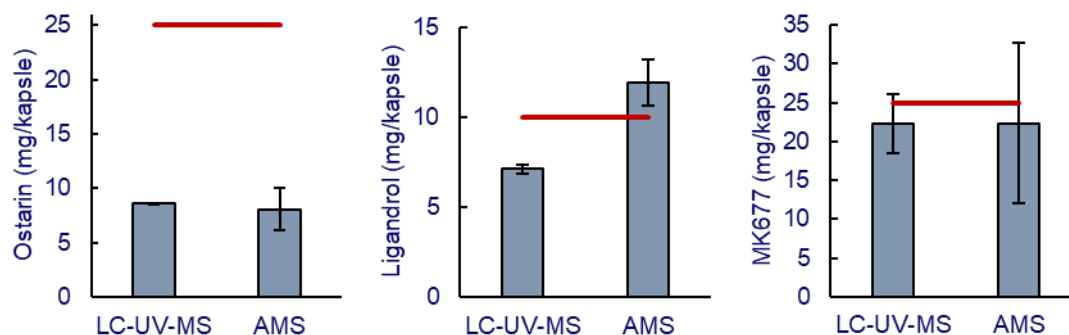
časů MRM přechodů. Při porovnání výsledků byla pozorována dobrá shoda; z celkového počtu 84 signálů, tj. 12 vzorků a 7 analytů, se 78 (93 %) signálů kvalitativně shodovalo, 4 (5 %) signály byly pomocí AMS vyhodnoceny jako falešně pozitivní a 2 (2 %) signály jako falešně negativní.

Data získaná z analýzy kalibrační závislosti byla dále použita pro kvantitativní vyhodnocení. Využití AMS pro kvantifikaci je omezené⁴, neboť tato metoda vykazuje vyšší variabilitu signálu v závislosti na složení vzorku nebo okolních podmínkách.

Tato práce zkoumá využití propranololu jako vnitřního standardu pro korekci kolísajícího signálu. Po integraci píku analytu a vnitřního standardu byla pro každý analyt sestavena normalizovaná kalibrační závislost (obr. 2, vpravo), pomocí které byl stanoven obsah jednotlivých SARM v přípravku. Porovnání výsledků s tradiční LC-UV-MS analýzou ukázalo různou míru shody (obr. 3), tento fakt je předmětem dalšího zkoumání. U mnoha přípravků byl také pozorován významný rozdíl mezi naměřeným obsahem a hodnotou deklarovanou výrobcem (obr. 3, vyznačeno červeně). Toto pozorování potvrzují i předchozí studie⁵,



Obr. 2. Kvalitativní a kvantitativní analýza ligandrolu: extrahovaný záznam signálu pro m/z 339,0932 v rozpouštědle (vlevo nahoře) a v kalibračním roztoku o koncentraci $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ (vlevo dole); záznam odpovídá třem konsektivním nástřikům roztoku do GC/SPME modulu. Integrací píků kalibračních roztoků byla získána kalibrační závislost pro ligandrol (vpravo); normalizováno na vnitřní standard propranolol, vynesena průměr a směrodatná odchylka pro $n = 3$



Obr. 3. Vybrané výsledky stanovení obsahu pomocí dvou metod pro analyt ostarin ve vzorku 1 (vlevo), ligandrol ve vzorku 3 (uprostřed) a MK677 ve vzorku 5 (vpravo). Červenou linií je vyznačen obsah deklarovaný výrobcem

důvodem může být absence kontrolních mechanismů, které by zajišťovaly kvalitu těchto produktů.

Ačkoliv ve srovnání s referenční LC-UV-MS analýzou vykazovala metoda AMS horší linearitu odezvy ($R^2 > 0,9$ versus $R^2 > 0,99$) a vysokou variabilitu signálu (s_r až 92 %), je nutné vyzdvihnout významně kratší dobu analýzy. Zatímco analýza jednoho vzorku pomocí LC-UV-MS trvala 12 min, pomocí AMS byla provedena přibližně za 5 s. Metoda AMS tedy může být užitečná pro semikvantitativní analýzu, kdy je cílem rychlé zjištění přítomnosti látky nad určitým prahem, například v kontextu toxikologických nebo legislativních limitů.

Závěr

V této práci byly studovány vybrané SARM pomocí přenosného ambientního zdroje Sicrit®. Metoda ukázala vysokou shodu s referenční LC-UV-MS metodou (93 % správně identifikovaných signálů) a výrazně kratší dobu analýzy (5 s oproti 12 min). Přestože má ambientní ionizace omezení v kvantitativní analýze, její rychlost a jednoduchost z ní činí užitečný nástroj pro semikvantitativní screening s využitím v terénu, například pro potřeby policie nebo celní správy.

LITERATURA

1. Handlon A. L., Schaller L. T., Leesnitzer L. M., Merrihew R. V., Poole C., Ulrich J. C., Wilson J. W., Cadilla R., Turnbull P.: *ACS Med. Chem. Lett.* 7, 83 (2016).
2. Wen J., Syed B., Leapart J., Shehabat M., Ansari U., Akhtar M., Razick D., Pai D.: *Clin. Endocrinol.* 102, 3 (2025).

3. Thevis M., Geyer H., Kamber M., Schänzer W.: *Drug Test. Anal.* 1, 387 (2009).
4. Feider C. L., Krieger A., DeHoog R. J., Eberlin L. S.: *Anal. Chem.* 91, 4266 (2019).
5. Gaudiano M. C., Aureli F., Manna L., Borioni A., Maccelli A., Raimondo M., De Giorgi D., Bartolomei M.: *Sex. Med.* 12, 2 (2024).

J. Knytllová^a, A. Nemeškalová^{a,b}, and M. Volný^{a,b}

^a Department of Analytical Chemistry, University of Chemistry and Technology in Prague, Prague, Czech Republic, ^b Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic): **Ambient Ionization Mass Spectrometry for Analysis of Selective Androgen Receptor Modulators**

Ambient ionization mass spectrometry (AMS) enables sample analysis in its native state with minimal preparation. This study explores the use of a commercial Sicrit® ion source, based on dielectric barrier discharge ionization, for detecting selective androgen receptor modulators (SARM) in dietary supplements, commonly abused for muscle mass enhancement. Tablets and capsules were dissolved in methanol and analyzed directly using the Sicrit® source coupled to an Orbitrap Exploris 120 mass spectrometer in positive mode. For confirmation, samples were also analyzed by LC-UV-MS. While LC-UV-MS provided superior quantitative analysis, AMS demonstrated strong qualitative agreement, indicating its potential for rapid screening of illegal anabolic substances in dietary supplements.

Keywords: ambient ionization, mass spectrometry, selective androgen receptor modulators



Užití tohoto díla se řídí mezinárodní licencí Creative Commons Attribution License 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.cs>), která umožňuje neomezené využití, distribuci a kopírování díla pomocí jakéhokoli média, za podmínky řádného uvedení názvu díla, autorů, zdroje a licence.