

Agilent Captiva EMR—Lipid Cleanup을 통한 인간 혈청 내 의약품의 LC/MS/MS 정량분석

응용 자료

임상 연구

저자

Limian Zhao, Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

개요

Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal—Lipid(Captiva EMR—Lipid)는 편리한 SPE 카트리지가 또는 96-well plate 포맷으로 사용하는 pass-through cleanup 제품입니다. 본 연구는 Captiva EMR—Lipid 96-well plate를 이용하여 인간 혈청 내 9종 대표적 의약품 화합물에 대해 LC/MS/MS 정량분석을 진행하는 방법에 대해 설명합니다. 시료는 *in situ* 단백질 침전(PPT)을 통해 단백질을 제거하고 Captiva EMR—Lipid cleanup을 통해 지질을 제거합니다. 전반 연구는 96-well plate에서 배치 방식으로 진행되었습니다. 이 정량적 분석법은 동위원소 또는 아날로그 내부 표준물을 이용해 혈청 내 9종 의약품 화합물 모두에 대해 0.5 ~ 200ng/mL의 동적검량범위(calibration dynamic range)를 처리할 수 있도록 개발되었습니다. 분석법 검증은 3일간의 정확성 및 정밀성 검사를 통해 이루어졌습니다. 결과는 탁월한 검량선 직선성($R^2 > 0.99$), 모든 5개 QC 농도에서 독보적인 정확성(최저정량한계(LLQ) < 20%, 다른 농도에서는 < 15%)과 정밀성(RSD < 15%)을 나타냈습니다. 분석 감도 및 교차오염 부분 역시 훌륭한 결과를 보였습니다. 이 연구 결과에 따르면, *in situ* PPT와 Captiva EMR—Lipid cleanup을 결합한 프로토콜은 생체시료 내 의약품 화합물 분석에서 신뢰성이 현저히 향상된 정량분석 결과를 얻을 수 있습니다.



Agilent Technologies

소개

생체시료 내 분석 대상 의약품 및 대사 화합물의 정량 검출을 위한 생체시료 분석은 보통 96-well plate에 기반한 높은 처리율을 나타내는 시료 전처리를 필요로 합니다. 시료는 96-well plate로 직접 분주(aliquoting)되며, 모든 시료 전처리 과정의 분석물 추출 및 매트릭스 cleanup은 96-well plate 포맷 내에서 진행됩니다. 이러한 방법은 높은 생산성과 효율성으로 인해 생체시료 분석에서 널리 응용되어 왔습니다. 생물학적 정량 분석법의 검량은 일반적으로 중복곡선의 검량선 직선성, 검정 표준품의 정확성, 측정 범위(dynamic range)에서 QC 농축 시료의 정확성과 정밀성, 분석법의 감도, 교차오염, 시료 처리과정의 안정성 테스트 등 엄정하고 철저한 조건을 포함하고 있습니다. 수용 가능한 엄격한 항목에는 최저정량한계(LLQ)에 대한 $100 \pm 20\%$ 의 정확성, 다른 농도에 대한 $100 \pm 15\%$ 의 정확성, LLQ에 대한 $\leq 20\%$ RSD, 다른 농도에 대한 $\leq 15\%$ RSD 등이 포함됩니다¹.

96-well plate 기반의 시료 전처리 기술에는 일반적으로 solid-phase extraction(SPE), liquid-liquid extraction(LLE), solid-supported liquid extraction(SLE), protein precipitation(PPT) 등이 있습니다². SPE는 액상의 생체시료(biofluid) 내 저분자 물질의 LC/MS/MS 정량에서 광범위하게 사용되며, 효율적인 매트릭스 cleanup이 가능합니다. 그러나 SPE 분석법 개발에 대한 연구가 더 필요하며, 분석 대상물질의 트랩(trap) 및 용출의 여러 단계가 요구됩니다³. LLE 또는 SLE는 간혹 SPE보다 효율적인 인지질 제거가 가능하나, 높은 극성 물질 분석 시 회수율이 문제가 되는 경우가 많습니다⁴. PPT는 가장 저렴하고 간편한 액상의 생체시료 전처리법으로, 널리 쓰이는 방식입니다. 아세토니트릴 또는 메탄올과 같은 유기 용매는 액상의 생체시료에서 단백질을 제거할 수 있지만 인지질을 제거할 수 없기 때문에 정량분석 및 기기 유지보수 면에서 많은 문제가 발생합니다⁵.

Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal—Lipid(Captiva EMR—Lipid) 시리즈 제품은 혁신적 흡착제를 사용해 시료 매트릭스에서 분석물의 손실 없이 주요 지질을 선택적으로 제거합니다. 지질 제거 메커니즘은 크기 배제 및 지질 성분의 긴 지방족사슬과 EMR—Lipid 흡착제 간 소수성 상호작용에 기반을 두고 있습니다. 선택적 상호작용 메커니즘을 통해 PPT 처리를 거친 액상의 생체시료에서 인지질 및 기타 지질류를 효과적으로 제거할 수 있습니다. Captiva EMR—Lipid SPE 카트리지/플레이트 포맷을 통해 *in situ* PPT절차 후 pass-through cleanup을 수행할 수 있습니다. 액상의 생체시료 내 인지질 제거 효율성에 대한 철저한 평가 및 비교 과정은 별도의 응용 자료⁶에 서술되어 있으며, Captiva EMR—Lipid는 PPT 이후의 인지질 제거에서 탁월한 결과를 보였습니다. 본 연구에서는 Captiva EMR—Lipid 96-well plate 프로토콜을 이용한 액상의 생체시료 내 저분자 정량분석의 탁월한 결과를 시연하기 위해, 대표적인 저분자 의약품 화합물을 표적성분으로 선정하였습니다. 선정된 의약품 화합물은 극성(친수성부터 소수성까지)과 작용기(산성, 중성, 염기성) 면에서 매우 다양했습니다. 그림 1에는 분석 대상 성분들의 화학적 성질과 구조가 표시되어 있습니다. 분석법은 표준 생물학적 분석법 검증 가이드에 따라 검증되었습니다. 또한 Captiva EMR—Lipid 흡착제 시료군 간 재현성은 3개의 서로 다른 생산로트의 흡착제에 대한 인지질 제거율 및 분석 대상물질 회수율을 기반으로 평가되었습니다.

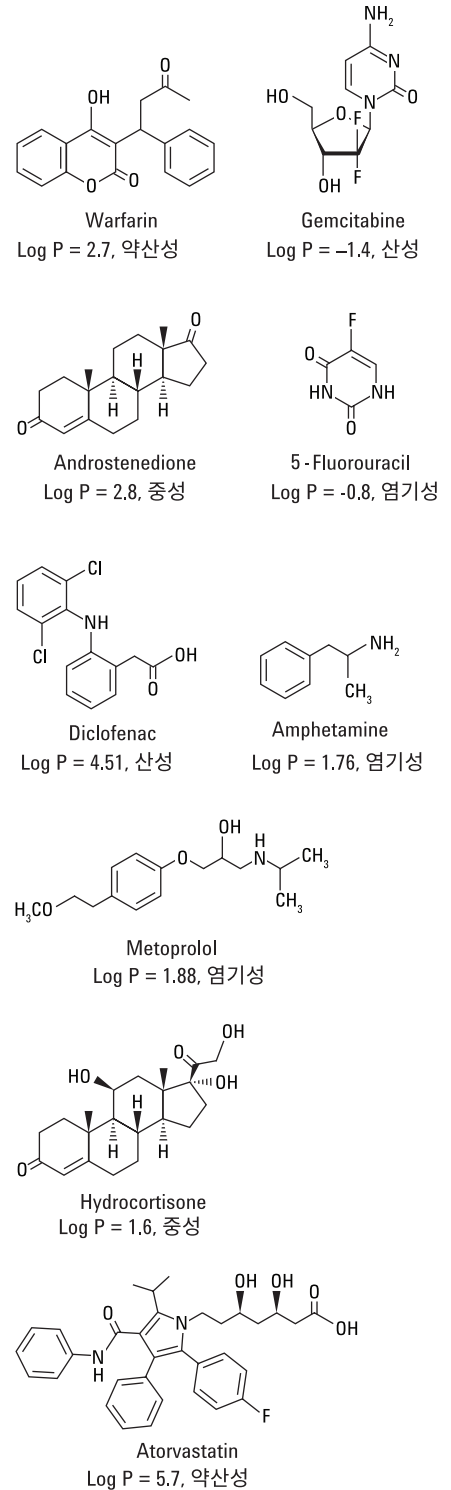


그림 1. 대표적 의약품 화합물의 화학적 구조와 성질

실험

시약 및 화학물질

모든 시약과 용매는 HPLC 또는 분석 등급을 사용했습니다. 아세토니트릴 (ACN)은 Honeywell(Muskegon, MI, USA)에서, 시약 등급의 포름산(FA)은 애질런트(제품번호 G2453-85060)에서 구입했습니다. 화학 표준품 및 기타 화학 물질은 정제 분말 또는 표준 저장용액 형태로 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서, 인간 혈청은 Biological Specialty Corporation(Colmar, PA, USA)에서 구입하였습니다.

표준품 및 용액

표준품 및 내부 표준물질(IS) 저장용액은 2.0mg/mL 농도로 메탄올 또는 DMSO 에서 만들어졌으며, 혼합 표준 스파이킹 용액은 각각 25µg/mL 농도의 1:1 ACN/물로 제조되었습니다. 분주 (aliquoting) 시료에 첨가하는 IS 작업용액은 2:8 ACN/물에서 2µg/mL 농도로 만들어졌습니다.

20mL의 아세토니트릴에 200µL의 FA를 첨가하여 1% FA의 ACN 용액을 제조하였습니다. 이 용액은 단백질 침전에 사용되었습니다.

0.1% FA(이동상 A)의 5mM 암모늄 아세테이트 완충용액은 1L의 Milli-Q 등급수에 385.3mg의 암모늄 아세테이트를 첨가한 후 1mL의 FA를 추가로 첨가해 만들었습니다. 0.1% FA의 ACN(이동상 B)은 1L의 ACN에 1mL의 FA를 더해 제조하였습니다.

5mM 암모늄 아세테이트 용액은 200mL의 Milli-Q 등급수에 77.06mg의 암모늄 아세테이트를 녹여 만들었습니다. 재용해(reconstitution) 용액은 이전의 완충용액에 ACN을 9:1 비율로 혼합하여 준비했습니다. 80:20 ACN/물 용액은 20mL의 물에 80mL ACN을 혼합하여 제조하였습니다.

HPLC 조건

파라미터	값
컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 LC column, EC-C18, 150 × 2.1 mm, 2.7 µm (p/n 699775-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 guard column, EC-C18, 5 × 2.1 mm, 2.7 µm (p/n 821725-911)
유속	0.3 mL/min
컬럼 온도	30 °C
Autosampler 온도	4 °C
주입량	8 µL
이동상	A) 5 mM ammonium acetate buffer with 0.1 % FA in water B) 0.1 % FA in acetonitrile
니들 세척	1:1:1 ACN/MeOH/IPA/H ₂ O with 0.2 % FA, flushing time: 7.5 seconds
이동상 변화도:	시간(min) %B 유속(mL/min)
	0 6 0.3
	2.5 40 0.3
	7.0 90 0.3
	7.01 100 0.3
Stop time	8 min
Post time	3 min

MS 조건

파라미터	값
가스 온도	120 °C
가스 유속	14 L/min
Nebulizer	40 psi
Sheath gas heater 온도	400 °C
Sheath 가스 유속	12 L/min
Capillary	3,000 V
iFunnel 파라미터	High-pressure RF: 150 V (POS), 90 V (NEG) Low-pressure RF: 60 V (POS), 60 V (NEG)
데이터 수집	dMRM

기기 및 재료

시료 전처리에 사용된 기기

- CentraCL3R 원심분리기(Thermo IEC, MA, USA)
- Eppendorf 피펫 및 repeater
- ViaFlo 96 Liquid Handler(Integra, Hudson, NH, USA)
- Captiva vacuum collar(p/n A796)
- 진공 펌프(Gast, Benton Harbor, MI, USA)
- CentriVap concentrator, cold trap, vacuum gauge(Labconco, Kansas City, MO, USA)
- Agilent Captiva EMR—Lipid 96-well plate(p/n 5190-1001)
- Agilent Captiva 96-well 1 mL collection plate(p/n A696001000)
- Agilent Captiva 96-well plate cover, 10/pk(p/n A8961007)

기기 조건

시료는 Agilent 1290 Infinity UHPLC 시스템에서 분석되었으며, 기기 구성은 다음과 같습니다.

- Agilent 1290 Infinity binary pump(G4220A)
- Agilent 1290 Infinity high performance autosampler(G4226A)
- Agilent 1290 Infinity thermostatted column compartment(G1316C)

UHPLC 시스템은 Agilent Jet Stream iFunnel 전기분무 이온화 소스가 장착된 Agilent G6490 Triple Quadrupole LC/MS 시스템과 함께 사용되었습니다. 데이터 수집 및 분석에는 Agilent MassHunter workstation 소프트웨어를 사용했습니다.

분석물 dMRM 마라미터는 표 1, 크로마토그램 및 피크 ID는 그림 2를 참조하십시오.

표 1. 분석 대상 성분의 LC-Triple quadrupole dMRM 파라미터 및 머무름 시간

분석물	RT (min)	Delta RT (min)	Polarity	Precursor ion (m/z)	Product ion			
					Quant ion	CE (v)	Qual ion	CE (v)
5-Fluorouracil	1.5	2	Negative	129	59.1	29	42.1	17
Gemcitabine	1.7	2	Positive	264.1	112.2	17	95.1	49
Amphetamine	3.7	2	Positive	136.1	119.1	5	91	21
Amphetamine-D5 (IS)	3.7	2	Positive	141.1	124.1	5	93	13
Metoprolol	4.1	2	Positive	268.2	77	69	56.1	41
Hydrocortisone	4.7	2	Positive	363.2	121.1	25	91	73
Androstenedione	6.1	2	Positive	287.2	109.1	29	97.1	25
Warfarin	6.1	2	Positive	309.1	251	15	163	8
Atorvastatin	6.3	2	Positive	559.3	440.2	25	250.1	49
Diclofenac	6.7	2	Negative	294	249.9	9	35.1	45
Progesterone-D9 (IS)	7.4	2	Positive	324.3	113.2	29	100	29

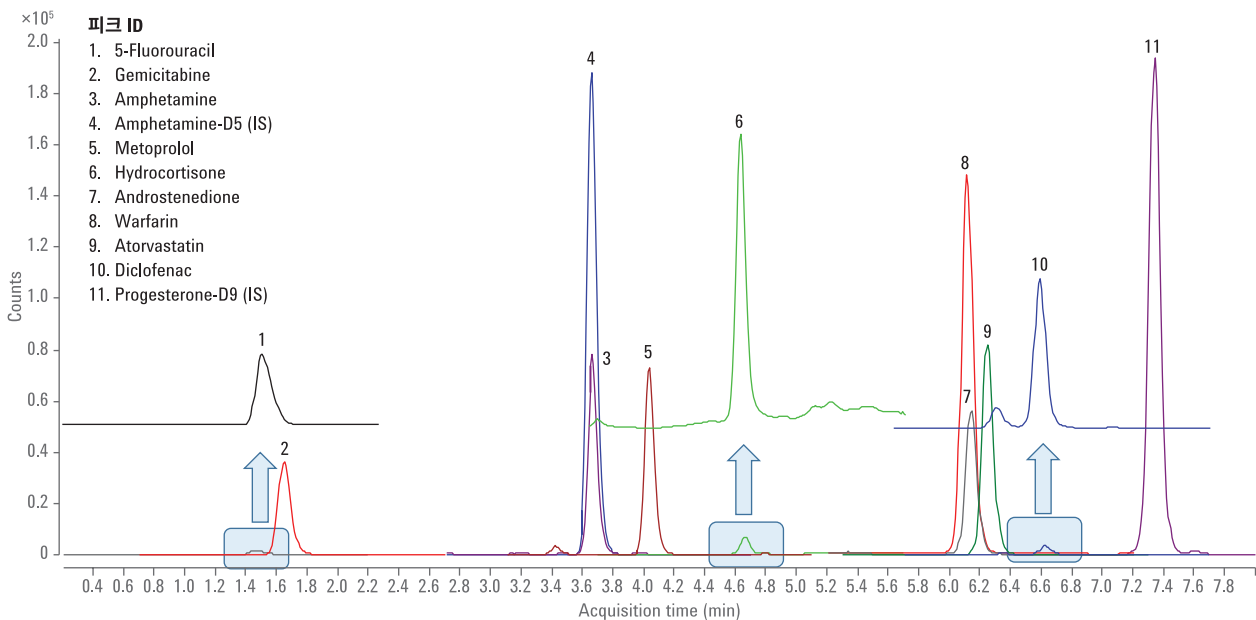


그림 2. 50ng/mL 의약품 표준물질 및 200ng/mL IS 표준물질이 첨가된 인간 혈청 시료에 대한 LC/MS/MS 크로마토그램(dMRM). 시료는 단백질 침전 및 Agilent Captiva EMR—Lipid cleanup을 통해 추출됨. 자세한 내용은 시료 전처리 섹션 참조.

검량 표준물질 및 QC 시료 전처리

혈청 내 검량 표준물질은 25µg/mL(1:1 ACN/물)의 표준 작업용액을 이용해 준비되었습니다. 매트릭스에 대한 용매 스파이크 효과를 줄이려면, 검량 표준물질을 스파이킹할 때마다 250ng/mL의 혈청 내 중간시료를 즉시 만들어 사용해야 합니다. 검량선의 측정 범위(dynamic range)는 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200ng/mL를 포함한 0.5 ~ 200ng/mL입니다. 이들 표준물질은 혈청 blank에 적당량의 혈청 중간시료를 스파이킹한 후 볼텍스 처리를 거쳐 잘 혼합하여 만들어졌습니다. 5가지 농도의 QC 시료로 분석법의 정확성 및 정밀성을 검증하였으며, 이 5가지 농도는 0.5ng/mL(LLOQ), 2ng/mL(low QC), 50ng/mL(mid QC), 150ng/mL(high QC), 200ng/mL(최대 정량한계(HLOQ))입니다. 이들 QC 시료 역시 적정량의 혈청 중간시료를 스파이킹하여 만들어졌습니다. 모든 검량 표준물질 및 QC 시료는 2mL 스냅 캡 튜브에서 제조한 후 추출을 위해 96-well plate로 옮겼습니다.

시료 추출

표 2에는 시료 전처리 과정이 자세히 설명되어 있습니다. 혈청 시료를 Captiva EMR-Lipid plate에 넣을 때 완전한 용액 상태로 넣어야 하는데, 이는 collection plate에 혈청 시료를 분주하고 IS 용액을 첨가하는 것이 중요합니다. 첫 번째, 이 과정은 여러 시료를 EMR-Lipid plate로 동시 이전하는 과정을 용이하게 하여 well 내 동시적 PPT를 가능하게 함으로써 시료 재현성을 높입니다. 두 번째, 생물학적 매트릭스 내 IS 용액의 첨가 및 혼합은 IS가 적절히 평형화된 후 추출 전 단백질을 바인딩함으로써 내부 표준물질과 분석 대상물질이 동일하게 행동하도록 합니다⁴.

표 2. 단백질 침전과 Agilent Captiva EMR-Lipid cleanup을 이용한 인간 혈청 시료 전처리 절차

절차	작업 파라미터
각 시료를 1mL 96-well plate에 분할	100 µL
IS 작업용액을 control blank를 제외한 각 시료에 첨가, 또는 50:50 ACN/물을 control blank에 첨가	10 µL
플레이트 커버를 덮고 2,500rpm에서 볼텍스 처리	1 min
1% FA의 ACN 용액을 또다른 1mL collection plate위에 놓은 Agilent Captiva EMR-Lipid plate에 첨가	300 µL
96 liquid handler를 이용해 전체 시료 혼합물을 EMR-Lipid plate로 옮김	110 µL
파펫으로 EMR-Lipid plate 내의 시료 혼합물을 혼합	3 ~ 5회
CapiVac collar를 EMR-Lipid plate와 collection plate 사이에 삽입	
각 시료에 make-up 용액(80:20 ACN/물) 첨가	300 µL
점진적이고 꾸준한 용출을 위해 적절한 진공 적용	2-4 inch Hg
마지막에 카트리지 베드 배수를 위해 더 높은 진공 적용	8-10 inch Hg
collection plate를 제거하고 CentriVap으로 건조될 때까지 증발시킴	40 °C
10:90 ACN/5mM 암모늄 아세테이트 완충용액으로 재용해	100 µL
2,500rpm에서 볼텍스 처리, 초음파 처리 후 플레이트 매트릭스로 덮음	2 min + 5 min

분석법 검증

분석법 검증은 3일간의 정확성 및 정밀성 (A & P) 분석을 통해 이루어졌습니다. 검증 절차는 다음과 같습니다.

- Double matrix blank
- Matrix blank(IS 스파이킹)
- 첫 번째 검량 표준물질 세트
- 2-3 Matrix blank
- LLOQ (n = 6)
- Low QC (n = 6)
- Mid QC (n = 6),
- High QC (n = 6)
- HLOQ (n = 6)
- 2-3 Carryover matrix blank
- Double matrix blank
- Matrix blank
- 두 번째 검량 표준물질 세트
- 2-3 Matrix blank

각 검증 실행 때마다 56 ~ 58개의 시료가 포함됩니다.

매트릭스 이온 억제 연구

매트릭스 이온 억제가 분석 대상 물질에 끼치는 영향은 표준 postcolumn infusion 분석법을 통해 측정되었습니다. 10:90 ACN/5mM 암모늄 아세테이트 완충액 (20ng/mL)으로 제조된 표준용액이 실린지 펌프와 T-커넥터를 통과하는 postcolumn infusion을 통해 LC 컬럼에서 MS 검출기로 향하는 흐름과 합쳐졌습니다. 그림 3은 표준 postcolumn infusion의 설정 다이어그램을 보여줍니다. 여러 cleanup 프로토콜에 따라 전처리된 Matrix blank는 이전에 언급된 분석법을 사용해 LC 시스템으로 주입되었습니다. 분석 대상 물질 MRM 채널을 스캔하여 총 8min의 크로마토그래피 창을 얻어 분석 물질 반응에 대한 매트릭스 효과를 모니터링합니다.

결과 및 토의

본 연구는 생체시료 내 저분자량 물질의 정량분석에 Captiva EMR—Lipid를 사용하는 법을 설명합니다.

분석법 검증

3일간의 정확성 및 정밀성 정량 결과는 LLOQ와 다른 농도에서의 정확성과 정밀성을 위한 수용 요건에 기반을 두고 분석되었습니다(예를 들어 LLOQ 농도에서 정확성 $\geq 80\%$, $RSD \leq 20\%$, LLOQ 농도에서 정확성 $\geq 85\%$, $RSD \leq 15\%$). 총 16개 검량점이 있습니다. 정확성 수용 농도를 초과하는 검량점은 검량 계산에 사용될 수 없었으며, 또한 사용 불가능한 검량점의 갯수가 총 검량점의 20% 이상이 될 수 없고, 이 요건을 만족시키지 못할 경우에는 실험이 실패하게 됩니다. 총 16개 검량점에서 사용 가능한 검량점은 13개 이상이어야 합니다.

표 3은 검량 표준품의 일내(intra-day) 분석결과를 보여줍니다. 모든 화합물은 수용 가능한 범위 내의 검량선 직선성과 정확성 결과를 나타냈습니다. cleanup 과정을 거친 매트릭스는 분석물 반응의 일관성을 보장했고, 결과적으로 엄정함과 직선성을 갖춘 중복되는 선형 검량선을 생성했습니다. 반대로 PPT만을 거친 시료는 다량의 인지질을 포함하고 있어, 일관적이지 않은 분석물 반응을 나타냈으며 결과적으로 일탈적이고 직선성이 떨어지는 중복 곡선을 생성했습니다(그림 4). 이러한 일탈적 곡선에서는 30% 이상의 검량점이 사용 불가해 실험은 실패하고 말았습니다. 표 4에는 QC 정확성 및 정밀성의 일내(intra-day) 분석결과가, 표 5에는 일간(inter-day) 분석결과가 나타나 있습니다. 일내 및 일간 정확성 및 정밀성 결과는 모두 수용 요건에 부합했습니다.

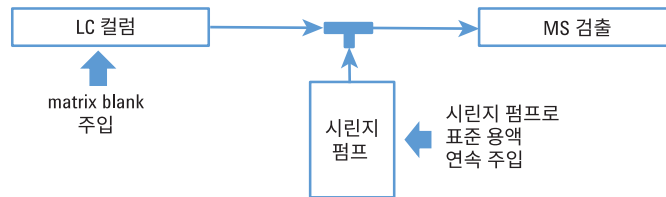


그림 3. 매트릭스 이온 억제 평가 및 비교 연구에서 표준 postcolumn infusion 설정 다이어그램

표 3. 검량 표준품에 대한 3일간의 정확성 및 정밀성 실험 결과 요약

분석물		5-Fluorouracil	Gemcitabine	Amphetamine	Metoprolol	Hydrocortisone	Warfarin	Androstenedione	Atorvastatin	Diclofenac
검량선	Regression	Linear	Linear	Linear	Linear	Linear	Linear	Linear	Linear	Linear
	Weight	1/x ²	1/x ²	1/x ²	1/x ²	1/x ²	1/x ²	1/x	1/x ²	1/x
정량화에 쓰인 IS		Am-D5	Am-D5	Am-D5	Am-D5	Am-D5	Am-D5	Pro-D9	Pro-D9	Pro-D9
Day 1	사용된 검량점 (총 검량점)	14(16)	15(16)	16(16)	16(16)	15(16)	15(16)	16(16)	15(16)	16(16)
	R ²	0.9929	0.9912	0.9958	0.9907	0.9966	0.9914	0.9989	0.9965	0.9988
	평균 정확성	97.6	98.7	100.0	100.0	101.5	98.5	100.0	100.2	100.0
	RSD(n=16)	8.5	7.3	3.8	5.2	5.8	8.2	2.5	3.9	3.9
Day 2	사용된 검량점 (총 검량점)	14(16)	15(16)	15(16)	14(16)	15(16)	15(16)	16(16)	15(16)	15(16)
	R ²	0.9918	0.9964	0.9975	0.9961	0.9948	0.9912	0.9985	0.9958	0.9981
	평균 정확성	101.6	99.7	99.9	99.0	99.1	99.6	100.0	98.8	101.7
	RSD(n=16)	5.8	2.7	2.3	6.3	6.1	6.8	3.7	6.0	8.1
Day 3	사용된 검량점 (총 검량점)	16(16)	16(16)	16(16)	16(16)	16(16)	16(16)	16(16)	16(16)	15(16)
	R ²	0.9926	0.9936	0.9953	0.9928	0.9910	0.9929	0.9993	0.9933	0.9971
	평균 정확성	100.5	99.2	99.7	99.5	99.4	98.9	100.0	100.0	100.6
	RSD(n=16)	5.0	5.1	4.9	6.7	4.8	2.6	2.2	6.1	2.8

Am = Amphetamine; Pro = Progesterone

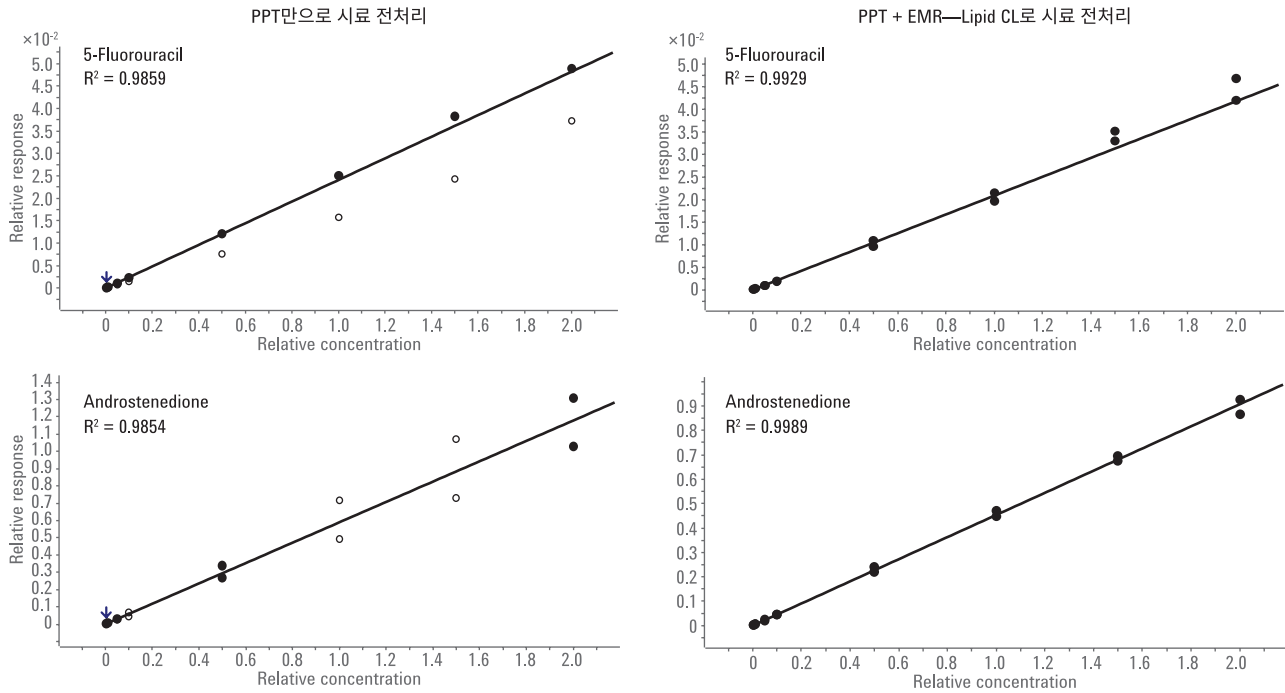


그림 4. PPT만으로 처리된 시료, PPT와 Agilent Captiva EMR—Lipid cleanup으로 처리된 시료의 중복되는 검량선 직선성 비교

표 4. 3일간의 정확성(%Ac), 정밀성(%RSD) 실험, QC 시료 일내 결과 요약, 각 농도당 6번 반복실행

분석물		5-Fluorouracil		Gemcitabine		Amphetamine		Metoprolol		Hydrocortisone		Warfarin		Androstenedione		Atorvastatin		Diclofenac	
		%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD	%Ac	%RSD
LLOQ (0.5 ng/mL)	Day 1	103.0	8.0	97.2	5.4	94.4	5.0	105.1	12.2	100.4	2.8	105.9	8.6	99.7	6.9	98.8	8.7	99.9	6.0
	Day 2	97.4	5.9	87.2	5.6	93.2	9.5	93.8	9.7	87.5	10.4	87.5	5.1	86.0	10.5	103.5	6.5	90.3	11.3
	Day 3	98.4	5.6	88.6	4.2	98.2	2.6	96.7	7.1	87.7	7.3	90.3	4.5	90.3	7.5	92.3	14.1	94.2	14.1
Low QC (2 ng/mL)	Day 1	103.7	10.0	90.5	5.5	96.1	4.2	99.7	6.4	103.3	5.2	88.7	6.0	95.8	4.7	94.5	7.3	89.9	14.2
	Day 2	97.4	6.5	87.2	7.5	93.2	3.6	93.8	3.6	87.5	4.1	87.5	8.6	86.0	7.0	103.5	6.1	90.3	15.0
	Day 3	85.8	6.1	95.2	4.6	100.3	3.8	101.9	10.8	97.9	3.7	99.3	6.2	99.3	6.2	93.8	6.8	91.2	8.1
Mid QC (50 ng/mL)	Day 1	107.0	6.3	94.7	3.3	97.9	5.0	107.5	6.9	103.1	4.7	92.2	3.8	104.3	3.8	86.6	12.2	97.3	6.7
	Day 2	101.5	7.1	94.3	7.0	100.5	5.0	102.5	9.5	92.5	14.6	97.7	10.4	97.7	3.4	95.9	13.0	93.3	6.5
	Day 3	85.8	7.6	95.2	4.2	100.3	6.1	101.9	5.6	97.9	6.5	99.3	5.2	99.3	5.2	93.8	7.1	91.2	8.6
High QC (150 ng/mL)	Day 1	109.2	11.9	102.8	3.8	98.9	4.1	95.6	4.9	108.7	7.6	101.5	8.0	94.2	3.7	92.5	7.8	96.4	10.5
	Day 2	104.4	5.6	99.4	9.3	100.0	5.1	92.3	5.1	101.7	7.8	105.1	6.6	93.4	6.5	93.4	5.1	94.8	6.1
	Day 3	110.1	3.1	99.5	6.4	99.7	4.1	92.7	4.4	103.3	6.9	103.6	8.9	105.8	8.0	98.2	7.4	102.7	9.0
HLOQ (200 ng/mL)	Day 1	108.7	4.3	106.9	4.3	101.1	5.6	101.3	8.4	112.5	2.6	107.0	8.4	97.6	3.6	85.4	14.2	93.1	4.5
	Day 2	104.5	6.6	101.7	7.4	102.7	4.6	94.1	8.7	109.0	4.9	108.5	7.2	101.5	5.0	95.5	8.9	100.9	4.5
	Day 3	100.5	6.4	100.7	3.9	99.5	4.6	90.0	1.8	107.3	6.0	110.6	6.7	110.6	6.7	105.8	5.9	110.0	3.4



그림 5. 분석법에 대한 일간 정확성 및 정밀성 결과 요약

농도가 제일 낮은 검량 표준물질 전에 실행되는 matrix blank는 분석법 선택성을 검증하는 데 사용할 수도 있습니다. 매트릭스와 함께 용출된 간섭물질의 반응은 LLOQ 농도에서 분석 대상 물질 반응의 20% 미만이어야 합니다. Amphetamine 피크에 간섭물질이 나타났으며, 농도가 0.5ng/mL일 때 Amphetamine 피크 반응의 간섭물질 비율은 20%를 초과했습니다. Hydrocortisone은 혈청 blank에서 극미량이 존재하나, 0.5ng/mL 농도에서의 반응은 화합물 반응의 20% 미만이었습니다. 최고농도의 검량 표준물질을 실행한 뒤 matrix blank를 사용하여 교차오염을 평가하였습니다. Androstenedione, Atorvastatin, Diclofenac에서는 보통 극미량 수준의 교차오염이 일어납니다. 니들 포트 세척 시간과 LC 그래디언트 컬럼 플러싱 시간을 늘려 이러한 극미량 수준의 교차오염 문제를 해결했습니다.

3일간의 정확성 및 정밀성 실험에서 이 분석법은 단일 실험으로 여러 의약품 화합물을 검출할 수 있는 방법으로 검증되었습니다. IS(내부 표준물질)가 검증된 방법에 사용되었습니다. 보통 안정적인 동위원소 라벨 부착 IS는 생물학적 분석에서 강력하게 권장되는 내부 표준물질입니다.

안정적인 동위원소 라벨 부착 IS를 구할 수 없을 때에는, 구조적으로 유사한 아날로그 IS가 사용되어야 합니다⁴. 이 분석법의 9종 의약품 화합물에 2개의 IS가 사용되었으며, 그 중 amphetamine에만 안정적인 동위원소 라벨 부착 IS인 amphetamine-D5가 사용되었습니다. 나머지 화합물에는 Amphetamine-D5와 progesterone-D9가 IS로 사용되었습니다. 그러나 이 확립된 분석법에서 많은 화합물에 대해 구조적으로 무관한 IS도 사용 가능하다는 것이 쉽게 검증되었으며, 결과적으로 더 깨끗한 시료 매트릭스와 줄어든 이온 억제 효과를 얻을 수 있었습니다. 이러한 이점은 이 분석법 개발과 검증을 한층 더 쉽고 비용 면에서 효율적으로 만들어주었습니다.

매트릭스 이온 억제

매트릭스 효과는 표준 postcolumn infusion 연구에 의해 평가되었으며, 준비된 혈청 blank를 LC 컬럼으로 주입 후 분석물의 연속되는 postcolumn infusion을 통해 가능한 매트릭스 효과를 검사하는 방식으로 진행되었습니다. 분석물의 머무름 시간 또는 그에 근접한 시점의 신호 세기 변화는 분석을 방해하는 매트릭스 간섭물질의 존재를 의미합니다.

postcolumn infusion 연구는 PPT만으로 전처리, PPT 이후 Captiva EMR—Lipid cleanup 처리, PPT 이후 기타 다른 지질 제거 제품으로 cleanup 처리를 한 3가지 혈청 matrix blank를 이용해 진행되었습니다. 그림 6에서 분석 대상물질의 중첩되는 비교 프로파일을 통해 분석물에 대한 서로 다른 이온 억제 효과를 확인하실 수 있습니다. 여기에는 RT 1–2min(영역 1), RT 3.5–6min(영역 2), RT 6.2–8min(영역 3)의 이온 억제 가능성이 있는 주요 영역 3개가 표시되어 있습니다. 영역 1에서는 모든 프로파일에 대한 억제 현상이 나타나 있으며, 이는 매트릭스의 염으로 인해 발생한 것입니다. 영역 2의 억제 현상은 주로 매트릭스 내 lysophospholipid에 의해 발생했으며, 영역 3의 억제는 주로 매트릭스 내 glycerophospholipid에 의해 발생했습니다. PPT와 Captiva EMR—Lipid cleanup으로 모두 처리된 시료의 프로파일은 영역 2와 3에서 현저한 골짜기 형태를 나타내지 않고 완만한 분석물 검출 결과를 보이므로 인지질이 효과적으로 제거되었음을 알 수 있습니다. 그러나 PPT만으로 처리되었거나 PPR와 기타 다른 방식의 지질 제거 제품으로 cleanup된 시료는 영역 2와 3에서 현저한 골짜기 형태가 나타나 인지질의 이온 억제를 확인할 수 있습니다. 이들 영역에서 발생한

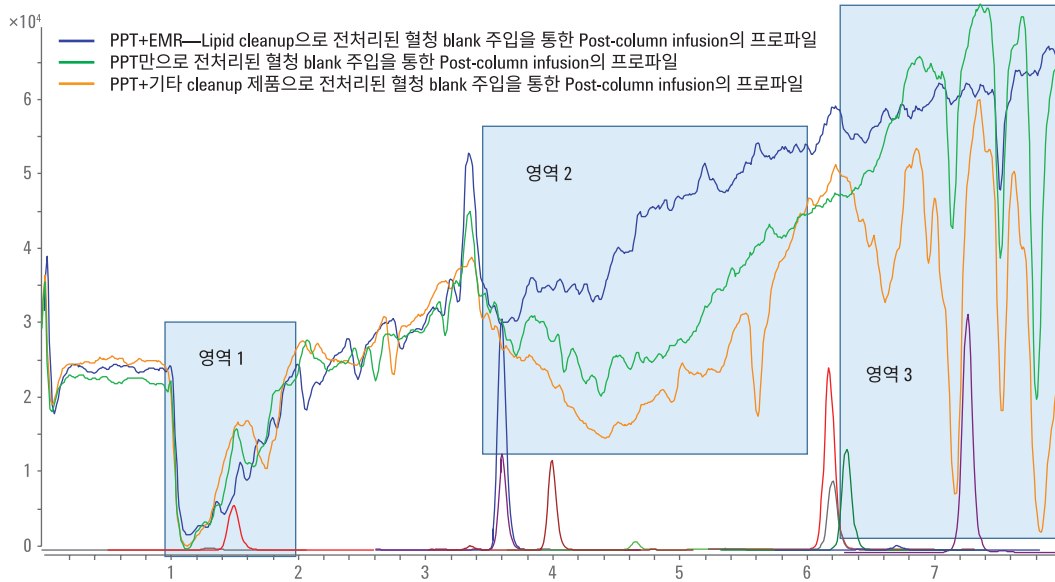


그림 6. 표준 postcolumn infusion 프로파일 비교 및 분석 대상물질에 대한 매트릭스 이온 억제 효과 시연

분석물에 대한 이온 억제, 특히 골짜기 끝부분에 위치한 분석물에 대한 이온 억제 효과는 정량분석의 신뢰성에 부정적인 영향을 끼칩니다.

Agilent Captiva EMR—Lipid 흡착제의 시료군 간 재현성

3개 서로 다른 생산로트의 흡착제로 충전된 1mL 카트리지를 사용하여

1ng/mL 농도수준에서 인지질 제거율과 분석물 회수율을 분석함으로써 Captiva EMR—Lipid 흡착제의 시료군 간 재현성을 평가합니다. 서로 다른 3개 생산로트의 흡착제 모두가 99%를 넘는 인지질 제거율을 보였습니다. Captiva EMR—Lipid 흡착제의 일관성 및 시료군 간 재현성은 또한 그림 7에 나타난 분석물 회수율의 일관된 결과에서도 드러납니다.

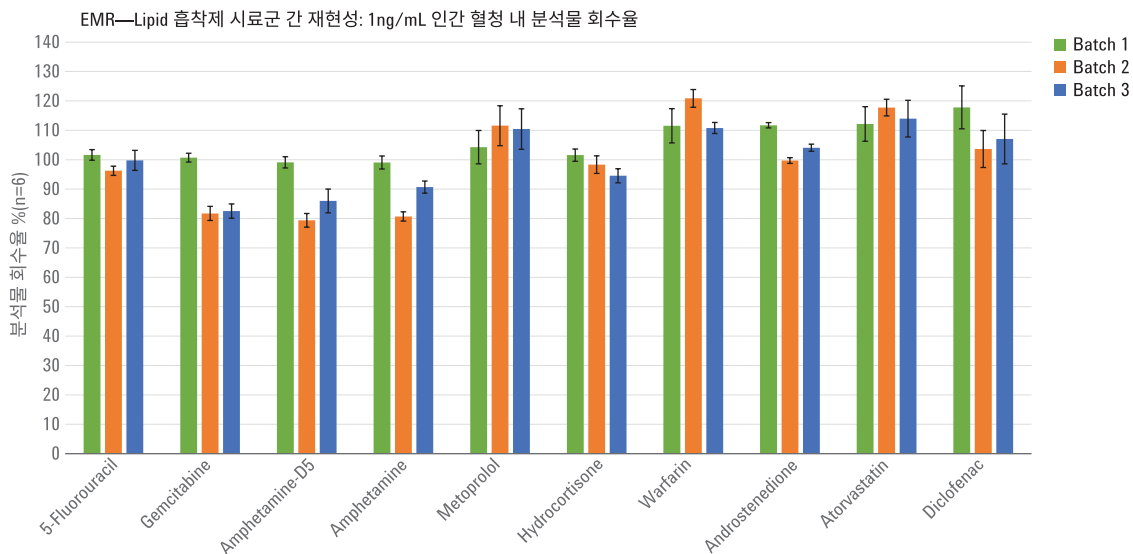


그림 7. 인간 혈청 내 1ng/mL의 분석물 회수율을 통해 증명된 Agilent Captiva EMR—Lipid 흡착제 시료군 간 재현성

결론

PPT 처리 후 Agilent Captiva Enhanced Matrix Removal—Lipid cleanup을 시행하는 시료 전처리 방법은 인간 혈청 내 9종의 대표적 의약품 화합물 정량분석에 적합한 방법으로 검증되었습니다. 3일간의 정확성 및 정밀성 검사는 이 전처리법이 충분히 넓은 측정 범위(dynamic range)와 재현성 있고 중복되는 검량선 직선성을 갖추고 있음을 보여주며, 탁월한 일내 (intra-day) 및 일간(inter-day) 정확성과 정밀성을 제공함을 제시하였습니다. 표준 postcolumn infusion 연구에서 이 전처리법은 PPT만을 사용했을 때나 PPT와 기타 다른 지질 제거 제품 cleanup 방식을 채택했을 때에 비해 현저히 낮은 매트릭스 이온 억제 효과를 나타냈습니다. 우수한 정량분석 결과가 증명하다시피, 매트릭스가 깨끗할 수록 분석법의 신뢰성이 더 뛰어납니다. 매트릭스가 깨끗하면 아날로그 IS 또는 심지어 구조적으로 무관한 IS를 사용할 수 있으므로 값비싼 안정적 동위원소 라벨 부착 IS를 사용할 필요가 없으며, 결과적으로 더 쉽고 비용 면에서 효율적인 시료 분석이 가능합니다.

참조

1. US Food and Drug Administration, *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation* **2001**.
2. Bylda, C.; Thiele, R. Recent advances in sample preparation techniques to overcome difficulties encountered during quantitative analysis of small molecules from biofluids using LC-MS/MS. *The Analyst* **2014**, *139*, 2265–2276.
3. León, Z.; *et al.* Solid-phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical method for the determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and its metabolites in both human urine and semen. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *398*, 831–843.
4. Mulvana, D.E. Critical topics in ensuring data quality in bioanalytical LC-MS method development. *Bioanalysis* **2010**, *2*, 1051–1072.
5. Michopoulos, F.; *et al.* Extraction methods for the removal of phospholipids and other endogenous material from a biological fluid. *Bioanalysis* **2011**, *3*, 2747–2755.
6. Zhao, L.; Lucas, D. Efficiency of Biological Fluid Matrix Removal using Captiva EMR—Lipid Cleanup. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-8006EN, **2017**.
7. Bonfiglio, R.; *et al.* The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13*, 1175–1185.

www.agilent.com/chem

이 정보는 사전 공지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc., 2017
2017년 4월 27일 한국에서 발행
5991-8007K0

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



Agilent Technologies