

임상 연구 실험실의 약물 스크리닝을 위한 고속 LC/TOF MS

저자

Adam Barker^{1,2},
Frederick G. Strathmann³,
Natalie N. Rasmussen⁴,
and Carrie J. Adler⁴

¹ ARUP Institute for Clinical
and Experimental Pathology,
Salt Lake City, UT

² Department of Pathology,
University of Utah,
Salt Lake City, UT

³ NMS Labs
Willow Grove, PA

⁴ Agilent Technologies, Inc.
Santa Clara, CA

개요

면역측정법 기반의 기술은 예로부터 임상 연구에서 약물 스크리닝을 위한 분석법으로 사용되어 왔습니다. 생물 표본 내의 관심 분석물질에 대한 이러한 추정 검출은 대개 가스 또는 액체 크로마토그래피(GC 또는 LC)와 탠덤 질량 분석법(MS/MS)을 결합하여 사용하는 보다 구체적인 확인 시험으로 전환되고 있습니다. 부정확한 추정 면역측정 결과에서 추가 시험을 필요로 하는 흔한 문제로 인해, 실험실 운영과 총비용에 중대한 후속 결과를 초래할 수 있기 때문입니다. 이 문제를 해결하기 위해, 애질런트는 84종의 약물과 대사체를 포함하는 약물 스크리닝용 분석 LC/TOF MS 분석법을 전체 데이터 품질의 개선과 함께 개발하였습니다.

서론

면역측정 기반 기술은 상대적으로 빠르고 간단하여 역사적으로 소변 표본의 약물 스크리닝에 대한 분석법으로 사용해 왔습니다. 관심 분석물질을 포함한 시료는 주로 GC 또는 LC와 MS/MS를 결합하여 사용하는, 보다 구체적인 확인 시험으로 대체되고 있습니다. 부정확한 추정 면역측정 결과가 종종 중대한 후속 결과를 초래할 수 있는 흔한 문제가 되기 때문입니다. 면역측정 기술의 대체 분석법으로, 애질런트는 84종의 약물과 대사체를 포함하는 빠른 LC/TOF MS 분석법을 개발하였습니다. LC/TOF MS는 간결한 분석 화면을 통해 다수의 약물을 식별하고 예측 시험 결과만으로도 충분한 정보를 얻을 수 있는 등, MS/MS를 능가하는 몇 가지 장점을 갖추고 있습니다. 뿐만 아니라, 추정 시험으로서의 LC/TOF MS는 항체 가용성과 성능에 대한 의존도를 낮춰줍니다. 이는 시판 면역측정 키트를 지속적으로 구매하는 것보다 비용이 적게 들고, 워크플로를 크게 수정하거나 개별 테스트 키트를 사용할 필요가 없어, 분석 화학물을 추가하는 것이 덜 복잡합니다. 본 연구는 면역측정법 기반 기술의 대체 수단으로 고속 LC/TOF MS 분석법을 성공적으로 사용함으로써, 더 우수한 데이터 품질을 생성하고 LC/TOF MS에 의한 표본 유효성 평가를 위해 creatinine 정량을 포함하였음을 보여줍니다.

실험

LC 구성 및 파라미터

구성				
Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프(G7120A)				
Agilent 1290 Infinity II multisampler(G7167A)				
Agilent 1290 Infinity 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B)				
니들 세척	Acetonitrile			
자동 시료 주입기 온도	4°C			
주입 부피(양이온 모드)	2µL			
주입 부피(음이온 모드)	5µL			
분석 컬럼	Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C8, 2.1 × 50mm, 2.7µm, LC 컬럼 (p/n 689775-906T)			
컬럼 온도	75°C			
이동상 A(양이온 모드)	5mM ammonium formate in water, pH 3.5			
이동상 B(양이온 모드)	0.1% Formic acid in acetonitrile			
이동상 A(음이온 모드)	0.1% Acetic acid in water			
이동상 B(음이온 모드)	Methanol			
유속	1mL/분			
그라디언트	양이온 모드	음이온 모드		
	시간(분)	%B	시간(분)	%B
	0.00	2	0.00	15
	1.25	95	1.25	95
재평형화 시간	0.5분			

LC/TOF 질량 분석기 구성 및 파라미터

구성	
Agilent 6550 iFunnel Q-TOF LC/MS(TOF 모드로 작동)	
이온화 모드	양이온 및 음이온
건조 가스 온도	250°C
건조 가스 유속	15L/분
Nebulizer 압력	60psi
Sheath 가스 온도	400°C
Sheath 가스 유속	12L/분
노출 전압(양이온)	0V
노출 전압(음이온)	0V, 0.8분에 500V
캐필러리 전압	3,500V
Fragmentor 전압	125V
Skimmer 전압	65V
Octopole RF	750V
질량 범위	100~1,000m/z
수집 속도	4spectra/초
검출기 속도	2GHz, 확장 측정 범위
기준 질량 유속	0.5mL/분
Agilent 1260 등용매 펌프	
기준 질량(양이온)	121.0509 및 922.0098
기준 질량(음이온)	119.0360 및 980.0163

화학물질 및 시약

Optima 등급의 methanol과 acetonitrile은 Fisher Scientific(Hampton, NH) 제품이었습니다. Glacial acetic acid와 formic acid는 MilliporeSigma(Saint Louis, MO)에서 구입하였습니다. Clinical Laboratory Reagent Water(CLRW)는 MilliporeSigma사의 Milli-Q Advantage A10 시스템으로부터 얻었습니다. 약물의 표준 원액, 대사체 및 중수소화된 내부 표준물질은 Cerilliant Corporation(Round Rock, TX)에서 구입하였습니다. Creatinine은 MilliporeSigma에서 구입하였고, creatinine-d3은 CDN Isotopes(Pointe-Claire, Quebec, Canada)에서 구입하였습니다. Creatinine 참조 표준물질은 NIST (Gaithersburg, MD)에서 구입하였습니다. 기준 질량 용액과 저농도 튜닝 혼합물은 Agilent Technologies(Santa Clara, CA) 제품이었습니다.

시료 전처리

모든 관심 대상 화합물을 검출하고 creatinine을 정량하기 위해 3개의 개별 시료 전처리를 사용하였습니다. 본 실험에 포함된 화합물, 극성, 머무름 시간, 표적 농도 및 내부 표준물질에 대한 전체 목록은 표 1을 참조하시기 바랍니다.

표 1. 분석물질 및 관련 내부 표준물질

분석물질	내부 표준물질	표적 농도 (ng/mL)	머무름 시간 (분)	극성
2-Hydroxyethylflurazepam	Diazepam-d ₅	200	1.291	양이온
3-Hydroxycotinine	Morphine-d ₃	100	0.432	양이온
6-Monoacetylmorphine (3)*	6-monoacetylmorphine-d ₆	300	1.025	양이온
7-Aminoclonazepam*	Meperidine-d ₄	200	1.146	양이온
Alprazolam*	Alpha-hydroxyalprazolam-d ₅	200	1.320	양이온
Amitriptyline (8)	Meperidine-d ₄	100	1.262	양이온
Amobarbital	Phenobarbital-d ₅	200	0.995	음이온
Amphetamine	Methamphetamine-d ₅	300	0.723	양이온
Anabasine	Morphine-d ₃	100	0.370	양이온
alpha-Hydroxyalprazolam	alpha-Hydroxyalprazolam-d ₅	200	1.266	양이온
alpha-Hydroxymidazolam	alpha-Hydroxyalprazolam-d ₅	200	1.274	양이온
alpha-Hydroxytriazolam	alpha-Hydroxyalprazolam-d ₅	200	1.270	양이온
Benzoylcegonine*	Benzoylcegonine-d ₃	150	1.079	양이온
Buprenorphine-glucuronide	Phenobarbital-d ₅	200	0.885	음이온
Buprenorphine*	Meperidine-d ₄	5	1.216	양이온
Butalbital	Phenobarbital-d ₅	200	0.910	음이온
Carisoprodol	Diazepam-d ₅	100	1.291	양이온
Chlordiazepoxide	alpha-Hydroxyalprazolam-d ₅	200	1.249	양이온
Clomipramine	Diazepam-d ₅	200	1.312	양이온
Clonazepam	alpha-Hydroxyalprazolam-d ₅	200	1.278	양이온
Cocaine	Benzoylcegonine-d ₃	150	1.150	양이온
Codeine (1)	Morphine-d ₃	300	0.942	양이온
Cotinine*	Morphine-d ₃	100	0.847	양이온
Desalkylflurazepam	Diazepam-d ₅	200	1.303	양이온
Desipramine	Meperidine-d ₄	100	1.262	양이온
Diazepam	Diazepam-d ₅	200	1.357	양이온
Doxepin*	Meperidine-d ₄	100	1.233	양이온
EDDP(8)	Meperidine-d ₄	150	1.270	양이온
Ethyl glucuronide	Phenobarbital-d ₅	500	0.182	음이온
Ethyl sulfate*	Phenobarbital-d ₅	500	0.182	음이온
Fentanyl*	Norfentanyl-d ₅	2	1.229	양이온
Flurazepam	alpha-Hydroxyalprazolam-d ₅	200	1.241	양이온
Hydrocodone(1)	6-monoacetyl morphine-d ₆	300	1.029	양이온
Hydromorphone(2)	Morphine-d ₃	300	0.420	양이온
Imipramine	Meperidine-d ₄	100	1.278	양이온
Lorazepam	alpha-Hydroxyalprazolam-d ₅	200	1.274	양이온
Lorazepam glucuronide	Phenobarbital-d ₅	200	0.978	음이온
MDA	Methamphetamine-d ₅	500	0.909	양이온

* QC 분석물질; (숫자) 동중원소 화합물

양이온 모드 전처리(10배 희석)

검량 물질, 품질 관리(QC)용 물질 및 시료 (100 μ L)를 96-well plate에 분주하였습니다. IMCSZyme rapid hydrolysis buffer의 resorufin glucuronide를 각 well에 넣은 다음, 기존에 설명한 대로 IMCSZyme β -glucuronidase를 첨가하였습니다⁵. 내용물이 바닥에 가라앉도록 플레이트를 잠시 원심분리 한 후 65°C에서 15분간 배양하였습니다. 배양 후 20 μ L의 내부 표준 원액을 첨가하였습니다. 그 다음, 5mM ammonium formate 수용액(pH 3.5, 양이온 모드의 이동상 A)과 0.1% formic acid Optima acetonitrile용액(양이온 모드의 이동상 B)의 98:2혼합액 880 μ L로 희석하였습니다. Well의 바닥에서 액체를 수집하기 위해, 플레이트를 짧은 시간동안 원심분리하였습니다.

음이온 모드 전처리(10배 희석)

검량 물질, QC 물질 및 환자 표본(10 μ L)을 96-well plate에 분주하고 5 μ L의 내부 표준 원액을 첨가하였습니다. 85:15 비율의 0.1% acetic acid CLRW 용액과 methanol 혼합액 85 μ L를 사용하여 표본을 희석한 후, 잠시 원심분리하여 액체를 well 바닥에 모았습니다.

Creatinine 시료 전처리(50배 희석)

검량 물질, QC 물질 및 환자 표본(10 μ L)을 96-well plate에 분주하고, 10 μ L의 creatinine-d₃ 내부 표준물질을 첨가하였습니다. 500 μ L의 양이온 모드 이동상 A:이동상 B (98:2) 희석액을 사용하였습니다. Well의 바닥에서 액체를 수집하기 위해 플레이트를 짧은 시간으로 원심분리하였습니다.

분석물질	내부 표준물질	표적 농도 (ng/mL)	머무름 시간 (분)	극성
MDEA	Methamphetamine-d ₅	500	1.071	양이온
MDMA	Methamphetamine-d ₅	500	1.013	양이온
Meperidine	Meperidine-d ₄	50	1.158	양이온
Meprobamate	Meperidine-d ₄	100	1.162	양이온
Methadone	Diazepam-d ₅	150	1.299	양이온
Methamphetamine (6)*	Methamphetamine-d ₅	300	1.013	양이온
Methylphenidate (5)	Meperidine-d ₄	스크리닝 없음	1.137	양이온
Midazolam	<i>alpha</i> -Hydroxyalprazolam-d ₅	200	1.266	양이온
Morphine (2)*	Morphine-d ₃	300	0.287	양이온
Naloxone (3)	6-monoacetyl morphine-d ₆	스크리닝 없음	0.893	양이온
N-desmethylpentadol	Meperidine-d ₄	100	1.121	양이온
Nicotine	Morphine-d ₃	100	0.266	양이온
Nitrazepam	<i>alpha</i> -Hydroxyalprazolam-d ₅	200	1.266	양이온
Norbuprenorphine-glucuronide	Phenobarbital-d ₅	300	0.462	음이온
Norbuprenorphine	Meperidine-d ₄	300	1.179	양이온
Norclomipramine (N-desmethyldomipramine)	Diazepam-d ₅	200	1.303	양이온
Nordiazepam	Diazepam-d ₅	200	1.312	양이온
Nordoxepin (desmethyldoxepin)	Meperidine-d ₄	100	1.224	양이온
Norfentanyl	Norfentanyl-d ₅	2	1.100	양이온
Norhydrocodone(2)	6-Monoacetyl morphine-d ₆	300	1.009	양이온
Normeperidine(5)	Meperidine-d ₄	50	1.137	양이온
Nornicotine	Morphine-d ₃	100	0.258	양이온
Noroxycodone (7)	Morphine-d ₃	300	0.967	양이온
Noroxymorphone	Morphine-d ₃	300	0.283	양이온
Nortriptyline(9)	Meperidine-d ₄	100	1.270	양이온
N-Desmethyl tramadol(4)	Meperidine-d ₄	200	1.133	양이온
O-Desmethyl tramadol(4)	6-Monoacetylmorphine-d ₆	200	1.029	양이온
Oxazepam*	<i>alpha</i> -Hydroxyalprazolam-d ₅	200	1.266	양이온
Oxazepam glucuronide	Phenobarbital-d ₅	200	0.952	음이온
Oxycodone	6-Monoacetylmorphine-d ₆	100	1.000	양이온
Oxymorphone(7)	Morphine-d ₃	100	0.345	양이온
PCP*	Meperidine-d ₄	25	1.220	양이온
Pentobarbital	Phenobarbital-d ₅	200	0.995	음이온
Phenobarbital*	Phenobarbital-d ₅	200	0.732	음이온
Phentermine(6)	Methamphetamine-d ₅	100	1.038	양이온
Protriptyline(9)	<i>alpha</i> -Hydroxyalprazolam-d ₅	100	1.270	양이온
Ritalinic acid*	Methamphetamine-d ₅	100	1.054	양이온
Secobarbital	Phenobarbital-d ₅	200	1.029	음이온

* QC 분석물질; (숫자) 동중원소 화합물

데이터 분석

데이터는 MassHunter Acquisition 소프트웨어(B.08.00)를 이용하여 수집하였으며, MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어(B.08.00) 및 Qualitative Analysis 소프트웨어(B.07.00)를 이용하여 분석하였습니다. 표적 농도와 그에 해당하는 면적측정을 매칭하였습니다. 84종의 약물과 대사체의 존재 여부는 표적 농도 이상에서의 정량과 accurate mass(7ppm 이내) 그리고 머무름 시간 매칭(±0.010분 이내)를 기반으로 측정하였습니다. 표 1은 표적 농도와 머무름 시간 근사치를 나타냅니다. 양이온 및 음이온 모드 모두에 대해, 표적 농도에서의 1-점 검량은 원점(origin)을 통과하도록 작성하여 양성 또는 음성을 결정하였습니다. 각 약물 종류를 대표하는 QC 물질은 표적 농도의 50%(음이온 대조군) 및 125%(양이온 대조군)이었습니다. 모든 분석물질은 11종 내부 표준물질(양이온 모드에서 9종, 음이온 모드에서 2종) 중의 하나로 정규화하였습니다. 가수분해가 충분했는지를 확인하기 위해, Qualitative Analysis에서 resorufin과 resorufin glucuronide를 분석하였습니다. 식별한 전체 화합물과 함께, 모든 양이온 QC의 반복 분석은 정성적으로 양이온이고, 모든 음이온 QC의 반복 분석은 정성적으로 음이온이었습니다. 농도가 증가된 시료를 측정할 다음, 검출되지 않는 대조 시료를 사용하여 테스트한 캐리오버는 전체 화합물에 대하여 0.1% 미만이었습니다.

Creatinine의 정량

20, 100, 200, 300, 400mg/dL의 검량 물질을 사용하여 creatinine에 대한 5-점 검량선을 작성하였습니다. QC 물질을 27.5, 87.7, 232.5, 360.1mg/dL의 표적 농도로 분석하여 검량을 검증하였습니다. 소변 내의 고농도 creatinine과 고감도의 기기 덕분에, creatinine의 첫 번째 동위원소를 이용하여 각 시료의 농도를 측정할 수 있었습니다.

분석물질	내부 표준물질	표적 농도 (ng/mL)	머무름 시간 (분)	극성
Tapentadol	Meperidine-d ₄	100	1.129	양이온
Tapentadol-O-sulfate (7.5 ~13 ppm)	Diazepam-d ₅	200	1.104	양이온
Temazepam	Diazepam-d ₅	200	1.312	양이온
Δ9-COOH-THC glucuronide*	11-nor-9-COOH-THC-d ₃	20	1.198	음이온
Tramadol	Meperidine-d ₄	200	1.133	양이온
Triazolam	Diazepam-d ₅	200	1.324	양이온
Zolpidem*	Meperidine-d ₄	20	1.187	양이온
Creatinine	Morphine-d ₃	20mg/dL	0.177	양이온
내부 표준물질	원액 농도 (ng/mL)	시료 내 최종 농도 (ng/mL)		
Norfentanyl-d ₅	1,000	20	1.096	양이온
THC-COOH-d ₃	2,000	10	1.257	음이온
Morphine-d ₃	2,000	40	0.283	양이온
Benzylocogonine-d ₃	2,000	40	1.079	양이온
Diazepam-d ₅	2,000	40	1.357	양이온
6-Acetylmorphine-d ₆	2,000	40	1.021	양이온
Medperidine-d ₄	2,000	40	1.154	양이온
α-Hydroxyalprazolam-d ₅	2,000	40	1.266	양이온
Phenobarbital-d ₅	4,000	20	0.724	음이온
Methamphetamine-d ₅	8,000	160	0.930	양이온
Creatinine-d ₃	5,200	52 mg/dL	0.177	양이온

* QC 분석물질; (숫자) 동중원소 화합물

결과 및 토의

표 2는 확인 분석법으로 LC/MS/MS 또는 LC/Q-TOF MS를 사용한 양성 및 음성 결과 요약을 보여줍니다. 분석법 성능을 테스트하기 위해, 본래 면역측정으로 스크리닝했던 420가지의 개별 생물 표본을 MS 확인과 대조하여 분석하였습니다.

효소증폭면역측정 위양성(false positive)

PCP, THC 및 tramadol을 제외하고, 면역측정으로 분석한 각 약물 종류가 시료 세트에서 최소 한 개의 위양성을 나타냈습니다. MDMA의 위양성 개수가 가장 높았으며, 전체 50개의 양성결과가 모두 LC/MS/MS에서 확인되지 않았습니다. 또한, meperidine에 대해서 양성으로 스크리닝된 7개 시료 전체도 역시 확인되지 않았습니다. 전반적으로, 면역측정에서 분석물질이 나타난 420개 생물 표본 중, 117개의 표본은 보다 특이적인 MS 분석법으로 확인되지 않았으며, 이는 위양성의 면역측정 결과를 의미하는 것입니다.

LC/TOF MS 위양성

이 표본 세트에서는 LC/MS/MS 또는 LC/TOF MS 확인에 기반하였을 때, LC/TOF MS 결과의 위양성이 식별되지 않았습니다.

EMIT 위음성(false negative)

LC/TOF MS 분석을 통해 다음의 44종 양성 결과를 추가로 발견하였습니다.

- Benzodiazepine류 22종
- 아편류 9종
- Ethanol 마커 5종
- THC류 4종
- Cocaine 및 barbiturate류 각 2종

LC/TOF MS 위음성

LC/TOF MS 분석법에서는 설정된 표적보다 낮은 농도로 인해, buprenorphine, ethanol 마커 및 아편류 내의 시료를 검출하지 못했습니다.

표 2. LC/TOF MS 또는 LC/MS/MS를 확인 분석법으로 사용한 면역측정법 및 LC/TOF MS의 감도 및 특이성

약물 종류	면역측정법				LC/TOF MS			
	TP	TN	FP	FN	TP	TN	FP	FN
Amphetamines	50	350	20	20	50	370	0	0
Barbiturates	7	711	1	2	9	411	0	0
Benzodiazepines	66	328	4	22	87	333	0	0
Buprenorphine	12	203	1	0	12	203	0	1
Cannabinoids	90	326	0	4	94	326	0	0
Carisoprodol	3	212	1	0	3	213	0	0
Cocaine	18	399	1	2	20	400	0	0
Ethanol glucuronide	35	380	0	5	41	378	0	1
Fentanyl	38	175	3	0	38	178	0	0
MDMA	0	370	50	0	0	420	0	0
Meperidine	0	209	7	0	0	216	0	0
Methadone	24	395	1	0	24	396	0	0
Opiates	171	240	3	6	177	243	0	0
Oxycodone	92	321	4	3	93	326	0	1
PCP	0	420	0	0	0	420	0	0
Tapentadol	1	205	9	0	1	215	0	0
Tramadol	18	198	0	0	18	198	0	0
Zolpidem	3	201	12	0	3	213	0	0

TP = 진양성, TN = 진음성, FP = 위양성, FN = 위음성

Nicotine

579종의 생체 시료 중 약 절반(275종, 47.4%)이 LC/TOF MS 분석에서 nicotine 및 최소 2개 이상의 대사체에 대해 양성으로 스크리닝 되었습니다. Nicotine이나 그 대사체를 포함하는 비교 연구에 가용한 패널이 없기 때문에, 이러한 시료는 EMIT로 스크리닝 하지 않거나 LC/MS/MS 분석법으로 확인하지 않았습니다.

Creatinine 정량 성능 특성

LC/TOF MS를 사용한 소변 내 creatinine의 정량은 전체 분석 측정 범위 20 ~ 400mg/dL, $R^2 \geq 0.999$ 인 검량 물질을 이용해 수행하였습니다. 정확도와 정밀도 연구를 통해 허용 가능한 표준 편차와 Jaffe법과의 분석 일치도를 입증하였습니다.

2개의 QC 수준에서 분석 간 및 분석 내 (Inter- and intra-assay)의 비정밀도는 3% 이하였습니다. 캐리오버는 0.02%로 계산되었습니다. 전체 420개의 환자 표본에 대해 Jaffe법과 LC/TOF MS 간의 비교 결과, 기울기 0.91, 상관 계수 0.96를 나타냈습니다. 저농도 분석물질에 대한 표준화된 시료 전처리법을 허용함과 동시에 고농도 분석물질을 정량하는데 처음으로 creatine의 첫 번째 탄소 동위원소 ($^{13}C_3H_7N_3O$)를 사용한 것은 이번이 처음인 것으로 사료됩니다.

결론

본 응용 자료는 기존 분석법보다 더 높은 특이성과 정확성을 가진 고속 LC/TOF MS 스크리닝을 사용하여 면역측정법 기반의 약물 스크리닝을 대체하고 creatinine 정량을 포함하는 연구를 나타냅니다. LC/TOF MS 분석법은 약물 스크리닝을 위해 보다 특이적이고 감도가 높을 뿐만 아니라 creatinine 정량을 제공할 수 있는 것으로 밝혀졌습니다. 단, 임상 환경에 적용하기 전에 보다 많은 추가 연구가 필요합니다.

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
2018년 8월 21일, 한국에서 인쇄
5994-0189KO

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

