

# Application News

No.LCMSMS-453K

## LC-MS/MS

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer LCMS™-8050

LC-MS/MS 분석법을 이용한 사람 혈장 중 Hydroxychloroquine 농도 분석  
(Determination of Hydroxychloroquine Concentration in Human Plasma by LC-MS/MS Method)

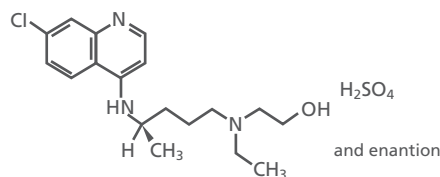
이 연구는 시마즈 액체크로마토그래피 텐덤질량분석기(UHPLC-MS/MS; Nexera™ with LCMS™-8050)를 이용하여 사람의 혈장 내 Hydroxychloroquine를 정량 분석하였다. 이 시험법은 혈장 내 Hydroxychloroquine(HCQ)의 농도를 아세토니트릴(Acetonitrile)을 이용하여 간단한 단백질 침전법으로 10 분 내에 정확하게 분석할 수 있으며, 특이성, 직선성, 정량한계(LOQ), 재현성, 매질효과 등을 평가하였다. 직선성은 농도범위 (0.5 ~ 500) ng/mL에서 상관계수 0.998 이상의 좋은 직선성을 나타내었으며, 정량한계(LOQ)는 0.5 ng/mL로 나타났다. 저농도, 중농도, 고농도의 일간 정밀성은 (1.57 ~ 8.33) % 였으며, 정확성은 (97.91 ~ 106.02) % 수준으로 나타났다. 또, 매질 효과는 HCQ의 저농도, 중농도, 고농도 뿐만 아니라 내부표준물질에서도 (98.31 ~ 108.17) % 수준으로 나타났다. 이와 같은 결과를 통해서 시마즈 LCMS-8050은 HCQ와 같이 중요한 약물 후보물질의 개발과 검증에 쉽고 빠르게 사용할 수 있다.

**Keyword :** LC-MS/MS, human plasma, hydroxychloroquine sulfate

### ■서론

말라리아의 예방과 치료에 쓰이는 Hydroxychloroquine sulfate(또는 Hydroxychloroquine, HCQ)는 새로운 코로나바이러스(COVID-19) 발병 이후 새로운 바이러스의 임상치료제로써 세계적으로 권고되고 있다. 우한대 쑨민 병원(Renmin Hospital of Wuhan University)의 연구팀은 COVID-19 환자치료에 대한 HCQ 효능의 평가를 목표로 medRxiv에 프리프린트(preprint)를 게재했다. 이 연구에서 31명의 환자들은 표준 치료제(산소요법, 항바이러스제, 항박테리아제, 그리고, 면역글로불린, 코르티코스테로이드의 유무) 외에 추가로 5일간 HCQ(400 mg/d)를 경구 투여했다. 이 결과 환자들의 체온 회복과 기침완화 시간이 HCQ를 투여하지 않은 환자와 비교했을 때 현저히 단축된 것으로 나타났으며, HCQ치료군이 대조군보다 더 많은 환자의 폐렴증상 개선을 보여주었다(25 vs 17). 폴 세잔 대학교의(Aix Marseille Universit) 디디에 라울(Didier Raoult)교수는 그의 연구진과 함께 HCQ와 아지스로마이신(azithromycin)으로 새로운 코로나 바이러스 치료에 대한 임상연구를 국제 항균 저널(International Journal of Antimicrobial Agents)에 게재했다. 36 명의 새로운 코로나 바이러스 환자를 대상으로 한 이 연구결과는 HCQ와 아지스로마이신(Azithromycin) 조합으로 치료를 받은 환자 6명이 100 % 치료되었고, HCQ만으로 치료받은 환자 12명도 상당한 개선 효과를 보여줬다. 이에 미국 FDA는 지난 3월 28일 특정 입원환자들에게 HCQ sulfate사용을 긴급 허가한 것으로 알려졌다.

이 연구는Shimadzu LCMS™-8050을 이용하여 사람 혈장 중 HCQ의 농도를 정량하기 위한 방법을 확립하였다. 이 방법은 간단하고 고감도이며, 높은 재현성 및 넓은 검량선 범위를 가질 수 있는 장점이 있으며, 사람 혈장 내에서 HCQ의 농도 결정 및 임상 사용에서의 기준으로 사용할 수 있다.



Hydroxychloroquine sulfate  
C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S  
MW 433.95  
CAS# : 747-36-4

■ 실험

1.1 장비

이 실험은 LC-30AD(x2, 펌프), DGU-20A5(Online degasser), SIL-30AC(오토샘플러), CTO-20AC(컬럼오븐), CBM-20A(시스템 컨트롤러), LCMS-8050<sup>TM</sup> 텐덤질량분석기로 구성된 LCMS-8050 시스템과 Labsolution<sup>TM</sup> Ver. 5.97 소프트웨어를 사용하였다.

1.2 분석 조건

LC conditions	
Column	Shim-pack <sup>TM</sup> GIST C18-AQ, (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 µm)(P/N: 227-30807-02)
Mobile phase	(A) 0.1 % Formic acid + 50 mM ammonium acetate in water (B) Methanol : Acetonitrile (1:1, v/v)
Flow rate	0.5 mL/min
Column Temp.	40 °C
Elution mode	Isocratic flow, 20 % of mobile phase B
MS conditions	
Interface	ESI, positive mode
Interface voltage	4.5 kV
Nebulizer gas flow	3.0 L/min, nitrogen
Heating gas flow	10.0 L/min, dry air
DL Temp.	250 °C
Heat block Temp.	400 °C
Probe Temp.	300 °C
Drying gas flow	10.0 L/min, nitrogen
MRM parameters	표 1.

표 1. HCQ sulfate 및 chloroquine diphosphate의 MRM 조건

Compound	CAS No.	Precursor ion [M+H] <sup>+</sup>	Product ion (m/z)	Q1 Pre Bias (v)	CE (v)	Q3 Pre Bias (v)
Hydroxychloroquine sulfate (HCQ)	747-36-4	336.20	247.10*	-12.0	-22.0	-28.0
			158.15	-12.0	-36.0	-18.0
Chloroquine diphosphate	50-63-5	320.20	247.10	-12.0	-22.0	-28.0

\* Qualifier ion

1.3 표준품 및 시약

Methanol, acetonitrile, ammonium acetate는(HPLC급) 머크(Merck)사, DMSO(분석용급)은 청두 질롱 화학(Chengdu Kelong Chemical Co., Ltd.), Formic acid(HPLC 급, 순도 98% 이상)은 ANPEL Laboratory Technologies(상하이) 사로부터 구입하여 상온에서 보관 하였으며, 초순수는 Millipore Milli-Q<sup>®</sup> Plus 초순수 장치를 사용하였다.

#### 1.4 표준물질과 내부표준물질

- HCQ sulfate 표준 원액 : HCQ sulfate의 무게를 정확하게 측정하여 물과 메탄올 혼합용액(1:1, v/v)에 녹여 10.0 µg/mL로 조제하였으며, 사용전까지 -20 °C에 보관하고 빛을 차단시켰다.
- HCQ sulfate 표준 용액 : HCQ sulfate 표준 원액을 물과 메탄올 혼합용액(1:1, v/v)으로 희석하여 각각 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000 ng/mL의 농도로 조제하였으며, 사용전까지 -20 °C에 보관하고 빛을 차단시켰다.
- Chloroquine (CQ) diphosphate (내부표준물질) 표준 원액 : CQ diphosphate의 무게를 정확하게 측정하여 물과 메탄올 혼합용액(1:1, v/v)에 녹여 농도 10.0 µg/mL로 조제하였으며, 사용전까지 4 °C에서 보관하였다.
- CQ diphosphate (내부표준물질) 표준 용액 : CQ diphosphate 표준 원액을 물과 메탄올 혼합용액(1:1, v/v)으로 희석하여 1000 ng/mL로 조제하였으며, 사용전까지 -20 °C에 보관하였다.

#### 1.5 시료 전처리

- 검량선 표준 물질 : 각각의 HCQ sulfate 표준 용액에 내부 표준 용액을 10 µL를 넣어 준비한 후, 이 용액을 사람 혈장 샘플(95 µL)에 5 µL를 넣고 30 초간 섞은 후, 400 µL의 acetonitrile을 추가하고 1분간 섞어 14,000 rpm에서 10 분간 원심 분리하였다. 상층액 300 µL를 시료 vial에 옮기고 2 µL를 주입하여 LC-MS/MS로 분석하였다.
- Quality control (QC) 시료 : 사람 혈장 샘플(95 µL)에 각각 5, 200, 4000 ng/mL 농도의 HCQ sulfate 표준 용액을 5 µL를 넣어 준비하고, 이후 전처리는 검량선 시료의 방법을 따랐다.
- 매트릭 효과(Matrix effect, spiked human plasma) 시료 : 사람 혈장 샘플(95 µL)에 400 µL의 acetonitrile 넣어 1 분간 섞어준 후, 각각 5, 200, 4000 ng/mL 농도의 HCQ sulfate 표준 용액 5 µL와 내부 표준 용액 10 µL 을 넣어 준비하고, 이후 전처리는 검량선 시료의 방법을 따랐다.
- 표준용액(Neat standard) (spiked Milli-Q® water) 시료 : 각각 5, 200, 4000 ng/mL 농도의 HCQ sulfate 표준 용액 5 µL를 각기 다른 초순수에 추가한다. 이후 전처리는 검량선 시료의 방법을 따랐다.

$$\text{Matrix effect (\%)} = \frac{\text{Peak area in spiked human plasma sample}}{\text{Peak area in spiked Milli-Q® water sample}} \times 100\%$$

### ■ 결과 및 고찰

#### 2.1 선택성 (Selectivity)

사람의 공혈장(100 µL)을 위에서 언급한 절차에 따라 추출하고 분석하였다. <그림 1>과 <그림 2>에서 보는 것과 같이 사람의 공혈장에서 HCQ와 CQ는 모두 검출되지 않았으며, 이와 같은 결과는 HCQ 및 CQ의 머무름 시간에 간섭이 없음을 명확히 보여주는 것이다.

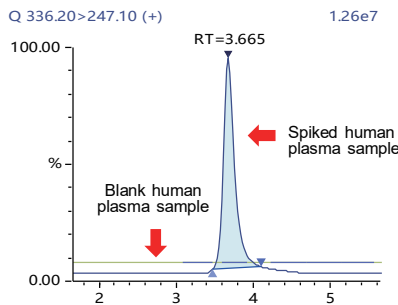


그림 1. 공혈장과 첨가된 혈장에서 HCQ의 크로마토그램

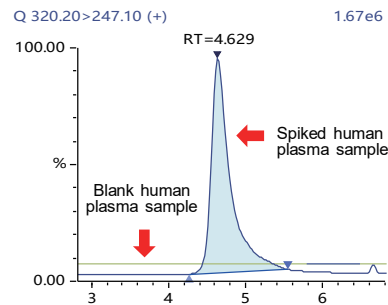


그림 2. 공혈장과 첨가된 혈장에서 CQ의 크로마토그램

### 2.2 검량선 (Calibration curve)

사람 혈장에서의 검량선 농도는 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 ng/mL 이 되게 하였으며, 검량선은 <그림 3>과 같다. 검량선의 선형방정식과 상관계수(r)는 <표 2>에 나타내었으며, Y는 CQ 피크 면적에 대한 HCQ 피크의 면적 비율, X는 CQ 농도에 대한 HCQ의 농도 비율을 나타낸다.

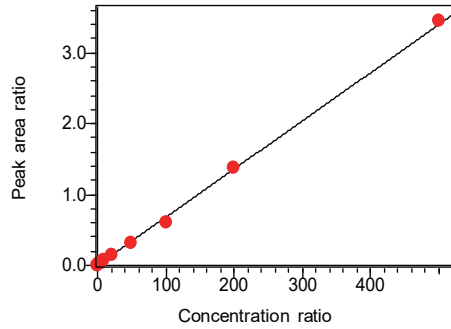


그림 3. 내부표준물질 CQ를 사용한 HCQ의 matrix-matched 검량선

표 2. HCQ의 matrix-matched 검량선

Compound	Calibration Equation	Linear range (ng/mL)	Accuracy (%)	Correlation coefficient, r
HCQ sulfate	$Y = (0.00140144)X + 0.000398161$	0.5 - 500	90.6 - 110.0	0.9988

### 2.3 매질효과 (Matrix effect)

HCQ와 내부표준물질(CQ)의 매질효과(matrix effect)는 <표 3>과 같으며, 범위는 (98.31 ~ 108.17) % 수준인 것으로 나타났다.

표 3. 매질효과(matrix effect) (n=3)

Spiked level	Matrix effects (%)	
	Theoretical concentration (ng/mL)	HCQ sulfate
LOQ	0.5	108.17
MQC	20	105.52
HQC	400	98.31
Internalstandard		105.72

## 2.4 정밀도와 정확도

HCQ의 일내 정밀도와 정확도는 3가지 품질관리 시료를 사용하여 평가하였으며, 그 결과는 <표 4>에서와 같이 정밀도는 (1.57 ~ 8.33) %, 정확도는 (97.91 ~ 106.02) % 수준인 것으로 나타났다.

표 4. 정밀도와 정확성 (n=6)

Compound	Concentration (ng/mL)	Precision (RSD, %)	Accuracy (%)
HCQ sulfate	0.5	8.33	106.02
	20	5.19	101.83
	400	1.57	97.91

## 2.5 시료의 안정성

Sample rack에서의 HCQ의 안정성은 3가지의 품질관리 시료를 6 °C에서 10시간 방치한 후 분석하여 평가하였으며, 그 결과는 <표 5>에서 보는 것과 같이 6 °C에서 10 시간 동안 안정함을 확인할 수 있었다.

표 5. Sample rack에서의 HCQ sulfate 안정성

Compound	Concentration (ng/mL)	Precision (RSD, %)	Accuracy (%)
HCQ sulfate	0.5	7.33	94.72
	20	4.56	98.01
	400	1.76	96.30

## ■ 결론

사람 혈장에 포함된 hydroxychloroquine(HCQ) sulfate의 정량분석을 위해 LC-MS/MS 분석법을 개발하고 평가한 결과, 사람 혈장에 추가한 농도 (0.5 ~ 500) ng/mL 범위 내에서의 검량선 상관계수는 0.998로 좋은 직선성을 보였으며, LOQ는 0.5 ng/mL로 나타났다. 또, 저농도, 중농도, 고농도에서 일내 정밀도(RSD %)는 (1.57 ~ 8.33) %, 정확도는 (97.91 ~ 106.02) % 수준으로 나타났으며, 내부표준물질 CQ 및 저농도, 중농도, 고농도에서의 HCQ 매질 효과(matrix effect)는 (98.31 ~ 108.17) % 수준으로 나타났다. 이와 같은 결과를 바탕으로 Shimadzu LCMS™-8050을 이용하여 사람 혈장 내의 HCQ를 분석하면, 빠르고 고감도의 신뢰할 수 있는 정량 분석을 쉽게 수행할 수 있을 것으로 판단된다.