

ALSACHIM Application Data Sheet

No. 04K

LC-MS/MS

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer

LC-MS/MS를 이용한 COVID-19 의약품 다성분 분석법

(Method for multiple COVID-19 drugs analysis by LC-MS/MS)

■ 서론

COVID-19 팬데믹은 전세계의 환자들을 치료하기 위해 용도 변경 의약품의 사용을 가속화시켰으며, 농도 및 약물 동태에 관한 지식의 부족으로 올바른 복용량을 제안하는 것이 이슈이다. 이 뉴스레터는 COVID-19 환자에 대해 세계적으로 임상시험의 50 % 이상 사용된 9 개의 의약품 (Favipiravir, GS 441524, Remdesivir, Hydroxychloroquine, Desethylchloroquine, Chloroquine, Azithromycin, Ritonavir, Lopinavir)을 모니터링하기 위해 LC-MS/MS 분석법을 개발하였다.

■ 분석방법

표 1. LC-MS/MS 분석조건

| LC system | Nexera X2 |
|---------------------|--|
| Flow | 0.5 mL/min |
| Mobile phase A | 0.1 % Formic acid in water |
| Mobile phase B | 0.1 % Formic acid in methanol |
| Gradient | 1 % B (0.0 min) - 99 % B (3-4 min) - 1 % B (4.5-6 min) |
| Column | C18 (2.1x50 mm., 5 μm) |
| Column oven | 30 °C |
| Injection volume | 1 μL |
| MS system | LCMS-8050 |
| Ionization | ESI positive |
| Nebulizing gas flow | 2 L/min |
| Interface temp. | 250 °C |
| DL temp. | 200 °C |
| Heat block temp. | 300 °C |
| Heating gas flow | 10 L/min |
| Drying gas flow | 10 L/min |

표 2. MRM 조건

| Molecules | Ref. | Transitions MRM (1) | Transitions MRM (2) |
|---|-------|---------------------|---------------------|
| Favipiravir | C8720 | 158.20 > 113.10 | 158.20 > 85.10 |
| GS 441524 | C8847 | 292.00 > 163.10 | 292.00 > 147.10 |
| Remdesivir | C8799 | 603.20 > 200.10 | 603.20 > 402.20 |
| Hydroxychloroquine | C4600 | 336.10 > 247.15 | 336.10 > 179.10 |
| Desethylchloroquine | C2331 | 292.10 > 179.05 | 292.10 > 114.20 |
| Chloroquine | C1741 | 320.10 > 247.15 | 320.10 > 142.20 |
| Azithromycin | C1746 | 749.40 > 591.50 | 749.40 > 158.20 |
| Ritonavir | C2792 | 721.20 > 296.25 | 721.20 > 228.25 |
| Lopinavir | C2745 | 629.30 > 155.15 | 629.30 > 447.30 |
| [¹³ C, ¹⁵ N]-Favipiravir | C8853 | 160.00 > 113.10 | 160.00 > 85.10 |
| [¹³ C ₅]-GS 441524 | C8855 | 297.20 > 164.10 | 297.20 > 148.10 |
| [U-Ring- ¹³ C ₆]-Remdesivir | C8854 | 609.20 > 206.20 | 609.20 > 408.35 |
| [² H ₅]-Hydroxychloroquine | C6422 | 341.30 > 247.20 | 341.30 > 179.20 |
| [² H ₅]-Desethylchloroquine | C2453 | 297.10 > 179.20 | 297.10 > 119.20 |
| [² H ₅]-Chloroquine | C5023 | 325.15 > 247.20 | 325.15 > 147.25 |
| [¹³ C, ² H ₃]-Azithromycin | C1768 | 753.50 > 595.50 | 753.50 > 158.25 |
| [¹³ C, ² H ₃]-Ritonavir | C2963 | 725.35 > 300.20 | 725.35 > 272.20 |
| [² H ₈]-Lopinavir | C4693 | 637.35 > 163.30 | 637.35 > 447.35 |

■ 시료 전처리

이 방법은 9개의 분석 대상 성분(Favipiravir, GS 441524, Remdesivir, Hydroxychloroquine, Desethylchloroquine, Chloroquine, Azithromycin, Ritonavir, Lopinavir) 및 분석 대상 성분에 안정한 동위원소로 표지된 표준물질을 포함하고 있으며, 샘플의 전처리는 아래와 같다.

- 1) 1.5 mL 마이크로 튜브에 50 µL의 plasma 샘플을 넣는다.
- 2) 내부표준물질을 포함한 200 µL의 메탄올을 더한다.
- 3) 1분 동안 vortex 한다.
- 4) 15,000 g에서 7 분 동안 원심분리를 한다.
- 5) 상등액을 이동상 용매 A로 희석한다.
: 인서트 바이알에 이동상 용매 A를 100 µL의 넣고, 50 µL의 상등액을 더한다.

■ 결과

Ritonavir와 Lopinavir는 10,000 ng/mL, 그 외 7개의 물질은 2,000 ng/mL 농도 범위까지 분석을 수행하였다. 각 물질의 검정곡선은 $r^2 > 0.99$ 로 나타났으며, 농도의 CV % 값은 15 % 이내로 수용 가능한 분석 범위 내에 있는 것으로 나타났다.

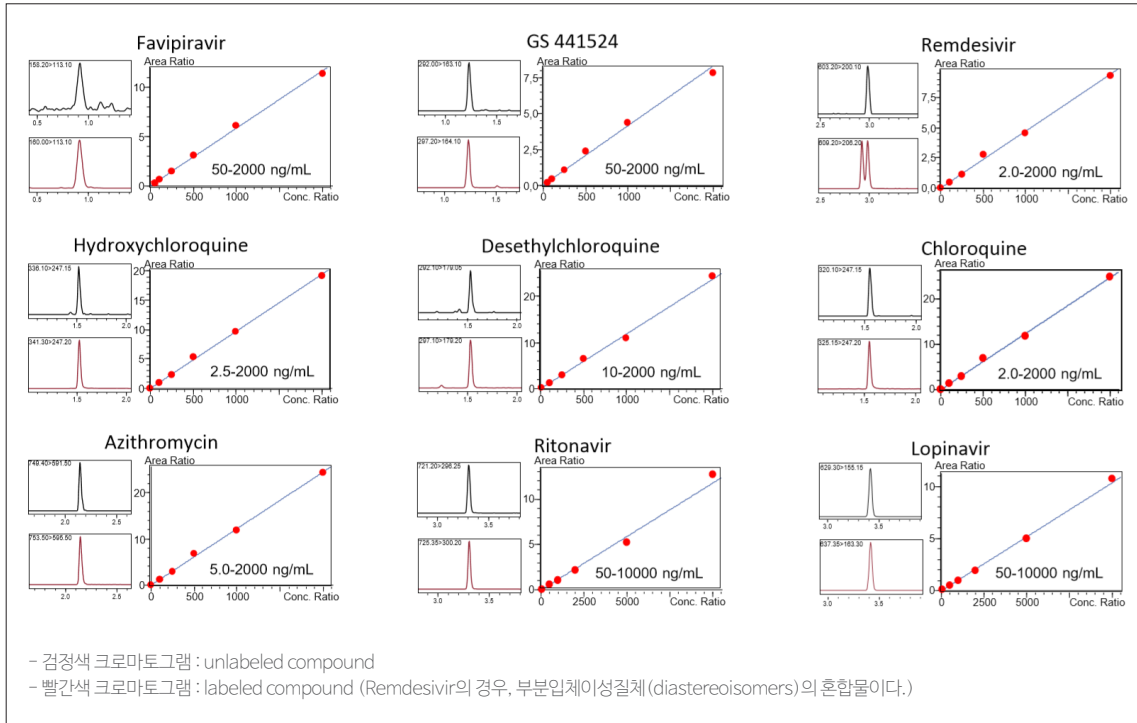


그림 1. 검정곡선 및 MRM 크로마토그램(검정곡선의 농도 수준 1 : 2.0 ~ 50 ng/mL)

표 3. 반복성 시험 결과 (n=6)

| | Favipiravir | | | GS 441524 | | | Remdesivir | | |
|-----------------------|--------------------|------|--------|---------------------|-------|--------|-------------|-------|-------|
| Concentration (ng/mL) | 50 | 100 | 1000 | 50 | 100 | 1000 | 25 | 100 | 1000 |
| Average (ng/mL) | 49.8 | 99.8 | 1092.5 | 47.6 | 99.6 | 1035.2 | 23.1 | 97.8 | 988.9 |
| CV (%) | 4.4 | 8.6 | 5.9 | 10.6 | 6.9 | 4.6 | 4.1 | 3.7 | 1.9 |
| Deviation (%) | -0.5 | -0.2 | 9.3 | -4.9 | -0.4 | 3.5 | -7.5 | -2.2 | -1.1 |
| | Hydroxychloroquine | | | Desethylchloroquine | | | Chloroquine | | |
| Concentration (ng/mL) | 25 | 100 | 1000 | 50 | 1100 | 1000 | 25 | 100 | 1000 |
| Average (ng/mL) | 24.4 | 96.6 | 1003.0 | 47.6 | 95.2 | 949.2 | 24.2 | 95.6 | 963.2 |
| CV (%) | 3.6 | 3.0 | 2.4 | 4.4 | 2.2 | 5.6 | 3.3 | 3.0 | 1.8 |
| Deviation (%) | -2.5 | -3.4 | 0.3 | -4.7 | -4.8 | -5.1 | -3.2 | -4.4 | -3.7 |
| | Azithromycin | | | Ritonavir | | | Lopinavir | | |
| Concentration (ng/mL) | 25 | 100 | 1000 | 100 | 500 | 1000 | 100 | 500 | 1000 |
| Average (ng/mL) | 24.9 | 97.2 | 962.2 | 98.3 | 498.6 | 891.3 | 92.1 | 503.7 | 917.2 |
| CV (%) | 6.6 | 2.5 | 2.0 | 3.2 | 2.0 | 3.1 | 2.0 | 0.8 | 1.3 |
| Deviation (%) | -0.6 | -2.8 | -3.8 | -1.7 | -0.3 | -10.9 | -7.9 | 0.7 | -8.6 |