SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

No.C217K

Liquid Chromatography Mass Spectrometry

전자동 전처리 LC-MS/MS 시스템을 이용한 사람 혈장 중의 Remdesivir 및 대사물 동시분석

Simultaneous Analysis of Remdesivir and Metabolites in Human plasma Using Fully Automated Sample Preparation LC-MS/MS System

Gilead Sciences사(U.S.)가 에볼라 바이러스 질환 치료를 위해 개발한 Remdesivir (제품명: Veklury®)는 단일가닥 RNA 바이러스에 대한 항바이러스 활성을 나타내는 전구약물(prodrug)입니다. Remdesivir가 생체 내에서 활성형인 GS-441524로 일부 대사되는 것으로 알려져 있습니다. Application News C218에서는 수동 전처리 후 LC-MS/MS를 이용한 신뢰성 있고 감도 높은 동시분석법을 소개하였습니다. 한편, 혈장 검체의 수동 전처리법은 일정 수준의 작업부하를 수반합니다. 본 자료에서는 시료간 오염, 검체 노출 위험을 줄일 수 있는 전자동 전처리 장치를 부착한 LC-MS/MS 시스템을 이용하여 Remdesivir 및 그 대사물의 동시분석법을 소개합니다(그림 1).

E. Imoto, D. Kawakami

그림 1. 전자동 전처리 장치를 부착한 LC-MS/MS 시스템

■ 혈장 중 Remdesivir의 전자동 전처리

LC-MS를 이용한 혈장 중 저분자 화합물 분석에서는 유기용매를 사용하여 제단백 처리를 한 후 상청액을 회수하여 분석에 사용하는 것이 일반적입니다. 완전 자동화된 전처리가 가능한 LC-MS/MS 시스템에서는 혈장을 분리한 후 채혈관을 넣는 것만으로 이러한 사전처리가 자동으로 이루어집니다(그림2). 다음 시료의 전처리도 LC-MS/MS의 분석과 병행해서 실시함으로써 각 시료의 분석에 소요되는 시간을 크게 단축할 수 있습니다.

이 분석에서는 혈장의 전처리부터 LC-MS/MS에 의한 Remdesivir와 대사물의 동시분석까지 시료당 7분의 주기 시간으로 분석하였습니다.

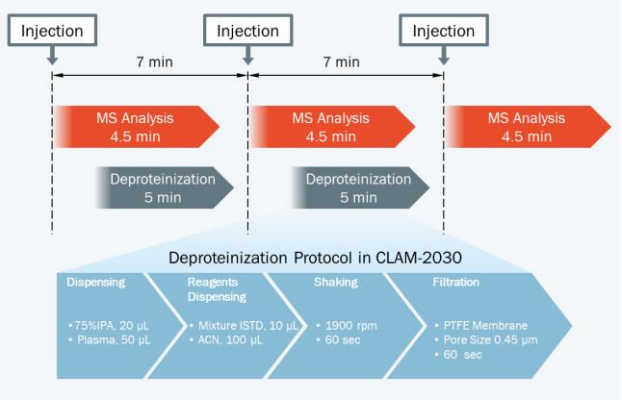


그림 2. 전자동 전처리 과정

■ 분석조건 및 시료 전처리

측정 대상 화합물인 Remdesivir (P/N:C8799*), GS-441524 (P/N: C8847*) 및 각각의 안정 동위원소인 [U-Ring-$^{13}C_6$]-Remdesivir (P/N: C8845*), [$^{13}C_5$]-GS-441524 (P/N:C8855*)는 모두 시마즈 그룹 회사인 Alsachim사로부터 구매하였고, [U-Ring-$^{13}C_6$]-Remdesivir와 [$^{13}C_5$]-GS-441524는 내부 표준물질로 사용하였습니다. 시판되고 있는 EDTA 2K로 처리한 사람 혈장에 Remdesivir 및 GS-441524를 첨가하여 검량선 및 QC용 샘플을 준비하였습니다. 표 1의 LC 및 MS 분석조건과 표 2의 MRM 파라미터를 이용하여 측정을 실시하였습니다. 분석 컬럼은 Shim-pack Scepter™ C18-120 (50 mm×2.1 mm I.D., 1.9 µm)을 사용하였습니다. 그림 3은 MS Chromatogram을 나타냅니다. Remdesivir는 100, 500, 1000, 2500, 5000 ng/mL, GS-441524는 5, 25, 50, 250, 500 ng/mL를 검량점으로 하여 각각 n=5로 측정하였습니다. 메탄올을 이용하여 [U-Ring-$^{13}C_6$]-Remdesivir (2.5 µg/mL), [$^{13}C_5$]-GS-441524 (0.25 µg/mL)의 혼합용액을 제작하여 내부표준(ISTD)으로 사용하였습니다. 혈장 시료의 전처리는 그림 2와 같이 75% IPA 20 µL, 혈장 50 µL, ISTD 10 µL, ACN 100 µL을 첨가 및 교반, PTFE 멤브레인 필터 여과까지 전자동 처리되어 그대로 LC-MS/MS 분석에 사용됩니다.

*Alsachim's product numbers

표 1. LC와 MS의 분석조건

<LC Analysis Conditions>		<MS Analysis Conditions>	
UHPLC	Nexera™ X2	LC/MS/MS system	LCMS-8060
Analysis column	Shim-pack Scepter C18-120 (50 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 µm)	Interface	Heated ESI
Mobile phase	A: 0.05 % Formic acid–water B: 0.05% Formic acid–acetonitrile	MS analysis mode	MRM (+)
Gradient program (%B)	5 % (0 – 0.30 min) ➡ 30 % (0.35 min) ➡ 70 % (1.50 min) ➡ 90 % (1.80 – 2.80 min) ➡ 5 % (2.90 – 4.50 min)	Heat block temperature	400 °C
Flow rate	0.4 mL/min	DL temperature	200 °C
Column oven temperature	40 °C	Interface temperature	300 °C
Injection volume	2.0 µL (co-injected with 20 µL of water)	Nebulizing gas flow rate	3 L/min
Rinse solution (for external rinse only)	MeOH: IPA = 1:1 (v/v)	Drying gas flow rate Heating gas flow rate	10 L/min 10 L/min

표 2. Remdesivir 및 GS-441524의 MRM Transitions

Compounds	Ion	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)
Remdesivir [$C_{27}H_{35}N_6O_8P$]	Quantitation ion	603.05	272.10
	Qualification ion	603.05	229.00
[$^{13}C_6$]-Remdesivir [$C_{21}{}^{13}C_6H_{35}N_6O_8P$]	Quantitation ion	609.05	278.20
	Qualification ion	609.05	229.15
GS-441524 [$C_{12}H_{13}N_5O_4$]	Quantitation ion	291.90	163.05
	Qualification ion	291.90	173.05
[$^{13}C_5$]-GS-441524 [$C_7{}^{13}C_5H_{13}N_5O_4$]	Quantitation ion	296.90	164.10
	Qualification ion	296.90	174.10

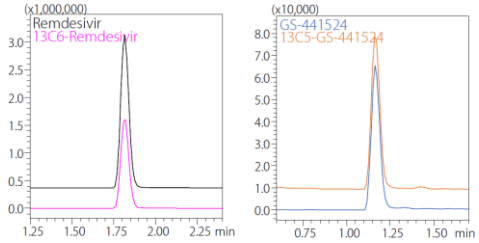
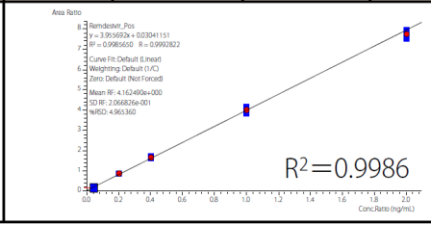
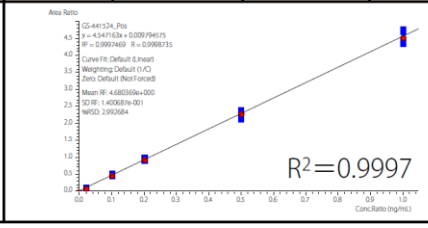


그림 3. Remdesivir, [U-Ring-$^{13}C_6$]-Remdesivir (좌) 및 GS-441524, [$^{13}C_5$]-GS-441524 (우)의 MS Chromatograms

■ 검량선 작성

완전 자동화된 전처리 장치가 장착된 LC-MS/MS를 이용하여 작성한 검량선을 표 3에 나타냈습니다. 설정된 정량범위에서 양호한 직선성을 얻었습니다. 정량 한계를 포함한 전체 농도 범위에서 Remdesivir와 GS-441524의 재현성는 각각 %RSD 0.5-2.9 %와 2.4-4.9%입니다. 또한 Remdesivir의 정확도는 87.8-108 %, GS-441524의 정확도는 94.5-105%이며 Remdesivir, GS-441524 모두 100±15% 이내입니다.

표 3. 전자동 LC-MS/MS을 이용한 혈장 중 Remdesivir, GS-441524 분석의 직선성, 정확도 및 정밀도

Compound	Remdesivir				GS-441524			
ID	Spiked Conc. (ng/mL)	Measured Conc. (ng/mL)	Precision %RSD	Accuracy %	Spiked Conc. (ng/mL)	Measured Conc. (ng/mL)	Precision %RSD	Accuracy %
Blank	---	---	---	---	---	---	---	---
Level 1	100	87.8	0.5	88	5	4.72	2.4	95
Level 2	500	539	0.8	108	25	26.2	4.8	105
Level 3	1000	1052	1.2	105	50	50.8	4.4	102
Level 4	2500	2536	2.9	101	125	125	4.9	100
Level 5	5000	4885	2.5	98	250	248	4.1	99
Calibration Curve								

■ QC시료를 이용한 분석시스템의 검증 시험

혈장 중 농도를 Remdesivir: 100, 750, 1000, 3750 ng/mL, GS-441524: 5, 37.5, 50, 187.5 ng/mL로 각각 조제한 시료를 QC시료로 하여 3일간의 재현성 시험을 실시하였습니다(표 4). 반복성 시험 결과에 따르면 Remdesivir의 정밀도는 %RSD 0.9-2.0%, GS-441524는 %RSD 2.3-3.6%였습니다. Remdesivir의 정확도는 90.5-106%, GS-441524는 88.5-91.6%로 100±15% 이내였습니다. 일간 재현성을 평가한 결과는 Remdesivir의 정밀도는 %RSD 0.1-7.2%, GS-441524는 %RSD 0.4-7.8%였습니다. Remdesivir의 정확도는 82.2-107%, GS-441524의 정확도는 86.7-92.8%이며 LLOQ에서 100±20% 이내, 다른 농도 범위에서 100±15% 이내입니다.

표 4. 혈장 중 Remdesivir, GS-441524 분석의 재현성

Compounds	QC Sample	Spiked Conc. (ng/mL)	Intra-Assay (*n*=6)		
			Average Conc. (ng/mL)	Precision %RSD	Accuracy %
Remdesivir	LLOQ	100	90.5	2.0	91
	Low	750	797	1.7	106
	Medium	1000	1045	0.9	105
	High	3750	3393	2.0	91
GS-441524	LLOQ	5	4.51	3.1	90
	Low	37.5	33.2	2.5	89
	Medium	50	45.2	2.3	90
	High	187.5	171.7	3.6	92

표 5. 혈장 중 Remdesivir, GS-441524 분석의 일간 재현성

Compounds	QC Sample	Spiked Conc. (ng/mL)	Day 1st (*n*=3)			Day 2nd (*n*=3)			Day 3rd (*n*=3)		
			Average Conc. (ng/mL)	Precision %RSD	Accuracy %	Average Conc. (ng/mL)	Precision %RSD	Accuracy %	Average Conc. (ng/mL)	Precision %RSD	Accuracy %
Remdesivir	LLOQ	100	91.6	1.1	92	82.2	4.9	82	85.1	1.9	85
	Low	750	788	1.8	105	734	1.4	98	770	0.1	103
	Medium	1000	1037	0.7	104	999	0.7	100	1018	0.6	102
	High	3750	3765	1.3	100	3441	1.3	92	3994	7.2	107
GS-441524	LLOQ	5	4.54	4.3	91	4.54	7.7	91	4.50	7.8	90
	Low	37.5	33.1	1.8	88	34.1	2.9	91	32.5	3.2	87
	Medium	50	44.8	3.2	90	44.5	2.7	89	43.8	0.4	88
	High	187.5	174.0	3.7	93	172.6	3.0	92	167.5	0.7	89

■ 결론

Remdesivir와 대사물인 GS-441524을 포함하는 혈장 시료를 분석하기 위해 완전 자동화된 전처리 장치 LC-MS/MS 시스템을 구축하였습니다.

QC시료를 이용해 반복성 및 일간 재현성을 평가한 결과, 양호한 정확도 및 재현성을 얻었습니다.

<References>

1) Richard T et.al., "Remdesivir: A Review of Its Discovery and Development Leading to Emergency Use Authorization for Treatment of COVID-19", ACS Cent. Sci.

The product described in this document has not been approved or certified as a medical device under the Pharmaceutical and Medical Device Act of Japan. It cannot be used for the purpose of medical examination and treatment or related procedures.

본 사 TEL.02)540-5541 FAX.02)541-2163 대전사무소 TEL.042)864-1161 FAX.042)864-1164 부산사무소 TEL.051)301-5400 FAX.051)301-5405 광주사무소 TEL.062)263-1293 FAX.062)263-1295
서울사무소 TEL.02)540-5061 FAX.02)3442-6737 대구사무소 TEL.053)746-5541 FAX.053)746-5560 울산사무소 TEL.052)249-5541 FAX.052)249-2163 전주사무소 TEL.063)273-5540 FAX.063)273-5547
기술연구소 TEL.02)540-5960 FAX.02)540-5980 천안사무소 TEL.041)910-5670 FAX.041)910-5672 여수사무소 TEL.061)921-5542 FAX.061)921-5543 스 펙 크 롬 TEL.02)540-0078 FAX.02)540-1278