

# Application News

## No.C153K

### Liquid Chromatography Mass Spectrometry

## 전자동 전처리 LC-MS/MS 시스템을 이용한 사람 혈장 중의 항부정맥제 동시분석

Simultaneous Analysis of Antiarrhythmic Drugs in Human Blood Plasma Using the Fully Automated Sample Preparation LC-MS/MS System

치료의 범위가 좁은 약이나 독성과 유효성의 경계가 근접하여 투여 관리가 어려운 약을 치료에 사용할 경우에는 환자의 약물 혈중농도를 측정하여 약동태학적·약리학적 해석을 근거로 개개인의 최적의 투여량과 투여방법을 결정합니다. 본 응용자료에서는 전자동 전처리 장치 CLAM-2000 및 LC-MS/MS를 사용하여 전처리를 포함한 분석 워크플로우의 효율화에 대한 연구를 진행하였습니다.

본 자료에서는 완전 자동화된 전처리 LC-MS/MS 시스템을 이용하여 6가지의 항부정맥제에 대한 신속한 동시 분석법에 대한 연구 성과를 소개합니다.

T. Tsukamoto, D. Kawakami

### ■ 완전 자동화된 전처리법을 이용한 혈장 내 항부정맥제 분석

일반적으로 혈장 시료의 전처리는 유기용매를 첨가하여 제단백질한 후 고체 성분을 원심 분리하여 상층을 취하는 과정이 필요합니다. 전자동 전처리 LC-MS/MS 시스템에서는 혈장을 분리한 후 채혈관을 설정하는 것만으로 이러한 전처리가 자동으로 이루어지며 연속해서 LC-MS/MS 분석이 이루어집니다(그림 1). LC-MS/MS 분석과 다음 시료의 전처리가 동시에 이루어짐으로 시료당 분석 시간을 크게 단축할 수 있습니다.

이 분석 예에서는 혈장 전처리부터 LC-MS/MS를 이용한 6가지 항부정맥제와 그 대사체의 동시분석까지 시료당 7분의 주기 시간을 실현했습니다(표 1 및 그림 2).

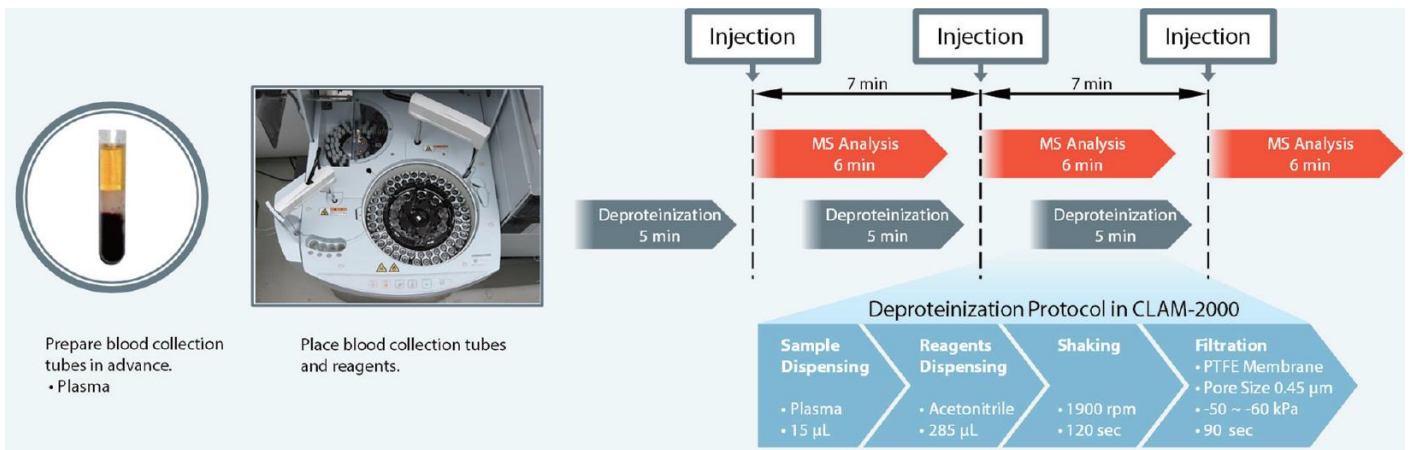


그림 1. 혈장 시료의 전처리 과정

표 1. 항부정맥제와 대사체

Compound	Molecular Formula	MRM Transition m/z
Amiodarone	C <sub>25</sub> H <sub>29</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	646.0 > 58.1
Desethylamiodarone	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> I <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	618.0 > 72.1
Bepiridil	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O	367.1 > 84.1
Flecainide	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> F <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	415.0 > 301.0
Pilsicainide	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O	272.9 > 110.1
Cibenzoline	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub>	262.9 > 115.0
Mexiletine	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> NO	180.1 > 58.0

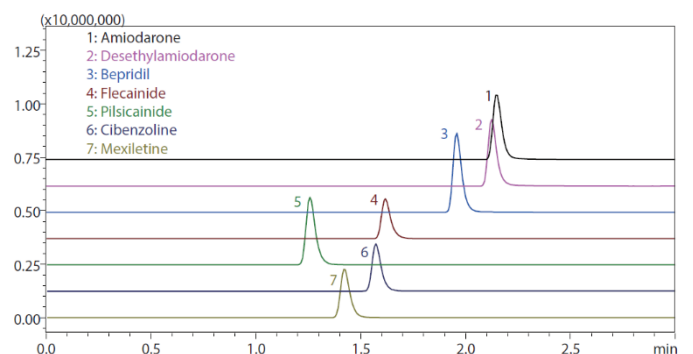


그림 2. 표준시료를 첨가한 사람 혈장의 Mass Chromatogram

### ■ 전자동 전처리 분석법의 적합성 평가

표준시료를 첨가한 대조군 혈장으로 검량선을 작성하고 QC 시료(각 농도 n=5)의 분석 결과를 바탕으로 정확도와 정밀도의 적합성을 평가하였습니다(표 2). 모든 시료에 대해 설정된 농도 범위에서 양호한 직선성을 얻을 수 있었습니다. 정량한계를 포함하는 전 범위에서 QC 시료의 정확도는 100±15% 이내입니다. 또한 정밀도에 대해서도 마찬가지로 %RSD 15% 이내의 양호한 재현성을 얻을 수 있었습니다.

검량선의 최고 농도 시료를 분석한 직후에 혈장 바탕시료를 측정하여 전자동 전처리 LC-MS/MS 시스템의 교차오염에 대해 확인하였습니다. 모든 시료에서 검량선의 최저 농도 시료의 피크강도와 비교했을 때 유의한 교차오염은 확인되지 않았습니다(그림 3). 이상의 결과로부터 전자동 전처리 LC-MS/MS 시스템이 광범위한 농도의 검체를 연속으로 분석할 때 충분한 신뢰성을 가진 정량분석이 가능하다는 것을 확인하였습니다.

표 2. 항부정맥제와 대사체 동시 분석의 적합성 평가 결과

Compound	Cal. Range [ng/mL]	Correlation Coefficient R	Accuracy, %				Precision, %RSD, n=5			
			LLOQ	Low	Medium	High	LLOQ	Low	Medium	High
Amiodarone*1	100-3000	0.9983	99.3	100.6	99.4	103.9	4.1	2.9	3.0	2.7
Desethylamiodarone*1	100-3000	0.9987	99.2	98.9	101.1	100.3	5.3	4.2	3.6	4.2
Bepidil*2	50-1500	0.9992	100.9	100.5	96.6	103.4	4.1	3.7	2.3	1.8
Flecainide*2	50-1500	0.9987	98.1	98.7	96.7	101.4	4.7	3.3	2.4	2.4
Pilsicainide*1	100-3000	0.9987	100.4	99.6	97.3	104.8	4.0	3.0	1.8	2.0
Cibenzoline*2	50-1500	0.9987	102.4	101.4	99.1	102.9	4.2	3.4	3.0	2.4
Mexiletine*1	100-3000	0.9984	104.5	107.4	106.3	107.8	3.8	3.9	2.6	2.6

\*1: 100 ng/mL for LLOQ, 250 ng/mL for Low, 1000 ng/mL for Medium, 3000 ng/mL for High  
 \*2: 50 ng/mL for LLOQ, 125 ng/mL for Low, 500 ng/mL for Medium, 1500 ng/mL for High

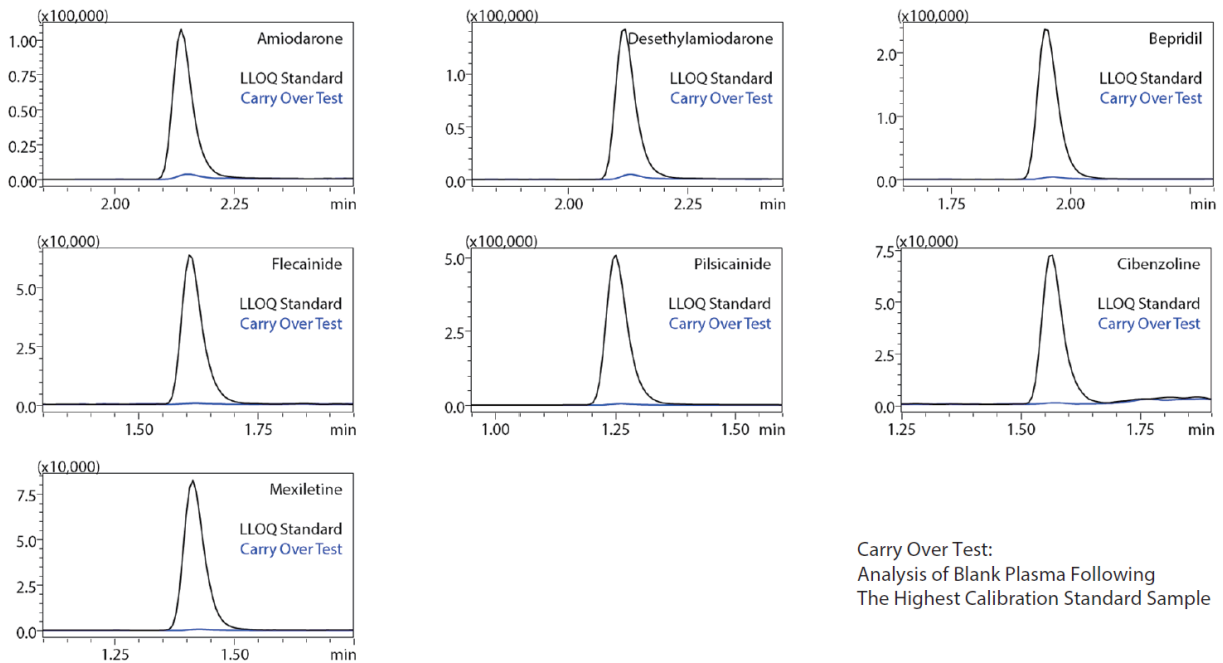


그림 3. 교차오염 실험 결과

표 3. 분석 조건 (적합성 검사)

System	: CLAM-2000 + Nexera + LCMS-8060	
Protocol	: Plasma disp. 15 µL - acetonitrile disp. 285 µL - shaking at 1900 rpm, 120 sec - filtration for 90 sec	
Column	: Shimadzu GLC Mastro C18 (50 mmL. × 2.1 mmI.D., 3 µm)	
Mobile Phase	: A) 0.1% Formic acid - Water, B) 0.1% Formic acid - Methanol	
Flow Rate	: 0.4 mL/min	
Time program	: B Conc. 10% (0 min) – 100% (2 – 3.5 min) – 10% (3.51 – 6 min)	
Column Temp.	50 °C	Injection Volume : 0.2 µL
Probe Voltage	: 2.0 kV (ESI-positive mode)	
Interface Temp.	: 300 °C	DL Temp. : 250 °C
Block Heater Temp.	: 400 °C	Nebulizing Gas Flow : 3 L/min
Heating Gas Flow	: 10 L/min	Drying Gas Flow : 10 L/min

## ■ 수동 전처리와의 비교 실험

아미오다론(amiodarone) 혈중 농도 측정용 인간 혈장을 이용하여 수동 처리법과 전자동 전처리 LC-MS/MS 시스템에 의한 전자동 전처리 분석법과의 비교 시험을 실시하였습니다.

수동 처리법은 수작업으로 혈장을 분취하고 아세토니트릴을 첨가, 혼합하여 제단백질을 실시했습니다. 이 시료를 원심분리 후 상층액을 바이알로 옮겨 LC-MS/MS 분석을 실시했습니다. 한편 전자동 전처리 분석법에서는 혈장 분취에서 LC-MS/MS 분석까지의 전 과정을 여기에 기술된 시스템을 이용하여 전자동으로 실시하였습니다(그림 4).

아미오다론(amiodarone) 및 그 대사체인 데스에틸아미오다론(desethylamiodarone)에 대하여 두가지 전처리 방법 간의 정량값을 비교하였습니다(그림 5, 그림 6, 표 4 및 표 5). 각 시료에서 검출된 폭넓은 농도 범위에서 수동 처리법과 전자동 전처리분석법의 정량 결과에서 양호한 유사성을 확인하였습니다. 이 결과로부터 산출된 결정계수 R<sup>2</sup>는 0.95 이상입니다(그림 7 및 8).

이 시스템을 이용한 전자동 전처리 분석법은 기존의 수동 처리법과 동등한 정량 결과를 얻을 수 있는 신속하고 간편한 분석 기법으로 향후 활용이 기대됩니다.

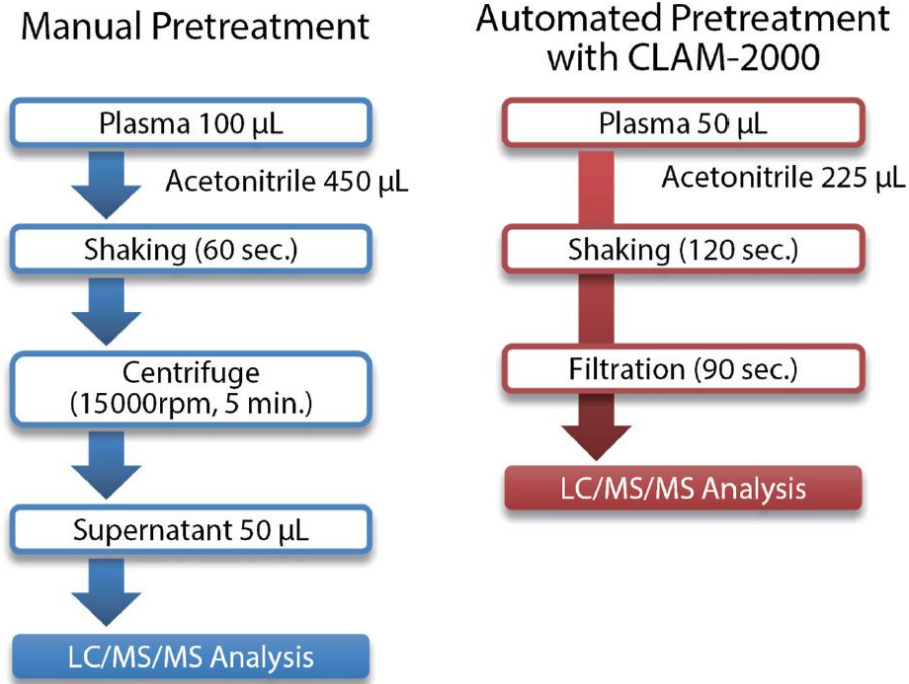


그림 4. 수동 전처리법과 자동화 전처리 분석법의 전처리 과정

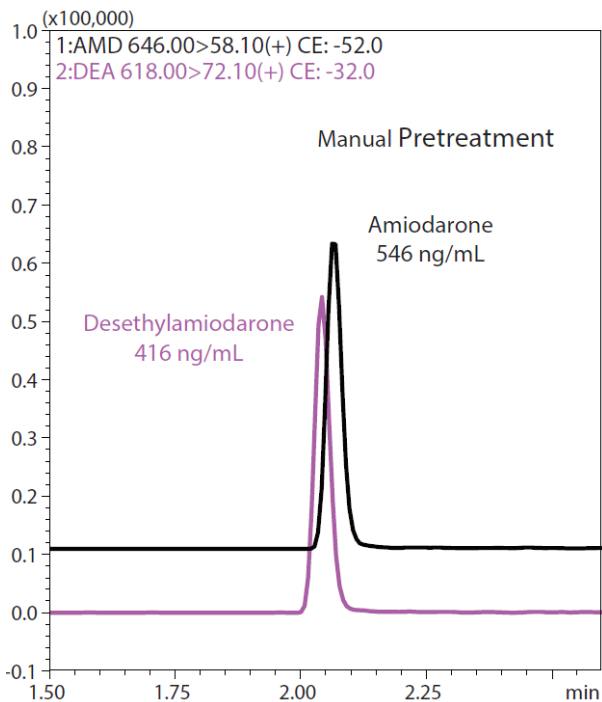


그림 5. 수동 처리법에 의한 사람 혈장(Sample3) 분석 결과

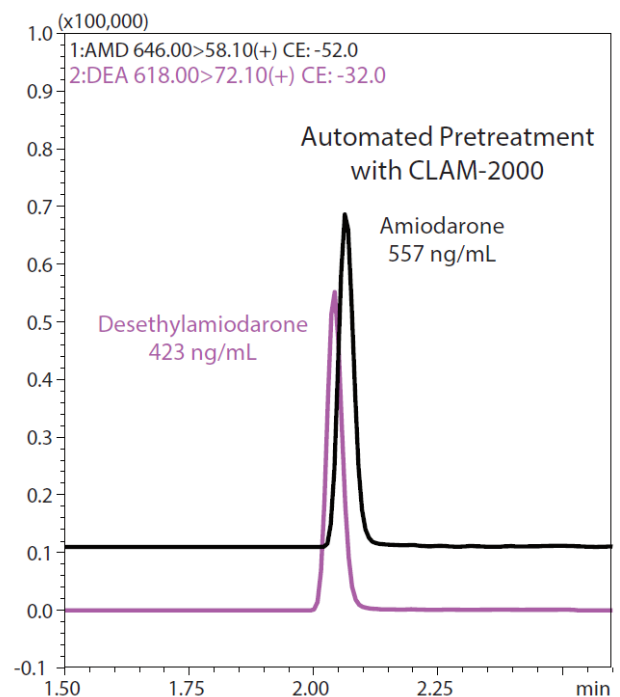


그림 6. 전자동 전처리 분석법에 의한 사람 혈장(Sample3) 분석 결과

표 4. 수동 전처리법과 전자동 전처리 분석법의 정량 결과 (아미오다론)

	Amiodarone		
	Manual [ng/mL]	Automated [ng/mL]	Ratio %*
Sample 1	373	411	110.2
Sample 2	399	404	101.3
Sample 3	546	557	102.0
Sample 4	205	211	102.9
Sample 5	963	895	92.9
Sample 6	1,318	1,213	92.0
Sample 7	1,271	1,229	96.7
Sample 8	1,233	1,282	104.0
Sample 9	2,259	2,208	97.7
<b>Average</b>			<b>100.0</b>
<b>RSD %</b>			<b>5.8</b>

\* 자동 전처리 / 수동 전처리

표 5. 수동 전처리법과 전자동 전처리 분석법의 정량 결과 (데스에틸아미오다론)

	Desethylamiodarone		
	Manual [ng/mL]	Automated [ng/mL]	Ratio %*
Sample 1	304	271	89.1
Sample 2	412	366	88.8
Sample 3	416	423	101.7
Sample 4	271	240	88.6
Sample 5	717	654	91.2
Sample 6	151	150	99.3
Sample 7	431	408	94.7
Sample 8	664	628	94.6
Sample 9	940	1,080	114.9
<b>Average</b>			<b>95.9</b>
<b>RSD %</b>			<b>8.9</b>

\* 자동 전처리 / 수동 전처리

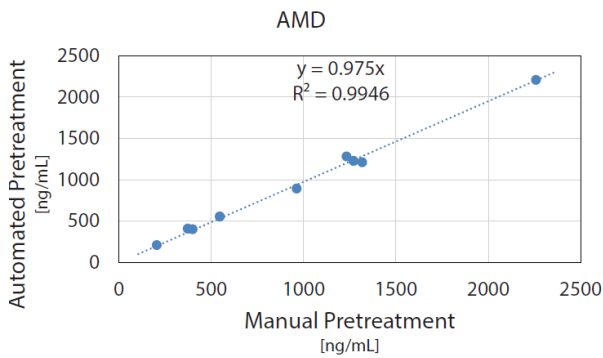


그림 7. 아미오다론의 정량 결과 비교

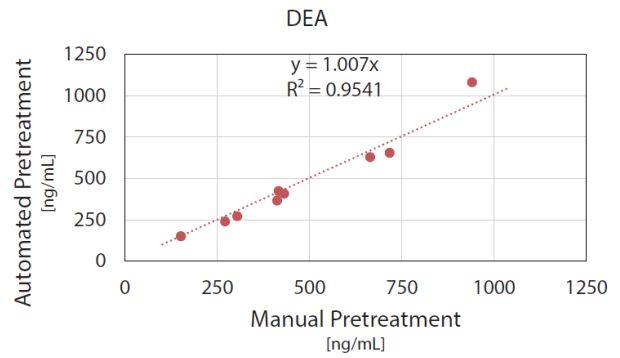


그림 8. 데스에틸아미오다론의 정량 결과 비교

표 6. 분석조건 (전처리법 비교실험)

System	: CLAM-2000 + Nexera + LCMS-8040		
Protocol	: Plasma disp. 50 µL - acetonitrile disp. 225 µL - mixing at 1900 rpm, 120 sec - filtration for 90 sec		
Column	: Shimadzu GLC Mastro C18 (50 mmL. × 2.1 mmI.D., 3 µm)		
Mobile Phase	: A) 0.1% Formic acid - Water, B) 0.1% Formic acid - Methanol		
Flow Rate	: 0.4 mL/min		
Time program	: B Conc. 10 % (0 min) – 100 % (2 – 3.5 min) – 10 % (3.51 – 6 min)		
Column Temp.	50 °C	Injection Volume	: 0.1 µL
Probe Voltage	: 4.5 kV (ESI-positive mode)		
DL Temp.	: 250 °C	Block Heater Temp.	: 400 °C
Neb. Gas Flow	: 3 L/min	Drying Gas Flow	: 15 L/min

**[Acknowledgments]**

We would like to thank pharmacist Yuko Shimamoto of the Pharmacy Division at the National Cerebral and Cardiovascular Center Hospital (National Research and Development Agency) in Japan for her significant cooperation in the investigation provided in this article.

**References** • Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation (2001, US FDA)

• Guideline on Bioanalytical Method Validation in Pharmaceutical Development (2013, Japan MHLW)

**Notes**

- 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.
- The samples described in this document were all sampled and measured at the National Cerebral and Cardiovascular Center Hospital in Japan. Permission was obtained regarding the publication of measurement data.