

Application News

No. 06-SAIP-LC-060-K

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer LCMS-8060

LCMS-8060을 이용한 혈장 중 Liraglutide 분석을 위한 선택적 고감도 방법

Selective and Sensitive Method for Estimation of Liraglutide in Human Plasma using Shimadzu LCMS-8060

사용자 활용 포인트

- ◆ LLOQ 0.5 ng/mL 까지 분석할 수 있는 간단한 고감도 분석법이다.
- ◆ 시료 추출 시 적은 혈장량으로 질량 분석기의 수명이 연장된다.
- ◆ 빠른 시료 추출 방식으로 시료 생산성이 향상된다.

■ 서론

Liraglutide는 인크레틴 모방체라고도 알려진 글루카곤 유사 펩타이드-1 수용체 작용제(GLP-1 receptor agonist)이다. 이는 췌장에서 인슐린 방출을 증가시키고 과도한 글루카곤 방출을 감소시킴으로써 작동한다^[1]. Liraglutide는 제2형 당뇨병이나 비만 치료에 사용되는 약물이다. Liraglutide의 장기 작용은 GLP-1-(7-37) 분자의 한 위치에 지방산 분자를 부착함으로써 달성되며, 이는 피하 조직 및 혈류에서 알부민과 자가 연관 및 결합을 가능하게 한다. 그러면 활성 GLP-1은 느리고 일관된 속도로 알부민에서 방출된다. 또한 알부민 결합은 GLP-1-(7-37)에 비해 더 느린 분해 및 감소된 신장 배설을 초래한다.

피하 투여 후, 투여 8~12시간 후에 평균 Cmax 35 ng/mL에 도달했으며, 절대 생체 이용률은 55%였다. 이는 약동학 평가에 필요한 분석법이 0.50 ng/mL의 감도를 달성해야 함을 나타낸다.

이러한 방법은 펩타이드가 제거하는 많은 문제, 즉 낮은 이온화, 비특이적 흡착, 캐리오버 및 낮은 추출 회수율을 해결해야 한다.

이 뉴스레터에서는 LCMS-8060을 사용하여 인간의 혈장 내 Liraglutide에 대해 0.50 ng/mL의 정량 하한(LLOQ)으로 높은 크로마토그래피 분해능과 우수한 감도를 갖춘 방법을 개발하였다. 보다 간단한 추출 절차, 고도로 최적화된 크로마토그래피 및 향상된 감도라는 몇 가지 주요 기준에 초점을 맞춘 방법이 개발되었다. 이러한 요인은 약동학 조사를 위한 Liraglutide의 선택적이고 높은 처리량의 분석을 가능하게 한다.

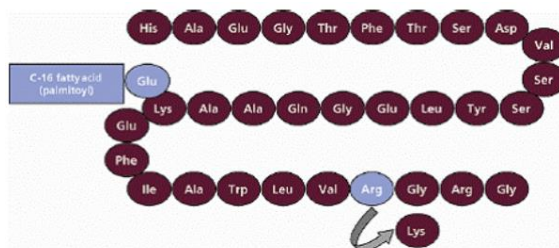


그림 1. Liraglutide의 구조^[2]

■ 특징

- 인간 혈장 내 Liraglutide 정량을 위한 신속하고 우수한 감도 및 높은 처리량의 분석법
- 고객 실험실로 쉽게 이전할 수 있는 검증된 분석법
- 단일 단계 SPE 방법으로 시료 처리량 증가
- Heated ESI와 새로운 UF-Qarray 이온 가이드 기술은 이온 생성을 증가시키고 전송을 향상시키는데 기여한다. 이를 통해 Liraglutide 0.50 ng/mL에서 선택적 고감도 정량이 보장된다.
- 더 적은 혈장 용량(200 µL)을 사용하여 혈장 시료의 불필요한 낭비를 방지하고 동시에 기기 수명을 늘릴 수 있다.

■ 분석법 밸리데이션

Liraglutide LCMS 분석법은 미국 주요 지침에 따라 검증되었다. 평가된 분석법 밸리데이션의 파라미터는 허용 기준을 충족하였다. Liraglutide 분석법 검증 결과는 표 1에 요약되어 있다.

표 1. 분석법 밸리데이션 요약

Calibration curve range		0.50 ng/mL - 202.70 ng/mL
Intraday precision and accuracy (For LLOQ-QC)	Accuracy	102.63
	Precision (% CV)	14.52
Intraday precision and accuracy (For LQC, MQC and HQC)	Accuracy	96.10 - 101.01
	Precision (% CV)	2.85 - 12.79
Global precision and accuracy (For LLOQ-QC)	Accuracy	109.98
	Precision (% CV)	18.52
Global precision and accuracy (For LQC, MQC and HQC)	Accuracy	102.40 - 106.7
	Precision (% CV)	7.45 - 13.09
Global % recovery	Recovery (%)	50.92
	Precision (% CV)	13.06

Note: LLOQ QC- Lower Limit of Quantification Quality Control, LQC- Lower Quality Control, MQC_ Middle Quality Control and HQC- Higher Quality Control.

■ 실험

시료 준비

시료는 양압 고체상 추출을 사용하여 처리되었다. 혈장 시료에 분석물질을 첨가한 200 µL의 혈장 시료에 600 µL의 완충용액을 넣고 볼텍싱하여 혼합하였다. 미리 컨디셔닝이 된 SPE 카트리지에 시료를 넣고, 유기-수용액으로 세척한 후 메탄올-아세트니트릴 용액으로 용출하였다. 이 용출된 용액은 Shimadzu LCMS-8060 시스템에 주입하였다.

LCMS-8060의 기기 분석 조건

분석 조건 및 기기 파라미터는 표 2에, MRM 조건은 표 3에 나타내었다.

표 2. 분석 조건 및 기기 조건

Parameter	HPLC
Column	Shim-pack™ Velox Biphenyl 2.7 µm, 2.1 × 100 mm column (P/N: 227-32015-03)
Mobile Phase	A: 0.1% formic acid in water B: 0.1% formic acid in acetonitrile
Flow Rate	0.25 mL/min
Oven Temp	40 °C
Injection volume	25 µL
Parameter	MS
Interface	ESI
Interface Voltage and temp.	5 kV and 400 °C
MS Mode	MRM, Positive
Heat Block Temp.	400 °C
DL Temp.	300 °C
CID Gas	270 kPa
Nebulizing Gas	3 L/min
Drying Gas	10 L/min
Heating Gas	10 L/min

표 3. Liraglutide의 MRM 조건

Compound	MRM (m/z)	CE (V)
Liraglutide	938.5-1128.4	-20



그림 2. Nexera™ X2 with LCMS-8060 system

■ 결과 및 토의

분석법 개발

Liraglutide를 아세트니트릴/물(50/50) 용액으로 용해시켰다. 그러나 표준 용액을 분석할 때 0.5-200 ng/mL 범위에서 선형성이 좋지 않은 것으로 나타났으며, 이는 강한 펩타이드 흡착 때문인 것으로 의심된다. 용매 강도를 강화한 후, 수용액상 표준용액의 선형성이 좋아졌다.

이 뉴스레터에서는 인간의 혈장 내 Liraglutide를 정량하기 위해 Shimadzu LCMS-8060을 사용하였다. 전구체(precursor)는 4+ 전하 상태의 m/z 938.5로 선택하였다. 특정 충돌 에너지 하에서 비슷한 감도의 이온 조각이 많이 생성되었다.

처음에는 몇 가지 가능한 조각 이온 (m/z 1064, m/z 1129, m/z 1185 및 m/z 523)이 조사를 위해 선택되었다. MRM 최적화 및 생물학적 시료를 사전 분석 후, 높은 감도와 최소한의 간섭을 나타내는 전이 m/z 938.5 → 1128.4 가 최종적으로 선택되어 인간의 혈장 내 Liraglutide를 정량하였다. 최적화된 MRM은 표 3에 나타내었다.

크로마토그래피 조건의 최적화는 간단했으며 이동상의 구성, 완충액 및 분석 컬럼 유형을 평가하는 데 중점을 두었다.

이전 연구 경험을 바탕으로 아세트니트릴이 메탄올보다 유기상으로 더 적합하고 포름산의 여부가 Liraglutide의 감도에 도움이 된다는 것을 발견하였다. 최종 이동상은 0.1% 포름산 아세트니트릴과 0.1% 포름산 수용액으로 구성하였다. 더 나은 피크 모양을 위해 여러 HPLC 컬럼을 평가하였으며, Shimadzu의 Shim-pack Velox Biphenyl 컬럼 (100 × 2.1mm, 2.7 µm)이 매트릭스 간섭을 최소화하고 우수한 크로마토그래피 분해능과 날카로운 피크 모양을 제공하였다. 분석시간은 10 분으로 설정하였다. Liraglutide의 추출된 바탕시료 및 LLOQ 크로마토그램은 그림 3에 나타내었다. LLOQ 수준에서 Liraglutide의 신호 대 잡음비는 S/N > 20으로 확인되었다.

시료 준비 측면에서 SPE가 테스트된 유일한 수단이었다. 특히 펩타이드의 정량적 생체 분석 경험에서 SPE의 사용은 가장 선택적인 추출 기술이며, 조절이 가능하고 매우 견고한 방법에 대한 기회를 나타낸다.

Liraglutide의 강력한 극성 특성을 고려하면, 어떤 형태의 액체-액체 추출 방식이라도 회수율이 미미할 것이라는 점은 쉽게 예측할 수 있었다. 유기 용매를 사용한 단백질 침전은 적절한 회수율을 제공할 수 있지만, 이 기술은 매우 비선택적이며 시료에서 가장 큰 단백질만 제거하고 시료 전처리 중에 분석물질 및 내부 표준물질이 경험하는 것과 동일한 농도 효과를 경험하게 되는 수많은 잠재적 간섭을 남긴다.

충분한 감도를 얻기 위해 시료 추출물에서 농축이 필요할 것으로 알려진 방법에서, 단백질 침전은 매트릭스 효과의 맥락에서 훨씬 더 실현가능성이 낮아진다. 또한 단일 기술기 주기 내에서 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 비용출에 대한 LC 조건의 제한은 시료 추출이 이러한 선택성을 제공하는 데 필요하다는 것을 의미했다. 이러한 간섭을 선택적으로 과도하게 머무르게 하는 것은 역상을 포함하고 최적화가 완전하고 적절하게 수행되는 SPE 흡착제에서 쉽게 달성할 수 있다.

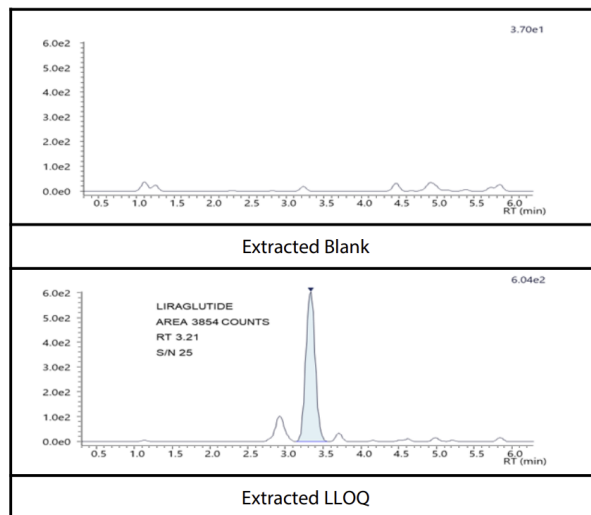


그림 3. Liraglutide의 크로마토그램 (추출한 바탕시료, 추출한 LLOQ)

분석법 밸리데이션

• 선택성

6개의 서로 다른 인간의 혈장 로트를 추출하고 분석하여 분석법의 선택성을 평가하였다. 6개 서로 다른 로트의 바탕시료 매트릭스는 Liraglutide의 머무름 시간 및 MRM에서 유의미한 간섭을 나타내지 않았다. 결과는 표 4에 나타내었다.

표 4. 선택성

Plasma lot no.	Liraglutide		
	Area in blank matrix	LLOQ area	% Interference
V2533	335	1,699	19.72
V2528	169	3,597	4.70
P8072	54	2,880	1.88
V2534	510	2,842	17.95
V2537	87	2,049	4.25
P8200	189	3,961	4.77

• 직선성

농도 대 면적 반응 관계에 선형 방정식이 가장 적합하다고 판단되었다. 선형 회귀 타입은 $1/Concentration^2$ 이며, 8개의 검량선 농도로 0.5 - 202.70 ng/mL 범위에서 선형으로 나타났다. 밸리데이션 과정에서 검량선의 결정계수(r^2)는 지속적으로 0.99보다 컸다. 그림 4에 검정곡선을 나타내었다.

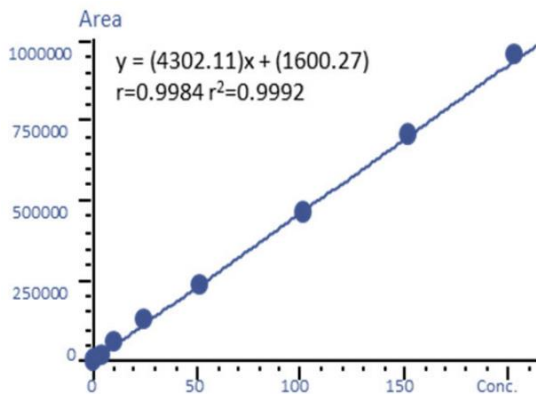


그림 4. 검정곡선

• 일중 정확도 및 정밀도

Liraglutide의 일중 정확도와 정밀도는 예상 범위를 기반으로 생물학적 매트릭스 내 품질 관리 시료의 최저 정량 한계(LLOQ QC), 저농도(LQC), 중농도(MQC) 및 고농도(HQC)를 결정하였다. 일중 정확도는 모든 품질 관리 시료에 대해 85-115% 이내였으며, LLOQ QC는 80-120% 이내였다. 정밀도의 경우, 모든 품질 관리 시료에 대해 %CV는 15% 이하이며, LLOQ QC는 20% 이하였다. 정량적 데이터는 표 5에 요약하였다.

표 5. 일중 정확도 및 정밀도

Intra-day (n=6)			
Nominal Conc (ng/mL)	Observed Conc (ng/mL)	Accuracy (%)	Precision (%CV)
LLOQ QC (0.50 ng/mL)	0.51	102.63	14.52
LQC (1.52 ng/mL)	1.54	101.01	12.79
MQC (25.39 ng/mL)	24.40	96.10	2.85
HQC (152.03 ng/mL)	149.40	98.27	4.92

• 일간 정확도 및 정밀도

Liraglutide의 일간 정확도와 정밀도는 3개의 배치에서 평가되었다. 일간 정확도는 모든 품질 관리 시료에 대해 85-115% 이내였으며, LLOQ QC는 80-120% 이내였다. 정밀도의 경우, 모든 품질 관리 시료에 대해 %CV는 15% 이하였으며, LLOQ QC는 20% 이하였다. 3개 배치에 걸쳐 분석된 각 수준의 18개 QC에 대한 결과가 표 6에 정리하였다.

표 6. 일간 정확도 및 정밀도

Intra-day (n=6)			
Nominal Conc (ng/mL)	Observed Conc (ng/mL)	Accuracy (%)	Precision (%CV)
LLOQ QC (0.50 ng/mL)	0.55	109.98	18.52
LQC (1.52 ng/mL)	1.62	106.78	13.09
MQC (25.39 ng/mL)	26.00	102.40	7.45
HQC (152.03 ng/mL)	158.18	104.04	12.87

• 회수율

세 가지 농도(LQC, MQC, HQC)에서 추출된 QC 시료의 피크 면적을 추출 후 첨가한 QC 시료와 비교하여 회수율 실험을 평가하였다. 추출 후 첨가한 QC 시료는 100% 회수율을 나타낸다. Liraglutide의 회수율은 50.92%였다. 전체 회수율 결과는 표 7에 나타내었고, 모든 농도 수준에서 정확하고 일관되며 재현 가능한 것으로 나타났다.

표 7. 회수율

QC level	Recovery (%)
LQC (n=6)	43.24
MQC (n=6)	54.54
HQC (n=6)	54.97
Mean	50.92
SD	6.65
% CV	13.06

• 매트릭스 효과

매트릭스 요인은 매트릭스 이온이 존재하는 경우의 피크 면적 비율과 매트릭스 이온이 없는 경우의 평균 피크 면적 비율을 비교하여 평가되었다.

추출되지 않은 바탕 품질 관리 시료는 6개의 서로 다른 인간의 바탕 혈장 배치에서 준비하고 처리한 후 수성 LQC 및 HQC 시료로 재구성하였다. 각 로트 당 단일 주입하여 분석하였다. 매트릭스 이온이 존재하는 피크 면적 비율은 추출되지 않은 LQC 및 HQC 시료로부터 얻었다.

매트릭스 이온이 없는 평균 피크 면적 비율은 전체 회수율로부터 얻어진 결과로 계산되었다.

LQC 및 HQC 시료의 정밀도는 각각 3.69% 및 3.02%로 허용 기준 15% 이하에 충족하였다. 매트릭스 요인의 대표적인 데이터는 표 8에 나타내었고, 결과는 인간의 혈장 중 Liraglutide의 정량 추정 방법의 적합성을 확인한다.

표 7. 매트릭스 효과

Liraglutide	Aqueous sample	Post extracted sample	Matrix factor
LQC	6,217	5,983	0.96
	5,883	5,777	0.98
	5,746	5,372	0.93
	6,024	5,723	0.95
	6,343	6,232	0.98
	5,718	5,936	1.04
Mean			0.97
SD			0.04
% CV			3.69

Liraglutide	Aqueous sample	Post extracted sample	Matrix factor
HQC	543,668	522,379	0.96
	581,892	576,332	0.99
	636,429	606,953	0.95
	619,884	561,864	0.91
	603,813	589,440	0.98
	581,429	550,638	0.95
Mean			0.96
SD			0.03
% CV			3.02

• 캐리오버

캐리오버(Carryover)는 추출된 바탕시료, 추출된 최고농도의 검량선용 표준용액, 추출된 바탕시료, 추출된 최저농도의 검량선용 표준용액의 순서로 시료를 주입하여 평가하였다. 가장 높은 농도의 검량선용 표준용액을 분석 후, 바탕시료에서 Liraglutide의 머무름 시간 및 MRM 상에 캐리오버가 관찰되지 않았다.

■ 결론

미국 주요 지침에 따라 인간의 혈장 내 Liraglutide의 정량화를 위한 생체분석적 LCMS 분석법이 성공적으로 개발 및 검증되었다. 이 방법은 검증된 정량 하한이 0.50 ng/mL으로, 0.50 - 202.70 ng/mL 범위의 인간의 혈장 내 Liraglutide를 측정하는 데 적용할 수 있다. 특별한 시료 전처리 및 최적화된 크로마토그래피와 함께 LCMS-8060은 인간의 혈장 내 Liraglutide 연구 시료의 생체 분석을 위한 매우 선택적이고 고감도 분석 방법을 제공한다. Nexera™ X2 UHPLC에서 간단한 이동상 및 0.250 mL/min의 최소 구배 유속으로 초고속, 고분리를 달성하였다. 바로 사용할 수 있는 솔루션을 제공함으로써 고객의 실험실과 협력하여 원하는 결과를 얻을 수 있다.

■ 참고문헌

1. <https://en.wikipedia.org/wiki/Liraglutide> (accessed Jan 02, 2020)
2. <https://www.rxlist.com/victoza-drug.htm> (accessed Jan 02, 2020)

