

# Application News

No. 06-SAIP-LC-067-K

## LCMS-8060NX를 이용한 혈장 중 Sub-pg/mL의 포르모테롤 검출을 위한 선택적 고감도 분석 방법

Highly Sensitive and Selective Method for Estimation of Formoterol at Sub-pg/mL in Human Plasma Using Shimadzu LCMS-8060NX

Avinash Gaikwad<sup>1</sup>, Chaitanya Krishna Atmakuri<sup>1</sup>, Yogesh Arote<sup>1</sup>, Jitendra Kelkar<sup>2</sup>, Pratap Rasam<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>ADC-Shimadzu Analytical (India) Pvt. Ltd., <sup>2</sup>Shimadzu Analytical (India) Pvt. Ltd.,

### 사용자 활용 포인트

- ◆ 최저 정량한계가 0.2 pg/mL인 간단하고 선택적인 고감도 분석 방법
- ◆ 선형 범위 0.2 pg/mL - 100 pg/mL 으로 약물동태학 연구에 적합한 방법
- ◆ 시료 생산성을 높이는 단일 단계 샘플 추출 방법

### ■ 서론

포르모테롤(Formoterol)은 천식과 만성폐쇄성폐질환(COPD) 치료에 기관지 확장제로 사용되는 흡입형 장기 작용 베타2-아드레날린 수용체 작용제이다 (그림1은 포르모테롤의 구조). 기관지 평활근에 작용하여 기도를 확장하고 이완시키며 활성(R;R) 및 비활성(S;S) 거울상 이성질체의 라세미 혼합물로 투여된다. 다른 흡입형 베타 작용제에 비해 포르모테롤의 주요 임상적 이점은 작용이 2~3분으로 빠르게 시작되어 살부타몰 (salbutamol)만큼 빠르며 작용 지속 시간이 길다는 점(12시간)이 결합되었다. 포르모테롤을 단일/다중 투여한 후, 약물의 생체이용률은 매우 낮게 나타나기 때문에 혈장에서 포르모테롤의 선택적 고감도 정량이 요구된다. 이 연구에서는 혈장에서 포르모테롤을 정확하게 정량하기 위한 선택적 고감도 분석 방법을 개발하였다.

따라서 이 뉴스레터에서 낮은 생체이용률 및 낮은 추출 회수율과 같은 문제를 해결하기 위해 새로운 LCMS 방법을 개발하였다. 개발된 방법은 높은 수준의 정확도를 가지고 있으며 인간 혈장에서 매우 낮은 농도의 포르모테롤을 검출할 수 있다. 추출 과정을 더 쉽게 만들고 크로마토그래피를 개선하고 감도를 높이는 데 집중하였다. 이를 통해 인간 혈장 중 포르모테롤에 대한 고감도의 생물학적 LCMS 분석방법을 개발할 수 있었다.

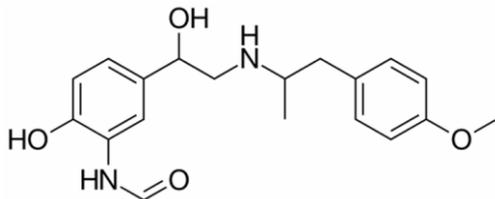


그림 1. 포르모테롤의 구조<sup>1)</sup>

### ■ 특징

- 인간 혈장에서 포르모테롤을 추정하기 위한 정량적 방법을 개발하였고 미국 주요 지침에 따라 부분적으로 검증되었다. (결과는 표 1에 나타냄)
- 매우 낮은 농도에서 분석물을 검출하고 정량하는 고감도 방법이다.
- 샘플 처리 및 데이터 생성을 위한 처리 시간이 빠르다.
- 분석물질의 농도와 분석 반응 사이에 선형 관계를 보여준다.
- 최소한의 단계로 간단한 샘플 준비를 할 수 있다.
- 빠른 분석 구현을 위한 부분적으로 검증된 방법을 사용하였다.

표 1. 분석 방법 밸리데이션 요약

Calibration curve range		0.20 pg/mL - 100 pg/mL
Intra-day precision and accuracy (For LLOQ-QC)	Accuracy (% Nominal)	113.60
	Precision (% RSD)	4.8
Intra-day precision and accuracy (For LQC, MQC and HQC)	Accuracy (% Nominal)	95.89 - 108.82
	Precision (% RSD)	2.10 - 4.70
Global precision and accuracy (For LLOQ-QC)	Accuracy (% Nominal)	105.43
	Precision (% RSD)	11.55
Global precision and accuracy (For LQC, MQC and HQC)	Accuracy (% Nominal)	98.82 - 101.43
	Precision (% RSD)	5.99 - 9.82
Global % recovery	Recovery (%)	62.09
	Precision (% RSD)	5.33
Matrix effect	Mean Matrix Factor	1.01

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

## ■ 실험

### 샘플 준비 및 분석 조건

- 추출 완충액 200  $\mu$ L을 혈장 샘플에 첨가하고, 30초 동안 볼텍싱하여 혼합한다.
- 볼텍싱 후 샘플은 고체상 추출 기술을 사용하였으며, 추출 프로토콜은 아래와 같다.

### 추출 프로토콜

- 컨디셔닝 및 평형화: 메탄올 1mL, 물 1mL 순서로 흘려준다.
- 샘플을 로딩한다.
- 세척 1: 0.05% 암모니아 용액 1 mL 로 세척한다.
- 세척 2: 물 1 mL 로 세척한다.
- 카트리지를 몇 초 동안 건조 시킨다.
- 용출: 100% 아세토니트릴 0.2 mL 로 용출한다.
- HPLC 바이알로 용액을 옮겨 분석한다.

## LCMS-8060NX 분석 조건

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

표 2. 분석 조건 및 기기 파라미터

[HPLC Conditions]	
Column	Shim-pack Velox™ C18 100 × 2.1 mm, 2.7 $\mu$ m (P/N: 227-32009-03)
Mobile Phase	(A) 0.1% formic acid in 5 mM ammonium acetate (B) 0.1% formic acid in acetonitrile
Flow Rate	0.3 mL/min
Column Temp.	50 °C
Injection Volume	20 $\mu$ L
[MS Conditions]	
Ionization	ESI
Interface Voltage and temp.	1 kV and 300 °C
MS Mode	MRM, Positive
DL Temp.	200 °C
Block Heater Temp.	100 °C
CID Gas	270 kPa
Nebulizing Gas Flow	3 L/min
Drying Gas Flow	10 L/min
Heating Gas Flow	10 L/min

표 3. 포르모테롤의 MRM 조건

Compound	MRM (m/z)	CE (V)
Formoterol	345.35 > 149.10	-15.0

## ■ 결과 및 토의

### 분석법 개발

#### - 질량 분석기 최적화 조건

포르모테롤의 효율적인 이온화를 위해 양성 전기 분무 이온화(ESI) 모드에서 수행되었다. 포르모산과 아세트산 암모늄을 포함한 다양한 이동상 조성을 평가하여 포르모테롤 이온화를 최적화하였다. 온도, 모세관 전압, 탈용매 가스 유량과 같은 파라미터를 최적화하여 감도와 재현성을 극대화하였다. 양성자화 된 분자 이온은 가장 높은 감도를 나타낸  $[M+H]^+$ =345.35를 포르모테롤의 전구체로 선택하였고, 정량은 위한 생성 이온으로 m/z 149.1이 가장 풍부하고 특정한 이온으로 확인되었다. 포르모테롤 D6은 m/z 351 > 152 로 설정하였다. 충돌 에너지는 선택된 생성 이온에 대해 가장 높은 신호를 얻도록 최적화되어 견고하고 신뢰할 수 있는 정량화를 보장하였다.

#### - 크로마토그래피 조건

크로마토그래피 기술로 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP HPLC)를 선택하였고, Shimadzu Shim-pack Velox C18, 2.1 x 100 mm, 2.7  $\mu$ m 입자 크기를 사용하여 우수한 피크 모양과 분해능을 얻었다. 이동상(A)는 0.1% 포르산 및 5 mM 아세트산 암모늄 수용액, 이동상(B)는 0.1% 포르산 아세토니트릴로 하여, 10% B 에서 시작하여 5분 동안 90% B까지 증가한 다음 2분간 유지하는 기울기 용리 프로그램을 사용하였다. 유속은 0.3 mL/min 으로 설정하고, 컬럼 온도는 피크 대칭성과 재현성을 개선하기 위해 50°C로 유지하였다. 주입량은 20  $\mu$ L로 최적화 하였다.

#### - 샘플 준비

샘플은 이미 공개된 방법을 약간 변경하여 전처리를 하였다. 포르모테롤은 혈장 단백질에 강하게 결합하기 때문에 최상의 결과를 얻으려면 추출 전에 이 결합을 끊어야 한다. 일반적으로 순수한 메탄올을 사용하지만 샘플이 소수성 상호 작용을 통해 흡착제에 달라붙기 때문에 메탄올을 너무 많이 사용하면 문제가 발생할 수 있다. 따라서 혈장 샘플을 20% 메탄올로 처리하여 단백질을 침전 시켰다. 샘플을 원심분리기에서 회전시킨 후, 맑은 액체를 카트리지에 넣어 세척하였다. 최대 50%의 메탄올을 카트리지에 사용해도 화합물이 손실되지 않는다는 것을 발견하였다. 따라서 50%의 메탄올을 사용하여 원치 않는 물질을 세척했다. 마지막으로 순수한 아세토니트릴을 사용하여 분석 물질을 얻었다. 이 방법을 사용하면 화합물의 60% 이상을 회수하고 원치 않는 물질의 대부분을 제거할 수 있었다.



그림 2. Nexera X2 및 LCMS-8060NX 시스템

**분석법 밸리데이션 요약**

생물학적 분석 방법은 분석물질 또는 내부 표준물질의 보유 시간에 간섭 피크가 관찰되지 않아 허용 가능한 선택성을 나타내었다. 이 방법은 0.2-100 pg/mL의 농도 범위에서 선형적이었으며, 상관 계수( $r^2$ )는 0.9967 이었다. 이 방법의 정확도와 정밀도는 허용 기준 내에 있었으며, 일중 정확도는 95.89%-108.82% 범위이고 일중 정밀도(%CV)는 5.0% 미만이었다. 일간 정확도와 정밀도도 허용 한계 내에 있었으며, 값은 각각 98.82%-101.43% 범위이고 %CV는 10.0% 미만이었다. 매트릭스에서 분석물질을 회수하는 것은 일관적이었으며, 평균 회수율은 62.09% 이었다. 매트릭스 효과 평가 결과, 매트릭스 계수가  $1.04 \pm 0.08$ 로 분석물질 반응에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 종합적으로, 부분 검증된 생물학적 분석 방법은 선택적이고 선형적이며 정확하고 정밀하며 매트릭스 샘플에서 분석물질을 정량화 하는 데 적합한 것으로 입증되었다.

표 4. 선택성

Plasma lot no.	Formoterol		
	Blank Plasma	LLOQ area	% Interference
V1102	0	19,359	0.00
V8245	0	17,936	0.00
V6132	0	17,594	0.00
V11886	0	18,480	0.00
V11782	0	23,070	0.00
V11911	0	19,115	0.00

표 5. 일중 정밀도 및 정확도

Intra-day (n=6)			
Nominal Conc (pg/mL)	Observed Conc (pg/mL)	Accuracy (%)	Precision (%RSD)
LLOQ QC (0.20 pg/mL)	0.23	113.60	4.80
LQC (1.57 pg/mL)	1.71	108.82	4.70
MQC (10.00 pg/mL)	9.59	95.89	4.20
HQC (50.00 pg/mL)	49.95	99.90	2.10

표 5. 일간 정밀도 및 정확도

Inter-day (n=18)			
Nominal Conc (pg/mL)	Observed Conc (pg/mL)	Accuracy (%)	Precision (%RSD)
LLOQ QC (0.20 pg/mL)	0.21	105.43	11.55
LQC (1.57 pg/mL)	1.55	98.82	9.82
MQC (10.00 pg/mL)	10.14	101.43	9.05
HQC (50.00 pg/mL)	50.62	101.24	5.99

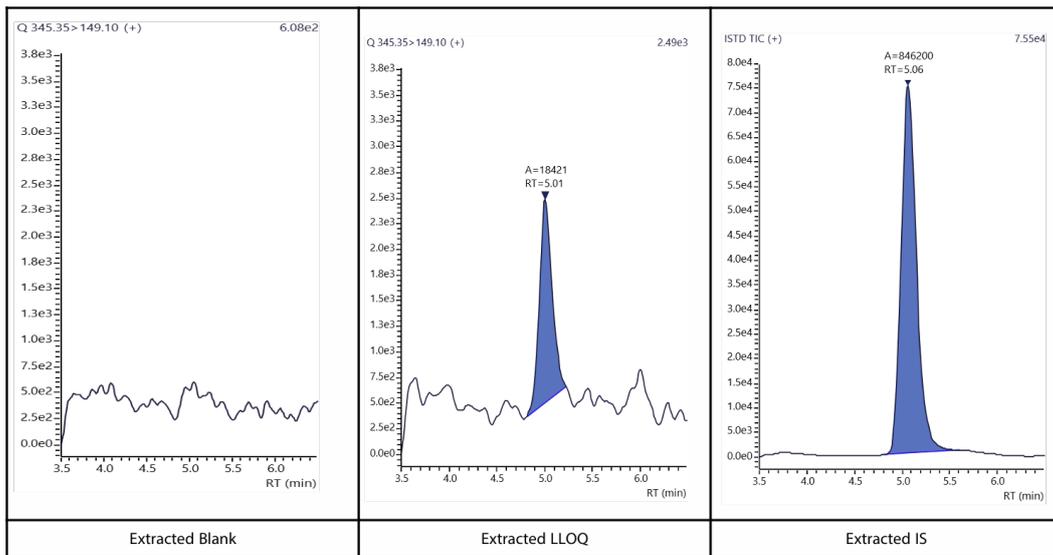


그림 3. 포르모테롤의 크로마토그램 (추출한 공시료, 추출한 LLOQ 및 IS)

표 7. 회수율

Sr.No.	Ext-Sample	PE-Sample	Ext-Sample	PE-Sample	Ext-Sample	PE-Sample
	LQC		MQC		HQC	
1	41,604	64,591	343,507	537,660	1,807,964	2,865,374
2	46,653	72,793	321,080	544,004	1,634,704	2,897,701
3	43,708	73,741	343,610	529,191	1,658,957	2,733,750
4	40,121	68,189	332,688	506,571	1,586,493	2,823,271
5	48,724	67,748	336,506	523,299	1,564,788	2,771,630
6	45,982	64,346	318,991	528,119	1,674,796	2,903,347
AVERAGE	44,465	68,568	332,730	528,141	1,654,617	2,832,512
STD DEV	3,251.35	3976.64	10707.57	12,900.07	86079.02	69,127.51
% RSD	7.31	5.8	3.22	2.44	5.2	2.44
% Recovery	64.85		63.00		58.42	

Note: Ext-Sample는 표준용액을 첨가하여 추출된 샘플을 의미하며, PE-Sample은 추출 후 표준용액을 첨가한 샘플을 의미한다.

표 8. 전반적인 회수율

QC Level	Recovery
LQC (n=6)	64.85
MQC (n=6)	63.00
HQC (n=6)	58.42
Mean	62.09
SD	3.31
%RSD	5.33

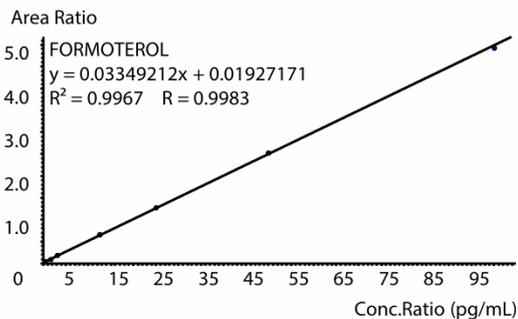


그림 4. 포르모테롤의 검량선

표 9. 매트릭스 효과

Formoterol	Aqueous sample	Post extracted sample	Matrix factor	Formoterol-D6	Aqueous sample	Post extracted sample	Matrix factor	IS Normalized Matrix Effect
LQC	59,541	67,353	0.88	LQC	1,163,053	1,367,542	0.85	1.04
	52,732	73,516	0.72		1,151,676	1,503,566	0.77	0.94
	53,781	72,457	0.74		1,134,897	1,493,306	0.76	0.98
	55,868	74,502	0.75		1,124,465	1,510,743	0.74	1.01
	58,883	73,438	0.80		1,123,858	1,503,789	0.75	1.07
	60,559	68,817	0.88		1,120,498	1,470,161	0.76	1.15
Mean								1.03
SD								0.08
% RSD								7.45

Formoterol	Aqueous sample	Post extracted sample	Matrix factor	Formoterol-D6	Aqueous sample	Post extracted sample	Matrix factor	IS Normalized Matrix Effect
HQC	3,043,248	2,833,021	1.07	HQC	1,226,890	1,181,358	1.04	1.03
	3,052,981	2,909,235	1.05		1,233,019	1,214,213	1.02	1.03
	2,995,738	2,831,373	1.06		1,243,741	1,176,539	1.06	1.00
	3,000,218	2,851,836	1.05		1,248,614	1,161,478	1.08	0.98
	3,030,254	2,846,925	1.06		1,231,934	1,138,770	1.08	0.98
	2,620,942	3,016,549	0.87		995,497	1,055,653	0.94	0.92
Mean								0.99
SD								0.04
% RSD								4.23

■ 결론

이 연구에서는 적은 혈장 용량으로 빠르고 고감도의 LC-MS 방법을 개발하여 인간 혈장 내 포르모테롤의 정량 방법을 검증하였다. 이 방법은 간단한 시료 준비를 이용하고, 짧은 크로마토그래피 분석시간을 제공하여 효율적인 고처리량 분석이 가능하였다. 또한, 우수한 선형성 (0.2 pg/mL-100 pg/mL), 정밀도, 정확도 및 선택성을 포함하여 뛰어난 분석 성능을 나타내었다. 0.2 pg/mL의 낮은 LLOQ와 최소한의 매트릭스 효과를 나타내어 PK 연구를 뒷받침하는 데 가치 있는 분석 도구로 활용될 수 있다.

<References>

- 1) <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.2340731.html>  
(Accessed Feb 13, 2024)



Shimadzu Corporation  
www.shimadzu.com/an/

Shimadzu Scientific Korea  
www.shimadzu.co.kr

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

This publication may contain references to products that are not available in your country. Please contact us to check the availability of these products in your country.

The content of this publication shall not be reproduced, altered or sold for any commercial purpose without the written approval of Shimadzu. See <http://www.shimadzu.com/about/trademarks/index.html> for details.

Third party trademarks and trade names may be used in this publication to refer to either the entities or their products/services, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®".

Shimadzu disclaims any proprietary interest in trademarks and trade names other than its own.

The information contained herein is provided to you "as is" without warranty of any kind including without limitation warranties as to its accuracy or completeness. Shimadzu does not assume any responsibility or liability for any damage, whether direct or indirect, relating to the use of this publication. This publication is based upon the information available to Shimadzu on or before the date of publication, and subject to change without notice.

06-SAIP-LC-067-K