

Application News

No. 01-00433-K

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer LCMS-2050

단일 사중극자 질량 분석기를 이용한 혈청 내 마이코페놀산 및 대사체의 정량 분석

Quantitative Analysis of Mycophenolic Acid and Metabolites in Serum Using a Single Quadrupole Mass Spectrometer

Kohei Yoshikawa and Toshikazu Minohata

사용자 활용 포인트

- ◆ 단일 사중극자 질량 분석기를 사용하면 시료당 2분 안에 마이코페놀산과 글루쿠론산 결합물을 분석할 수 있다.
- ◆ LCMS-2050은 작은 크기로 HPLC 기기와 동일한 설치 공간에서 사용할 수 있다.

■ 서론

면역분석법은 생물학적 시료에서 약물 농도를 측정하는 데 일반적으로 사용된다. 그러나 항체 시약의 비특이적 반응과 로트 대 로트 차이가 관찰되고 있다. 액체 크로마토그래피는 이러한 문제를 극복하는 데 도움이 되며, LC의 주요 요소로 다이오드 어레이 검출기와 형광 검출기가 있다. 그러나 매트릭스와 분리하기 위해 분석 시간이 길어질 수 있으며 감도도 부족할 수 있다.

질량 분석기(MS)는 m/z에 따라 분리할 수 있고 처리량과 감도 측면에서 우수하기 때문에 매우 선택적이다. 따라서 LC/MS는 현재 면역분석법을 대체하는 주류의 분석 방법이 되었다.

이 뉴스레터에서는 단일 사중극자 질량 분석기를 사용하여 혈장에서 마이코페놀산(MPA)과 글루쿠론산 접합체(MPA-G)를 분석하는 예를 제시한다. 단일 사중극자 질량 분석기는 삼중 사중극자 질량 분석기보다 저렴하고 조건 설정이 간단하여 질량 분석법을 처음 접하는 사람도 분석을 시작하기 쉽다.

■ 시료 준비

이 뉴스레터에서는 시약 키트(DOSIMYCO™)를 사용하여 MPA 및 MPA-G 표준물질질을 혈장에 첨가하였다. 여기서는 DOSIMYCO 검량선용 샘플과 대조 샘플을 사용하였으며, 각각의 동위원소 표지 화합물 [$^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3$]-MPA 및 [$^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3$]-MPA-G를 내부 표준물질로 사용하였다.

MPA 및 MPA-G로 혈장 샘플을 전처리한 내용은 그림 1에 나타내었다. 여기서는 내부 표준 물질 25 mL와 DOSIMYCO 추출물 350 mL를 혈장 샘플 50 mL에 첨가하고 교반한 다음 원심분리 후 상층액을 바이알에 옮겨 LC/MS로 분석하였다.

1. Calibrators/Controls 50 μL
2. Add 25 μL of internal standard ([$^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3$]-MPA, [$^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3$]-MPA-G)
3. Add 350 μL of DOSIMYCO extract
4. Vortex (60 sec)
5. Centrifuge (15,000 xg, 7 min)
6. Dispense 200 μL of supernatant to LC vial

그림 1. 프로토콜

■ 조건

Nexera™X3 초고성능 액체 크로마토그래프와 LCMS-2050 단일 사중극자 질량 분석기를 이용하였다(그림 2). LCMS-2050은 가열된 DUIS™ 이온화를 갖춘 소형이며, 사용하기 쉬운 고성능 단일 사중극자 질량 분석기로, ESI와 APCI 방법의 장점과 m/z 2-2000의 질량 범위를 가지고 있다.



그림 2. Nexera™ 및 LCMS-2050

표 1은 HPLC와 MS의 분석 조건을, 표 2는 SIM의 조건을 나타내었다.

표 1. 분석 조건

HPLC Conditions	
System:	NexeraX3
Column:	DOSIMYCO trapping column DOSIMYCO analytical column
Mobile Phases:	DOSIMYCO mobile phases A, B
Flow rate:	A/B 0.8 mL/min (for analysis) C 2 mL/min (for trap)
Column Temp.:	65 °C
Injection Volume:	10 μL
MS Conditions	
Instrument:	LCMS-2050
Ionization:	ESI
Mode:	SIM (Selected Ion Monitoring)
Nebulizing Gas Flow:	3.0 L/min
Drying Gas Flow:	5.0 L/min
Heating Gas Flow:	7.0 L/min
Desolvation Line Temp.:	355 °C
DL Temp.:	100 °C

표 2. SIM 조건

Compound	Polarity	m/z
MPA	+	338.0
[$^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3$]-MPA	+	342.0
MPA-G	+	514.0
[$^{13}\text{C}, ^2\text{H}_3$]-MPA-G	+	518.0

그림 3은 유로 구성을 나타내었다. 주입된 샘플은 트랩 컬럼에 의해 포집되고 분석 컬럼에 의해 분리되어 질량 분석기에 도입된다.

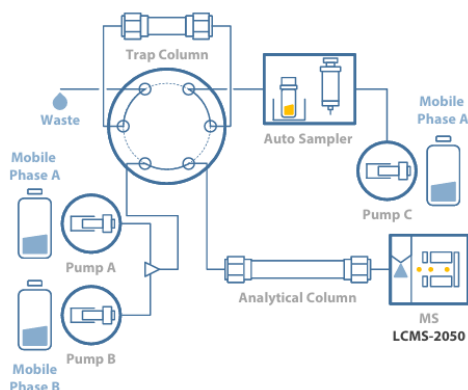


그림 3. 전처리 및 LC-MS 시스템의 유로 구성

■ 검량선의 결과

6개의 검량선 농도에서 3번 반복 분석하였다. 검량선과 검량선의 가장 낮은 농도의 크로마토그램을 그림 4에 나타내었다. 농도 범위 (MPA: 0.1-50 mg/L, MPA-G: 1-250 mg/L)에서 R^2 값이 0.999 이상으로 양호한 선형성 얻었다. 각 농도의 정확도도 양호했으며, 각 성분에게 대해 $100 \pm 10\%$ 이내였다.

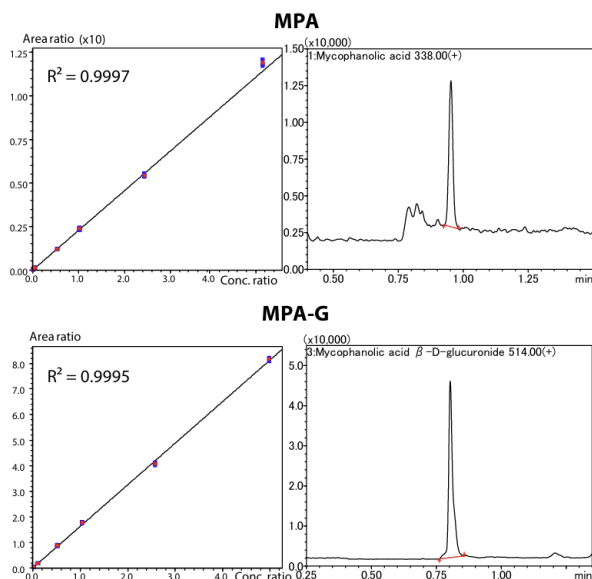


그림 4. 검량선 및 검량선의 가장 낮은 농도의 크로마토그램

■ 대조군 샘플의 결과

3개의 대조군 샘플을 3번 반복 분석하였고, 결과는 표 3에 정리하였다. 모든 성분에 대해 좋은 결과가 얻어졌으며, 정확도는 $100 \pm 10\%$ 이내, 농도 %RSD는 5% 이내였다.

표 3. 대조군의 결과

MPA			
Sample	Conc. (mg/L)	Accuracy % (average, n=3)	%RSD (n=3)
Control 1	1.02	90.4	1.03
Control 2	8.13	92.3	0.19
Control 3	31.6	104.8	1.54

MPA-G			
Sample	Conc. (mg/L)	Accuracy % (average, n=3)	%RSD (n=3)
Control 1	10.1	98.6	0.64
Control 2	43.1	97.8	0.33
Control 3	168.3	103.6	4.03

■ 결론

혈장 내 마이코페놀산(MPA)과 글루루론산 접합체(MPA-G)는 단일 사중극자 질량 분석기를 사용하여 분석하였다. 두 성분 모두 2분의 짧은 분석 시간 내에 설정된 농도 범위에서 좋은 선형성과 정확성을 얻었다. 단일 사중극자 질량 분석기는 높은 감도와 높은 처리량으로 생물학적 샘플에서 약물을 분석하는 데 사용될 수 있음을 확인하였다.

단일 사중극자 질량 분석기는 질량 분석기 경험이 없는 사람이라도 다루기 쉬우며, 비교적 가격이 저렴한 기기이다. 광범위한 약물 응용 분야가 질량 분석법의 개발로 이어질 것으로 예상된다.