

Application News

No. 06-SAIP-LC-069-K

Liquid Chromatograph Mass Spectrometer LCMS-8060

LCMS-8060을 이용한 혈장 중 Sub-pg/mL의 플루티카손 프로피오네이트 고감도 신속 정량법

Rapid, Highly Sensitive and Direct Quantification of Fluticasone Propionate at Sub-pg/mL in Plasma Using LCMS-8060

Avinash Gaikwad, Chaitanya Krishna Atmakuri, Yogesh Arote, Jitendra Kelkar, Pratap Rasam

사용자 활용 포인트

- ◆ 정량한계 0.2 pg/mL 수준의 고감도의 간단한 고속 분석법
- ◆ 단일 단계의 시료 추출로 샘플 전처리 효율을 극대화한 분석법

■ 서론

플루티카손 프로피오네이트는 중등도(medium-potency)의 합성 코르티코스테로이드로, 알레르기성 및 비알레르기성 비염 치료를 위해 비강 스프레이 또는 방울 형태로 투여되거나, 천식 치료를 위해 구강 흡입제로 사용된다. 플루티카손 프로피오네이트의 치료 용량은 혈장에서의 농도가 매우 낮게 나타나기때문에, 약물을 정확하게 정량하기 위한 고감도의 생체시료 분석법이 필요하다.

Shimadzu Application Development Centre (ADC), Navi Mumbai는 0.2 pg/mL 수준의 가장 낮은 정량 한계(LLOQ)를 가진 고감도의 분석법을 개발하였고 그 유효성을 검증하였다. 이 분석법은 단일 단계의 시료 추출 기법과 직접 주입 방식을 사용하여 주변 환경에서 유래한 오염을 제거한다. 위 요소들은 고속 분석을 통한 약리학적 연구의 생산성을 높이는 데 기여하였다.

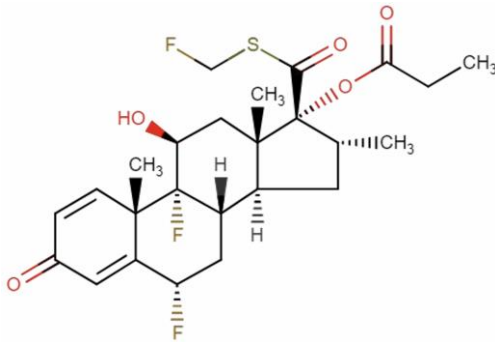


그림 1. 플루티카손 프로피오네이트 구조

■ 주요 장점

- 인간 혈장 중 플루티카손 프로피오네이트를 정량하기 위한 검증된 분석법이 미국의 주요한 가이드라인에 맞춰 개발되었다^[1]. 그 결과는 표 1에 제시되었다.
- 빠른 단일 단계 추출 전처리와 LCMS-8060 시스템의 초고속 기술을 사용하여 분석 처리량이 향상되었다.
- 이온화 과정과 이온 가이드 기술 최적화를 통해 이온 생성 및 전이가 개선되어, 플루티카손 프로피오네이트를 선택적으로 0.2 pg/mL까지 고감도의 정량이 가능하였다.
- 혈장 시료 부피가 최적화되어 시료 낭비를 최소화하고 질량 분석기의 수명을 연장할 수 있었다.
- 크로마토그래픽 분석법이 최적화되어 내인성 간섭을 제거하고 분석물질과 중수소로 표지된 내부표준물질의 간섭을 줄였다.

- 이 분석법은 미국 주요 가이드라인에 따라 아래 항목에 대해 검증되었다.

- ✓ 선택성
- ✓ 직선성
- ✓ 일간 및 일내 정밀도와 정확도
- ✓ 회수율
- ✓ 매트릭스 효과
- ✓ 안정성 시험(장기간 안정성 제외)

표 1. 분석법의 유효성 검증결과 요약

검정곡선 범위	0.20 pg/mL - 120.00 pg/mL		
일내 정확도와 정밀도 (LLOQ QC)	Accuracy(% Nominal)	100.00	
	Precision(%RSD)	16.33	
일내 정확도와 정밀도 (LQC, MQC, HQC)	Accuracy(% Nominal)	100.24 - 107.89	
	Precision(%RSD)	4.98 - 7.41	
총 정확도와 정밀도 (LLOQ QC)	Accuracy(% Nominal)	102.50	
	Precision(%RSD)	18.33	
총 정확도와 정밀도 (LQC, MQC, HQC)	Accuracy(% Nominal)	102.17 - 108.34	
	Precision(%RSD)	7.73 - 11.14	
총 % 회수율	Recovery(%)	64.29	
	Precision(%RSD)	7.26	
매트릭스 효과	LQC	1.06	
	HQC	0.95	
매트릭스 실온 안정성 (6.0 시간)	% Change	LQC=-4.92	HQC=0.81
	Precision(% RSD)	LQC=6.13	HQC=3.05
	Accuracy(% Nominal)	LQC=96.85	HQC=106.11
매트릭스 오토샘플러 안정성(30.0 시간)	% Change	LQC=-3.12	HQC=-1.63
	Precision(% RSD)	LQC=12.83	HQC=5.07
	Accuracy(% Nominal)	LQC=100.32	HQC=110.57
매트릭스 동결-해동 안정성(3 주기)	% Change	LQC=-4.8	HQC=6.12
	Precision(% RSD)	LQC=8.34	HQC=7.33
	Accuracy(% Nominal)	LQC=96.98	HQC=111.70

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

■ 실험

1. 시료 전처리와 분석조건

플루티카손 프로피오네이트 표준물질과 품질관리 시료는 K2EDTA 처리된 인간 혈장에 첨가하여 준비되었다. 검정곡선은 0.20 pg/mL에서 120.00 pg/mL 범위이며(그림 4 참고), 품질관리 시료는 LLOQ QC(0.22 pg/mL), LQC(1.68 pg/mL), MQC(26.28 pg/mL), HQC(105.12 pg/mL) 농도로 조제되었다. 500 µL의 인간 혈장 시료에 50 µL의 650.00 pg/mL 플루티카손 프로피오네이트-D5와 400 µL의 LC-MS 등급 물을 첨가한 후, SPE 정제 과정을 진행하였다. 시료는 컨디셔닝을 한 역상 SPE 카트리지에 로딩 하였고, 20% 아세토니트릴 함유 수용액으로 세척한 뒤, 0.3 mL의 50% 메탄올 함유 수용액으로 용출하였다. 용출액은 LC-MS/MS에 직접 주입하여 분석을 진행하였다.

2. LCMS-8060 기기 파라미터

분석조건 및 기기의 파라미터는 표 2에, MRM 조건은 표 3에 나타내었다.

표 2. 분석 조건 및 기기 파라미터

Parameter	HPLC
Column	Shim-pack™ GIST C18, 3 µm, 2.10x50 mm (P/N: 227-30008-03)
Mobile phase	Pump A-0.1% Ammonia in Water Pump B-Acetonitrile
Flow rate	0.5 mL/min
Oven Temp	50 °C
Injection volume	50 µL
Parameter	MS
Interface	ESI
Interface Voltage and temp	5 kV and 300 °C
MS Mode	MRM, Positive
Heat Block Temp	400 °C
DL Temp	150 °C
CID Gas	270 kPa
Nebulizing Gas	2 L/min
Drying Gas	10 L/min
Heating Gas	10 L/min

표 3. MRM 조건과 플루티카손 프로피오네이트의 LC-MS/MS 파라미터

Compound	Precursor(m/z)	Product(m/z)	CE(V)
Fluticasone Propionate	501.00	293.05	-20.0
Fluticasone Propionate-D5	506.00	313.10	-20.0



그림 2. Nexera™ X2와 LCMS-8060 시스템

■ 결과 및 토의

1. 분석법 개발

초기 실험에서는 양이온 및 음이온 ESI 모드에서 플루티카손 프로피오네이트의 최적화를 진행하였다. 양이온 모드에서는 m/z 501.0의 [M+H]⁺ 이온이 형성되었으며, 이로부터 m/z 293.05의 주요 생성 이온이 나타나 신호 대 잡음 비(S/N 비)가 향상되었다. 반면, 음이온 모드에서는 생성 이온 피크의 S/N 비가 낮게 나타났다.

내부 표준물질(I.S.)은 m/z 506.0에서 분자 이온을 나타내었다. 전구체 이온(m/z 501.0 및 506.0)은 충돌 셀로 도입되어 생성 이온 스펙트럼을 형성하였다. 플루티카손 프로피오네이트와 플루티카손 프로피오네이트-D5 모두 공통적인 조각패턴을 보였으며, 생성 이온 스펙트럼의 베이스 피크(base peak)는 각각 m/z 293.05와 313.1이 관찰되었다. 생성 이온의 신호 강도가 가장 높게 나타난 충돌 에너지는 -20 eV였다. 플루티카손 프로피오네이트 및 플루티카손 프로피오네이트-D5의 모니터링을 위해 선택된 전이조건은 각각 m/z 501.0→293.05 및 506.0→313.1 이었다.

인간 혈장에서 플루티카손 프로피오네이트의 초저 검출한계를 달성하기 위해 다양한 HPLC 컬럼과 그라디언트 프로그램을 시험하여 반응 계수(Response factor)를 최적화하였다.

초기 조건은 LLOQ 1 pg/mL인 기존의 LC-MS/MS 분석법을 기반으로 설정되었다. 분석법 개발 과정에서 총 다섯 가지 HPLC 컬럼을 평가하였으며, 그 중 Shim-pack GIST C18 컬럼이 더 높은 반응계수, 향상된 감도, 그리고 우수한 분해능을 제공하는 것으로 나타났다. 분석 대상물질은 그라디언트 구간에서 컬럼으로부터 용출되었다.

SPE 과정 최적화는 최대 효율과 회수율 달성에 중점을 두었다. 주요 단계는 카트리지의 컨디셔닝 단계와 물로 세척하는 것이었다. 세척 및 용출을 위한 유기용매 농도를 조정하면서 최적 조건을 위해 다양한 용매 부피와 재용해 용매를 시험하였다. 이상적인 유기 용매 농도는 20% 아세토니트릴 수용액을 세척 용액으로, 50% 메탄올 수용액을 용출 용액으로 사용하는 것이었다. 용출액은 LC-MS/MS에 직접 주입하여 분석을 진행하였다.

2. 유효성 검증

연구 초기 단계에서는 분석법과 기기 성능에 대한 사전 평가가 수행되었다. 검정 범위 전반에 걸쳐 일관되게 높은 상관 계수($r^2 > 0.9900$)가 관찰되어 신뢰할 수 있는 분석법인 것을 입증하였다. 품질관리 시료에 대한 일내 및 일간 정밀도와 정확도 데이터는 표 5와 표 6에 요약되어 있다.

이러한 데이터는 LC-MS/MS 분석법의 일관성과 우수한 신뢰도를 보여주며, 정량한계(LLOQ)에서 좋은 정확도(100% ±20%)와 정밀도(<20%)를 나타내었다. 저농도(LQC), 중간농도(MQC), 고농도(HQC)에서 정확도(100 ±15%)와 정밀도(<15%)는 허용 범위 내에 있으며, 검증 기준을 충족하였다. 이 MRM 조건은 LLOQ가 0.2 pg/mL이고 신호 대 잡음비(S/N)가 >15로, 문헌에서 보고된 이전 분석법(LLOQ 1 pg/mL)보다 현저히 높은 감도를 제공한다^[2]. 따라서 MRM 분석은 플루티카손 프로피오네이트에 특이적인 생성 이온을 모니터링하여 추가적인 선택성을 제공할 뿐만 아니라, 이 뉴스레터에서 나타난 것 같이 감도와 회수율을 증가시켰다. 제시된 분석법은 [2]에서 보고된 분석법보다 고감도이다. 양이온 모드에서 ESI 이온화 방법을 사용하는 이 분석법은 소동 부가물 간섭에 취약한 기기를 사용하여 플루티카손 프로피오네이트를 정량하는 대안이 된다. 유효성 검증 결과의 일부는 아래에 나타내었다.

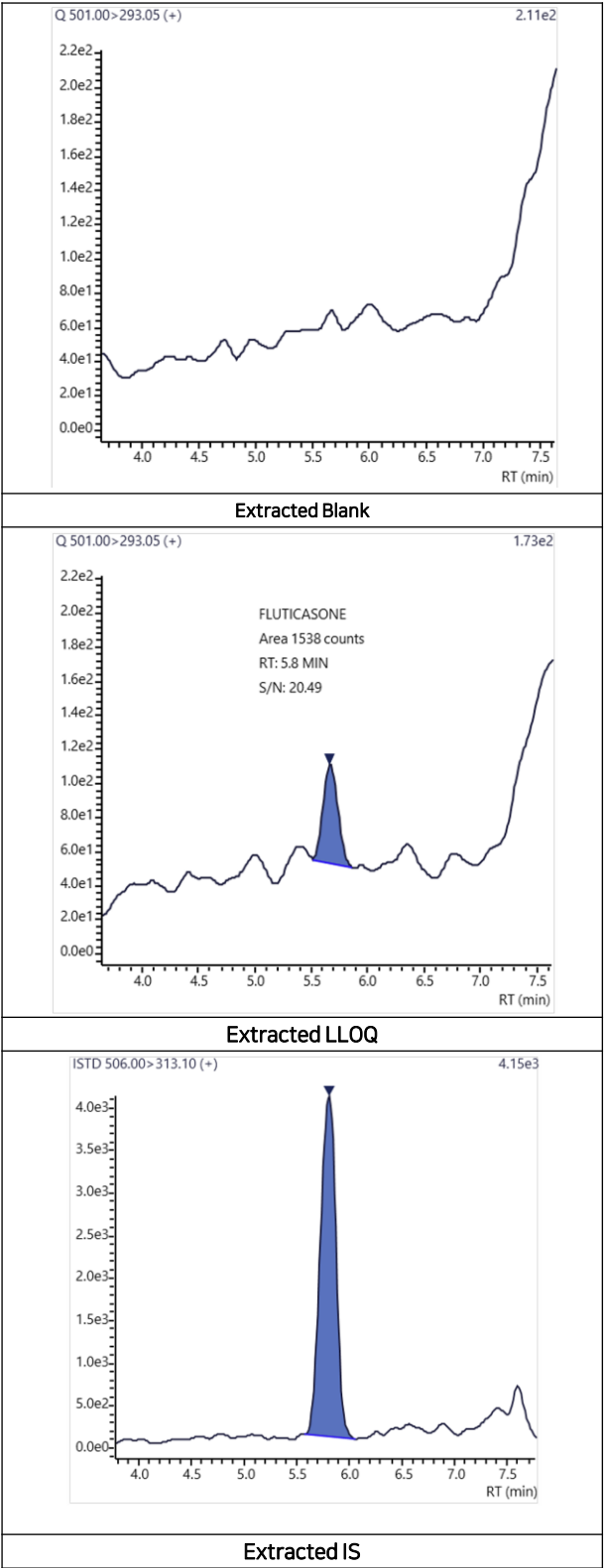


그림 3. 플루티카손 프로피오네이트의 크로마토그램 (공시료, LLOQ 시료, IS 시료)

● 선택성

이 분석법의 선택성은 다양한 혈장에서 평가되었고, 플루티카손 프로피오네이트와 플루티카손 프로피오네이트-D5 모두에서 매트릭스 간섭을 평가하였다(그림 3 참조). 플루티카손 프로피오네이트의 LLOQ 영역에서의 간섭비율은 10.00% 미만으로 나타났으며, 이는 아래 표 4에서 확인할 수 있다.

표 4. 선택성

Plasma lot no.	Fluticasone propionate		
	Blank Plasma	LLOQ area	% Interference
P4458	46	493	9.33
P4791	0	689	0
P5515	0	627	0
P5517	68	798	8.52
P5518	0	571	0

Plasma lot no.	Fluticasone propionate-D5		
	Blank Plasma	LLOQ area	% Interference
P4458	122	66,851	0.18
P4791	220	70,195	0.31
P5515	153	51,592	0.30
P5517	143	53,529	0.27
P5518	374	59,237	0.63

● 직선성

플루티카손 프로피오네이트의 검정곡선은 0.2 - 120.0 pg/mL 범위에서 직선성을 나타내었으며, 상관계수(r^2)는 0.99를 초과하였다. 대표적인 표준곡선 방정식은 $y=0.1641828x+0.01882287$ 로 나타났으며, 가중치 인자(weighted factor)는 $1/x^2$ 를 사용하였다. 잔차는 농도에 따른 변동 없이 일관된 직선성을 확인할 수 있었으며, 이는 그림 4에 나타난다.

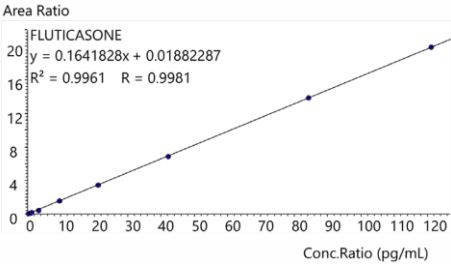


그림 4. 검정곡선

● 일내 및 일간 정밀도와 정확도

일내 및 일간 정밀도와 정확도는 3일 동안 4개의 농도 수준에서 QC 시료의 6회 반복 측정을 통해 평가되었다. 표 5와 6에 자세히 나와 있는 이 결과는 정밀도에서 평균 RSD 값이 15% 미만이며, 정확도는 LQC, MQC, HQC에서 85%에서 115% 사이로 나타났다. LLOQ QC에서는 정밀도 RSD 값이 20% 미만이고, 정확도는 80%에서 120% 사이였다.

표 5. 일내 정밀도와 정확도

Intra-day (n=6)			
Nominal Conc(pg/mL)	Observed Conc(pg/mL)	Accuracy(%)	Precision (% RSD)
LLOQ QC(0.220 pg/mL)	0.2200	100.00	16.33
LQC(1.682 pg/mL)	1.6860	100.24	6.60
MQC(26.280 pg/mL)	28.3547	107.89	7.41
HQC(105.120 pg/mL)	107.7737	102.52	4.98

표 6. 일간 정밀도와 정확도

Inter-run (n=18)			
Nominal Conc(pg/mL)	Observed Conc(pg/mL)	Accuracy(%)	Precision (% RSD)
LLOQ QC(0.220 pg/mL)	0.2255	102.50	18.33
LQC(1.682 pg/mL)	1.7184	102.17	7.73
MQC(26.280 pg/mL)	28.4715	108.34	10.51
HQC(105.120 pg/mL)	112.3098	106.84	11.14

● 회수율

플루티카손의 회수율은 세 가지 농도수준(LQC, MQC, HQC)에서 추출된 시료와 추출 후 스파이크된 시료의 피크 면적을 비교하여 결정되었다. 플루티카손의 평균 회수율은 60.61%에서 69.54% 사이로 나타났으며, 이는 일관되고 재현 가능한 추출 효율을 보여준다(표 7 참조). 이러한 결과는 시료 전처리법이 효율적이며, 일상적인 생체 분석에 모든 수준에서 회수율의 정밀도가 신뢰할 수 있음을 확인시켜 준다는 것을 나타낸다.

표 7. 회수율 요약

QC level	Recovery
LQC(n=6)	69.54
MQC(n=6)	60.61
HQC(n=6)	62.70
Mean	64.29
SD	4.67
%RSD	7.26

● 매트릭스 효과

매트릭스 효과는 플루티카손 프로피오네이트와 플루티카손 프로피오네이트-D5에 대해 LQC와 HQC 시료를 이용하여 시험하였다. 매트릭스 인자(Matrix factor)는 각각 LQC와 HQC 시료에서 1.06과 0.95로 나타났다. 매트릭스 효과에 대한 대표적인 데이터는 표 8에 나타내었다. 이 결과는 인간 혈장에서 플루티카손 프로피오네이트의 정량분석을 위한 분석법의 적합성을 확인시켜 준다.

표 8. 매트릭스 인자

Fluticasone Propionate	Aqueous standard	Post extracted sample	Matrix factor
LQC	4792	5550	1.16
	5320	5709	1.07
	4789	5331	1.11
	5450	5389	0.99
	5333	5522	1.04
	5292	5157	0.97
Mean	1.06		
SD	0.07		
%RSD	6.77		

Fluticasone Propionate	Aqueous standard	Post extracted sample	Matrix factor
LQC	365280	348228	0.95
	352894	337526	0.96
	348430	350845	1.01
	362809	342762	0.94
	364014	326980	0.90
	357803	336132	0.94
Mean	0.95		
SD	0.03		
%RSD	3.68		

● 캐리오버 효과

캐리오버는 추출된 공시료, 추출된 최고 농도의 검량곡선용 시료, 추출된 공시료, 추출된 최저 농도의 검량곡선용 시료 순서로 시료를 주입하여 평가하였다. 최고 농도의 검량곡선용 시료 후 추출된 공시료에서 분석 물질의 머무름 시간과 MRM 전이에서 캐리오버가 없음을 확인하였다.

■ 결론

LCMS-8060 과 특별한 시료 전처리법은 플루티카손 프로피오네이트의 고난도 생체 분석에서 우수한 감도를 제공한다. 이러한 분석의 중요성은 기술적인 도전 뿐만 아니라 제약산업에 미치는 상업적인 영향 면에서도 매우 크다. 우리는 손쉬운 솔루션을 제공함으로써 외부 연구소와 협력하여 과학적 목표를 달성할 수 있도록 지원하고자 한다.

■ 참고자료

- 1) Food and Drug Administration, Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, 2018.
<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry> (accessed Nov 27, 2024).
- 2) Ji AJ, Zhou D, Zhang S, Cawley MA, Fang X, Wu J. Ultrasensitive and automated 1 pg/ml fluticasone propionate assay in human plasma using LC-MS/MS. Bioanalysis.2013Feb;5(4):42335.doi:10.4155/bio.12.338.P MID: 23414376.



SHIMADZU

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-069-K