

Application News

No. 01-01143-K

Triple Quadrupole Liquid Chromatograph Mass Spectrometer

LC-MS/MS를 이용한 전혈 중 27종 항당뇨병제 동시분석

Analysis of 27 Antidiabetic Drugs in Whole Blood by LC-MS/MS

Toshinari Ishii¹, Tadashi Ogawa^{2,3}, Yuki Sakamoto¹, Tomohito Matsuo^{2,3}, Masae Iwai^{2,3}, Katsutoshi Kubo^{2,4}, Mamiko Fukuta^{2,3}

¹ Shimadzu Corporation, ² Aichi Medical University Department of Legal Medicine,

³ Aichi Medical University Poison Analysis Center,

⁴ Aichi Gakuin University Department of Oral Pathology and Forensic Odontology, School of Dentistry

사용자 활용 포인트

- ◆ 다양한 화학 구조를 가진 27종 항당뇨병제를 단일 분석으로 정량할 수 있다.
- ◆ 인간의 전혈에서 항당뇨병제를 0.1 ng/mL 농도까지 고감도로 검출할 수 있다.
- ◆ 본 분석은 기존의 "LC/MS/MS Forensic Toxicology Database"와 동일한 워크플로우 및 분석 조건에서 수행할 수 있다.

■ 서론

당뇨병 치료에 처방되는 항당뇨병제(혈당 강하제)는 비구아니드, 설폰닐우레아(SU), DPP-4 억제제, SGLT2 억제제 등 작용 기전이 다른 다양한 계열의 약물로 구성된다. 이러한 약물을 과다 복용하거나 여러 성분을 병용할 경우, 심각한 저혈당증이 발생할 수 있다. 이는 의식 상실로 이어질 뿐만 아니라 낙상, 교통사고 등 2차 대형 사고를 유발할 수 있어 각별한 주의가 필요하다. 최근 소셜 미디어(SNS)를 중심으로 일부 항당뇨병제가 '체중 감량제'로 잘못 홍보되면서, 미용이나 다이어트 목적으로 오남용되는 사례가 심각한 사회적 문제로 대두되었다. 특히 해외 직구 등 개인 수입을 통해 약물을 쉽게 구할 수 있게 되면서, 의사의 처방이나 감독 없는 과다 복용 및 병용 투여에 따른 부작용 우려가 더욱 커지고 있다.

본 뉴스레터에서는 LCMS-8050RX를 활용하여, 혈액 중에 존재하는 27종 항당뇨병제를 동시 분석할 수 있는 LC-MS/MS 분석법의 유효성검증 결과를 소개한다.



그림 1. Nexera™ X3 + LCMS-8050RX

■ 시료 전처리

인간의 전혈과 초순수에 27종의 항당뇨병제를 첨가하여 첨가 시료 및 표준 시료를 조제하였다. 화합물 정보는 표 1에 요약되어 있다. 시료 전처리는 Micro Volume QuEChERS 키트(P/N: S225-37870-91)를 사용하여 수행되었다. 내부 표준물질(ISTD)로는 메탄올에 희석한 Diazepam-d5(0.2 µg/mL)를 조제하여 사용하였다. 시료 전처리의 전체적인 워크플로우는 그림 2에 나타나 있다.

Micro Volume QuEChERS 키트 초순수 200 µL, 아세토니트릴 300 µL, 전혈 100 µL, 내부 표준물질(ISTD) 20 µL를 첨가하고 철저히 혼합하였다. 원심분리 후 상층액을 수집하여 질소로 증발 건조시켰다. 남아 있는 잔류물을 20% 메탄올 100 µL로 재용해하여, 이 최종 용액을 분석 시료로 사용하였다.



그림 2. Micro Volume QuEChERS Kit를 사용한 시료 전처리 과정

표 1. 항당뇨병제 화합물 정보

#	Name	Formula	M.W.	Drug class
1	Metformin	C4H11N5	129.1	Biguanide
2	Imeglimin	C6H13N5	155.12	Glimin
3	Buformin	C6H15N5	157.13	Biguanide
4	Vildagliptin	C17H25N3O2	303.19	DPP-4 inhibitor
5	Anagliptin	C19H25N7O2	383.21	DPP-4 inhibitor
6	Alogliptin	C18H21N5O2	339.17	DPP-4 inhibitor
7	Saxagliptin	C18H25N3O2	315.19	DPP-4 inhibitor
8	Trelagliptin	C18H20FN5O2	357.16	DPP-4 inhibitor
9	Omarigliptin	C17H20F2N4O3S	398.12	DPP-4 inhibitor
10	Sitagliptin	C16H15F6N5O	407.12	DPP-4 inhibitor
11	Teneligliptin	C22H30N6O5	426.22	DPP-4 inhibitor
12	Linagliptin	C25H28N8O2	472.23	DPP-4 inhibitor
13	Chlorpropamide	C10H13ClN2O3S	276.03	Sulfonylurea
14	Pioglitazone	C19H20N2O3S	356.12	Thiazolidinedione
15	Acetohexamide	C15H20N2O4S	324.11	Sulfonylurea
16	Empagliflozin	C23H27ClO7	450.14	SGLT2 inhibitor
17	Gliclazide	C15H21N3O3S	323.13	Sulfonylurea
18	Tofogliflozin	C22H26O6	386.17	SGLT2 inhibitor
19	Ipragliflozin	C21H21FO5S	404.11	SGLT2 inhibitor
20	Luseogliflozin	C23H30O6S	434.18	SGLT2 inhibitor
21	Dapagliflozin	C21H25ClO6	408.13	SGLT2 inhibitor
22	Glibenclamide	C23H28ClN3O5S	493.14	Sulfonylurea
23	Mitiglinide	C19H25NO3	315.18	Glinide
24	Canagliflozin	C24H25FO5S	444.14	SGLT2 inhibitor
25	Glimepiride	C24H34N4O5S	490.22	Sulfonylurea
26	Nateglinide	C19H27NO3	317.2	Glinide
27	Repaglinide	C27H36N2O4	452.27	Glinide

■ 분석 조건

LC-MS/MS 분석 조건은 표 2에, 각 화합물에 대한 MRM 조건은 표 3에 제시하였다. 그림 3은 이러한 조건에서 얻은 MRM 크로마토그램을 보여준다.

표 2. LC-MS/MS 기기 분석 조건

System	: Nexera X3
Column	: Kinetex XB-C18 (100 mm × 2.1 mm I.D., 2.6 µm) (Phenomenex, P/N : 00D4496-AN)
Temperature	: 40 °C
Injection Volume	: 1 µL
Mobile phase	: 10 mM Ammonium Formate + 0.1% Formic acid Water 10 mM Ammonium Formate + 0.1% Formic acid MeOH
Flow rate	: 0.3 mL/min
Time program	: Refer to LC/MS/MS Forensic Toxicology (%B) Database
System	: LCMS-8050RX (Corespray ESI)
Nebulizing gas	: 3 L/min
Drying gas	: 10 L/min
Heating gas	: 10 L/min
DL temp.	: 250 °C
Heat block temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 300 °C

표 3. 항당뇨병제의 머무름 시간과 MRM 조건

#	Name	Retention time (min)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)
1	Metformin	0.777	[M+H] ⁺ 131.1	> 60.0 (CE -14 V), 71.1 (CE -23 V), 85.0 (CE -14 V)
2	Imeglimin	1.810	[M+H] ⁺ 156.1	> 113.1 (CE -19 V), 71.0 (CE -30 V), 68.0 (CE -35 V)
3	Buformin	2.210	[M+H] ⁺ 158.1	> 60.0 (CE -15 V), 57.0 (CE -24 V), 116.2 (CE -18 V)
4	Vildagliptin	2.618	[M+H] ⁺ 304.2	> 154.1 (CE -18 V), 97.0 (CE -32 V), 151.1 (CE -22 V)
5	Anagliptin	3.630	[M+H] ⁺ 384.2	> 160.0 (CE -31 V), 231.1 (CE -18 V), 132.0 (CE -51 V)
6	Alogliptin	3.840	[M+H] ⁺ 340	> 116.1 (CE -33 V), 323.1 (CE -18 V), 266.6 (CE -21 V)
7	Saxagliptin	3.871	[M+H] ⁺ 316.2	> 180.1 (CE -20 V), 119.2 (CE -45 V), 163.0 (CE -37 V)
8	Trelagliptin	3.965	[M+H] ⁺ 358.2	> 341.1 (CE -20 V), 107.1 (CE -60 V), 134.1 (CE -35 V)
9	Omarigliptin	4.146	[M+H] ⁺ 399.1	> 153.1 (CE -29 V), 127.0 (CE -58 V), 382.1 (CE -19 V)
10	Sitagliptin	4.403	[M+H] ⁺ 408.1	> 235.2 (CE -18 V), 174.0 (CE -28 V), 193.0 (CE -25 V)
11	Teneligliptin	5.042	[M+H] ⁺ 427.2	> 243.2 (CE -28 V), 68.1 (CE -50 V), 267.2 (CE -28 V)
12	Linagliptin	5.216	[M+H] ⁺ 473.2	> 420.2 (CE -23 V), 403.1 (CE -28 V), 158.1 (CE -61 V)
13	Chlorpropamide	5.838	[M+H] ⁺ 277	> 111.0 (CE -31 V), 175.0 (CE -19 V), 192.0 (CE -20 V)
14	Pioglitazone	5.978	[M+H] ⁺ 357.1	> 134.0 (CE -28 V), 119.0 (CE -47 V), 106.0 (CE -47 V)
15	Acetohexamide	6.081	[M+H] ⁺ 325.1	> 243.0 (CE -12 V), 119.1 (CE -28 V), 183.0 (CE -20 V)
16	Empagliflozin	6.416	[M+NH4] ⁺ 468.2	> 71.1 (CE -27 V), 355.0 (CE -14 V), 397.0 (CE -15 V)
17	Gliclazide	6.538	[M+NH4] ⁺ 324.1	> 127.1 (CE -18 V), 110.0 (CE -22 V), 91.0 (CE -40 V)
18	Tofogliflozin	6.656	[M+H] ⁺ 387.2	> 267.1 (CE -15 V), 119.0 (CE -30 V), 369.1 (CE -10 V)
19	Ipragliflozin	6.721	[M+NH4] ⁺ 422.1	> 285.1 (CE -15 V), 151.0 (CE -24 V), 369.1 (CE -12 V)
20	Luseogliflozin	6.789	[M+NH4] ⁺ 452.2	> 135.0 (CE -21 V), 417.2 (CE -12 V), 269.1 (CE -24 V)
21	Dapagliflozin	6.831	[M+NH4] ⁺ 426.2	> 135.1 (CE -21 V), 355.1 (CE -14 V), 166.9 (CE -26 V)
22	Glibenclamide	7.193	[M+H] ⁺ 494.1	> 369.0 (CE -14 V), 169.1 (CE -33 V), 304.0 (CE -26 V)
23	Mitiglinide	7.215	[M+H] ⁺ 316.2	> 298.1 (CE -16 V), 126.1 (CE -23 V), 145.0 (CE -30 V)
24	Canagliflozin	7.315	[M+NH4] ⁺ 462.2	> 191.0 (CE -25 V), 267.2 (CE -20 V), 249.0 (CE -19 V)
25	Glimepiride	7.437	[M+H] ⁺ 491.2	> 352.1 (CE -14 V), 126.0 (CE -27 V), 103.1 (CE -44 V)
26	Nateglinide	7.564	[M+H] ⁺ 318.2	> 166.1 (CE -13 V), 120.1 (CE -22 V), 125.2 (CE -22 V)
27	Repaglinide	8.006	[M+H] ⁺ 453.3	> 230.2 (CE -30 V), 162.1 (CE -21 V), 174.1 (CE -45 V)

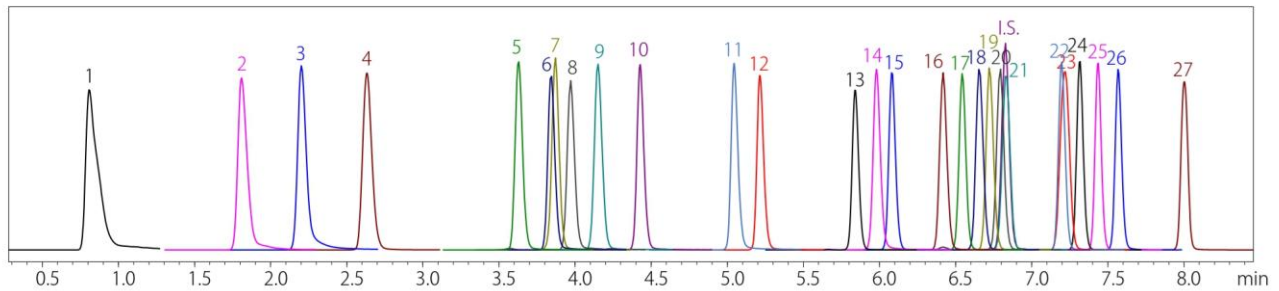


그림 3. 27종 항당뇨병제와 diazepam-d5 (ISTD)의 MRM 크로마토그램

1: Metformin, 2: Imeglimin, 3: Buformin, 4: Vildagliptin, 5: Anagliptin, 6: Alogliptin, 7: Saxagliptin, 8: Trelagliptin, 9: Omarigliptin, 10: Sitagliptin, 11: Teneligliptin, 12: Linagliptin, 13: Chlorpropamide, 14: Pioglitazone, 15: Acetohexamide, 16: Empagliflozin, 17: Gliclazide, 18: Tofogliflozin, 19: Ipragliflozin, 20: Luseogliflozin, 21: Dapagliflozin, 22: Glibenclamide, 23: Mitiglinide, 24: Canagliflozin, 25: Glimepiride, 26: Nateglinide, 27: Repaglinide, I.S.: Diazepam-d5

■ 유효성 검증 결과

직선성과 민감도를 평가하기 위해 전혈 내 농도가 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10, 50, 100, 500 ng/mL 이 되도록 교정 표준 물질을 첨가하였다. 검량 범위와 상관계수는 표 4에 요약되어 있다. 오마리글립틴, 피오글리타존, 레파글리니드 3종 화합물은 0.1~100 ng/mL 범위에서, 아나글립틴, 알로글립틴, 삭사글립틴, 트렐라글립틴, 시타글립틴, 아세토헥사미드, 글리벤클라미드, 미티글리니드, 나테글리니드 9종 화합물은 0.1~200 ng/mL 범위에서, 나머지 15종 화합물은 0.1~500 ng/mL 범위에서 우수한 직선성 ($R > 0.995$)을 나타냈다. 또한, 모든 화합물에서 0.1 ng/mL의 낮은 농도에서도 피크가 검출되었다. 각 화합물에 대한 MRM 크로마토그램은 그림 4에 나타내었다.

정확도와 반복성을 평가하기 위해 표준 용액을 전혈에 20 ng/mL 농도로 첨가하였다 ($n = 5$). 모든 화합물의 정확도는 80~120% 범위 내로 확인되었다.(그림 5). 반복성은 %RSD로 나타냈을 때 $\leq 7.9\%$ 였으며, 이는 본 분석법이 전혈 분석에 충분한 정밀도를 제공함을 의미한다.

표 4. 검량 범위 및 직선성

Name	Calibration range (ng/mL)	R	R ₂
Metformin	0.1-500	0.9956	0.9912
Imeglimin	0.1-500	0.9991	0.9981
Buformin	0.1-500	0.9986	0.9972
Vildagliptin	0.1-500	0.9991	0.9982
Anagliptin	0.1-200	0.9998	0.9996
Alogliptin	0.1-200	0.9990	0.9979
Saxagliptin	0.1-200	0.9976	0.9953
Trelagliptin	0.1-200	0.9987	0.9974
Omarigliptin	0.1-100	0.9958	0.9916
Sitagliptin	0.1-200	0.9999	0.9999
Teneligliptin	0.1-500	0.9992	0.9983
Linagliptin	0.1-500	0.9980	0.9961
Chlorpropamide	0.1-500	0.9993	0.9986
Pioglitazone	0.1-100	0.9998	0.9995
Acetohexamide	0.1-200	0.9999	0.9997
Empagliflozin	0.1-500	0.9999	0.9999
Gliclazide	0.1-500	0.9995	0.9990
Tofogliflozin	0.1-500	0.9997	0.9993
Ipragliflozin	0.1-500	0.9983	0.9966
Luseogliflozin	0.1-500	0.9964	0.9928
Dapagliflozin	0.1-500	0.9994	0.9988
Glibenclamide	0.1-200	0.9995	0.9989
Mitiglinide	0.1-200	0.9998	0.9996
Canagliflozin	0.1-500	0.9995	0.9989
Glimepiride	0.1-500	0.9986	0.9971
Nateglinide	0.1-200	0.9993	0.9985

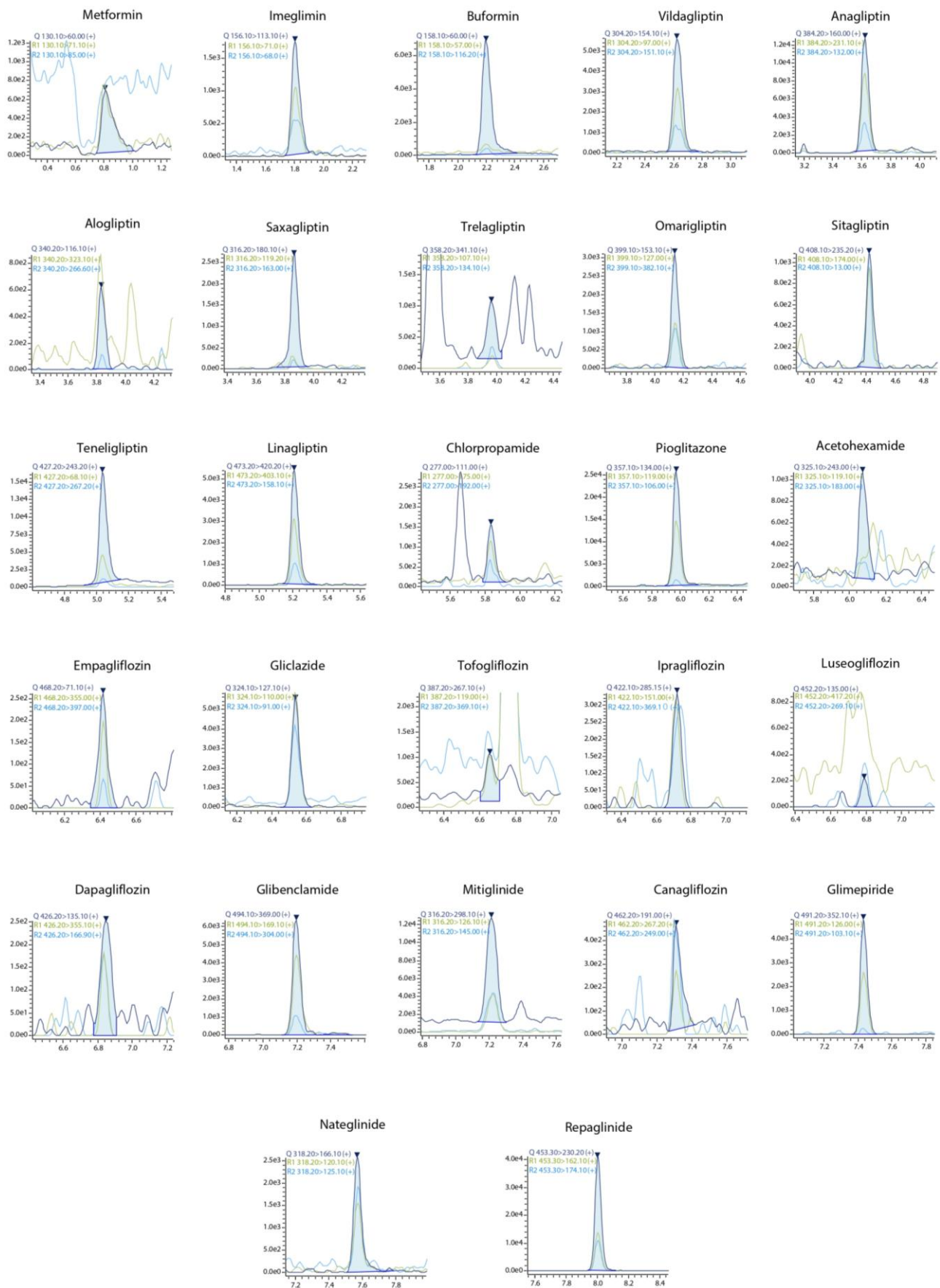


그림 4. 전혈 중 항당뇨병제의 MRM 크로마토그램 (농도 : 0.1 ng/mL)

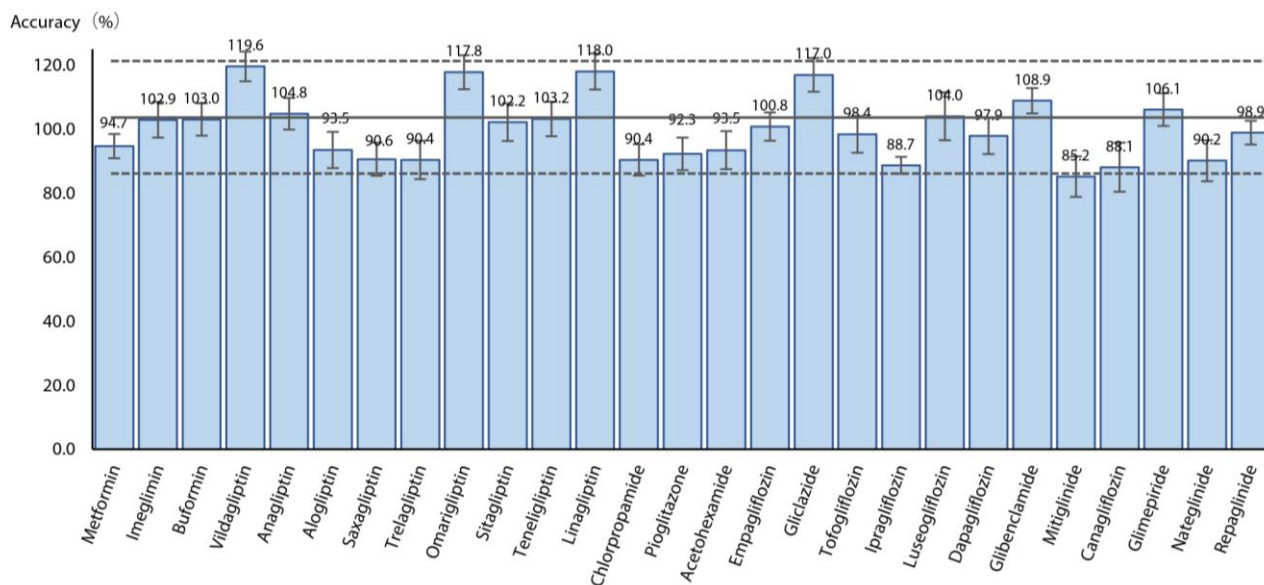


그림 5. 항당뇨병제가 첨가된 전혈에서의 정확도 및 반복성 (n = 5)

■ 결론

본 분석법을 통해 단일 분석으로 27종 항당뇨병제를 정량할 수 있다. 본 분석법은 높은 감도를 제공하여 전혈 내 약 0.1 ng/mL의 낮은 농도에서도 검출이 가능하며, 광범위한 농도 범위에서 정량을 수행할 수 있다.

Micro Volumn QuEChERS 키트는 "LC/MS/MS Forensic Toxicology Database"와 동일한 워크플로우 및 분석 조건을 사용하여 진행할 수 있다. 이를 통해 다른 오남용 약물과의 병행 분석이 가능하며, 연구 및 법의학 분야에서 보다 효율적이고 포괄적인 독성학적 분석을 지원한다.

<Reference>

- 1) Wasim Rauf Kadri, Khalid Raza, "Comparison of Different Antidiabetic Medication Classes: Efficacy and Safety", European Journal of Cardiovascular Medicine. Vol.15, 10. Oct. 025, p.223-227

**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.

No. 01-01143-K