LC-MS/MS를 이용한 혈중 심혈관제 측정가이드

Measurement guide for quantitative analysis of cardiovascular drugs in sera by LC-MS/MS

2023. 11.

한국표준과학연구원

이 측정가이드는 측정·시험 절차가 없는 신제품(기술)에 대한 신뢰성 제고를 위해 개발되었습니다. 현재까지의 축적된 경험과 과학적 사실에 근거해 해당분야 전문가에 의해 작성되었고 새로운 과학적 타당성이 확 인될 경우 언제든지 개정될 수 있습니다.

또한, 이 측정가이드에 기술된 내용은 권고사항으로 법적인 구속력을 갖지 않습니다. 제시된 방법은 최신의 규정과 과학적 근거를 바탕으로 기술한 것으로 추후 관련 규정 개정 및 과학의 발전으로 수정 될 수 있습니다.

이 측정가이드에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 한국표준과학연구원 중소기업협력그룹으로 연락주시기 바랍니다.

전화번호: (042)868-5411

측정가이드 제·개정 이력

개정	일 시	개정사유	작 성 자							
번호	린 기	711/8/1511		;	소	속			성	명
0	2023.11.3	최초 제정	한 국	丑 一	준 과	학	연 구	원	권 ㅎ	·
	최종 제·개	정 심의위원	위 우 한 국 녹 〈	석 표 ·		학 역		령 독 교 원 단	김년 김리 이원 정지 조선	l아 년웅 1선

[※] 심의위원 명단은 '가나다' 순서임.

목 차

1.	요약문	1
2.	적용 범위	1
3.	인용규격 및 참고문헌	2
4.	용어의 정의	2
5.	시험내용	3
6.	필요 장비명세 및 최저 요구 성능	4
7.	준비사항	4
8.	시험방법	6
9.	시험결과의 기록	8
10	부록	9

LC-MS/MS를 이용한 혈중 심혈관제 측정 가이드

Measurement guide for quantitative analysis of cardiovascular drugs by LC-MS/MS

1. 요약문

이 측정가이드는 심혈관제의 혈중 약물 모니터링 (Therapeutic drug monitoring, TDM)을 수행하기 위해 요구되는 LC-MS/MS 기법을 기술한다. TDM은 유효한 치료농도를 설정하거나, 적정한 혈중 약물 농도가 유지되는지 확인하기 위하여 임상검사실에서 수행되는 대표적인 시험검사 중 하나이다. 특히, 치료농도 범위가 좁은 약물의 경우, 적정한 혈중 약물 농도가 유지되지 못하면 유효한 효능·효과를 나타내지 못하고 심각한 부작용을 나타낼 수 있으므로 과학적으로 검증된 타당한 방법으로 수행되어야 한다. 이 중 심혈관제(digoxin, digitoxin, deslanoside, lidocaine, procainamide 및 quinidine) 및 고지혈증 치료제 (atorvastatin)는 심부전, 부정맥, 심혈관계 질환 등에 흔히 단독 및 병용투여되어 TDM이 요구되나 현재까지 대부분의 임상검사실에서 면역측정법(immunoassay)를 이용하여 측정해왔다. 그러나 면역측정법은 비특이적인(non-specific) 측정방법으로서 일부 환자군 또는 여러 의약품을 함께 복용하는 비율이 높은 만성질환 환자의 경우, 혈중 약물 농도 측정의 정확도를 기대하기에 한계가 뚜렷하다. 이에 혈액 중 다양한 심혈관제를 정확하게 동시정량할 수 있는 측정법의 개발이 요구된다. 최근에는 여러 성분의 동시분석이 가능하고 높은 감도와 선택성을 제공하는 액체크로마토그래피-텐덤 질량분석법(LC-MS/MS)이 면역측정법 등 기존 측정법을 대체하거나 검증할 수 있는 첨단 분석방법으로 주목되고 있으나, 일선의 임상검사실에서 첨단 분석방법을 이용하여 분석대상물질별로 측정법을 개발하고 엄격한 측정 절차의 타당성을 검증하기에 현실적인 어려움이 많다. 따라서 과학적으로 철저하게 검증된 측정법을 개발하여 체계적인 측정 절차가 제공되면 사용자가 쉽게 수준 높은 측정법을 적용할 수 있어 임상검사의 신뢰성 및 소급성 향상에 크게 기여할 수 있다. 이에 본 측정가이드는 7 종의 심혈관제에 대해 동시분석이 가능한 LC-MS/MS 측정법을 제시하고자 한다.

2. 적용 범위

이 측정가이드는 1) 7 종의 심혈관제 분리 및 검출을 위한 LC-MS/MS 조건, 2)

표준물질의 준비 3) 혈청 내 심혈관제 추출 및 정제를 위한 시료 전처리 과정, 4) 혈청 내 심혈관제 농도 산출 과정 등에 대하여 기술한다. 이 측정가이드는 임상검사실에서 TDM 수행 시 심혈관제를 투여한 환자의 혈청에서 해당 의약품의 농도를 측정하기 위해 질량분석법 기반 측정 절차를 구축하고자 할 때 참고할 수 있다.

3. 인용규격 및 참고문헌

- 3.1. ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- 3.2. ISO/IEC Guide 98-3:2008 Uncertainty of measurement Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM: 1995).
- 3.3. Abady MM, Jeong JS, Kwon HJ. Development and validation of an analytical method using liquid chromatography—tandem mass spectrometry for the therapeutic drug monitoring of seven cardiovascular drugs in clinical usage. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2023 Jan 1;1214:123552. doi: 10.1016/j.jchromb.2022.123552.

4. 용어의 정의

4.1 액체크로마토그래피-텐덤 질량분석법 (LC-MS/MS)

액체크로마토그래피(Liquid chromatography, LC)를 텐덤 질량분석기(Tandem mass spectrometry, MS/MS)에 연결한 실험장치이다. 액체크로마토그래피는 화합물의 분리 장치로서 일반적으로 목적 성분 별로 고정상(칼럼)과 이동상(용리액)간의 분배계수가 차이가 나는 특성을 이용하여 분리하는 기법이다. LC에서 분리된 성분과 용리액은 질량분석기로 도입되며, 이온화 장치를 통해 적정 조건 하에서 목적 성분이 이온화되어 고유의 mass to charge ratio (m/z) 값을 갖게 된다. 이후 질량측정기 (mass analzyer)를 통해 형성된 이온을 각각의 m/z 값에 따라 분리시킨 후 검출기에서 이온이 만드는 신호를 검출한다. 이 중 텐덤 질량분석법은 여러 개의 질량측정기를 사용하는 기술로 최초로 형성된 모이온을 분리한 후, 그 이온의 충돌분해 반응(collision-induced dissociation)에 의해 생성된 이온을 측정하는 방법이다. 이 때 생성된 이온은 모이온의 구조적 특성을 나타내기 때문에 매우 선택적인 측정이 가능하며, 이 경우, 특성 이온을 선택하여 다중 반응 검출(multiple reaction monitoring, MRM)을 수행할 수 있다.

4.2 표준물질

순도 혹은 농도가 명기된 고순도 물질이다. 표준물질을 무게법으로 용매에 녹이거나 희석하여 그 농도를 특정할 수 있는 표준용액은, 시료 중 목적 물질의 농도를 측정하기 위한 기준이 된다.

4.3 내부표준물질

크로마토그램에서 목적 물질과 구분될 수 있는 물질로서 표준물질 및 시료에 일정한 양을 첨가하여 함께 분석된다. 목적 물질과의 피크면적비를 이용하여 농도 산출에 반영하여 시료 전처리 과정 및 기기분석 과정에서 발생하는 변화를 보정할 수 있다. 내부표준물질을 이용하여 정량하는 방법을 내부표준법이라고 한다.

4.4. 동위원소희석 질량분석법

내부표준물질로 목적물질을 구성하는 원소의 일부가 동위원소(예, ²H, ¹³C, ¹⁵N)로 치환된 물질을 사용하는 방법으로 질량분석기를 검출기로 사용할 때 적용가능한 내부표준법이다. 이 경우 동위원소 표지 내부표준물질은 목적물질과화학적/물리적 성질이 동일하기 때문에 분석 과정 중 발생할 수 있는 여러요소(농축, 희석, 휘발, 매질 효과)들과 상관없이 그 농도비를 일정하게 유지할 수 있어, 측정 과정 중 발생할 수 있는 분석 오차를 효과적으로 보정할 수 있게 된다.

5. 시험내용

본 측정가이드에서 얻고자 하는 측정값은 혈청 내 심혈관제로 사용되는 성분의 농도이다. LC-MS/MS 기법을 비롯한 화학분석은 기본적으로 농도를 정확하게 알고 있는 표준물질과의 비교 분석을 통해 얻어진다. 또한, 시료는 LC-MS/MS에 적용하기 적합한 상태로 목적물질을 추출하고 정제해야 한다. 따라서 해당 실험 내용은 표준용액 및 시료의 제조, LC-MS/MS 구동 과정, 계산식 산출 과정 등을 포함한다. 그림 1에 간략히 실험 모식도를 나타내었다.

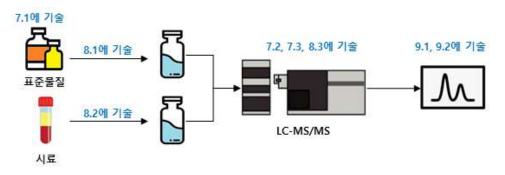


그림 1. LC-MS/MS를 이용한 심혈관제 분석 모식도

6. 필요 장비명세 및 최저 요구 성능

6.1 LC-MS/MS 장비

LC장비는 이동상 연결 장치, 탈기장치, 펌프, 칼럼 컴파트먼트, 자동시료 주입기로 구성된다. 이때 펌프의 경우 고성능 액체크로마토그래피 (High performance liquid chromatography) 이상의 내압을 구현 가능할 수 있는 펌프로, 기울기 용리(gradient elution)가 가능한 분석용 펌프(quaternary pump 혹은 binary pump)를 사용한다. 칼럼 컴파트먼트는 냉각 및 오븐 기능이 있어 특정 온도를 유지할 수 있는 모델을 사용한다. 질량분석기는 Triple—Quadrupole (QQQ) 모델을 추천하며 Quadrupole—time of flight (Q—TOF)도 활용 가능하다. 주요 제조사 및 모델은 Waters사의 Xevo TQ 모델, SCIEX 사의 Triple Quad, QTRAP, QTOF 모델, Agilent 사의 QQQ 및 qTOF 모델 등이 있다. 질량분석기 사용을 위해서는 질소 공급장치(액체질소 혹은 질소발생기)가 함께 준비되어야 한다.

6.2 화학저울

분해능 0.01 mg, weighing capacity 220 g (예, Mettler Toledo, XP205)

6.3 전처리 장비

원심분리기: 16,200g 이상 속도로 회전 가능한 원심분리기 농축기: 감압 펌프와 원심분리장치가 연결된 원심농축기 용액 혼합기: 용액을 균일하게 혼합하기 위한 vortex mixer

6.4 기구 및 시약

기구: 10 ~ 15 mL tube, 1.5 ~ 2 mL tube, micropipette (0.02 ~ 0.2 mL, 0.1 ~ 1 mL), 칭량용 백금 접시, 핀셋, spatula, filter catridge (PVDF 0.2 μm), 이동상 여과장치

시약: 아세토니트릴 (HPLC grade), 메탄올 (HPLC grade), 탈이온수 (18.2 MΩ) 고순도 물질 및 동위원소표지 물질 (7.1 참조)

7. 준비사항

7.1 표준물질 및 내부표준물질의 준비

분석 대상이 되는 심혈관제 7 종 및 내부표준물질로 사용할 동위원소표지 물질을 구입한다. 표 1에 사용했던 표준물질의 예를 나타내었다.

표 1. 분석 대상 성분으로 사용된 심혈관제의 종류

Drugs	Therapeutic range (ng/mL)	Class	Product No.1)	Internal standard ²⁾
Procainamide ^a	4000-8000	Na+ channel blocker	PHR1252	39778
Lidocaine	500-5000	Na+ channel blocker	PHR1252	Lidocaine-(diethyl
Quinidine	2000-6000	Na+ channel blocker	226600	-d10)
Deslanoside	0.8-2.4	Cardiac glycoside	1173009	
Digoxin	0.5-2	Cardiac glycoside	D6003	901189
Atorvastatin ^b	3-150	HMG-CoA reductase inhibitor	ZP0001	Digoxin-21,21,22 -d3
Digitoxin	10-30	Cardiac glycoside	1199002	

^a Procainamide hydrochloride form

7.2 LC의 준비

- 7.2.1 이동상의 준비 : 아래와 같은 조성³⁾, 혹은 이에 준하는 조건으로 제조된 이동상을 제조한 후 감압여과장치로 여과한다.
 - A: 2 mM ammonium formate, 1 %(v/v) formic acid, and 1(v/v)% ACN in water
 - B: 2 mM ammonium formate, 1 %(v/v) formic acid, and 99(v/v)% ACN in water
- 7.2.2 칼럼의 선택: 적절한 역상칼럼 및 보호칼럼을 선택한 후⁴⁾, 칼럼 제조사의 지침서에 따라 MS 바탕 신호가 낮아질 때까지 칼럼 conditioning을 한다. 준비된 이동상을 퍼징 후 흘려주고 선택된 칼럼에 적합한 기울기 용리 프로그램을 정한다.

7.3 MS/MS의 준비

- 7.3.1 진공상태 확인 : 질소 공급 라인을 열고 nitrogen gauge를 확인한다. MS를 작동시켜 장치와 연결된 진공펌프의 작동유무를 확인하고 진공된 정도를 연결되어있는 컴퓨터 모니터 상에서 확인한다.
- 7.3.2 이온화 조건 : 이온화법으로 ESI(electrospray ionization)법을 하고 positive(+) ion mode를 사용한다.

^b Atorvastatin calcium salt trihydrate

¹⁾ 각 물질들은 모두 Sigma Aldrich에서 구입하였으며, 순도 98 % 이상을 나타내었다. 이에 준하는 다른 고순도 물질로도 대체 가능하다.

²⁾ 각 물질들은 모두 Sigma Aldrich에서 구입하였으며, 이에 준하는 다른 동위원소표지 물질도 가능하다. 본 절차에서는 2 종의 동위원소표지 내부표준물질로 7 종의 심혈관제를 정량하였다.

³⁾ 암모늄 이온은 digoxin 및 deslanoside의 $[M+NH^4]+$ 이온 형성에 도움을 주고 포름산도 목적 성분의 양이온 형성 및 감도 증가에 영향을 주었다.

⁴⁾ 사용한 칼럼 예 : Zorbax SB-aQ (2.1 x 150) 혹은 이와 비슷한 성능의 역상 칼럼

7.4.2 기기 tune up : 표준용액을 약 0.1 mg/kg 정도로 이동상에 희석한 후, 1 mL 용량의 시린지에 넣고 시린지 펌프에 장착한 후 mass interface와 직접 연결하고 시료를 주입한다. 스펙트럼을 확인하고 각 화합물 별 precursor ion 및 product ion을 정하고 (표 2) MS 제조사의 가이드에 따라 최적의 MS parameter를 찾아 분석 조건을 확립한다.

표 2. 7 종의 심혈관제에서 MS/MS 분석시 형성된 precursor ion 및 product ion.

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (V)
Procainamide	236.15 [M+H]+	163.08 (quantifier ion) 120.04 (qualifier ion)	30
Lidocaine	235.23 [M+H]+	86.09 (quantifier ion) 58.07 (qualifier ion)	20
Quinidine	325.18 [M+H]+	184.07 (quantifier ion) 307.17 (qualifier ion)	48
Deslanoside	961.51 [M+NH4]+	651.37 (quantifier ion) 522.31 (qualifier ion)	19
Digoxin	798.46 [M+NH4]+	651.37 (quantifier ion) 521.31 (qualifier ion)	19
Atorvastatin	559.26 [M+H]+	440.22 (quantifier ion) 466.20 (qualifier ion)	28
Digitoxin	782.45 [M+H]+	652.37 (quantifier ion) 521.24 (qualifier ion)	15
Lidocaine-(diethyl-d10)	245 [M+H]+	96.09 (quantifier ion)	20
Digoxin-21,21,22-d3	801 [M+NH4]+	654.38 (quantifier ion)	20

7.4 예비 측정

LC-MS/MS 기기의 측정준비가 완료되면 전처리가 끝난 시료 또는 동위원소비 표준용액을 반복 측정하여 목적 물질의 분리 정도, 피크 모양, 이온의 세기, 피크 면적비의 재현성을 확인한다. 추가로 여러 농도 범위의 표준용액을 측정하여 각성분별로 직선성을 나타내는 농도 범위 및 정량한계(Limit of quantification, LOQ)에 해당하는 농도를 확인한다.

8. 시험방법

8.1 표준용액 및 내부표준용액의 제조

7.1에서 준비된 고순도 표준물질 및 내부표준물질을 각각 화학저울로 정밀하게 측정하여 메탄올, 혹은 제조사에서 권장하는 용매로 용해시켜⁵⁾ 약 1 mg/g 정도의

⁵⁾ 표 1에 해당하는 제품을 구입했을 경우, atrovastin calcium salt trihydrate는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹일 것을 권장했기에 atrovastatin은 DMSO에 녹이고 나머지 표준물질들은 메탄올에 녹였다.

고농도 stock solution을 제조한다. 표준물질 stock solution은 표 1에서 기술된 therapeutic range를 참고하여 실제 혈청 시료에서 있을 것으로 예상되는 농도 범위를 포함하도록 섞고 희석하여 직선성 범위 내에서 calibrator로 사용할 여러 농도의 표준용액을 제조한다.

내부표준물질로 사용될 동위원소 표지물질도 같은 방법으로 stock solution으로 만든 후 예상 농도와 비슷한 한 가지 농도를 정한 후 희석하여 내부표준용액으로 한다. 준비된 표준용액 및 내부표준용액을 동량으로 섞어서 동위원소비 표준용액을 제조한 후 오토샘플러 바이알에 옮겨 담는다.

제조된 표준용액 및 내부표준용액은 소분하여 -20°C에 보관한다. 메탄올에용해된 stock solution 및 물로 희석된 표준용액 내의 7 종의 심혈관제 성분은 냉동및 용해를 5 회 반복했을 때까지 안정하였다.

8.2 시료의 준비 및 전처리

시료는 실제 약물 투여 환자에게서 얻은 혈청, 심혈관제가 투여되지 않은 공혈청, 구입 혹은 자체 제조된 정도관리용 혈청 기반 표준물질 등을 포함한다. 혈청의 추출용매로 아세토니트릴: 메탄올 (부피비 2:1) 혼합액을 준비한다. 혈청 시료 약 1 mL 정도를 정밀하게 취하여 8.1에서 제조된 내부표준용액 0.2 mL를 첨가하여 30 초간 vortexing 후 추출용매를 첨가하여 약 12 mL로 한다.6) 추출용매를 첨가하면 혈청내 단백질들이 응고되어 뿌옇게 되는데 이 상태로 30 분간 shaking 후 16,200 g에서 20 분간 원심분리한다. 침전된 단백질을 제외하고 상등액만 취하여 농축한다. 이후 50 % 메탄올 0.2 mL7)를 첨가하여 용해시킨 후 필터 (pore size 0.2 μm)하여오토샘플러 바이알에 옮겨 담는다. 전처리된 혈청 시료는 24 시간 동안 오토샘플러(4℃) 내에서 안정하였다.

8.3 기기 분석

8.1 및 8.2에서 준비된 시료 바이알을 오토샘플러에 넣고 7.2 및 7.3에서 확립된 LC-MS/MS 조건에서 측정한다. 측정 과정 중 LC 펌프의 압력, 칼럼 온도, 질소발생기의 유량, MS의 진공 상태 등의 관련 파라미터들을 꾸준히 확인한다. 분석이 끝나면 MS/MS 스펙트럼을 통해 product ion들을 확인하고 피크의 머무름

⁶⁾ 추출시 추출용매가 총 부피의 90 v/v%였을 때 7 종의 심혈관제에 대하여 가장 추출효율이 좋았으므로 이에 맞추어 사용된 혈청 및 내부표준용액의 양을 고려하여 추출용매의 양을 조절할 수 있다. 7) 혈청 1 mL를 전처리하여 최종적으로 0.2 mL로 제조할 경우 결과적으로 5 배의 농축효과가 있다. 7.4에서 측정된 각 실험실 장비 조건의 정량한계(LOQ)를 고려했을 때, 5 배까지 농축할 필요없이 측정이 가능하다면 최종적으로 첨가되는 50 % 메탄올의 양(0.2 mL)을 늘리거나 전처리에 사용되는 혈청(1 mL)의 양을 줄이고 이를 고려하여 내부표준용액의 첨가량을 변경할 수 있다.

시간 및 대칭성 등을 확인한다. 표 2에 제시된 quantifier ion의 크로마토그램을 추출하여 소프트웨어 상에서 피크 면적을 적분한다.

9. 시험 결과의 기록

9.1 한 점 교정법

분석된 하나의 표준용액을 calibrator로 사용하는 방법으로 Eq (1)에 따라 혈청 중 농도를 계산한다.

$$C_{sample} = \frac{AR_{sample}}{AR_{std}} \times \frac{MR_{std}}{MR_{sample}} \times C_{std} \qquad (1)$$

 C_{sample} : 혈청 시료 중 심혈관제의 농도

 C_{std} : 선택된 표준용액 중 심혈관제의 농도

AR_{sample}: 혈청 시료를 분석한 크로마토그램에서 피크면적비(분석대상물질/내부표준물질)

ARstd: 표준용액에서 분석한 크로마토그램에서 피크면적비(분석대상물질/내부표준물질)

MR_{sample}: 혈청량과 내부표준용액 혼합 시 부피비 (혈청/내부표준용액)

MRstd: 표준용액과 내부표준용액 혼합 시 부피비 (표준용액/내부표준용액)

9.2 다점 교정법

여러 농도의 표준용액을 분석한 후 표준용액의 농도(C_{std})와 표준용액과 내부표준용액 혼합 시 부피비 (표준용액/내부표준용액, MR_{std})를 곱한 값을 x 축으로 하고, 표준용액에서 분석한 크로마토그램에서 피크면적비 (분석대상물질/내부표준물질, AR_{std})을 y 축으로 하여 y = ax + b로 표현되는 linear equation을 구한다. Eq (2)에 따라 혈청 중 농도를 계산한다.

$$C_{sample} = \frac{(AR_{sample} - B)}{A \times MR_{sample}} \quad \text{(2)}$$

 C_{sample} : 혈청 시료 중 심혈관제의 농도

AR_{sample}: 혈청 시료를 분석한 크로마토그램에서 피크면적비 (분석대상물질/내부표준물질)

MR_{sample}: 혈청량과 내부표준용액 혼합 시 부피비 (혈청/내부표준용액)

A: 표준용액을 측정으로 얻어진 linear equation에서 기울기

B: 표준용액을 측정으로 얻어진 linear equation에서 y-절편

10. 부록

실제 심혈관제 7 종의 분석 사례를 기술한다.

분석 조건은 각 실험실에서 사용하는 장비 및 소모품에 따라 다시 최적화를 진행해야 하고, 최적화된 조건에 따라 분석 결과를 검증할 것을 권장한다.

10.1 LC-MS/MS 측정 조건

丑 3. HPLC condition

사용 장비	Shiseido의 NASCA2 system
칼럼	Zorbax SB-Aq column (2.1 × 150 mm, 3.5 μm)
이동상	A: 2 mM ammonium formate, 1 %(v/v) formic acid, 1(v/v)% ACN in water
시중장	B: 2 mM ammonium formate, 1 %(v/v) formic acid, 99(v/v)% ACN in water
7 0 7 0 7	4% B (0~1분), 4~40% B (1~3분), 40~50% B (3~9분), 50~100% B (9~10
기울기 용리	분), 100% B (10~13분), 이후 최초 4% B로 2분간 평형화
유속	0.2 mL/min
시료 주입량	5 μL
칼럼 온도	30 °C
오토샘플러	4 °C

표 4. MS/MS condition: Triple TOF 5600+의 ESI positive mode (Source Temperature 500 ℃, ion spray voltage floating 5500 V)

Compound	Collsion energy (CE) (V)	declustering potential (DP) (V)	cone gas (GS1) (psi)	Drying gas (GS2) (psi)	Curtain gas (psi)
Procainamide	30	60	55	55	30
Lidocaine	20	60	55	55	30
Quinidine	48	60	55	60	30
Deslanoside	19	60	60	55	25
Digoxin	19	60	55	50	20
Atorvastatin	28	60	40	55	20
Digitoxin	15	60	50	55	25
[2H10]-lidocainea	20	60	55	55	30
[² H21, 21 ,22] digoxin ^b	20	60	50	55	30

^a Internal standard for the quantification of lidocaine, procainamide, and quinidine.
^b Internal standard for the quantification of digoxin, digitoxin, deslanoside, and atorvastatin.

10.2 스펙트럼 및 크로마토그램

7종 강심제는 크로마토그램 상에서 완전 분리가 되지 않았으나, MS에서 적절한 체널 선택을 통해 선택성이 확보되었다.

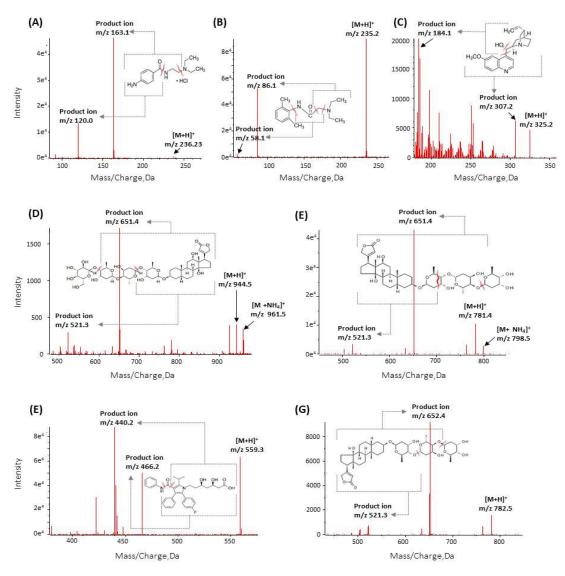


그림 2. 7 종 의약품의 MS/MS 스펙트럼 (A) procainamide, (B) lidocaine, (C) quinidine, (D) deslanoside, (E) digoxin, (F) atorvastatin, and (G) digitoxin.

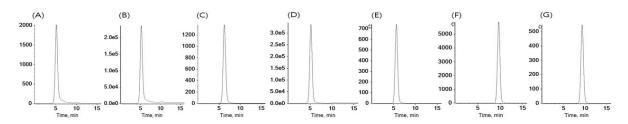


그림 3. 7 종 의약품의 extracted ion chromatogram. (A) procainamide, (B) lidocaine, (C) quinidine, (D) deslanoside, (E) digoxin, (F) atorvastatin, and (G) digitoxin.

10.3 Carry over, 선택성 및 매질효과

확립된 LC/MS/MS 방법에 대하여 전처리된 공혈청 시료를 주입했을 때 carry over가나타나지 않는 것을 확인하였다. 또한 전처리되 공혈청 시료에 일정량의 표준용액을 첨가하여 정확도 평가를 진행하였을 때, 7종의 의약품을 4가지 농도 레벨에서 15%이내의 정확도를 충족하는 것이 확인되었다. Post-column infusing 방법으로 매질효과 (matrix effect)를 측정했을 때, 각 피크들의 머무름 시간에서 현저한 signal suppression이 없는 것을 확인하였다.

다만 이 결과는 표 3 및 표 4의 조건에 따른 분석 방법을 적용했을 때의 결과이며, 각 실험실에서 사용하는 장비를 바탕으로 새롭게 방법을 set-up할 때에는 다시 한번 평가되어야 한다.

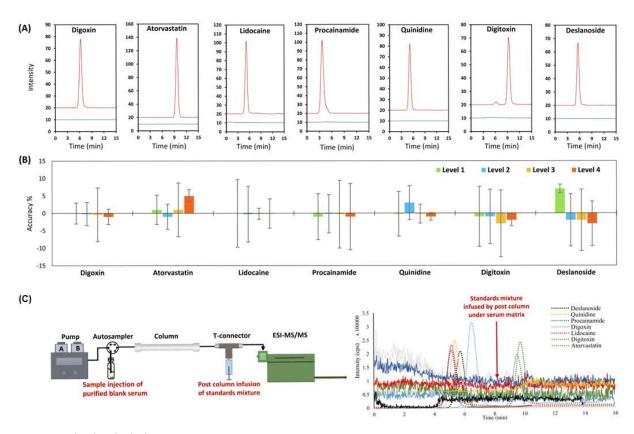


그림 4. 측정 방법의 검증 (A) carry over, (B) selectivity (C) matrix effect.

10.4 직선성, 정확도 및 정밀도 결과

7종의 의악품에 대하여 LOQ에서 LOL(선형 한계) 범위 내에서 상관계수(r²) 0.999 이상의 직선성을 나타내었다. Procainamide, lidocaine 및 quinidine 등 다른 의약품과 동시 분석 시 상대적으로 고농도로 분석되어야 하는 경우는 해당 의약품의 혈중 농도 범위에서의 직선성도 평가되었으며 상관계수(r²) 0.998 이상을 나타내었다.

표 5. 7 종 심혈관제의 직선성 및 검출한계 (LOD), 정량한계 (LOQ)

Drug	Linearity range (ng/mL)	Linear equation	r^2	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Procainamide	2.5-500 (1000-50000) ^a	y=0.9041x+0.0201 $(y=0.9997x+3.2883)^a$	0.9997 (0.9996) ^a	0.01	0.5
Lidocaine	2.5-250 (500-20000) ^a	y=1.0011x+0.0058 $(y=1.0129x+1.1832)^a$	0.9996 (0.9986) ^a	0.01	0.5
Quinidine	2.5-500 (1000-100000) ^a	y=0.1089x+0.0012 $(y=0.1489x+0.1645)^a$	0.9999 $(0.9985)^{a}$	0.02	0.5
Deslanoside	10-2500	y=0.3074x+0.0274	0.9997	0.05	5
Digoxin	5-2500	y=0.8946x+0.2417	0.9991	0.025	0.5
Atorvastatin	2.5-2500	y=0.2513x-0.0232	0.9992	0.025	1
Digitoxin	100-25000	y=0.0294x-0.0163	0.9991	0.25	25

^a Results from extended concentration range

측정 방법의 정확도 및 정밀도 평가를 위한 일중/일간 분석을 실시하였을 때, 회수율은 96.3~102.8% 범위에서 나타났으며, 반복 측정 시 상대표준편차(%)는 6%를 넘지 않았다.

표 6. 심혈관제를 첨가한 혈청 시료 분석 시 일중 및 일간 정확도 및 정밀도 (n=6)

Drug	Gravimetric	Intra-day		Inter-day	
	value (ng/g)	Recovery (%)	Precision (RSD %)	Recovery (%)	Precision (RSD %)
Procainamide	24.46	98.0	4.6	98.3	2.8
	250.4	98.6	4.4	101.3	2.5
	3834	98.8	2.5	102.8	3.5
	7297	100.3	4.8	97.2	5.9
Lidocaine	63.15	98.1	3.4	102.2	4.3
	263.5	101.1	3.0	102.8	2.3
	534.6	100.5	2.5	101.1	2.3
	3059	100.5	4.1	97.6	4.4
Quinidine	25.80	96.8	2.2	97.3	5.6
	1465	101.2	5.8	100.7	2.1
	1475	99.8	5.0	100.8	1.6

	6297	102.8	2.2	102.8	0.1	
Deslanoside	0.8283	101.9	2.2	100.8	4.3	
	2.440	101.8	3.8	102.1	1.7	
	454.8	97.2	5.2	96.9	0.7	
	1413	98.8	5.9	100.7	2.1	
Digoxin	0.5887	101.9	3.4	98.8	4.6	
	2.029	98.4	4.9	98.5	3.7	
	132.6	99.1	4.8	99.3	2.4	
	483.1	98.7	1.8	99.3	5.9	
Atorvastatin	2.980	102.5	2.5	99.8	2.7	
	24.87	97.5	2.8	97.8	3.6	
	128.6	100.6	4.2	100.6	5.1	
	590.2	96.6	5.5	97.5	5.4	
Digitoxin	10.03	100.0	4.6	101.3	1.3	
	14.95	98.6	3.2	98.9	0.3	
	25.59	102.1	3.1	100.7	4.6	
	5232	96.3	4.9	100.3	4.9	

10.5 다양한 혈청 매질에 응용

실제 임상시료에 적용하는 대신, 광범위한 임상 시료의 특성을 포함할 수 있도록 고지혈증, 고혈당 및 고알부민 혈청 매질에서 정확도 평가를 실시하였다. 측정 결과 정확도 정밀도 모두 15 % 이내의 허용 가능한 수준을 나타내었다.

표 7. 고지혈증, 고혈당 및 고알부민 혈청에서의 측정 결과

Deur	Expected concentration	Measured values (ng/g)				
Drug	(ng/g)	Hyperlipidemia serum	Hyperalbuminemia serum	Hyperglycemia serum		
Procainamide	4900	5253 ±398	4754 ± 346	4456 ±460		
Lidocaine	2919	3167 ± 275	2721 ± 274	3225 ± 316		
Quinidine	3933	4042 ± 285	3705 ± 266	4311 ± 397		
Deslanoside	2.421	2.34 ± 0.14	2.2 ± 0.27	2.37 ± 0.35		
Digoxin	2.011	2.017 ± 0.12	2.008 ± 0.15	1.94 ± 0.15		
Atorvastatin	151.5	147.25 ± 13.92	137.9 ± 17.71	147.23 ± 16.1		
Digitoxin	25.18	22.203 ± 2.98	24.76 ± 3.03	25.95 ± 1.65		

주 의

- 1. 이 보고서는 한국표준과학연구원에서 시행한 주요사업의 연구 보고서입니다.
- 2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국표준과학연구원에서 시행한 주요사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
- 3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개 하여서는 안 됩니다.