KRISS/TR--2023-039

LC-MS/MS를 이용한 혈청 중 항바이러스제 측정가이드

Measurement guide for quantitative analysis of antiviral drugs in serum using LC-MS/MS

2023. 10.

한 국 표 준 과 학 연 구 원

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 확인될 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 번호	일 시	개정사유	작 성 자	
			소 속	성 명
0	2023.10.31	최초 제정	한 국 표 준 과 학 연 구 원	정지선
최종 제·개정 심의위원			한 국 표 준 과 학 연 구 원	권하정
			㈜ 보 령 중 앙 연 구 소	김남희
			순 천 향 대 학 교 천 안 병 원	윤영안
			우 석 대 학 교 약 학 대 학	이원웅
			한 국 표 준 과 학 연 구 원	임동규

※ 심의위원 명단은 ‘가나다’ 순서임.

목　　차

1. 요약문 ····· 1

2. 적용 범위 ····· 2

3. 인용규격 및 참고문헌 ····· 2

4. 용어의 정의 ····· 2

5. 시험내용 ····· 3

6. 필요 장비명세 및 최저 요구 성능 ····· 4

7. 준비사항 ····· 5

8. 시험방법 ····· 7

9. 시험 결과의 기록 ····· 8

10. 부록 ····· 10

LC-MS/MS를 이용한 혈청 중 항바이러스제 측정가이드

Measurement guide for quantitative analysis of antiviral drugs in serum using LC-MS/MS

1. 요약문

이 측정가이드는 항바이러스제의 혈청시료 중 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. 최근 유례없는 COVID-19 팬더믹을 맞아 유효한 치료제가 없는 상황에서 다른 질환 치료의 목적으로 개발된 항바이러스제(chloroquine, hydroxycholroquine, umifenovir, ritonavir, lopinavir 및 favipiravir 등)의 단독 및 병용투여를 통해 코로나19에 유효한 치료효과를 나타내는지 신속한 탐색이 필요했다. 그러나 과학적으로 검증된 혈중 약물 농도 측정법이 마련되어 있지 않아 신규 치료제 탐색에 어려움이 컸다. COVID-19에 대한 효과는 상이하였고, 현재 질환에 따른 표적 치료로 활용되거나, 범용 항바이러스제로 활용되는 등 다양한 활용이 이루어지고 있으나, 이후 또다른 팬더믹이 도래할 경우, 지난 경험에 비추어 repurposed drug의 활용과 임상적 효능 및 독성, 치료 용량에 대한 연구가 다시 이루어질 것으로 전망할 수 있다. 이에 혈액 중 다양한 항바이러스제를 동시정량할 수 있는 측정법의 개발이 요구된다. 기존에 사용하던 항바이러스제 분석방법들은 대부분 측정 대상이 단일 성분이거나 추출 및 제단백 등 전처리 과정이 복잡하고, 낮은 감도 등 한계가 뚜렷하다. 최근에는 여러 성분의 동시분석이 가능하고 높은 감도와 선택성을 제공하는 액체크로마토그래피-텐덤 질량분석법(LC-MS/MS)이 기존 분석방법을 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 적용하게 되어 임삼검사의 신뢰성 및 소급성 향상에 크게 기여할 수 있다. 이에 본 측정가이드는 혈청을 매질로 하는 6 종의 항바이러스제에 대해 동시분석이 가능한 LC-MS/MS 측정법을 제시하고자 한다.

2. 적용 범위

이 측정가이드는 1) 6 종의 항바이러스제 분리 및 검출을 위한 LC-MS/MS 조건, 2) 표준물질의 준비 3) 혈청 내 항바이러스제 추출 및 정제를 위한 시료 전처리 과정, 4) 혈청 내 항바이러스제 농도 산출 과정 등에 대하여 기술한다. 이 측정가이드는 임상검사실에서 TDM 수행 시 항바이러스제를 투여한 환자의 혈청에서 해당 의약품의 농도를 측정하기 위해 질량분석법 기반 측정 프로토콜을 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 Kim B, et al., “Development of a certified reference material for the determination of acrylamide in potato chips” Anal. Bioanal. Chem. 398:1035-1042(2010). doi: 10.1007/s00216-010-3953-8. Epub 2010 Jul 14.

3.4 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.

3.5 Rosli N, Kwon HJ, Jeong JS. Simultaneous quantification method for multiple antiviral drugs in serum using isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. pre-printed version Available at SSRN: https://ssrn.com/abstract=4511166 or http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4511166

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. LC는 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 질량분석관 (mass analyzer)을 통해 형성된 이온을 각각의 *m/z* 값에 따라 분리시킨 후 검출기에서 이온이 만드는 신호를 검출한다. 이 중 텐덤 질량분석법은 여러 개의 질량분석기를 직렬로 연결하여 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 안정동위원소(예, ^{2}H=D, ^{13}C, ^{15}N)로 치환된 물질을 사용하는 방법으로 질량분석기를 검출기로 사용할 때 적용 가능한 내부표준법이다. 이 경우 동위원소 표지 내부표준물질은 목적물질과 화학적/물리적 성질이 동일하기 때문에 분석 과정 중 발생할 수 있는 여러 요소(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 항바이러스제로 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.

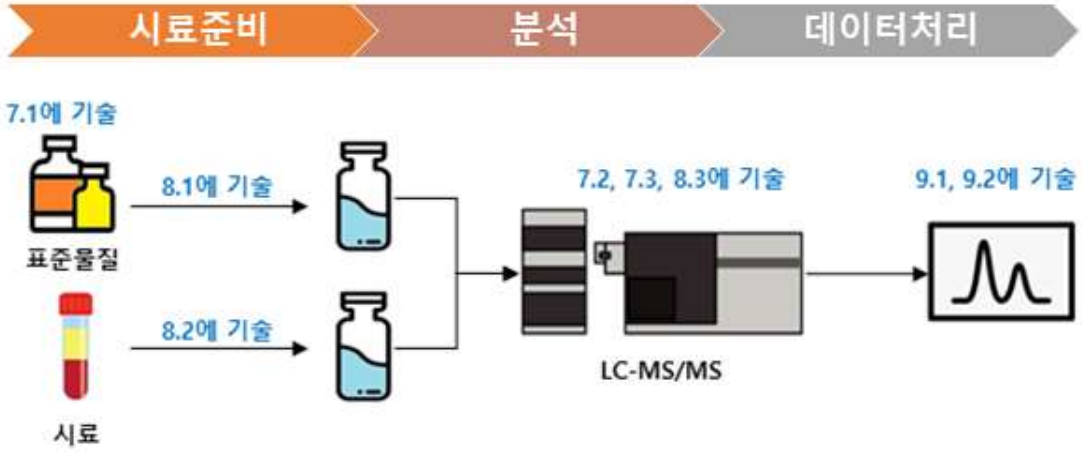

그림 1. LC-MS/MS를 이용한 항바이러스제 분석 모식도

6. 필요 장비명세 및 최저 요구 성능

6.1 LC-MS/MS 장비

LC장비는 이동상 연결 장치, 탈기장치, 펌프, 칼럼 항온조, 자동시료 주입기로 구성된다. 이때 펌프의 경우 HPLC 이상의 내압 (> 20 MPa)을 장기간 사용할 수 있는 고성능 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 삼중 사중극자 질량분석기(Triple-Quadrupole (QQQ)) 모델을 추천하며 사중극자-비행시간 질량분석관 (Quadrupole-time of flight (Q-TOF)도 활용 가능하다. 본 가이드에서는 Waters사의 Acquity UPLC와 Xevo TQ-S MS를 연결한 LC-MS시스템을 기준으로 하며, 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 : 12,000 rpm 이상 속도와 온도 제어가 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), 칭량 접시, 핀셋, spatula, 일회용 시료 여과용 filter unit (0.2 μm pore size, PVDF membrane filter), 이동상 감압 여과장치

시약 : 탈이온수 (18 MΩ), 아세토니트릴 (HPLC grade), 메탄올 (HPLC grade), 고순도 표준물질 및 동위원소표지 물질 (7.1 참조)

7. 준비사항

7.1 표준물질 및 내부표준물질의 준비

분석 대상이 되는 항바이러스제 6 종 및 내부표준물질로 사용할 동위원소표지 물질을 구입한다. 표 1에 사용했던 표준물질의 예를 나타내었다.

표 1. 분석 대상 성분으로 사용된 항바이러스제의 종류

성분명	화학식	분자량 (g/mol)	CAS no.	1차 타겟질환	C_{max}
Hydroxy-chloroquine	$C_{18}H_{26}ClN_3O$	335.872	118-42-3	말라리아	34 -45 ng/mL
Chloroquine	$C_{18}H_{26}ClN_3$	319.872	54-05-7	말라리아	0.72 μmol/L (0.25-1.38)
Favipiravir	$C_5H_4FN_3O_2$	157.104	259793-96-9	인플루엔자	51.5 μg/mL
Umifenovir	$C_{22}H_{25}BrN_2O_3S$	477.415	131707-23-8	인플루엔자 COVID-19	0.41 mg/L
Ritonavir	$C_{37}H_{48}N_6O_5S_2$	720.948	155213-67-5	HIV/AIDS	832 ng/mL
Lopinavir	$C_{37}H_{48}N_4O_5$	628.814	192725-17-0	HIV/AIDS	9.8 ± 3.7 μg/mL

7.2 LC의 준비

7.2.1 이동상의 준비 : 아래와 같은 조성, 혹은 이에 준하는 조건으로 제조된 이동상을 제조한 후 감압여과장치로 여과한다.

A: 0.2% (v/v) formic acid in 10 mM ammonium formate

B: 0.2% (v/v) formic acid in methanol

7.2.2 칼럼의 선택 : 적절한 역상칼럼 및 보호칼럼을 선택한 후[1], 칼럼 제조사의 지침서에 따라 conditioning을 한다. 준비된 이동상을 퍼징 후 송액하며 선택된 칼럼에 적합한 기울기 용리 프로그램[2]을 정한다.

7.3 MS/MS의 준비

7.3.1 진공상태 확인 : 질소 공급 라인을 확인하고 nitrogen gas 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) positive(+) ion mode를 사용한다.

7.4.2 기기 tune up : 측정 대상별 MS 신호감도에 따라 표준용액을 약 10 ~ 100 mg/kg 정도로 이동상에 희석한 후, 1 mL 용량의 시린지나 적절한 용기에 넣고 시린지 펌프 혹은 MS에 부착된 infusion device에 장착한 후 mass interface와 연결한다. T-mixer 등을 활용하여 이동상과 표준물질이 주입되는 환경에서의 신호감도 및 스펙트럼을 확인하고 각 화합물 별 적절한 MS parameter들을 설정한다. 설정한 조건에서 precursor ion 및 product ion을 정하고 (표 2) 시험분석을 통해, retention time 안정성, peak area의 반복측정 정밀성 등을 검토하여 최종 분석 조건을 정한다.

표 2. 6 종의 항바이러스제와 내부표준물질 MS/MS 분석시 설정한 precursor ion 및 product ion과 조건

Analytes	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	Collision Energy (V)	Declustering potential (V)	Ionization Temperature (℃)
Hydroxychloroquine	336.2	247.1	110	30	500
Chloroquine	320.2	247.1	100	24	500
Favipiravir	158.0	141.0	80	17	500
Umifenovir	479.1	432.0	100	27	500
Ritonavir	721.3	296.1	100	31	500

1) 사용한 칼럼 예 : Atlantis Premier BEH C18 AX with VanGuard FIT, 2.1 mm ID x 150 mm, 5 µm (Waters) 혹은 이와 비슷한 성능의 역상 칼럼

2) 사용한 기울기 용리 예시 5~50 % B (0~2분), 65% B (2~2.5분), 85% B (2.5~5.5분), 95% B (7~8.5분), 이후 최초 5% B로 6.5분간 평형화(총 15분/시료, 유속 0.2 mL/min)

Lopinavir	629.4	447.3	100	24	500
Hydroxychloroquine-D_4	340.2	247.1	100	30	500
Chloroquine-D_4	324.2	251.1	100	28	500
Favipiravir-$^{13}C_3$	161.0	144.0	100	20	500
Umifenovir-D_6	432.0	432.0	100	26	500
Ritonavir-D_6	727.4	302.2	100	25	500
Lopinavir-D_8	637.4	477.3	100	20	500

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 각 성분별로 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 용해시켜[3] 약 1 mg/g 정도의 고농도 stock solution을 제조한다. 표준물질 stock solution은 표 1에서 기술된 therapeutic range (최고농도 C_{max})를 참고하여 실제 혈청 시료에서 있을 것으로 예상되는 농도 범위를 포함하도록 섞고 희석하여 직선성 범위 내에서 calibrator로 사용할 농도의 표준용액을 제조한다.

내부표준물질로 사용될 물질들 (표 2 참고)은 측정하고자하는 시료의 예비실험을 통해 예상농도를 확인할 수 있는 경우, 그에 맞추어서 농도를 정한 후 섞어 내부표준용액으로 한다. 한 점 교정을 선택하는 경우와 검량선을 작성하는 경우에 따라 내부표준물질의 준비 농도는 달라질 수 있다. 준비된 표준용액 및 내부표준용액을 동량으로 섞어서 동위원소비 표준용액을 제조한 후 사용하는 기기에 맞는 분석용 시료 바이알에 옮겨 담는다.

제조된 표준용액 및 내부표준용액은 소분하여 - 20 ˚C에 보관한다. 메탄올에 용해된 stock solution 및 희석된 표준용액 내의 6 종의 항바이러스제 성분은 냉동 및 용해를 3 회 반복했을 때까지 안정하였다.

8.2 시료의 전처리

3) 표 1에 해당하는 제품은 모두 메탄올을 사용하였고, 희석할 때에는 50% 메탄올/물을 사용하였다. 제조사에서 권하는 다른 용매인 DMSO에 녹인 경우에 비해 측정 정밀도가 향상되었음.

시료는 실제 약물 투여 환자에게서 얻은 혈청, 측정 대상 약물이 투여되지 않은 공혈청, 구입 혹은 자체 제조된 혈청 기반 표준물질 등을 포함한다. 혈청의 추출 용매로 메탄올 (> 99 %)을 준비한다. 혈청 시료 약 0.1 mL 이상을 정밀하게 취하여 8.1에서 제조된 내부표준용액 0.1 mL를 첨가하여 30 초간 vortexing 하여 동위원소와 균질화를 시킨 후 추출 및 제단백을 위하여 메탄올을 추가하여 75 v/v% 메탄올로 맞춘다.[4] 추출 용매를 첨가하면 혈청 내 단백질들이 응고되어 뿌옇게 되는데 이 상태로 10 분간 강하게 shaking 후 13,000 rpm에서 20 분간 원심분리한다. 침전된 단백질을 제외하고 상등액만 취하여 건조농축한다. 이후 50 % 메탄올 0.2 mL[5]를 첨가하여 용해시킨 후 필터 (pore size 0.2 μm)하여 오토샘플러 바이알에 옮겨 담는다. 전처리된 혈청 시료는 10 ℃로 온도가 유지되는 시료 보관함 내에서 3 일간 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, 질소발생기의 유량, MS의 진공 상태, 온도 등의 관련 파라미터들을 꾸준히 확인한다. 분석이 끝나면 MS/MS 스펙트럼을 통해 product ion을 확인하고 피크의 retention time 및 대칭성 등을 확인한다. 표 2에 제시된 ion transition channel의 크로마토그램을 추출하여 소프트웨어 상에서 피크 면적을 적분한다. 사용된 분석 조건의 예시는 표3에 정리한다.

9. 시험 결과의 기록

9.1 한 점 교정법

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

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

---

4) 메탄올의 농도가 약 75 v/v%였을 때, 항바이러스제의 추출효율 및 회수율 등이 가장 좋았으므로 이에 맞추어 추출용매의 양을 조절할 수 있다.

5) 혈청 0.1 mL를 전처리하여 최종적으로 0.2 mL로 제조할 경우 결과적으로 2 배의 희석효과가 있다. 7.4에서 측정된 각 실험실 장비 조건의 정량한계(LOQ)를 고려했을 때, 농축이나 추가 희석이 필요한 경우, 재용해 단계에서 최종적으로 첨가되는 50 % 메탄올의 양(0.2 mL)을 늘리거나 전처리에 사용되는 혈청(0.1 mL)의 양을 변화시키고 이를 고려하여 내부표준용액의 첨가량을 변경함으로서 적정한 분석농도를 조절 할 수 있다. 희석이나 농축배율은 명기하여 최종 농도를 계산할 때 반드시 반영될 수 있도록 한다.

C_{sample} : 혈청 시료 중 대상 약물의 농도
C_{std} : 선택된 표준용액 중 대상 약물의 농도
AR_{sample} : 혈청 시료를 분석한 크로마토그램에서 피크면적비 (분석대상물질/내부표준물질)
AR_{std} : 표준용액에서 분석한 크로마토그램에서 피크면적비 (분석대상물질/내부표준물질)
MR_{sample}: 혈청량과 내부표준용액 혼합 시 부피비 (혈청/내부표준용액)
MR_{std} : 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 $y = ax + b$로 표현되는 linear equation을 구한다. Eq (2)에 따라 혈청 중 농도를 계산한다.

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

C_{sample} : 혈청 시료 중 대상 약물의 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 항바이러스제 6 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

표 3 . LC-MS 분석 조건의 예

Descriptions	LC-MS parameters
System	Nanospace SI-2 series UHPLC (Shiseido) and 5600+ TripleTOF MS (ABSciex)
Column	Atlantis Premier BEH C18 AX with VanGuard FIT, 2.1 mm ID x 150 mm, 5 µm (Waters)
Mobile phases	A: 0.2% (v/v) formic acid in 10 mM ammonium formate B: 0.2% (v/v) formic acid in methanol
Column temperature	45 ℃
Flow rate	0.2 mL/min

Gradient program

Time [min]	Total Flow [µL/min]	Mobile Phase B [%]	Mobile Phase A [%]
Initial	200	5	95
2.0	200	50	50
2.0	200	65	35
2.5	200	65	35
2.5	200	85	15
5.5	200	85	15
5.5	200	95	5
7.0	200	95	5
8.5	200	95	5
8.5	200	5	95
10.0	200	5	95
15.0	200	5	95

Injection volume	3 µL
Ionization mode	ESI positive
Ionization voltage	5500 V
Desolvation temp.	500 ℃
Curtain gas	50 L/h of nitrogen
Gas 1 and 2	30, 30 L/h

Selected ion transitions

Analytes	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	Collision Energy (V)	Declustering potential (V)	Ionization Temperature (℃)
Hydroxychloroquine	336.2	247.1	110	30	500
Chloroquine	320.2	247.1	100	24	500
Favipiravir	158.0	141.0	80	17	500
Umifenovir	479.1	432.0	100	27	500
Ritonavir	721.3	296.1	100	31	500
Lopinavir	629.4	447.3	100	24	500
Hydroxychloroquine-d_4	340.2	247.1	100	30	500
Chloroquine-d_4	324.2	251.1	100	28	500
Favipiravir-$^{13}C_3$	161.0	144.0	100	20	500
Umifenovir-d_6	432.0	432.0	100	26	500
Ritonavir-d_6	727.4	302.2	100	25	500
Lopinavir-d_8	637.4	477.3	100	20	500

10.2 스펙트럼 및 크로마토그램

Hydroxychloroquine과 Chloroquine은 LC에서 완전히 분리되지 않았으며, 이러한 경우 MS에서 완전히 분리가능한 channel을 설정하여야한다 (표 3 참고).

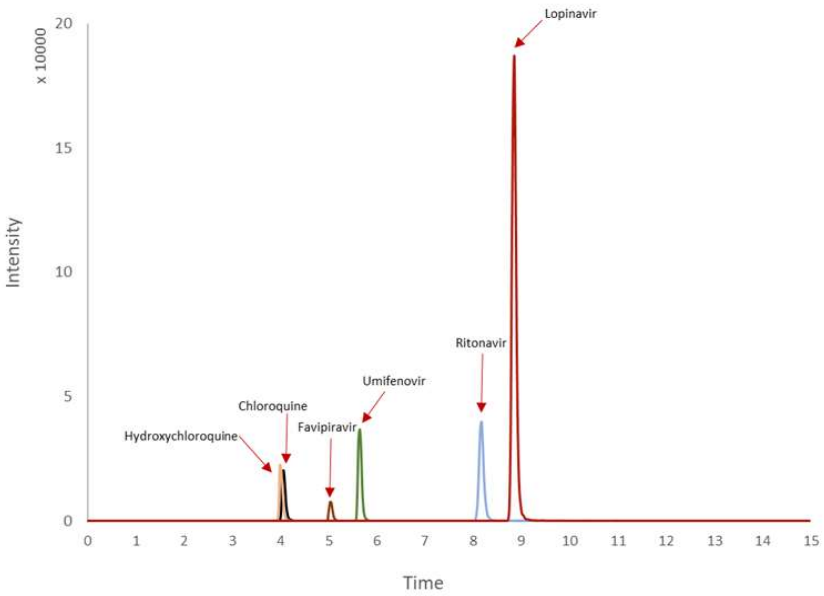

그림 2 . 6 종 항바이러스제의 LC-MS 동시분석 크로마토그램 (Total ion chromatogram)

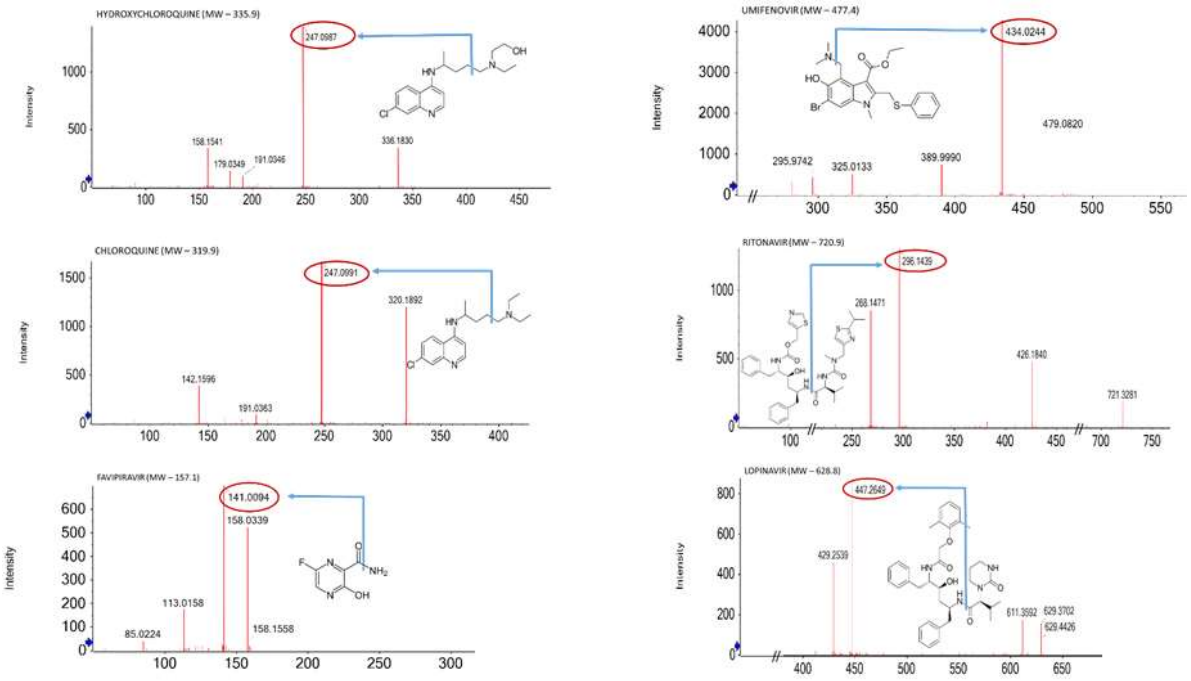

그림 3 . 각 약물의 MS/MS spectrum, (좌상) Hydroxycholroquine, (우상) Umifenovir, (좌중) Chloroquine, (우중) Ritonavir, (좌하) Favipiravir, (우하) Lopinavir

10.3 직선성, 정확도 및 정밀도 결과

설정된 LC-MS분석법은 6종 분석대상 항바이러스에 대해 치료약물로서의 농도를 포함하는 범위에서 우수한 직선성을 보였으며, 검출 한계와 정량한계도 치료약물 농도를 판정하는데에 충분한 수준을 확보하였으며, 이러한 내용은 다음 표5에 정리하였다. 또한, 혈중 대상 약물 분석에 있어, 일중, 일간 반복성과 재현성을 검토한 결과, 시료의 전처리와 LC-MS분석을 포함하는 제시된 측정 절차의 전과정의 반복성과 재현성은 충분히 유의적이며, 만족할만한 수준인 것으로 확인되었다. 이러한 내용은 다음 표 6에 정리하였다.

표 5. 6 종 항바이러스제의 직선성 및 검출한계 (LOD), 정량한계 (LOQ)

Analyte	Linear range (mg/kg)	Correlation coefficient (r^2)	LOD (ng/kg)	LOQ (ng/kg)
Hydroxychloroquine	0.01 - 6.0	0.9996	3	10
Chloroquine	0.01 - 4.0	1.0000	3	10
Favipiravir	0.15 - 200	0.9992	30	150
Umifenovir	0.01 - 4.0	1.0000	3	10
Ritonavir	0.01 - 10.0	0.9996	3	10
Lopinavir	0.20 - 60.0	0.9955	50	200

표 6. 6 종 항바이러스제를 첨가한 혈청 시료 분석 시 일중 및 일간 정확도 및 정밀도 (n=6, %)

Analyte			Hydroxychloroquine	Chloroquine	Favipiravir	Umifenovir	Ritonavir	Lopinavir
Low*	Intra-Assay	Accuracy	92.5	91.7	93.8	109.0	106.5	100.9
		Precision	1.7	3.3	2.8	3.2	1.7	2.1
	Inter-Assay	Accuracy	94.2	90.8	94.2	104.8	105.1	100.7
		Precision	5.8	7.5	8.6	3.2	3.3	1.7
Medium	Intra-Assay	Accuracy	99.8	100.5	99.2	104.4	104.1	94.4
		Precision	1.1	1.5	2.8	1.3	1.2	1.0
	Inter-Assay	Accuracy	98.9	101.1	101.2	103.6	104.3	94.5
		Precision	1.8	2.0	4.1	2.6	2.1	2.7
High	Intra-Assay	Accuracy	103.5	110.2	97.6	101.7	90.0	92.3
		Precision	2.7	5.2	3.2	1.9	0.9	1.0
	Inter-Assay	Accuracy	105.5	106.4	98.9	100.3	91.5	93.3
		Precision	5.9	6.8	8.0	1.4	1.5	1.6

* 약물별로 C_{max}가 상이하므로 이에 준하여 Low는 0.2 ~ 12 mg/kg, Medium은 2.0 ~ 50 mg/kg, High는 3.0 ~ 100 mg/kg로 회수율 평가를 위한 첨가용 표준물질의 농도가 상이하다. 정확한 농도는 참고문헌 3.5를 참고할 것

10.4 보관 온도 조건에 따른 단기 안정성 평가 결과

실온과 냉장온도에서 1, 3, 7 일간 보관할 경우 6 종 약물의 측정값의 변화를 살펴보았다. 3 일까지는 안정하였으며, 7 일간 보관 후 측정한 결과는 약물에 따라 차이를 나타냈으므로 다성분 동시정량의 경우, 가능한 냉장이 유지되는 조건으로 3 일 이내의 분석을 권장한다. Ritonavir의 경우 2 개의 다른 동위원소로 만들어진 내부표준물질을 사용하여 분석하였으나, 내부표준물질에 따른 측정결과의 유의적인 차이는 확인되지 않았다.

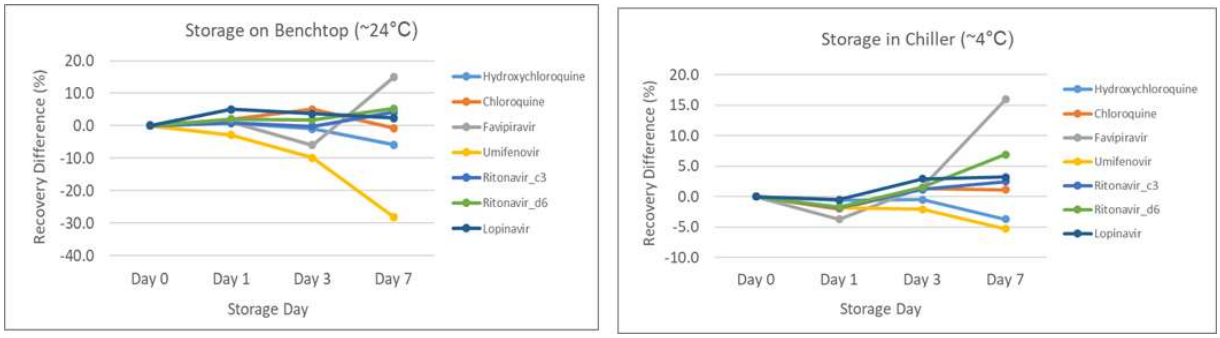

그림 4 . 단기 안정도 평가

10.5 다종 LC-MS system간 호환성 검토

임상검사실에는 다양한 제조사와 조합의 LC-MS 시스템이 구비되어있다. 이 가이드의 LC-MS조건은 표 3에 제시된 제조사와 사양의 LC-MS 시스템에 최적화되어있으나, 가이드의 활용성을 높이기위해 서로다른 제조사와 사양의 LC-MS 시스템에서 기본적인 분석 조건을 변경하지 않은 상태에서 어떻게 분석되는지를 검토하였다. System I was an ultra-HPLC-QToF MS (Nanospace SI-2 UHPLC system with 5600+ quadrupole time-of-flight MS system, Shiseido and ABSciex), system II was an HPLC-QToF MS (Prominence 20A HPLC system with 5600+ quadrupole time-of-flight MS system, Shimadzu and ABSciex), and system III was an ultra-HPLC-QQQ MS (Acquity UPLC system with Xevo TQ-S triple quadrupole MS, Waters)아래 그림 5는 3 가지 LC-MS 시스템에 적용한 결과이며, 각각 분리도와 감도는 상이하지만, 분석의 품질에 큰 변화를 주지는 않는 것으로 확인되었다. 다만, 분석의 목적 물질의 변동에 따라 분석 조건별로 최적화하거나 verification을 통해 추가 검증을 시행한 후, 활용하는 것을 권장한다.

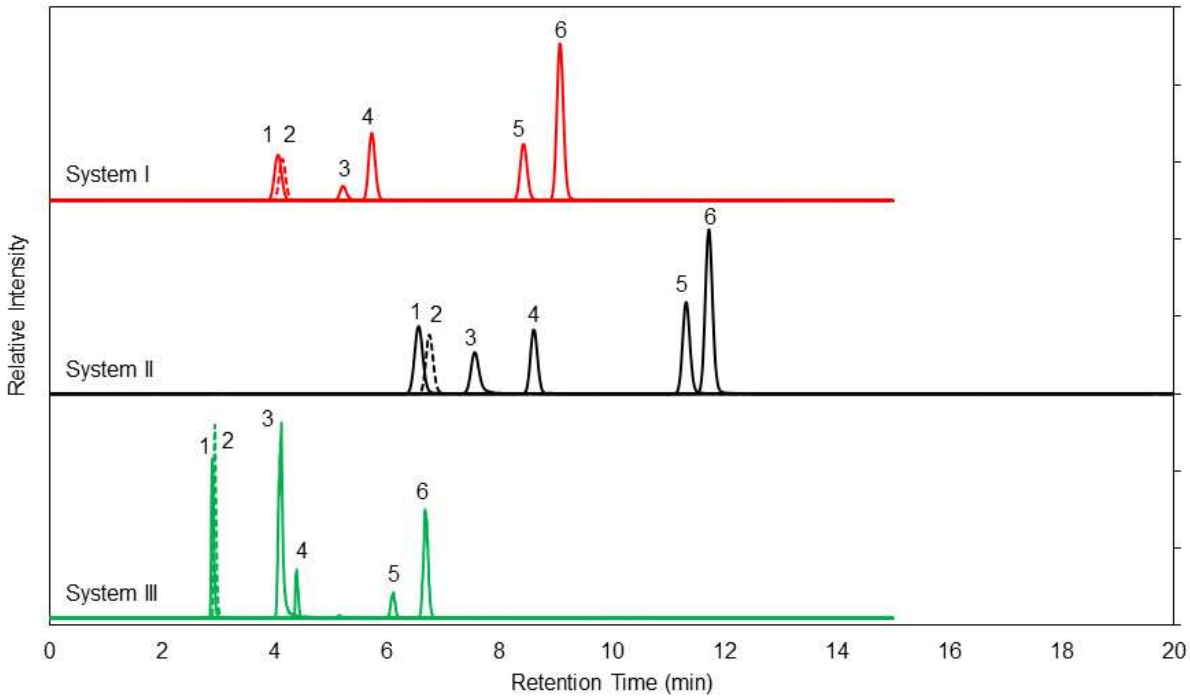

그림 5. 3 가지 종류의 서로 다른 LC-MS 조합의 시스템에 동일한 분석 조건을 적용할 경우 6 종 항바이러제의 측정 결과 크로마토그램의 예. Peak annotations, 1: hydroxychloroquine, 2: chloroquine, 3: favipiravir, 4: umifenovir, 5: ritonavir, and 6: lopinavir. 점선은 Chloroquine을 나타내며, System I (ultra-HPLC-QToF MS), System II (HPLC-QToF MS), System III (ultra-HPLC-QQQ MS).

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 공개하여서는 안 됩니다.