

LC - MS/MS를 이용한 혈장과 뇨중에서 Vancomycin의 빠른정량분석

김호현*+* · 노형진+ · 한상범*+

*(재) 서울의과학연구소, +(주) 바이오코아
(2002, 5. 8 접수)

Rapid Quantitative Analysis of Vancomycin in Human Plasma and Urine Using LC - MS/MS

Hohyun Kim*+, Hyeongjin Roh+, Sang-Beom Han*+

*Department of Pharmacokinetics, Seoul Medical Science Institute (SCL), 7-14, Dongbinggo-dong,
Yongsan-gu, Seoul, 140-809, South Korea

+Department of Pharmacokinetics, Biocore. Co. Ltd., 108-1, Yangjea-dong, Seocho-gu, Seoul, 137-130, South Korea
(Received May. 8, 2002)

요약 : 본 연구에서는 LC - MS/MS를 이용해 혈장과 뇨중에서 반코마이신을 신속하게 정량분석하는 방법을 개발하였다. 크로마토그래피는 C₁₈ XTerra MS 컬럼 (2.1×30 mm, 3.5 μm)을 사용하여 분석하였다. 이동상으로는 0.25% 초산이 섞인 10% 아세토니트릴 용액을 사용하였으며, 유속은 250 μL/min이다. 반코마이신과 카페인 (내부표준물질)은 multiple reaction monitoring (MRM) 방법을 사용하여 검출하였으며 반코마이신은 precursor ion m/z 725.0 ([M+2H]²⁺)와 product ion m/z 100.0을 사용하였다. 혈장에서 반코마이신의 검출한계는 1 nM이며 좋은 정확성과 정밀성을 보여주었다. 또한 혈장중에서 반코마이신의 정량범위는 0.01 μM - 100 μM이다. 혈장과 뇨중에서 반코마이신을 정량하는 이 분석방법은 약물동력학연구 및 관련연구에 성공적으로 적용되었다.

Abstract : In this study, a new quantitative analytical method has been developed for the rapid determination of vancomycin in human plasma and urine using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC - MS/MS). Chromatography was carried out on a C₁₈ XTerra MS column (2.1×30 mm) with a particle size of 3.5 μm. The mobile phase was 0.25% formic acid in 10% acetonitrile and the flow rate was 250 μL/min. Vancomycin and caffeine (internal standard) were detected by MS/MS using multiple reaction monitoring (MRM). Vancomycin gives a predominant doubly protonated precursor molecule ([M+2H]²⁺) at m/z 725.0 and a corresponding product ion of m/z 100.0. Detection of vancomycin was good, accurate and precise, with a limit of detection of 1 nM in plasma. The calibration curves for vancomycin in human plasma was linear in a concentration range of 0.01 μM - 100 μM for plasma. This method has been successfully applied to determine the concentration of vancomycin in human plasma and urine from pharmacokinetic study and relative studies.

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)2-3461-0560 Fax : +82+(0)2-3461-9134

E-mail : novakim@scclab.co.kr

Key words : Liquid Chromatography, Tandem Mass Spectrometry, Vancomycin, Pharmacokinetics

1. 서 론

반코마이신(Vancomycin)은 글리코펩타이드(glycopeptide)계 대장염(Colitis) 치료제이며, 경구투여는 Staphylococcal enterocolitis 와 Clostridium difficile에 의해 야기된¹ antibiotic-associated pseudomembranous Colitis의 치료를 위해 사용되며 또한 Corynebacterium²같이 penicilline에 저항이 있는 박테리아에 사용된다. 반코마이신은 황색 포도상구균(Staphylococcal), 장구균(Enterococci), 폐렴구균(Streptococcus pneumoniae) 등을 죽이는 처음이자 마지막 항생제로³ 널리 알려져 있다.

반코마이신과 같은 항생물질의 체내 작용메카니즘은 Reynolds⁴, Nagarajan⁵ 등에 의해 잘 알려져 있다. 이러한 항생물질은 박테리아 세포벽에 붙어 세포막 형성을 방해하여 결론적으로 박테리아를 죽게 한다. 하지만 최근에는 마지막 항생제로 알려진 반코마이신에도 내성이 있는 황색포도상구균(Staphylococcus aureus)이 발견되어 의료계 및 제약산업 그리고 관련 학계에 심각한 문제를 야기시키고 있다. 따라서 1990년대 후반부터 반코마이신과 유사한 형태의 항생물질 개발과 이에 관련된 많은 연구가⁶⁻⁸ 이루어지고 있다.

위와 같은 대체 항생물질 개발에 맞추어, 많은 분석연구자들은 약물동력학 실험 및 이와 관련된 실험을 위해 생체시료중 반코마이신의 분석에 노력을 기울이고 있다. 반코마이신 분석은 주로 고체상추출법(solid phase extraction, SPE)을 이용한 고성능 액체 크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 분석방법과^{9,10} 액체-액체 추출법(liquid-liquid extraction, LLE)을 이용한 HPLC 분석방법이^{11,12} 현재 주종을 이루고 있다. 그리고 HPLC 방법외에 microbiological assay^{13,14}, radioimmunoassay^{15,16}, fluorescence polarization immunoassay (FPIA)^{17,18} 방법을 이용하여 검출하기도 한다.

지금까지 보고된 HPLC 방법에서 검출한계는 일반적으로 100 ng/mL 이고, 가장 낮게 보고된¹⁹ 것은 10 ng/mL이다. 그리고 HPLC 방법에서의 정량범위가 가장 넓은 것이 0.1 - 100 µg/mL이다.

본 연구에서는 액체-액체추출법(LLE)과 액체크로마토그래피-텐덤질량분석기(Liquid Chromatography -

Tandem Mass Spectrometry, LC - MS/MS)를 사용하여 HPLC 방법에서 보고된 검출한계보다 낮은 농도의 검출한계를 갖고, 정량범위 또한 더 넓은 범위를 가지며, 좋은 정확성과 정밀성을 갖고, 약물동력학연구 및 관련연구에 성공적으로 적용되었기에 이를 보고하고자 한다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기구

본 연구에서 사용한 반코마이신, 카페인(내부표준물질), 초산 등은 Sigma - Aldrich Korea (Kyunggi - Do, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. 그리고 아세트니트릴, 물, 메탄올, 퍼클로릭산, 디클로로메탄 등은 Fisher scientific Korea (Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. Fig. 1은 반코마이신의 화학적 구조이다.

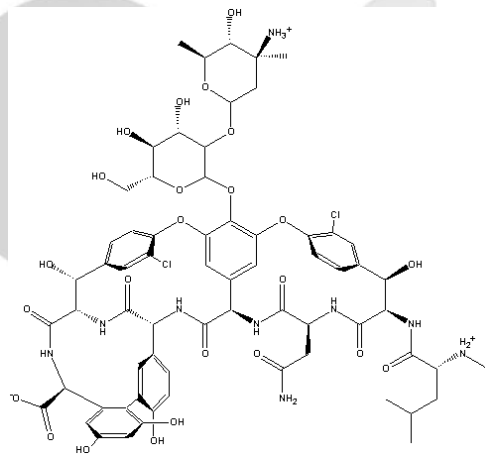


Fig. 1. Structure of vancomycin (MW=1448).

그리고 본 연구에서 사용한 tandem mass spectrometer는 Wallac사(Wallac PerkinElmer, Ohio, USA)에서 나온 API 2000 모델을 사용하였다. API 2000 모델은 turbo electrospray ionization을 사용하는 interface를 장착하고 있다. 그리고 이동상을 흘려주기 위해 사용한 펌프로는 PerkinElmer에서 나온 series 200 마이크로펌프(Wallac PerkinElmer, Ohio, USA)를 사용하였다. 그리고 시료를 텐덤질량분석기(MS/MS)에 주입하기 위하여 PerkinElmer

series 200 autosampler (Wallac PerkinElmer, Ohio, USA)를 사용하였으며 분석컬럼으로는 Waters Korea로부터 구입한 C₁₈ XTerra MS 컬럼(2.1×30 mm, 3.5 μm)을 사용하였다. 본 연구에서 사용한 전체적인 시스템 모식도는 Fig. 2에 나타내었다.

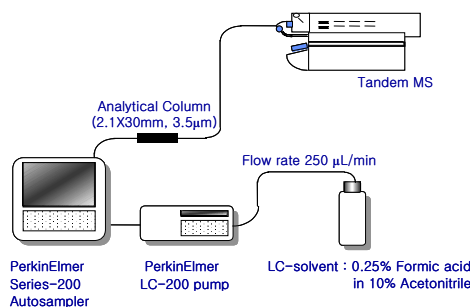


Fig. 2. Schematic diagram of on-line system.

2.2. 실험방법

시료의 전처리에는 혈장(노)용액 400 μL를 micro-centrifuge tube에 넣고 여기에 내부표준물질인 카페인 표준용액 100 μL (2 μM)와 아세토니트릴 400 μL를 가하여 30초동안 vortex mixer (Maxi Mix II, Barnstead/thermolyne, Iowa, USA)에서 충분히 흔들어 혼합한 후 (제단백 과정을 거친 뒤), 13000 rpm에서 5분간 원심분리 (Hanil Micro-12, Hanil Science Industrial Co. Ltd., Seoul, Korea)하고 상층액 400 μL를 다른 micro-centrifuge tube에 취하였다. 여기에 4 M의 perchloric acid 20 μL와 dichloromethane 400 μL를 가하고 1분간 vortex mixing을 한 뒤 13000 rpm에서 원심분리한다. 원심분리한 후, 상층액인 수층을 취하여 이중 20 μL를 LC-MS/MS에 주입하였다.

액체크로마토그래피 분석조건으로 이동상은 0.25% 초산이 섞인 10% 아세토니트릴용액을 사용하였으며, 유속은 250 μL/min이다. 그리고 탠덤질량분석기의 interface는 positive electrospray를 사용하였으며 시료검출은 multiple reaction monitoring (MRM) 방법을 사용하여 시료를 검출하였다.

반코마이신 검출을 위해서 precursor ion m/z 725.0 ($[M+2H]^{2+}$)와 product ion m/z 100.0을 사용하였으며, 내부표준물질인 카페인 검출을 위해서 precursor ion m/z 194.6 ($[M+H]^+$)와 product ion m/z 138.0을 사용하였다. 그리고 반코마이신과 카페인을 검출하기 위한 최

적의 tuning 조건은 다음과 같다. 반코마이신의 경우 DP (declustering potential)가 21.0 V, FP (focusing potential)가 360.0 V, EP (entrance potential)가 -9.0 V, CEP (collision cell entrance potential)가 38.0 V, CE (collision energy)가 71.0 V, CXP (collision cell exit potential)가 2 V, CAD (collision activated dissociation gas)가 11 psi, curtain gas가 50 psi, nebulizer gas가 30 psi, auxiliary gas가 80 psi, IS (ionspray voltage)가 5500 V, Ion source 온도가 400 °C, Deflector가 150 V 그리고 CEM (channel electron multiplier)이 2500 V이다. 카페인의 경우 DP가 21.0 V, FP가 350.0 V, EP가 -8.5 V, CEP가 16.0 V, CE가 29.0 V, CXP가 4 V이다. 그리고 탠덤질량분석기에서 사용한 가스는 모두 고순도 질소를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

혈장 및 뇨중에서 반코마이신 (Vancomycin)을 검출하는 대부분의 분석연구논문은 HPLC와 UV를 사용하여 검출하고 있다. HPLC/UV는 LC-MS/MS에 비해 검출한계가 높으며 또한 분석시간이 오래걸리는 단점이 있어, 약물동력학연구에는 적합한 방법이 아니다. 따라서 본 연구는 약물동력학 및 이와 관련된 연구를 위한 목적으로 LC-MS/MS를 사용하여 반코마이신을 분석하였다.

우선 반코마이신 검출을 위해, Q1 mass scan을 통해 precursor ion (m/z 725.0, $[M+2H]^{2+}$)을 결정하였고, 결정된 precursor ion의 product ion scan을 통해 가장 잘 검출되는 product ion (m/z 100.0)을 결정하였다. 그리고 내부표준물질인 카페인도 마찬가지로 precursor ion (m/z 194.6, $[M+H]^+$)과 product ion (m/z 138.0)을 결정하였다. (Fig. 3)

Fig. 3 (A)는 반코마이신의 Q1 mass 스펙트럼이고 Fig. 3 (B) 반코마이신의 product ion scan을 통해 얻은 스펙트럼이다. 그리고 Fig. 3 (C)와 Fig. 3 (D)는 내부표준물질인 카페인의 Q1 mass 스펙트럼과 product ion scan을 통해 얻은 스펙트럼이다.

Fig. 4는 Fig. 2에서 보여준 시스템과 Fig. 3에서 결정된 이온을 이용하여 혈장중에서 반코마이신과 카페인을 분석한 크로마토그램을 보여주는 것이다. Fig. 4 (A)는 혈장중에서 얻은 total ion chromatogram (TIC)고 Fig. 4 (C)는 카페인의 extracted ion chromatogram (XIC)이다.

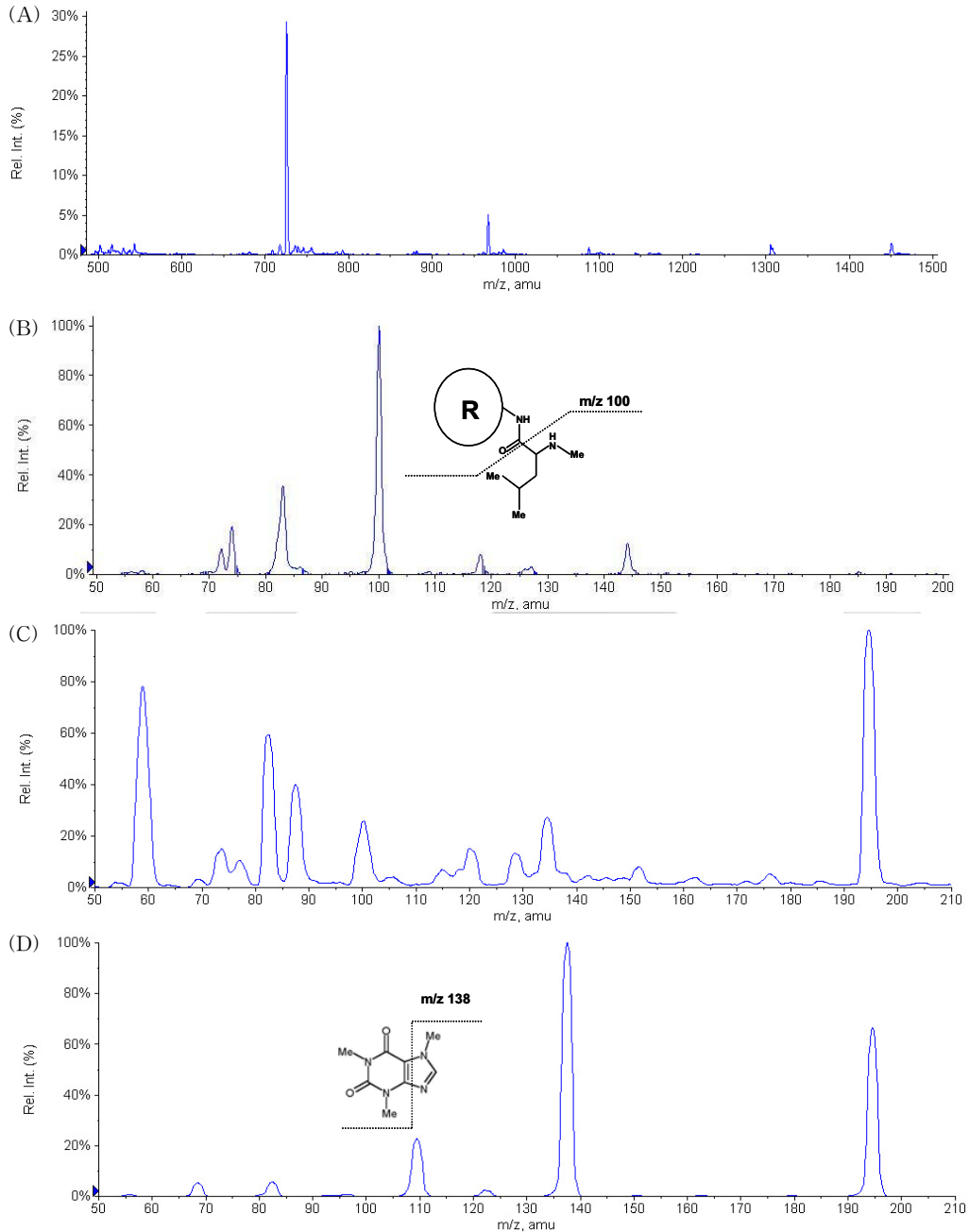


Fig. 3. Representative electrospray spectra (A) Q1 mass spectrum of vancomycin and (B) product ion spectrum for the $[M+2H]^{2+}$ molecule of vancomycin and (C) Q1 mass spectrum of caffeine and (D) product ion spectrum for the $[M+H]^+$ molecule of caffeine obtained using the PE Sciex API - 2000.

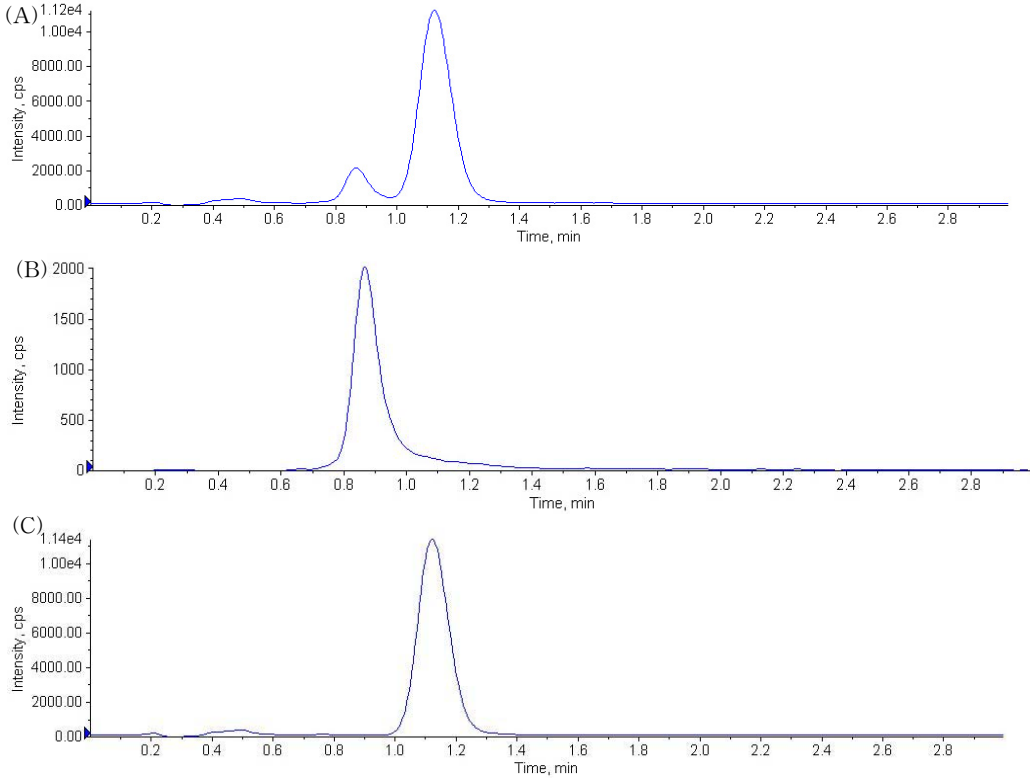
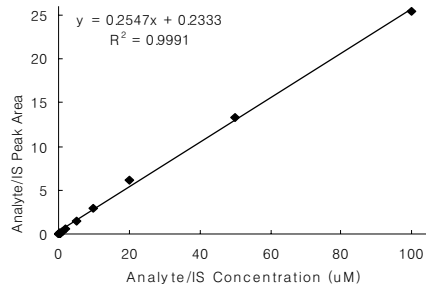


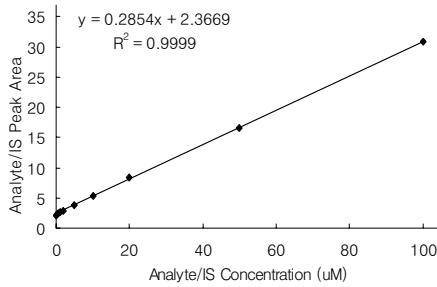
Fig. 4. Representative chromatograms of vancomycin sample containing caffeine internal standard. (A) total ion chromatogram (TIC), (B) extracted ion chromatogram (XIC) m/z 725.0 \rightarrow 100.0 for vancomycin. (C) extracted ion chromatogram (XIC) m/z 194.6 \rightarrow 138.0 for caffeine.

다음으로 검량선을 작성하기 위해 혈장 및 뇨표준액을 제조하였다. 혈장 및 뇨표준액은 반코마이신을 물에 녹여 1 mM이 되도록 제조하고 이를 순차적으로 희석하여 그 농도가 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 500 μ M, 1000 μ M이 되도록 제조하였다. 그리고 내부 표준물질인 카페인은 물에 녹여 농도가 2 μ M이 되도록 제조하였다. 위와 같이 제조한 표준용액을 사람 혈장 및 뇨 360 μ L에 반코마이신 표준용액 각 40 μ L씩을 가하여 혈장 중 최종농도가 100 nM, 200 nM, 500 nM, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M이 되도록 혈장표준액을 제조하였다. 이렇게 제조한 혈장 및 뇨표준액을 LC/MS/MS에 주입한 후 얻은 크로마토그램으로부터 내부표준물질에 대한 반코마이신의 피크 면적비를 y축에 대응시키고 내부표준물질에 대한 반코마이신의 농도비를 x축에 대

응시켜 검량선을 작성하였다. Fig. 5는 혈장중 반코마이신의 검량선 (Fig. 5 (A))과 뇨중 반코마이신의 검량선 (Fig. 5 (B))을 나타낸 것이다.



(A) Plasma



(B) Urine

Fig. 5. Calibration curve of vancomycin in plasma (A) and Urine (B).

다음으로 위와 같이 실험한 분석방법에 대한 검증으로 0.2 µM, 2 µM, 20 µM, 100 µM 4가지 농도의 vancomycin 혈장표준액을 상기의 검체처리방법으로 처리하여 분석하는 실험을 하루에 5번 반복 시행하여 일내 정밀성 (%RSD로 표시)을 구하였고, 5일간 실험을 반복 시행하여 일간 정밀성 (%RSD로 표시)을 구하였다. 정밀성은 아래의 식 (1)을 이용하여 구하였고 정확성은 아래의 식 (2)를 이용하여 구하였다.

$$\frac{\text{vancomycin과 내부표준물질의 피크면적비의 표준편차}}{\text{vancomycin과 내부표준물질의 피크면적비의 평균값}} \times 100 \quad (1)$$

$$\frac{\text{검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값}}{\text{기지(nominal) 농도}} \times 100 \quad (2)$$

Table 1은 네가지 농도에 대하여 일내 다섯번 반복 시행하여 얻은 정밀성과 정확성을 표로 나타낸 것이며, Table 2는 네가지 농도에 대하여 5일간 실험을 반복 시행하여 얻은 정밀성과 정확성을 표로 나타낸 것이다.

Table 1. Intraday accuracy and precision obtained from the analysis of human plasma samples.

Vancomycin Nominal Concentration (µM)	Vancomycin [Mean ± SD] ^a Calculated Concentration (µM)	Accuracy (%)	Precision (% RSD)
0.2	0.22 ± 0.01	110	6.43
2	2.02 ± 0.06	101	2.94
20	22.5 ± 1.0	113	4.41
100	115 ± 2	115	2.01

^a(n=5)

Table 2. Interday accuracy and precision obtained from the analysis of human plasma samples.

Vancomycin Nominal Concentration (µM)	Vancomycin [Mean ± SD] ^a Calculated Concentration (µM)	Accuracy (%)	Precision (% RSD)
0.2	0.22 ± 0.01	110	2.45
2	2.01 ± 0.07	101	3.37
20	23.0 ± 0.5	115	2.35
100	112 ± 6	112	5.04

^a(n=5)

또한 혈장에서의 검출한계는 위와 같은 분석방법에 의해 실험한 결과 1 nM (=1.448 ng/mL)이었으며, 정량범위는 0.01 µM - 100 µM (0.0145 µg/mL - 145 µg/mL)이었다. 이는 지금까지 보고된 HPLC/UV방법에서 검출한계가 가장 낮게 보고된 것 보다 7배 가량 검출한계가 낮으며 정량범위 또한 낮은 범위에서 7배, 높은 범위에서 1.5배 가량 좋을 수 있었다.

혈장 및 뇨중에서 반코마이신의 정량분석법이 실제 약물동력학적 연구를 위한 실험에서 잘 검출되는지를 알아보기 위해, 실제 약물을 투여후 얻은 사람의 plasma 시료에서 농도를 측정해 본 결과 잘 분석됨을 알 수 있었다. 실제 약물을 투여하기 위하여 반코마이신 1 g을 500 mL의 5% dextrose in water에 희석하였고, 이렇게 희석한 약물을 정맥주사 하여 투여하였으며 채혈은 약물을 투여했던 곳과 반대편의 상박주정부 정맥내 카테타를 통하여 매회 5 mL씩 채혈하였다.

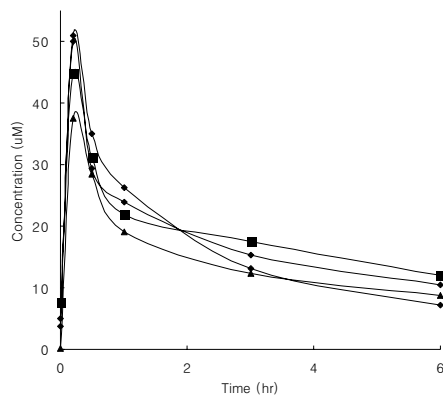


Fig. 6. PK curves of vancomycin.

Fig. 6은 이렇게 채혈하여 얻은 4명의 체내 반코마이신의 농도를 시간대 별로 나타낸 것이다. 시간은 투여직전과 투여후 15분, 30분, 1시간, 3시간 그리고 6시간에 대하여 표시하였다. Fig. 6에서 보듯이 본 분석방법은 약물투여후 15분에서 최대 혈중 농도를 나타내었으며, 시간이 지남에 따라 모두 비슷하게 감소함을 알 수 있었다. 따라서 위 방법은 약물동력실험에 잘 적용되리라 예상된다.

4. 결 론

본 연구에서는 약물동력학 실험 및 이와 관련된 연구를 위한 목적으로 LC-MS/MS를 사용하여 기존의 방법보다 감도가 좋으며, 신속하게 반코마이신을 정량 분석하였다. LC-MS/MS로 분석하기 위해 필요한 전처리 시간은 기존의 다른 분석방법들 보다 많은 시간을 단축시켰을 뿐만아니라, 시료를 분석하는 시간 또한 상당히 많이 단축시켰다. 반코마이신은 precursor ion m/z 725.0 ($[M+2H]^{2+}$)와 product ion m/z 100.0을 사용하여 선택적으로 검출할 수 있었으며, 내부표준물질인 카페인은 precursor ion m/z 194.6 ($[M+H]^+$)와 product ion m/z 138.0을 사용하여 검출할 수 있었다. 앞으로 이 방법은 약물동력학 및 이와 관련된 연구의 실험에 유용한 분석방법이 되리라 기대된다.

참고 문헌

1. J. E. Geraci, *Mayo Clin. Proc.*, **52**, 631-634 (1977).
2. R. E. VanScoy, S. N. Cohen, J. E. Geraci and J. A. Washington, *Mayo Clin. Proc.*, **52**, 216-219 (1977).
3. J. E. Geraci and P. E. Hermans, *Mayo Clin. Proc.*, **58**, 88-91 (1983).
4. P. E. Reynolds, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **8**, 943-950 (1989).
5. R. Nagarajan, *Glycopeptide Antibiotics*, **63**, ISBN 0-8247-9193 (1994).
6. E. M. Tracy and s. DiTaranto, *J. Pediatr. Oncol. Nurs.*, **19(2)**, 60-61 (2002).
7. M. T. Suller and d. Lloyd, *J. Appl. Microbiol.*, **92(5)**, 866-872 (2002).
8. J. J. McAtee, S. L. Castle, Q. Jin and D. L. Boger, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12(9)**, 1319-1322 (2002).
9. D. W. Backes, H. I. Aboleneen and J. A. Simpson, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **16**, 1281-1287 (1998).
10. J. Bauchet, E. Pussard and J. J. Garaud, *J. Chromatogr.*, **414**, 472-476 (1987).
11. J. Lukša and A. Marušič, *J. Chromatogr. B*, **667**, 277-281 (1995).
12. P. Favetta, J. Guitton, N. bleyzac, C. Dufresne and J. Bureau, *J. Chromatogr. B*, **751**, 377-382 (2001).
13. B. Robredo, K. V. Singh, F. Baquero, B.E. Murray and C. Torres, *J. Food Microbiol.*, **54(3)**, 197-204 (2000).
14. R. Lorenz, M. Herrmann, A. M. Kassem, N. Lehn, H. Neuhaus and M. Classen, *Endoscopy*, **30(8)**, 708-712 (1998).
15. A. L. Somerville, D. H. wright and J. C. Rotschafer, *Pharmacotherapy*, **19(6)**, 702-707 (1999).
16. L. M. Perino and B. A. Mueller, *Ann Pharmacother.*, **27(7-8)**, 892-893 (1993).
17. D. Farin, G. A. Piva, I. Gozlan and R. Kitzes-Cohen, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **18(3)**, 367-372 (1998).
18. L. O. White, H. A. Holt, D. S. Reeves and A. P. MacGowan, *J. Antimicrob. Chemother.*, **39(3)**, 355-361 (1997).
19. H. Hosotsubo, *J. Chromatogr.*, **487(2)**, 421-427 (1989).