creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

약학석사학위논문

고속 액체 크로마토그래피 질량분석기를 이용한 macrolide계열 항생제의 동시분석법 개발

Simultaneous analysis of nine macrolide antibiotics using HPLC/MS/MS

2014년 8월

서울대학교 대학원
약학과 약품분석학전공
송 인 기

고속 액체 크로마토그래피 질량분석기를 이용한 macrolide계열 항생제의 동시분석법 개발

Simultaneous analysis of nine macrolide antibiotics using HPLC/MS/MS

지도교수 권성원

이 논문을 약학석사학위논문으로 제출함

2014년 5월

서울대학교 대학원

약학과 약품분석학전공

송 인 기

송인기의 약학석사학위논문을 인준함

2014년 6월

위 원 장	**박 정 일**	(인)
부 위 원 장	**송 준 명**	(인)
위 원	**권 성 원**	(인)

국 문 초 록

Macrolide계열 항생제는 하나 이상의 디옥시당이 큰 락톤 고리에 결합한 항생물질로 주로 그람 양성균에 효과적이다. penicillin보다 넓은 범위의 미생물에 효과적이라 penicillin 알러지가 있는 환자에 대체용으로 사용된다.

Macrolide계열 항생제는 국내에서 세 번째로 많이 사용되는 항생제이며 사용량이 매년 증가하고 있지만 분석법은 표준화가 완료되지 않은 상황인데 특히 몇몇 종은 낮은 자외선 흡광도를 보여주기 때문에 액체크로마토그래프(LC)법에 이용되는 자외선 검출기(UV detector)는 분석에 적합하지 않다. 이에 높은 감도와 정량성을 보여주는 고속 액체 크로마토그래피 삼중 사중극자 질량분석기(HPLC/triple-Q MS)를 이용한 분석법을 개발하였다.

실험에는 10종의 macrolide계열 항생제(내부 표준물질 포함)를 사용하였으며 분석조건 최적화를 위해 이동상의 pH, 조성, 컬럼의 온도 등을 시험하여 각각 0.2%, acetonitrile과 methanol 비율 9 : 1, 45 ℃로 분석조건을 설정하였다. 컬럼은 작은 입자크기임에도 상대적으로 낮은 압력을 보여주는 superficially porous particle octadecylsilica (SPP C18) 컬럼을 사용하였다.

질량분석기를 이용한 분석법 최적화를 위한 분리조건 확인은 scan mode, 정성 및 정량은 multiple reaction monitoring(MRM) mode에서 진행하였으며 각 화합물에 맞게 조건을 설정하였다.

최적화된 분석조건으로 밸리데이션을 수행하였다. 질량분석기 유량한계에 맞추기 위해 분류를 통해 도입유량을 반으로 줄였음에도 검출한계 0.5~50 ng/mL, 정량한계 1~500 ng/mL를 나타내었다. 직선성은 0.9974 이상의 r^2값을 기록했고 recovery는 77.01~110.69%, intra-day precision과 inter-day precision은 각각 0.26~6.21%,

0.71～25.29%를 나타내었다.

개발된 분석조건의 시험을 위해 시판되는 macrolide계열 항생제에 대한 recovery를 측정하였다. 시험결과 azithromycin은 77.53～119.88%, clarithromycin은 84.64～106.79%, roxithromycin은 83.32～109.22%의 recovery를 나타내었다.

본 연구의 결과 macrolide계열 항생제의 동시분석을 위한 정량법 표준화를 통해 효율성 향상을 기대할 수 있게 되었으며 다른 화합물, 혹은 다른 분석기기를 통한 분석법 개발을 기대할 수 있게 되었다.

주요어: Macrolides, HPLC/MS/MS(High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry), ESI Triple-Q MS(Electrospray Ionization Triple Quadrupole Mass Spectrometer), MRM(Multiple Reaction Monitoring), Method validation

학번: 2012-23592

목 차

국문초록 ····· i
목 차 ····· iii
List of Figures ····· v
List of Tables ····· vi

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 실험 ····· 4
1. 시약 및 기기 ····· 4
1-1. 시약 및 용매 ····· 4
1-2. 실험기구 ····· 4
1-3. 분석기기 ····· 5
2. 실험방법 ····· 6
2-1. 시료 전처리 ····· 6
2-2. HPLC 분석조건 최적화 ····· 6
2-3. MS/MS parameter 최적화 ····· 8
2-4. 분석법 밸리데이션 ····· 10

Ⅲ. 결과 ····· 12
1. HPLC 분석조건 최적화 ····· 12
1-1. 이동상의 pH ····· 12
1-2. 이동상의 유기용매 조성 ····· 13
1-3. 컬럼 온도 ····· 14
1-4. 최적화 결과 ····· 15
2. MS 분석조건 최적화 ····· 16
2-1. MS scan(MS1) parameter 최적화 ····· 16
2-2. MRM parameter 최적화 ····· 16
3. 분석법 밸리데이션 ····· 18
3-1. Linearity ····· 18
3-2. Accuracy ····· 18
3-3. Precision ····· 19
3-4. Application ····· 20

Ⅳ. 결론 ····· 21

Ⅴ. 참고문헌 ····· 22

Abstract ····· 24

List of Figures

Fig 1. 국내 항생제 사용량(2011년) ····· 2

Fig 2. 항생제 사용량 연도별 비교 ····· 3

Fig 3. Erythromycin의 MS1 spectra ····· 9

Fig 4. Erythromycin의 product ion(MS2) spectra ····· 9

Fig 5. 이동상의 pH가 macrolide 분석에 미치는 영향 ····· 12

Fig 6. 이동상의 조성이 macrolide 분석에 미치는 영향 ····· 13

Fig 7. 컬럼 온도가 macrolide 분석에 미치는 영향 ····· 14

List of Tables

Table 1. Gradient 조건 ····· 7

Table 2. 최적화된 HPLC 분석조건 ····· 15

Table 3. MS parameter (scan mode) ····· 16

Table 4. MS parameter (MRM mode) ····· 17

Table 5. Compound별 linearity, LOD 및 LOQ ····· 18

Table 6. Compound별 recovery(%) ····· 19

Table 7. Compound별 precision ····· 19

Table 8. 시판되는 macrolide 제제의 recovery 및 RSD ····· 20

Ⅰ. 서론

Macrolide계열 항생제는 하나 이상의 데옥시당이 큰 락톤 환구조에 결합한 모습을 하고 있다. 그람 양성균이나 인플루엔자균의 감염에 사용한다. 레지오넬라균, 마이코박테리아, 마이코플라스마, 몇몇 리케차와 클라미디아에도 효과를 보이는 등 penicillin에 비해 넓은 항균스펙트럼을 가지고 있어 penicillin 알러지환자에 대한 대체용으로도 쓰인다.

Macrolide계열 항생제는 2011년 국내 항생제 사용량 중 15.0%의 점유율을 보이며 베타락타마제 저해제 포함 penicillin 조합물(22.0%), 2세대 cephalosporin(17.9%)에 이어 세 번째로 많이 사용된 항생제이며(fig 1, fig 2) 전년대비 2.7%의 증가율을 보이며(fig 2) 항생제시장에서 큰 비중을 차지하고 있다.

그러나 이런 비중에 걸맞지 않게 macrolide계열 항생제에 대한 시험법은 체계적으로 정리되어있지 않은 상태이다. 특히 낮은 파장에서 상대적으로 낮은 흡광도를 보이는 몇몇 macrolide종들에 대하여 현행 공정서에서 제시하는 LC/UV를 이용한 시험법은 적합하지 않다. 다른 시험법으로 제시된 원통평판법도 배지제작, 배양 등에 시간과 자원이 소비되는 번거로운 과정을 거치기 때문에 분석법으로 적합하지 않

이에 macrolide계열 항생제 분석에 적합한 분석법 개발을 위한 조건을 설정하였다. 분석시간 향상을 위해 HPLC 시스템을 이용하였는데 이는 높은 압력을 견딜 수 있어 분리능이 좋은 작은 입자를 가진 컬럼을 사용할 수 있다. 그 결과 분석시간 단축과 좋은 분리능 유지라는 결과를 얻을 수 있었다. 검출기로는 자기장을 통해 이온화된 분자를 분리해내는 질량분석기를 이용하였는데 세 개의 quadrupole이 연결된 triple-Q MS를 이용하여 정성성과 정량성을 향상시켰다.

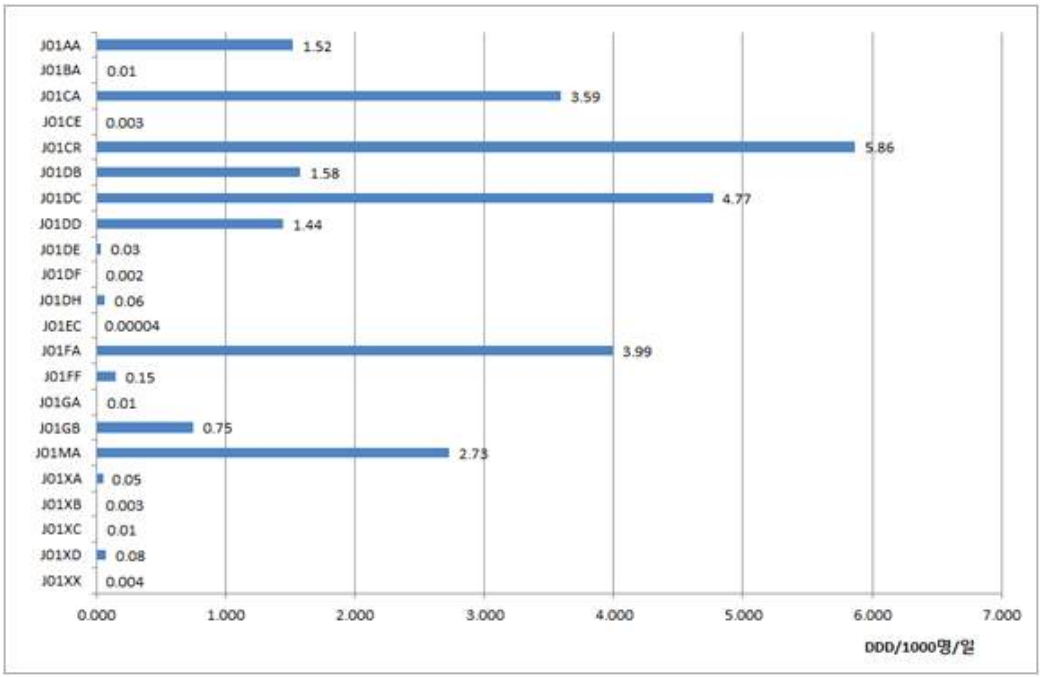

Fig 1. 국내 항생제 사용량(2011년)
(참고;2011년도 의약품 소비량 및 판매액 통계 심층분석,
한국보건사회연구원)

분석조건 설정을 위해 HPLC의 분리능력 최적화를 위한 변수를 고려하여 최적화를 진행하였으며 MS의 parameter를 조정하여 최적의 결과를 얻으려 노력하였다.

확립된 분석법을 바탕으로 표준품과 시판되는 제제를 이용하여 밸리데이션을 진행하였다.

(단위: DDD/1,000명/일, %)

ATC	ATC 4th Level	2009년		2010년		2011		2010대비 2011 증감률
		사용량	구성비 (%)	사용량	구성비 (%)	사용량	구성비 (%)	(%)
J01AA	Tetracyclines	1.361	5.40%	1.562	5.8%	1.519298	5.7%	-2.8%
J01BA	Amphenicols	0.009	0.00%	0.010	0.0%	0.008967	0.03%	-11.2%
J01CA	Penicillins with extended spectrum	3.434	13.60%	3.685	13.6%	3.592242	13.5%	-2.5%
J01CE	Beta-lactamase sensitive penicillins	0.003	0.00%	0.003	0.01%	0.003327	0.01%	9.1%
J01CF	Beta-lactamase resistant penicillins	0.002	0.00%	-	0.0%			
J01CR	Combinations of penicillins, incl. beta-lactamase inhibitors	5.884	23.40%	6.269	23.2%	5.864796	22.0%	-6.4%
J01DB	First-generation cephalosporins	1.564	6.20%	1.686	6.2%	1.577434	5.9%	-6.5%
J01DC	Second-generation cephalosporins	4.269	17.00%	5.061	18.7%	4.768191	17.9%	-5.8%
J01DD	Third-generation cephalosporins	1.304	5.20%	1.370	5.1%	1.440518	5.4%	5.1%
J01DE	Fourth-generation cephalosporins	0.017	0.10%	0.028	0.1%	0.033655	0.1%	18.5%
J01DF	Monobactams	0.002	0.00%	0.003	0.0%	0.002447	0.009%	-4.7%
J01DH	Carbapenems	0.031	0.10%	0.053	0.2%	0.064085	0.2%	21.6%
J01EC	Intermediate-actin g sulfonamides	0.0005	0.00%	0.0004	0.0%	4.03E-05	0.0002 %	-90.6%
J01EE	Combinations of sulfonamides and trimethoprim, incl. derivatives	0.193	0.80%	-	0.0%			
J01FA	Macrolides	3.167	12.60%	3.886	14.4%	3.989828	15.0%	2.7%
J01FF	Lincosamides	0.148	0.60%	0.160	0.6%	0.146395	0.5%	-8.5%
J01FG	Streptogramins	0.000	0.00%	0.000	0.0%		0.0%	-100.0%
J01GA	Streptomycins	0.005	0.00%	0.007	0.0%	0.00673	0.0%	-2.6%
J01GB	Other aminoglycosides	0.772	3.10%	0.376	1.4%	0.750356	2.8%	99.6%
J01MA	Fluoroquinolones	2.743	10.90%	2.768	10.2%	2.728196	10.2%	-1.5%
J01MB	Other quinolones	0.000	0.00%	0.0000 5	0.0%			-100.0%
J01RA	Combinations of antibacterials	0.161	0.60%	-	0.0%			
J01XA	Glycopeptide	0.028	0.10%	0.045	0.2%	0.050345	0.2%	11.1%

Fig 2. 항생제 사용량 연도별 비교
(참고;2011년도 의약품 소비량 및 판매액 통계 심층분석,
한국보건사회연구원)

Ⅱ. 실험

1. 시약 및 기기

1-1. 시약 및 용매

분석법 확립을 위해 10종의 macrolide 표준품을 사용하였다. spiramycin(SPM), dirithromycin(DRM), tilmicosin(TLC), erythromycin(ERM), tylosin tartrate(TYL), clarithromycin(CLM), roxithromycin(RXM), josamycin(JSM), magnamycin A(MGM)는 sigma-aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구매하였고 azithromycin dihydrarte(AZM)는 TCI(Tokyo, Japan)에서 구매하였다. 이중 erythromycin을 내부 표준품으로 사용하였다. 실험법 확인을 위해 사용한 시판품으로 일동제약의 아지탑스 정 (Seoul, Korea), 한국화이자제약의 지스로맥스 정 (Seoul, Korea), 코오롱제약의 아지로신 정 (Gyeonggi, Korea)을 사용하였다.

이외에 사용된 시약 및 용매 중 formic acid는 sigma aldrich에서 구매하였고 acetonitrile(ACN), methanol(MeOH) 및 물은 모두 LC 등급으로 J. T. Baker(Philipsburg, NJ, USA)에서 구매하였다.

1-2. 실험기구

- Adjust pipette (0.5～10 μL, 20～200 μL, 100～1000 μL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Pipette tips (0.5～10 μL, 20～200 μL, 100～1000 μL, Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Centrifuge tube (1.5 mL, 2 mL, Eppendorf AG, Hamburg,

Germany)

- Conical tube (15 mL, 50 mL SPL Life Sciences Co., Ltd.)
- Centrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Germany)
- Glass syringe (1000 µL, Hamilton, USA)
- Mortar and pestle
- Nitrogen purge (Tokyo Rikakikai Co., Ltd, Tokyo, Japan)
- PTFE membrane filter (0.2 µm, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany)
- Ultrasonicator (Sonics & Material, Inc., USA)
- Vortex Mixer (Scientific Industries, Inc., New York, USA)
- Volumetric flask (100 mL, 1000 mL, Schott Duran, Germany)

1-3. 분석기기

HPLC : Alliance 2795 (Waters, Massachusetts, USA)

Detector : Quattro micro API (Waters, Massachusetts, USA)

Columns : Poroshell 120 (SPP C18, 4.6 mm x 150 mm, 2.7 µm, Agilent Technologies, California, USA)

2. 실험방법

2-1. 시료의 전처리

Macrolide 표준품의 경우 저울로 정밀하게 측정한 표준품을 1 mg/mL의 농도로 메탄올에 녹여 저장용액을 만들었다. 저장용액을 필요한 양만큼 옮긴 뒤 메탄올을 증발시키고 남은 표준품을 Water : ACN : MeOH(10 : 9 : 1, v/v)용액에 녹여 검액으로 사용하였다. 용액의 비율은 이동상과 흡사하나 낮은 pH에서 쉽게 분해되는 macrolide의 특성상 formic acid를 배제하여 제작하였다.

시판되는 macrolide 제제의 경우 막자사발에 넣고 곱게 갈아 1 mg/mL의 농도로 메탄올에 녹였다. 제작된 용액을 필요한 양만큼 옮긴 뒤 메탄올을 증발시키고 남은 표준품을 Water : ACN : MeOH(10 : 9 : 1, v/v)용액에 녹여 검액으로 사용하였다. 분석 전 제작된 검액을 여과하였다.

2-2. HPLC 분석조건 최적화

분석에 사용된 alliance 2795에 맞는 HPLC 분석을 위하여 조정 가능한 변수를 고려하여 적절한 머무름 시간동안 최선의 분석결과가 나오도록 최적화를 진행하였다.

컬럼의 경우 먼저 시험한 C18 컬럼(2.1 x 50 mm, 5 μm, flow rate 0.4 mL/min)의 경우 분리가 완벽히 이루어지지 않아 길이 150 mm의 일반 C18 컬럼(Phenomenex Luna, 4.6 x 150 mm, 5 μm, flow rate 0.7 mL/min)과 SPP 컬럼(Agilent poroshell 120, 4.6 x 150 mm, 2.7 μm)을 비교하였으며 이 중 분석 효율이 좋은 SPP 컬럼을 선택하였다.

효과적인 분리를 위해 gradient 조건을 설정하였다(Table 1).

Table 1. Gradient 조건

Time (min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	75	25
3	75	25
6	65	35
9	60	40
11	55	45
15	50	50
18	0	100
33	0	100

Equilibration time : 10 min

Quattro micro의 flow rate 한계가 0.4 mL/min이기 때문에 split flow(1 : 1)를 통해 MS로 들어가는 유량을 조절하였다.

기기와 컬럼, gradient 조건을 선택한 뒤 최적화를 진행하기 위해 선택한 변수는

- 이동상의 pH
- 이동상의 유기용매 조성
- 컬럼 온도

이며 변수에 따라 2~3가지의 조건을 시험하였다.

이동상의 pH의 경우 MS분석에 일반적으로 이용되는 formic acid 농도 0.1%와 0.2%를 시험하였다. 0.2% formic acid가 포함된 물의 경우 pH가 2에 가까워지기 때문에 컬럼의 허용 pH(2~14)를 고려하여 0.2%를 한계로 설정하였다.

이동상의 유기용매는 polarity가 다른 ACN과 메탄올을 혼합하여

최적의 분리효율을 얻으려 하였다. 메탄올의 비율이 늘어날수록 머무름시간의 증가가 발생하기 때문에 적은 비율의 메탄올을 이용하여 9 : 1, 8 : 2 v/v의 ACN : MeOH 비율을 시험하였다.

컬럼 온도의 경우 상온에 해당하는 25 ℃부터 온도를 증가시켜 시험하였으며 낮은 pH에서의 안정성을 위해 최대 온도를 45 ℃로 설정하였다.

변수설정에 따른 분리결과를 MS로 분석하여 나온 TIC(total ion chromatogram)를 관찰하여 분석법 최적화를 진행하였다.

2-3. MS/MS parameter 최적화

MRM분석을 위해서는 분석물질의 이온화 결과 관찰되는 precursor ion과 precursor ion에 에너지를 주어 fragmentation을 진행한 결과 생성되는 product ion에 대한 정보가 필요한데 이는 검액을 glass syringe를 통해 MS로 바로 주입하는 direct injection으로 확인하였다. Triple-Q MS는 이름 그대로 세 개의 quadrupole로 구성되어 있는데 첫 번째 quadrupole을 통과하여 나온 이온들을 MS1 scan으로 확인하여 대상물질의 precursor ion([M+H]+ 형태, Fig 3)을 확인한다. 그 뒤 precursor ion에 대한 product ion scan을 진행하는데 두 번째 quadrupole에서 collision energy를 주어 fragmentation을 진행한 뒤 세 번째 quadrupole을 지나는 이온을 MS2 scan으로 확인하게 된다(Fig 4). 확인한 product ion 중 가장 큰 이온을 정량이온, 다음으로 큰 이온 중 특징적인 이온을 정성이온으로 설정하였다. 결과 monitoring과 동시에 parameter를 조정하여 분석조건의 최적화를 진행하였다.

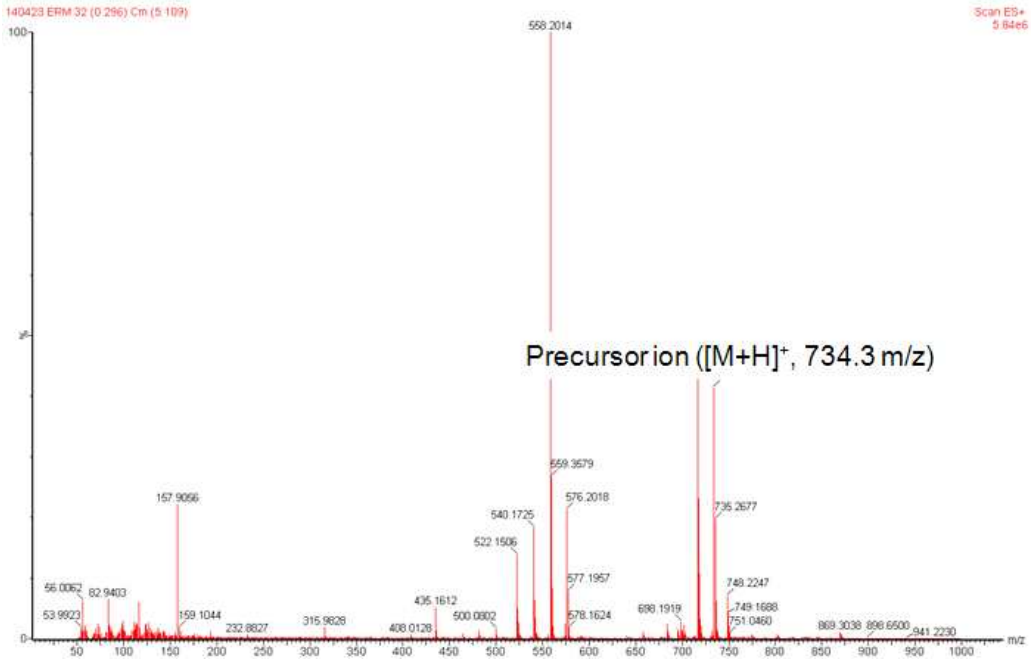

Fig 3. Erythromycin의 MS1 spectra

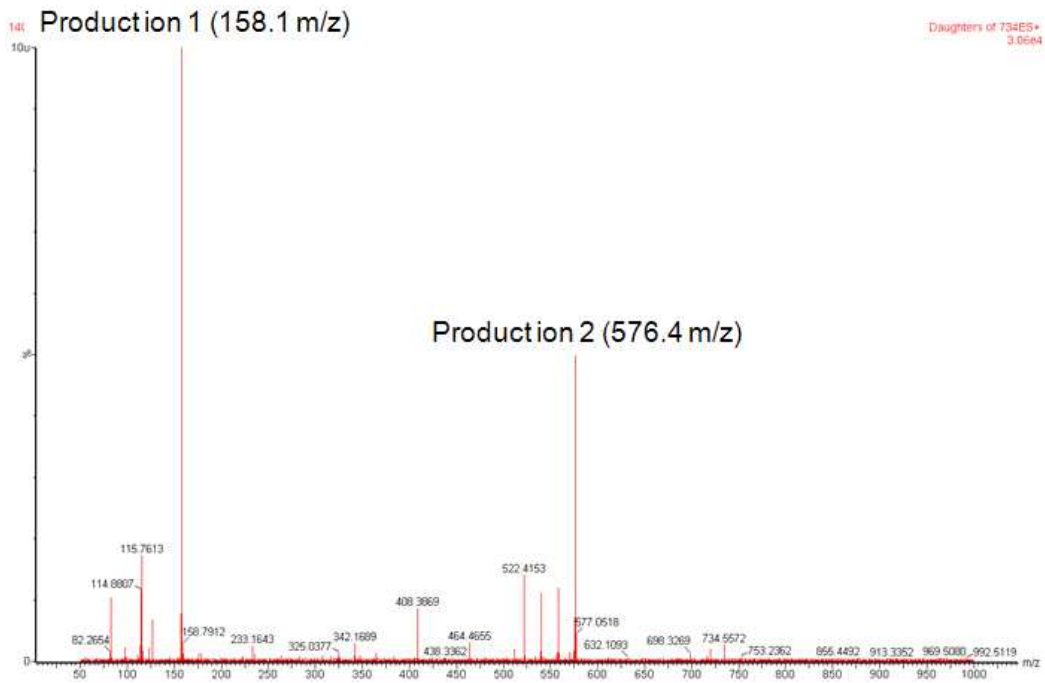

Fig 4. Erythromycin의 product ion(MS2) spectra

2-4. 분석법 밸리데이션

분석법의 최적화 이후 이에 대한 밸리데이션을 작업을 진행하였다. 밸리데이션은 linearity, accuracy, precision, application의 항목에 대하여 진행하였다. 분석법 적용 후 LOD(Limit of Detection)와 LOQ(Limit of Quantification)를 구했다. 두 항목 모두 S/N(signal to noise ratio)를 기반으로 구하게 되는데 S/N는 다음과 같이 구한다.

$$S/N = (2 \times \text{Peak height}) / \text{noise}$$

S/N가 3.3이 넘어가는 농도를 LOD, 10이 넘어가는 농도를 LOQ로 하며 LOQ를 기반으로 그 이상의 농도에 대하여 linear range를 설정하였다. 설정된 linear range를 이용하여 linearity를 확인하였다. 여기서 linearity란 검체 중 분석대상물질의 농도에 비례하여 일정 범위 내에 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 말한다. Linearity를 입증하기 위해 linear range에서 최소 5개의 표준액을 조제하여 검증한다. 이를 통해 얻은 추정회귀직선에 대한 linearity는 r^2(coefficient of determination)로 나타낸다.

Accuracy는 측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도를 말하며 recovery(%)로 나타내었다. Recovery는 다음과 같이 구한다.

$$\text{Recovery}(\%) = (\text{Peak area}_{\text{sample}} / \text{Peak area}_{\text{standard}}) \times 100$$

Accuracy는 최소 세 농도에 대해서 적어도 3회씩 반복 측정한 결과로부터 평가한다.

Precision은 균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 검체를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성(분

산정도)을 말한다. Precision은 RSD(Relative Standard Deviation)%로 나타내며 RSD%는 다음과 같이 구한다.

$$RSD\% = Standard\ Deviation \times 100 / Average_{measurements}$$

Precision은 최소 세 농도에 대해서 하루 안에 적어도 3회씩 반복 측정한 결과(intra-day precision)와 3일간 반복 측정한 결과 (inter-day precision)로부터 평가한다.

Application은 표준품으로부터 나온 결과를 실제 판매되는 제제에 적용한 결과이며 recovery로 나타내었다. 최소 세 농도에 대해서 적어도 3회씩 반복 측정한 결과로부터 recovery와 RSD%를 구하였다.

Ⅲ. 결과

1. HPLC 분석조건 최적화

1-1. 이동상의 pH

이동상의 pH는 이동상에 첨가되는 formic acid의 양으로 조절하였다. 일반적인 0.!% 농도의 formic acid를 첨가했을 때보다 0.2% 농도의 formic acid를 첨가하여 pH를 낮췄을 때 감도의 상승과 peak 모양의 개선을 보여주었다(Fig 5).

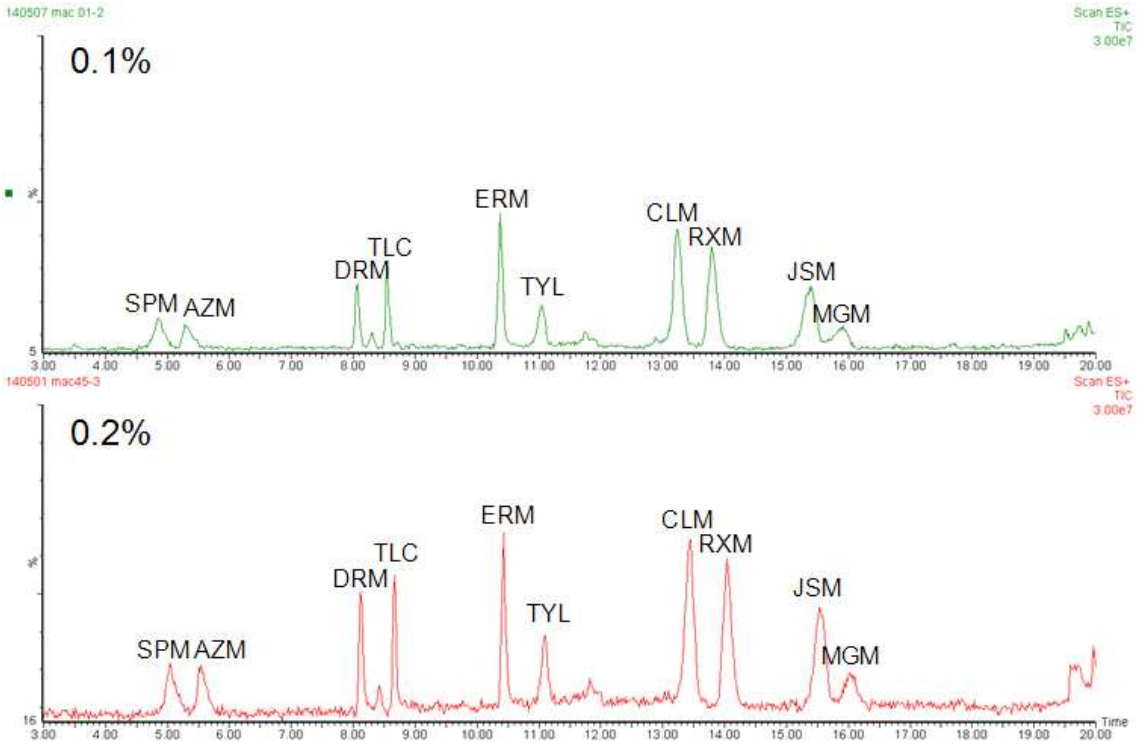

Fig 5. 이동상의 pH가 macrolide 분석에 미치는 영향

1-2. 이동상의 유기용매 조성

ACN과 메탄올은 polarity가 다르기 때문에 각기 다른 분리 양상을 보인다. 분리능의 향상을 위해 ACN에 메탄올을 혼합하여 분리효율을 관찰하였다. ACN과 메탄올을 9 : 1의 비율로 혼합했을 경우 100% ACN의 결과보다 clarithromycin과 roxithromycin의 분리효율이 개선되었으며 전체적인 감도도 증가하였지만 8 : 2 혼합물의 경우 머무름 시간의 증가와 josamycin과 magnamycin A의 peak가 겹치는 현상이 일어나 9 : 1 혼합물을 선택하였다(Fig 6).

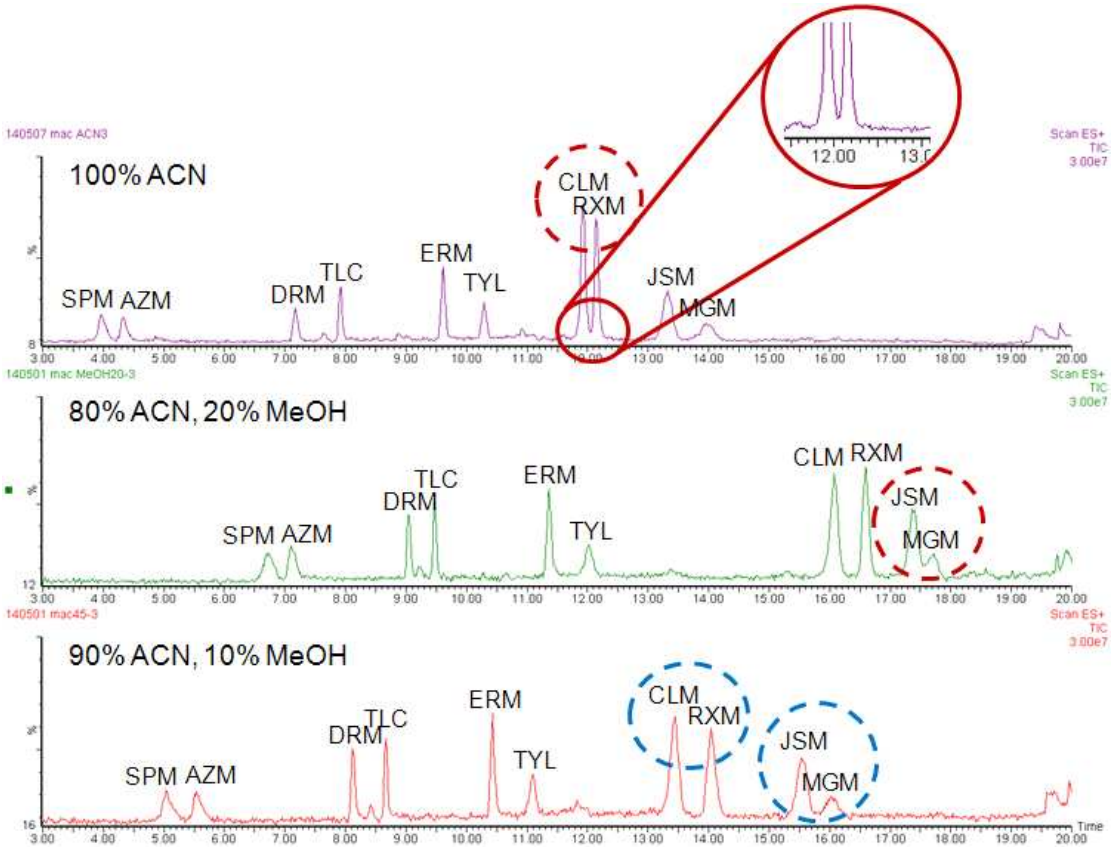

Fig 6. 이동상의 조성이 macrolide 분석에 미치는 영향

1-3. 컬럼 온도

컬럼 온도를 변화시키면서 결과를 monitoring하였다. 컬럼 온도가 높아질수록 noise가 줄어드는 등 peak 모양의 개선이 이루어졌는데 spiramycin, tylosin, josamycin, magnamycin A에서 두드러진 변화를 보였다(Fig 7).

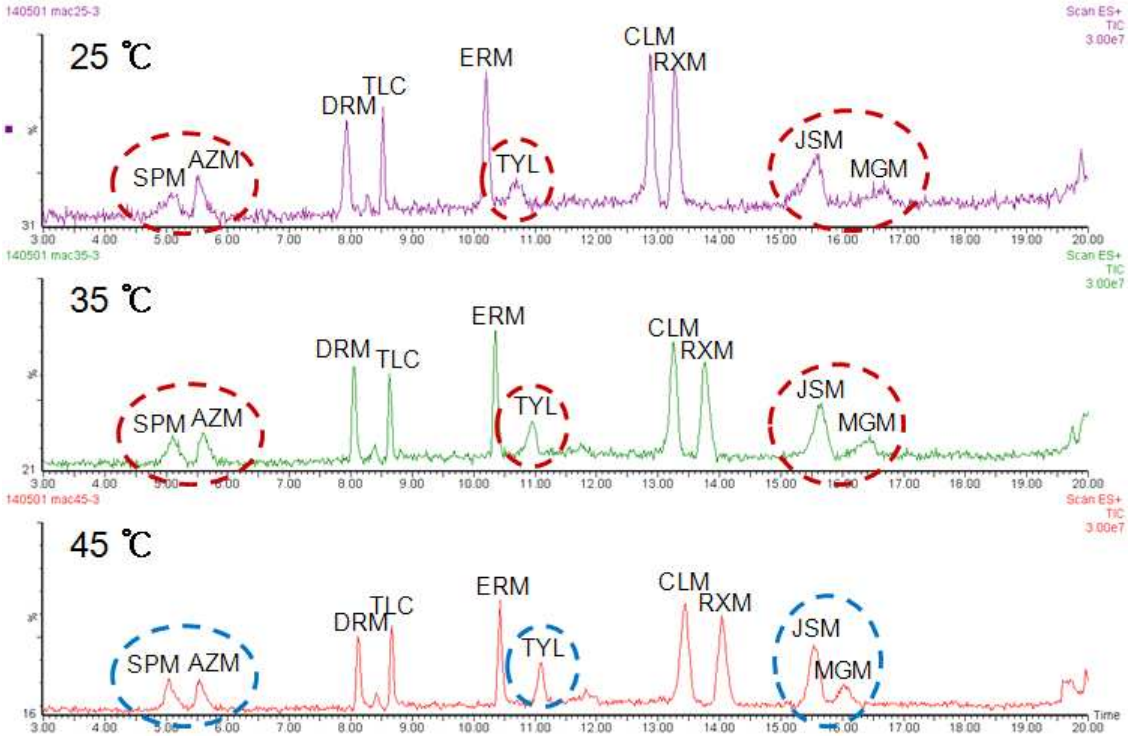

Fig 7. 컬럼 온도가 macrolide 분석에 미치는 영향

1-4. 최적화 결과

변수를 고려한 HPLC조건 최적화 결과 다음과 같은 분석조건을 개발하였다(Table 2).

Table 2. 최적화된 HPLC 분석조건

Mobile phase	A : 0.2% formic acid in water B : 0.2% formic acid in ACN and MeOH (9 : 1 v/v)
Column	Agilent poroshell 120 (4.6 x 150 mm, 2.7 μm) Temperature : 45 ℃
Flow rate	0.7 mL/min Split flow (1 : 1)
Injection volume	10 μL

2. MS 분석조건 최적화

2-1. MS scan(MS1) parameter 최적화

MS scan mode는 정해진 m/z 범위에서 측정되는 모든 이온이 기록되며 기록된 ion spectra를 기반으로 chromatogram이 표시된다. HPLC 분석조건 최적화는 MS1 scan 결과를 기반으로 이루어졌기 때문에 MS1 조건설정은 매우 중요하다. Ion source와 quadrupole의 parameter를 조절하여 분석조건을 최적화하였다(Table 3).

Table 3. MS parameter (scan mode)

Ion mode	Positive
Capillary voltage	3.5 kV
Cone voltage	45 V
Source temperature	120 ℃
Desolvation temperature	350 ℃
Desolvation gas flow	500 L/h
Mass range	100 - 1000 m/z

2-2. MRM parameter 최적화

Direct infusion을 통한 product ion scan으로 각각의 물질에 대한 MRM parameter를 최적화하였다. 각각의 물질은 고유한 precursor ion, product ion, cone voltage 및 collision energy를 가지며 나머지 parameter는 scan mode와 동일하다(Table 4).

Table 4. MS parameter (MRM mode)

Compounds	Precursor ion ($[M+H]^+$)	Product ion 1 (for quantification)	Product ion 2 (for indentification)	Collision energy (eV)	Cone voltage (V)
SPM	843.44	174.09	540.25	35	45
AZM	749.44	158.07	591.36	35	45
DRM	835.32	158.13	677.37	35	45
TLC	869.33	174.20	696.37	45	70
ERM	734.30	158.05	576.38	25	25
TYL	916.31	174.10	772.50	30	45
CLM	748.34	158.10	590.35	25	25
RXM	837.29	158.09	679.34	30	30
JSM	828.25	174.10	600.30	30	50
MGM	842.25	174.14	614.27	30	50

3. 분석법 밸리데이션

3-1. Linearity

분석결과 LOD와 LOQ는 각각 0.5~50 ng/mL 및 1~500 ng/mL로 측정되었다. 이를 바탕으로 1~10000 ng/mL의 농도 사이에서 linear range를 정하였고 이에 포함되는 다섯 개의 농도의 검액을 이용하여 검량선을 작성한 결과 0.9974 이상의 r^2를 기록하여 양호한 linearity를 나타내었다(Table 5).

Table 5. Compound별 linearity, LOD 및 LOQ

Compounds	r^2	Linear range (ng/mL)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
SPM	0.9990	500 - 10000	50	500
AZM	0.9990	50 - 1000	20	50
DRM	0.9974	100 - 2000	20	100
TLC	0.9980	50 - 1000	10	50
ERM	0.9999	2 - 50	0.5	2
TYL	1.0000	10 - 200	2	10
CLM	0.9999	1 - 20	0.5	1
RXM	0.9999	2 - 50	1	2
JSM	1.0000	5 - 100	2	5
MGM	0.9997	20 - 500	2	20

3-2. Accuracy

Accuracy 측정을 위해 200, 500 및 2000 ng/mL의 농도를 선택하였으나 spiramycin의 경우 200 ng/mL의 농도는 LOQ보다 낮기 때문에 10000 ng/mL의 농도를 추가하였다. 분석결과 77.01~110.69%의 recovery를 보이며 대부분이 20%보다 적은 양호한 차이를 보였다(Table 6).

Table 6. Compound별 recovery(%)

Compounds	200 ng/mL	500 ng/mL	2000 ng/mL	10000 ng/mL
SPM	N.A.	110.69	104.33	98.74
AZM	77.01	88.47	89.13	91.84
DRM	82.74	93.86	83.55	97.54
TLC	84.60	102.76	95.73	101.93
TYL	94.21	97.35	106.95	108.93
CLM	101.95	99.56	96.71	96.87
RXM	109.11	94.06	95.57	101.13
JSM	94.02	97.19	101.01	102.36
MGM	95.10	94.78	103.18	104.31

N.A., Quantification not available

3-3. Precision

Precision 측정을 위해 200, 500, 2000 및 10000 ng/mL의 농도를 선택하였다. Intra-day precision은 0.26~6.21%의 양호한 결과를 보였으며 inter-day precision은 0.71~25.29%의 결과를 보여 대부분 20% 이하의 양호한 결과를 보였다(Table 7).

Table 7. Compound별 precision

Compounds	Intra-day (RSD%)				Inter-day (RSD%)			
	200 ng/mL	500 ng/mL	2000 ng/mL	10000 ng/mL	200 ng/mL	500 ng/mL	2000 ng/mL	10000 ng/mL
SPM	N.A.	0.88	5.26	2.42	N.A.	6.64	10.96	0.89
AZM	4.11	3.99	3.67	1.50	24.95	8.07	8.13	6.29
DRM	0.74	4.65	3.48	2.5	25.29	6.70	12.68	1.78
TLC	2.10	3.98	2.84	2.99	16.66	6.55	3.08	1.34
TYL	1.61	4.53	5.87	3.83	4.48	7.05	4.75	5.80
CLM	0.26	4.90	2.87	2.61	1.71	3.98	2.36	2.29
RXM	2.05	3.59	5.06	3.57	10.96	8.35	3.21	0.79
JSM	1.79	5.33	6.21	4.62	8.25	6.90	0.71	1.63
MGM	2.40	4.17	5.07	4.13	6.16	10.75	2.21	2.91

3-4. Application

개발된 분석법의 확인을 위해 시판되는 macrolide 제제에 대한 recovery를 측정하였다. 분석결과 77.53~119.88%로 대부분의 제제가 20% 이내의 양호한 recovery를 나타내었다(Table 8).

Table 8. 시판되는 macrolide 제제의 recovery 및 RSD

Major compound	Dosage form	Recovery (%)		
		200 ng/mL	500 ng/mL	2000 ng/mL
Azithromycin	A (tablet)	77.53	91.65	119.09
	B (tablet)	84.63	87.73	119.88
	C (tablet)	106.92	102.78	107.56
Roxithromycin	A (tablet)	91.64	88.65	84.74
	B (tablet)	89.64	91.28	88.06
	C (tablet)	83.32	109.22	107.42
Clarithromycin	A (injection)	84.64	97.38	106.79

Ⅳ. 결론

1. HPLC/MS/MS을 기반으로 9종의 macrolide계열 항생제에 대한 동시분석법을 개발하여 불필요한 시간 및 자원의 낭비를 막고 정확하고 효율적인 정성 및 정량이 가능하게 되었다.

2. Macrolide계열 항생제 분석에 필요한 MRM 조건을 최적화하여 필요에 따라 peak의 분리 없는 빠른 분석조건으로의 변경이 용이하며 정량 및 정성이온의 선택으로 보다 정확한 분석이 가능하게 되었다.

3. HPLC 조건을 최적화를 통한 9종의 macrolide계열 항생제의 분리를 달성하여 single quadrupole MS, ELSD(Evaporative Light Scattering Detector), CAD(Charged Aerosol Detector), UV 등의 분리가 필요한 검출기를 이용한 macrolide계열 항생제의 분석기반을 마련하였다.

Ⅴ. 참고문헌

1) María José González de la Huebra, Ursula Vincent, Christoph von Holst, Sample preparation strategy for the simultaneous determination of macrolide antibiotics in animal feedingstuffs by liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD), J Pharm Biomed Anal., Volume 43, Issue 5, pp. 1628-1637 (2007)

2) Murielle Juhel-Gaugain, Béatrice Anger, Michel Laurentie, Multiresidue Chromatographic Method for the Determination of Macrolide Residues in Muscle by High-Performance Liquid Chromatography with UV Detection, Journal of AOAC International, Volume 82, 1046-1053 (1999)

3) Jian Wang, Determination of Five Macrolide Antibiotic Residues in Honey by LC-ESI-MS and LC-ESI-MS/MS, J. Agric. Food Chem., Volume 52, pp 171 - 181 (2004)

4) María José González de la Huebra, Guy Bordin, Adela Rosa Rodríguez, Development of a Multiresidue Liquid Chromatography Method with Electrochemical Detection (HPLC-ECD) for the Determination of Macrolide Antibiotics, Electroanalysis, Volume 15, Issues 5-6, pp 473 - 479 (2003)

5) M. Dubois, D. Fluchard, E. Sior, Ph. Delahaut, Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography - electrospray tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography B, Volume 753, Issue 2, pp 189 - 202 (2001)

6) S. Yang, K.H. Carlson, Solid-phase extraction - high-performance liquid chromatography - ion trap mass spectrometry for analysis of trace

concentrations of macrolide antibiotics in natural and waste water matrices, Journal of Chromatography A, Volume 1038, Issues 1-2, pp 141 - 155 (2004)

7) Sónia Abuin, Rosa Codony, Ramon Compañó, Mercè Granados, Maria Dolors Prat, Analysis of macrolide antibiotics in river water by solid-phase extraction and liquid chromatography - mass spectrometry, Journal of Chromatography A, Volume 1114, Issue 1, pp 73 - 81 (2006)

8) Eberhard Scheuch, Janina Spieker, Monica Venner, Werner Siegmund, Quantitative determination of the macrolide antibiotic tulathromycin in plasma and broncho-alveolar cells of foals using tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography B, Volume 850, Issues 1 - 2,, pp 464 - 470 (2007)

9) Rosa Codony, Ramon Compañó, Mercè Granados, José Antonio García-Regueiro, Maria Dolors Prat, Residue analysis of macrolides in poultry muscle by liquid chromatography - electrospray mass spectrometry. Journal of Chromatography A, Volume 959, Issues 1 - 2, pp 131 - 141 (2002)

10) Jian Wang, Daniel Leung, and Steven P. Lenz, Determination of Five Macrolide Antibiotic Residues in Raw Milk Using Liquid Chromatography—Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry, J. Agric. Food Chem., Volume 54, pp 2873 - 2880 (2006)

Abstract

Simultaneous analysis of nine macrolide antibiotics using HPLC/MS/MS

Song, In Gi
Department of Pharmacy, Pharmaceutical Anaysis
The Graduate School
Seoul National Univerity

Macrolide antibiotics are group of drugs that one or more deoxy sugars attached to the large lactone ring. Macrolides are effective in infections caused by Gram-positive bacteria. Macrolides are a common substitute for the patients who have penicillin allergy due to their wide antimicrobial spectrum.

Macrolides are the third most used antibiotics in Korea and consumption is increasing year by year. However, standardization of analytical methods is not completely set. LC/UV, a common instrument for drug analysis, is not suitable for analysis because some macrolide species only have low UV absorbance in low wavelength. For this reason, analytical method by using high-performance liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometer(HPLC/triple-Q MS) which shows better sensitivity is developed.

10 macrolides including internal standard were tested for the

optimization of analytical conditions-pH of mobile phase, organic solvent composition, and column temperature. After optimization, 0.2% formic acid in mobile phase, 9 : 1 mixture of acetonitrile and methanol, and 45 ℃ of column temperature were selected. Superficially porous particle octadecylsilica(SPP C18) column which shows low pressure with small particle size was used.

Scan mode was used to check the separation conditions for the optimization of analytical method and multiple reaction monitoring(MRM) mode was used for qualitative and quantitative analysis using a mass spectrometer.

After the analytical conditions were optimized, method validation was performed. Limit of detection(LOD) and limit of quantification(LOQ) show 0.5~50 ng/mL and 1~500 ng/mL respectively in spite of the inlet flow reduced to half to match the mass spectrometer flow restriction. Linearity showed more than 0.9974 of r^2, recovery records a value of 77.01~110.69%, intra-day and inter-day precision showed 0.26~6.21% and 0.71~25.29% respectively.

Developed analytical method was tested with macrolides that are commercially available. Recovery of azithromycin, clarithromycin, and roxithromycin showed 77.53~119.88%, 84.64~106.79%, and 83.32~109.22% respectively.

Improvement of efficiency is to be expected for the entire standardization of the assay for the simultaneous analysis of the macrolide antibiotics from this study.

Keywords: Macrolides, HPLC/MS/MS(High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry), ESI Triple-Q

MS(Electrospray Ionization Triple Quadrupole Mass Spectrometer), MRM(Multiple Reaction Monitoring), Method validation

Student Number : 2012-23592