

# Agilent LC/Q-TOF 및 Mass MetaSite 소프트웨어를 이용한 원활한 대사체 식별

## 응용 자료

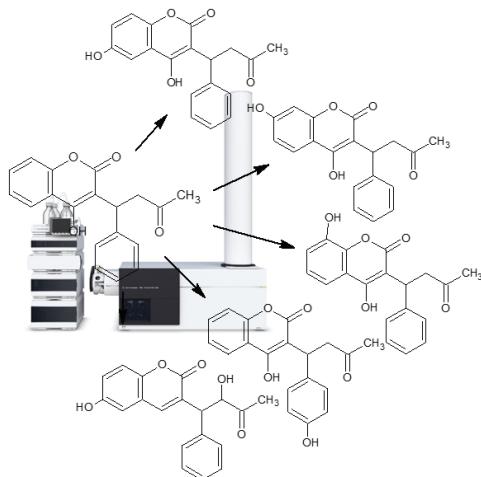
저분자 의약품

### 저자

Siji Joseph  
Application Scientist  
Agilent Technologies, Inc  
Bangalore, India

### 개요

대사체의 검출 및 식별은 신약 연구의 초기에서 매우 중요한 단계입니다. 복잡한 생물학적 시료 내에서 대사체는 극미량 수준으로 존재할 수기에 대사체의 식별은 종종 까다로운 도전 과제이기도 합니다. 이 응용 자료는 고감도 Agilent LC/Q-TOF 기기와 소프트웨어 도구(Mass MetaSite 소프트웨어)의 원활한 통합을 통한 약물 대사체 식별에 대해 소개합니다. Mass MetaSite 소프트웨어는 대사변환 예측, 주요 대사 지점 추정, accurate mass MS/MS 데이터를 이용한 대사체 구조 할당 등 작업을 수행합니다. 이 워크플로는 와파린(warfarin)을 24시간 동안 배양한 쥐 간세포(rat hepatocyte)로부터 1차 대사산물을 예측하고 식별하는 실험입니다.



Agilent Technologies

## 소개

약물 대사를 이해하는 것은 신약 연구 및 개발 시 핵심적인 부분입니다. 규제 기관은 약물 선별 초기 단계에서 모든 주요 대사체의 식별을 요구합니다. 대사체 참조 표준물질은 사용에 제한을 받는 경우가 많으며 이는 식별의 신뢰도에 영향을 미칩니다. 다행이 고감도 accurate mass 측정 기술의 발전으로 MS/MS 데이터는 대사체 식별과 관련된 대량의 구조 정보를 제공할 수 있게 되었습니다. 따라서 복잡한 생물학적 매트릭스에서 유래한 대사체의 식별에는 고분해능의 accurate mass 분석을 이용하는 것이 적합합니다. 이 응용 자료는 Agilent LC/Q-TOF 시스템과 Mass-MetaSite 소프트웨어를 이용해 와파린 대사체를 식별하고 구조를 규명하는 작업을 소개합니다.

## 실험

### 화학물질 및 시약

Methanol은 LC/MS 등급, formic acid는 LC/MS 용리액 첨가제 등급을 사용하였습니다(Sigma-Aldrich, Bangalore, India). 모든 실험에서는 Milli-Q 증류수를 사용하였습니다 (Merck, Darmstadt, Germany). 이 연구에서 사용된 모든 기타 화학물질은 Sigma-Aldrich (Bangalore, India)에서 구입하였습니다.

### 간세포 배양 시료

공동 연구자로부터 라세미체 와파린 (racemic warfarin)을 24시간 동안 배양한 쥐 간세포 시료를 공급 받았습니다. 갓 분리된 쥐 간세포를 20만 세포/well/0.5mL의 시딩 밀도 (seeding density)로 Williams E 배지(소태아혈청(Life Technologies, Carlsbad, CA) 첨가)의 콜라겐으로 코팅된 24-well plate에 발랐습니다. 2시간 후 plating 완충제를 제거하고, 혈청을 첨가하지 않은 Williams E 배지로 2회 세척하였습니다. 이어서 각 well에 30μM의 와파린을 포함하고 혈청을 첨가하지 않은 Williams E 배지 0.5mL를 추가하고, 플레이트를 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에 37°C의 온도로 24시간 동안 배양하였습니다. 그 후 세포를 긁어내어 2배 부피의 acetonitrile로 quenching하였습니다. 반응 혼합물을

12,000rpm으로 10분 동안 원심분리하였으며, 상등액을 취하여 LC/Q-TOF로 분석하였습니다.

### 워크플로

Agilent 1290 Infinity LC 시스템을 이용해 대사체를 크로마토그래피 분리한 후, Agilent 6550 Q-TOF 시스템을 이용해 accurate mass MS 및 MS/MS 스펙트럼을 획득하였습니다. Mass-MetaSite 소프트웨어로 데이터 수집 파일을 처리하여 대사체를 식별하였습니다. 워크플로는 그림 1과 같습니다.

### 기기 및 소프트웨어

역상 크로마토그래피 분석은 다음과 같은 구성의 Agilent 1290 Infinity LC를 사용해 수행하였습니다.

- Agilent 1290 Infinity Binary 펌프(G4220A)
- Agilent 1290 Infinity 자동 시료 주입기(G4226A)
- Agilent 1290 Infinity 온도 조절 장치(G1330B)
- Agilent 1290 Infinity 항온 컬럼 장치 G1316C

대사체 분리는 Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl Hexyl, 2.1 × 150mm, 1.8μm 컬럼을 이용해 수행하였습니다. Agilent 1290 Infinity LC의 분석법 파라미터가 표 1에 정리되어 있습니다.

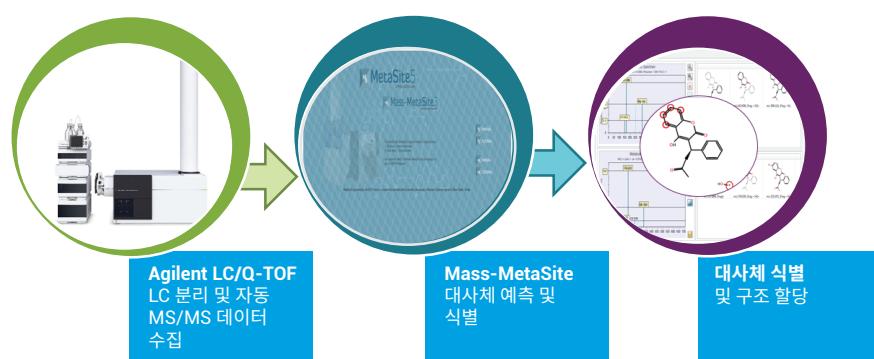


그림 1. Agilent LC/Q-TOF 기기와 Mass MetaSite 소프트웨어를 사용한 대사체 식별 워크플로

표 1. LC 분석법 파라미터

#### Agilent 1290 Infinity LC 크로마토그래피 분석 조건

이동상	A) 0.05% formic acid in water B) 0.05% formic acid in methanol	
컬럼	Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl Hexyl, 2.1 × 150mm, 1.8μm	
컬럼 온도	55°C	
주입량	3μL, flush port에서 10초 간 작동	
니들 세척	Methanol	
유량	0.24mL/min	
그레디언트	시간(분)	%B
	0	55
	12	98
	18	98
	21	55
	25	55

LC에서 분리된 용리액은 Agilent 6550 Q-TOF 질량 분석기로 검출되었습니다. 감도 향상을 위해 전자분무 소스에 Agilent Jet Stream (AJS) thermal gradient focusing 기술을 적용하였으며, 양이온 모드에서 분석을 수행하였습니다. 데이터 수집 및 분석에는 Agilent MassHunter Workstation(B.05.01 버전) 소프트웨어를 사용하였습니다. 내부 기준 질량으로  $m/z$ , 121.0505 및 922.0098의 화합물을 사용하였으며, 소프트웨어에서 기준 질량 보정 기능을 활성화하여 수집과 동시에 accurate mass 보정을 하도록 하였습니다. 표 2는 6550 Q-TOF의 분석법 파라미터를 보여줍니다. 이 기기 설정은 바탕용액 (acetonitrile), 기질(acetonitrile 내의 와파린) 및 와파린을 24시간 동안 배양한 간세포 시료의 데이터 의존성 MS/MS 스펙트럼을 수집하는 데 사용되었습니다. 데이터는 Mass MetaSite 소프트웨어 (버전: 3.2.0)를 통해 처리하였으며 파라미터는 표 3에 기재되어 있습니다.

표 2. Agilent 6550 Q-TOF 분석법 파라미터

Agilent 6550 Q-TOF 수집 파라미터	
수집 모드	자동 MS/MS
이온 극성	양이온
가스 온도	275°C
가스 유량	8L/min
분무기	25psi
Sheath 가스	325°C
Sheath 가스 유량	10L/min
노즐 전압	500V
Fragmentor	150 V
Skimmer	65V
충돌 에너지	Formula, Charge: 1, Slope: 3.6, Offset: -4.8
V Cap	3,500
기준 질량	121.0505 및 922.00979
MS 범위	100~1,000 $m/z$ , 6 spectra/s rate
MS/MS 범위	50~2,000 $m/z$ , 5 spectra/s rate

표 3. MassMetaSite 파라미터

Mass-MetaSite 파라미터	
계산 모드	DD-MS/MS
Mass spectrometer	Agilent 6550 Q-TOF
이온화 모드	[M+H] <sup>+</sup>
CYP(s)	간
대사체 세대수	2
기질 결합 손상 한계	4
결합 손상 인식, 짹수 전자	활성화
결합 손상 인식, 헐수 전자	활성화
결합 손상 인식, N-oxide	활성화
반응 메커니즘	마이크로솜 반응 세트
동일 피크 내성 (amu)	0.01
크로마토그램 자동 필터링 임계값	0.97
MS 자동 필터링 임계값	0.97
MS/MS 자동 필터링 임계값	0.9
신호 필터링	자동
스캔 필터링	자동

## 결과 및 토의

### Mass MetaSite 소프트웨어를 이용한 대사 지점 추정 및 대사체 예측

Mass MetaSite 소프트웨어에서 와파린 구조의 mol 파일을 사용해 가능성이 가장 높은 약물 대사 지점을 추정하였습니다. 간의 효소 대사 모델을 선택하였으며, 소프트웨어를 통해 예측한 대사체 리스트는 표 2에 기재되어 있습니다. 이것들은 1단계 대사체이고, 주로 하이드록실화된 대사체를 포함하고 있습니다. 대사 지점 추정을 통해 특정 대사체의 형성 가능성을 예측하였으며, 그 결과는 막대 그래프로 표시되었습니다(그림 3). exact monoisotopic mass 및 RRT(각 대사체의 관련 친유성에 근거함)도 함께 예측하였습니다.

### LC/Q-TOF 분석

Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl Hexyl 컬럼을 사용한 LC 분석법을 통해 복잡한 배양 시료 매트릭스에서 우수한 성능으로 피크를 분리해냈습니다. 그림 4는 용리 프로파일의 Q-TOF 총 이온 크로마토그램(Total Ion Chromatogram, TIC)을 보여줍니다.

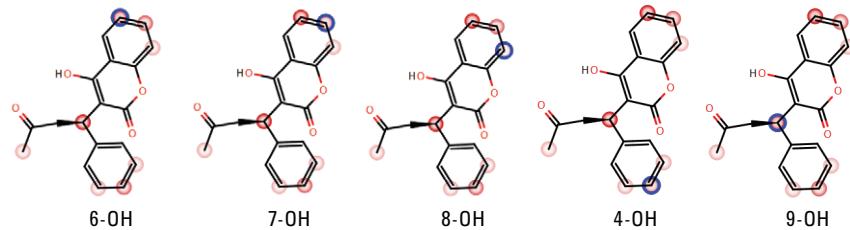


그림 2. 예측한 hydroxywarfarin 대사체 구조

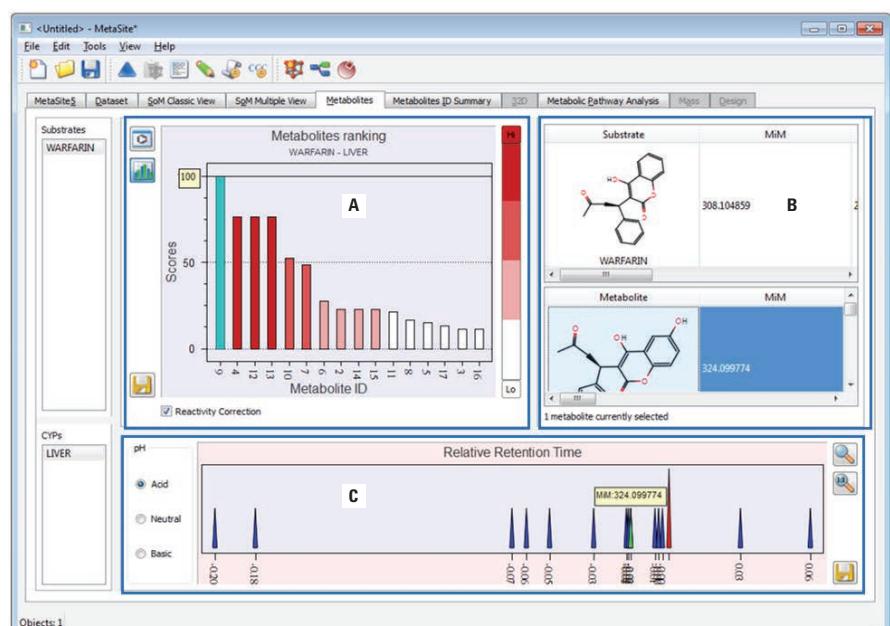


그림 3. A) 대사체 형성 가능성을 나타낸 막대 도표. 패널 A의 파란색 막대는 가능성이 가장 높은 대사체를 나타냅니다. 패널 A의 각 막대를 클릭하면, 예측한 대사체에 대한 세부 정보가 패널 B에 표시됩니다. C) 산성 이동상 조건에서 기질과 비교한 상대적 머무름 시간이 각 대사체의 accurate mass와 함께 표시되었습니다.

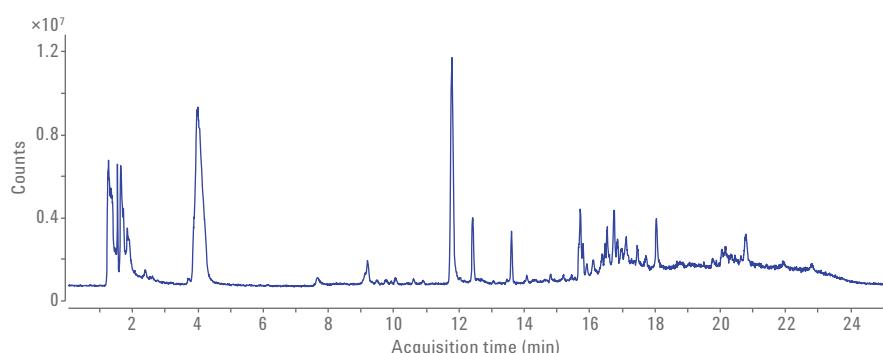


그림 4. 와파린을 배양한 주 간세포 시료의 TIC 스캔 결과. TIC에 나타난 많은 피크는 시료의 복잡성을 시사합니다.

## Mass MetaSite 소프트웨어를 이용한 대사체 식별

일반적으로 Mass-MetaSite 소프트웨어를 이용한 Q-TOF 데이터 분석은 다음 2단계로 이루어집니다.

- 복잡한 TIC 결과에서 추출한 크로마토그라피 피크로 약물 및 관련 대사체 식별
- 식별된 각 대사체의 화학적 구조 할당

이 소프트웨어는 구조 할당 과정에서 모체 약물(parent drug) 및 대사체의 이론적 조각을 예측하고, 이를 실험을 통해 얻은 MS 및 MS/MS 결과와 비교합니다. 이 실험에서 Mass MetaSite 소프트웨어는 Q-TOF 데이터로부터 3개의 hydroxywarfarin 대사체를 식별하였습니다(그림 5). 녹색으로 표시된 피크들은 대사체가 1단계 대사 반응에서 유래했음을 증명합니다. 식별된 대사체의 질량값은 예측된 값과 일치하였습니다.

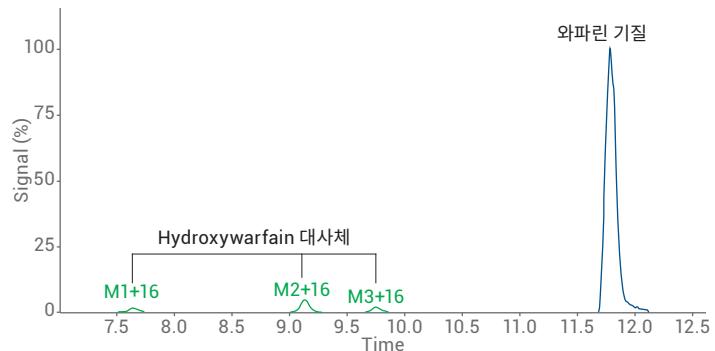


그림 5. 간세포 배양 시료에서 유래된 와파린 및 하이드록시 대사체의 용리 프로파일. 3개의 하이드록시 대사체가 기질 와파린 피크와 함께 M1+16, M2+16, M3+16으로 라벨링되었습니다.

### 조각화 패턴에 기반을 둔

#### hydroxywarfarin 기하 이성질체 (regio-isomer)의 구조적 식별

와파린의 산화 대사는 하이드록실 대사체의 5개 주요 기하 이성질체 (regio-isomer)를 형성할 수 있습니다<sup>1</sup>. 4', 10-hydroxywarfarin은 특징적인

MS/MS 조각을 가지고 있으나, 6-, 7-, 8-hydroxywarfarin으로 불리는 그 외 3개의 와파린 하이드록실 대사체는  $m/z$  179의 특정 조각이 포함된 유사한 조각화 패턴을 나타냈기 때문에 MS/MS 스펙트럼으로는 서로 구별할 수 없습니다<sup>2,3</sup>.

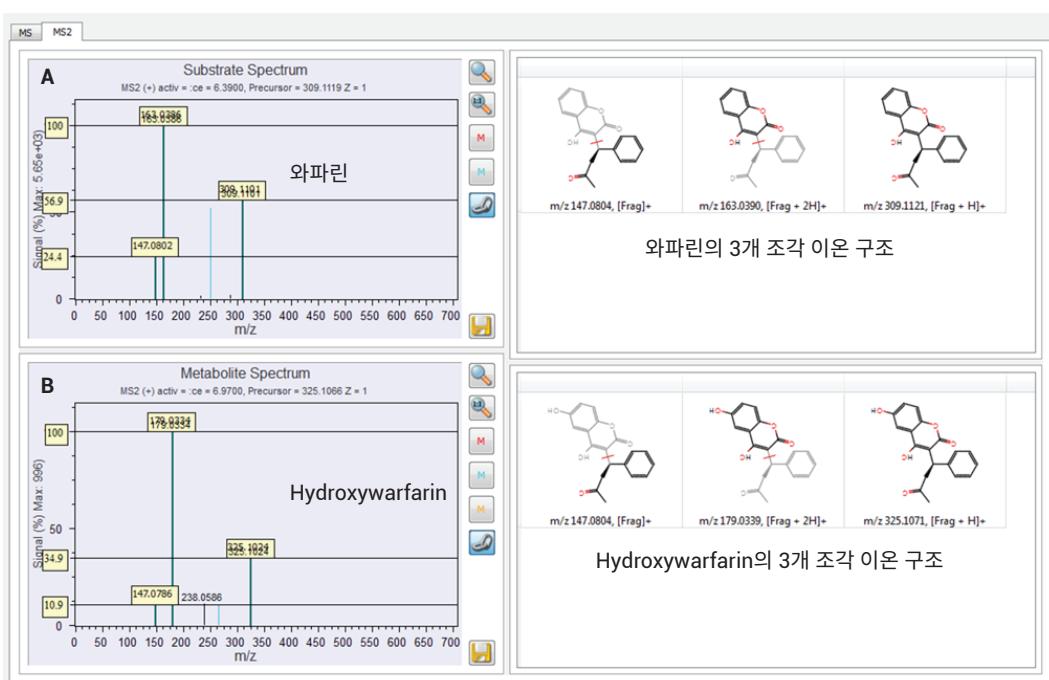


그림 6. 6-hydroxywarfarin 대사체(M+16)의 구조 할당. 자동 조각 분석은 해석에 사용된 하부 구조를 표시합니다. A는 기질(와파린)의 조각화 패턴과 구조 규명을 보여주며, B는 M+16 대사체를 보여줍니다.  $m/z$  179에서 예측된 구조는 이론적으로 6-, 7-, 8-hydroxywarfarin일 가능성성이 있습니다.

Mass MetaSite 소프트웨어를 이용해 간세포 배양 시료의 Q-TOF MS/MS 데이터를 처리하여 hydroxywarfarin의 기하 이성질체에 화학적 구조를 할당하였습니다. 이 소프트웨어는 고유한 MS/MS 조각화 패턴을 사용하여 대사체 피크 중 하나를 4-hydroxywarfarin으로 식별하였습니다. 그러나 기타 2개 대사체 피크는  $m/z$  179의 특정 조각이 포함된 유사한 조각화 패턴을 보였습니다. 따라서 2개의 대사체 피크는 6-, 7-, 8-hydroxywarfarin 중 하나일 수 있습니다. 예를 들어 그림 6은 9.7분에 용리된 3번째 hydroxywarfarin ( $M+16$ ) 대사체 피크의 구조 할당 결과를 보여줍니다. 여기에서 Mass-MetaSite 소프트웨어는 이 피크를 6-hydroxywarfarin으로 식별하였습니다. MassHunter Qual 소프트웨어를 통해 질량 정확도 값을 추가 관찰한 결과는 그림 7에 나타나 있습니다.

## 결론

이 연구에서는 생물학적 시료에서 유래한 약물 대사체를 식별하는 쉽고 믿을 수 있는 방법에 대해 소개하였습니다. Agilent 1290 Infinity LC 시스템은 탁월한 크로마토그래피 분리능을 보였으며, Agilent 6550 Q-TOF는 고분해능의 accurate mass MS/MS 데이터를 제공하였습니다. 또한 Mass MetaSite 소프트웨어는 체계적으로 확실한 대사체 구조를 식별하는데 사용할 수 있습니다. 본 실험의 워크플로는 와파린을 24시간 동안 배양한 쥐 간세포에서 유래한 hydroxy warfarin 대사체의 3가지 기하 이성질체를 쉽게 식별하였습니다. 모체 약물 화합물에서 유래한 대사체 구조에 대한 이해는 식별의 정확도를 향상하며, 더 우수한 약물 설계와 연구를 촉진합니다.

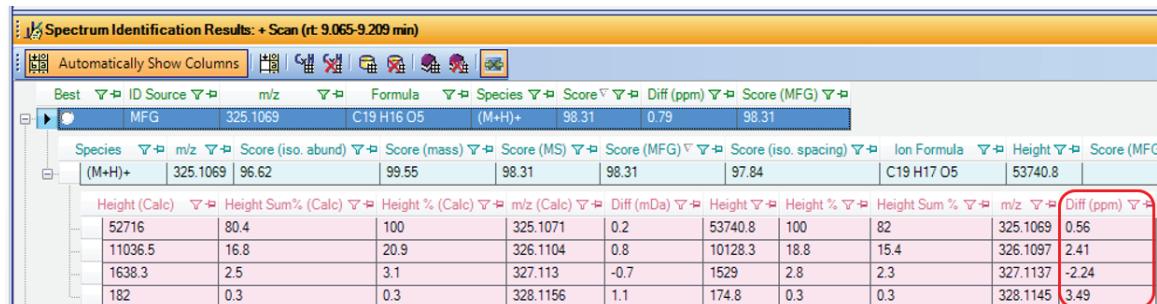


그림 7. Hydroxywarfarin 대사체 [ $(M+H)^+$ ,  $C_{19}H_{16}O_5$ ,  $m/z$  325.1069]의 질량 정확도 값을 보여주는 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 소프트웨어 화면의 스크린샷. Agilent Q-TOF의 고유한 설계 특성은 높은 질량 정확도 값을 통해 원소 조성을 확인하고, 높은 신뢰성으로 대사체를 식별할 수 있도록 합니다. 강조 표시된 부분은 동위원소에 대한 낮은 질량 오차값(< 3.5 ppm)을 나타냅니다.

## 감사의 글

배양된 간세포 시료를 제공해주신 인도  
방갈로르 Syngene Ltd., BMS-Biocon  
Research Center의 Murali  
Subramanian 박사님의 지원에  
감사드립니다.

## 참고문헌

1. Miller, G.P; Jones, D. R;  
Sullivan, S. Z; et al. Assessing  
cytochrome P450 and UDP-  
glucuronosyltransferase  
contributions to warfarin  
metabolism in humans. *Chem.*  
*Res. Toxicol.* **2009**, 22, p 1239.
2. Zhi-Yi Zhang. LC/MS/MS  
warfarin assay – An emerging  
tool for the early detection of  
cytochrome P450-associated  
drug–drug interactions in drug  
discovery, *Spectroscopy* **17** **2003**,  
pp 491-502.
3. Regalado, E. L; et al.  
Chromatographic resolution  
of closely related species:  
separation of warfarin  
and hydroxylated isomers,  
*J. of Chromatog. A* **2013**, 1314,  
pp 266- 275.

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2015  
2015년 9월 1일, 한국에서 발행  
5991-6129KO

서울시 용산구 한남대로 98, 일신빌딩 4층 우)04418  
한국애질런트테크놀로지스(주) 생명과학/화학분석 사업부  
고객지원센터 080-004-5090 [www.agilent.co.kr](http://www.agilent.co.kr)



**Agilent Technologies**