

# Agilent LC-MS/MS와 RapidFire 400-MS/MS를 이용한 *in vitro* 미세염색체 대사 안정성 분석의 비교분석

## 저자

최나영,  
한국애질런트테크놀로지스(주)

## 개요

대사 안정성은 초기 약물 발견 과정의 중요한 단계로 1상 대사를 조사하는 데 사용되며 대량의 시료에 대하여 분석하기 때문에, 신속하고 안정적인 분석법이 필요합니다.

Agilent RapidFire 400 고처리량 시스템은 대량의 시료를 처리하기 위한 자동 시료 주입기입니다. 본 장비는 하나의 시료 당 10초의 짧은 시료 주입 시간으로 질량 분석기와 함께 의약품 발견 과정에서 수행되는 ADME 시험에 가장 최적화된 시스템입니다.

본 응용 자료에서는 대사 안정성 평가를 위해 수행되는 *in vitro* 미세염색체 대사 안정성 분석(*in vitro* Microsomal Metabolic Stability assay, MMS assay)을 기존 LC-MS/MS에서 얻어진 결과와 RapidFire 400과 Ultivo를 결합하여 얻은 실험 결과를 비교하였습니다. 72종의 화합물에 대하여 Agilent MassHunter Optimizer 소프트웨어를 사용하여 MRM 조건을 최적화하였습니다. 두 시스템은 유사한 검사 결과( $R^2 = 0.94$ )를 제공했지만 RapidFire 400-MS/MS 결과는 기존 LC-MS/MS 결과 대비 10배 이상 빠른 처리량을 제공함으로써 분석의 효율성을 극대화할 수 있었습니다.

## 서론

약물동태학(Pharmacokinetic Analysis)이란 체내에 투여된 약물의 시간 경과에 따른 흡수(Absorption), 분포(Distribution), 대사(Metabolism) 및 배설(Excretion) 과정을 수학적 계산을 통해 정량적으로 이해하고자 하는 학문으로써, 약물 발견의 중요한 초기 단계입니다. 이러한 초기 분석에는 대규모 시료세트가 포함되므로 높은 분석 처리량을 요구하는 분석방식이 바람직합니다. Agilent RapidFire 400 고처리량 시스템은 MS/MS와 결합하여 대량의 시료 처리를 가능하게 함으로써 ADME 분석을 간소화할 수 있습니다.

*In vitro* MMS assay는 ADME 실험의 일종으로 대사 안정성을 확인하는 실험입니다. 시간 경과에 따라 소실된 화합물의 백분율로 정의되는 대사 안정성은 간 마이크로솜의 존재로 평가됩니다. 이는 생체 내 안정성 지표로서, 궁극적으로는 약물의 효능에 영향을 미치기 때문에 약물동태학의 임상 연구자료로서 초기 약물발견에 널리 사용됩니다.

본 실험은 다양한 약물 후보자에 대하여 *in vitro* MMS assay 실험이 수행되었으며, Agilent RapidFire 400 고처리량 시스템과 Agilent Ultivo Triple Quadrupole을 결합하여 검사를 진행하였습니다. 이러한 시스템을 통해 하나의 시료 당 약 10초의 빠른 분석 처리로 기존 LC-MS/MS 방법과 유사한 결과를 매우 짧은 시간 내에 만들어 냈습니다. 이 결과를 통해 RapidFire 400-MS/MS 분석법이 *in vitro* MMS assay 시험에 대하여 기존 LC-MS/MS 분석을 대체할 수 있는 시스템인 것을 확인할 수 있었으며, 유사한 *in vitro* ADME 실험에도 적용할 수 있음을 확인하였습니다.

## 실험

### 시료 전처리

분석 반복성 및 검량선에 사용된 표준품 원액은 아세트니트릴에 녹여져 있었으며 0.1% 개미산이 포함된 물을 이용해 1:2(v/v) 희석하여 분석에 사용하였습니다. LC-MS/MS와 RapidFire 400-MS/MS의 상관관계(Correlation) 비교를 위한 실험에는 사람의 간 마이크로솜(Human liver microsomes, HLM)이 사용되었습니다. *in vitro* MMS assay 시료는 96 well plate에서 준비하였습니다. 제어된 환경에서 배양된 화합물 혼합액 50 $\mu$ L를 새 플레이트에 옮긴 뒤, 아세트니트릴에서 제조된 50ng/mL의 내부표준용액(Tolterodine) 200 $\mu$ L를 첨가함으로써 반응을 종결하였습니다. 4°C의 3,000rpm에서 10분간 원심분리 후, 상층액을 취하여 0.1% 개미산이 포함된 물을 이용하여 1:2 (v/v) 희석한 뒤 분석에 적용하였습니다.

## 분석 기기 및 조건

RapidFire 400-MS/MS 시스템에서 시료는 RapidFire 카트리지(C4)를 통해 SPE를 거쳐 MS로 유입되고, 일반적인 MS 소스 조건 하에서 MRM으로 분석되었습니다. 재현성 및 직선성 분석에 사용된 데이터는 LC-MS/MS와 RapidFire 400-MS/MS에서 각각 분석한 뒤 비교하였으며, MS/MS로는 Agilent Ultivo Triple Quadrupole을 이용하여 분석을 수행하였습니다. *In vitro* MMS assay가 완료된 실험은 기존에 사용하던 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 및 Agilent 6470 Triple Quadrupole과 Agilent RapidFire 400 및 Agilent Ultivo Triple Quadrupole로 각각 분석하여 두 결과를 비교함으로써 LC-MS/MS 와 RapidFire 400-MS/MS간의 상관관계를 산출하였습니다. 데이터 수집을 위한 소프트웨어로는 Agilent RapidFire Control, RapidFire UI, MassHunter Acquisition(ver.10.1)을 통해 획득되었으며, 이는 단일 raw data로 전환하여 Agilent MassHunter Qualitative Analysis(ver.10.1) 및 MassHunter Quantitative Analysis(ver.10.1)을 사용하여 데이터를 처리할 수 있습니다.

표 1. LC-Triple Quadrupole MS 조건.

Agilent 1290 Infinity II UHPLC 시스템	
컬럼	Zorbax Eclipse Plus C18, 2.1 x 50mm, 1.8 $\mu$ m
컬럼 유량	0.4mL/min
주입량	5 $\mu$ L
이동상	A: 0.1% 개미산이 함유된 물
	B: 0.1% 개미산이 함유된 아세트니트릴
그라디언트(%B, 분)	60%, 2분
Agilent Triple Quadrupole MS 시스템	
이온 소스	ESI with Agilent Jet Stream
수집 모드	MRM
가스 온도	350°C
가스 유량	12L/min
네블라이저	30psi
Sheath 가스 온도	350°C
Sheath 가스 유량	11L/min
캐필러리(V)	(+)3,000, (-)4,000
노즐 전압(V)	(+)0, (-)1,500
극성	Positive/Negative

표 2. RapidFire 400-Triple Quadrupole MS 조건.

Agilent RapidFire 400 시스템	
펌프 1	0.1% 개미산이 함유된 물, 1.5mL/min 유량
펌프 2	아세트오니트릴, 1mL/min 유량
펌프 3	0.1% 개미산이 함유된 60% 아세트오니트릴, 1mL/min 유량
주입량	5µL
SPE 카트리지	Agilent RapidFire 카트리지 A (reversed phase C4 chemistry, G9203A)
흡입시간	600ms for sip sensor
로드/세척	3,000ms
Extra Wash	0
Elute	3,000ms
안정화시간	500ms
Agilent Ultivo Triple Quadrupole MS 시스템	
이온 소스	ESI with Agilent Jet Stream
수집 모드	MRM
가스 온도	350°C
가스 유량	12L/min
네블라이저	30psi
Sheath 가스 온도	350°C
Sheath 가스 유량	11L/min
캐필러리(V)	(+)3,000, (-)4,000
노즐 전압(V)	(+)0, (-)1,500
극성	Positive / Negative

## 결과

분석법에 대한 신뢰성을 얻기 위하여 직선성 및 분석 반복성의 결과를 비교하였습니다. 본 실험에 사용된 화합물은 실제 *in vitro* MMS assay에서 레퍼런스 화합물로 사용하는 Warfarin 표준액을 이용하였으며, 내부표준액으로는 Tolterodine을 적용하였습니다. Agilent Ultivo Triple Quadrupole MS를 이용해 분석하였으며, Agilent 1290 infinity II UHPLC와 RapidFire 400의 서로 다른 주입 시스템을 적용하여 분석을 진행하였습니다. 이를 통해 분석법에 대한 정밀성 및 직선성 결과를 확인하였고 그 결과, LC-MS/MS와 RapidFire 400-MS/MS 모두 우수한 결과를 나타내는 것을 통해 LC-MS/MS 뿐만 아니라 RapidFire 400-MS/MS 분석에 대한 신뢰성을 확보할 수 있었습니다.

이후 약효가 확인된 72종의 화합물에 대하여 HLM 내에서 MMS assay 전처리가 완료된 시험 세트를 LC-MS/MS 및 RapidFire 400-MS/MS 각각 분석을 수행하여 그 결과를 비교하였습니다. LC-MS/MS와 RapidFire 400-MS/MS 분석결과의 상관관계를 비교함으로써, 유사한 검사결과를 보이는 것을 확인할 수 있었습니다. 이러한 실험과정을 통해, 기존 MMS assay에 사용되는 LC-MS/MS 시험법을 RapidFire 400-MS/MS 시험법으로 완전히 이전할 수 있게 되었으며 이를 통해 분석의 효율성을 극대화하였습니다.

## 직선성 결과 비교

RapidFire 400-MS/MS 분석법의 직선성을 확인하고 LC-MS/MS의 결과와 비교하기 위하여 Warfarin 표준액을 이용하여 검량선을 작성하였고, 그 결과를 비교하였습니다. 검량선의 농도 범위는 0.5ng/mL부터 50ng/mL에서 총 7 농도로 준비하였으며, 내부표준액을 적용하여 검량선을 작성하였습니다.

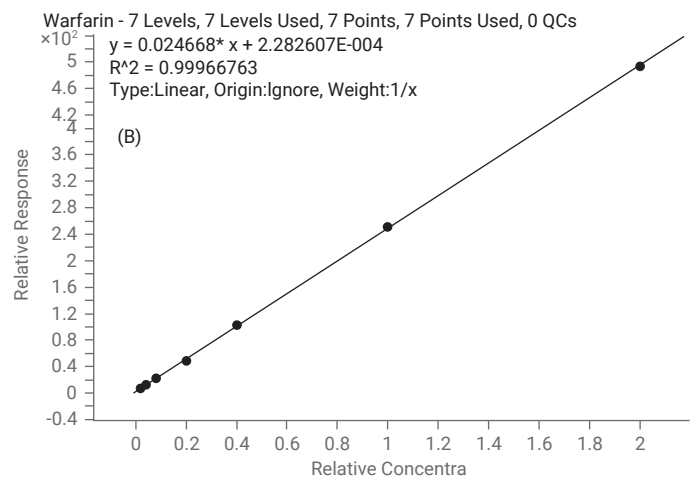
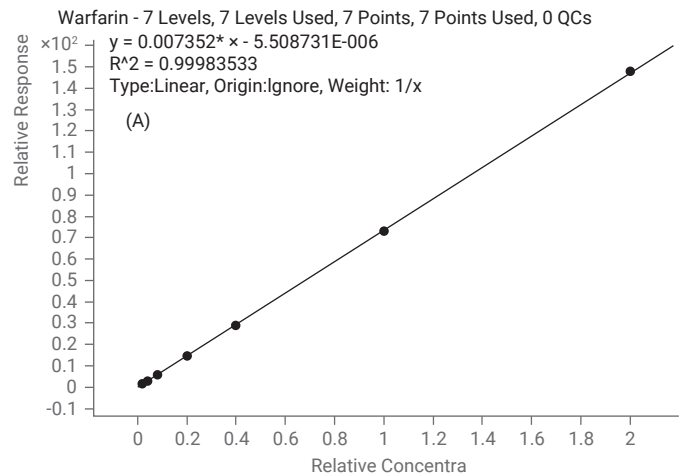


그림 1. LC-MS/MS를 이용한 검량선 결과(A) 및 RapidFire 400-MS/MS를 이용한 검량선 결과(B).

검량선은 0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50ppb(ng/mL)로 제작하였으며, 내부표준액 Tolterodine은 동일하게 25ppb가 포함되어 있습니다. LC-MS/MS와 RapidFire 400-MS/MS로 각각 분석하여 평가된 검량선 결과는 그림 1에서 확인할 수 있습니다. (A)는 LC-MS/MS를 이용해 분석된 검량선 결과이며, (B)는 RapidFire 400-MS/MS를 이용해 분석된 검량선 결과입니다. 두 결과 모두 1/x의 가중치를 적용하였으며, 정확성 80%~120% 이내에서  $R^2 = 0.999$  이상을 넘는 아주 우수한 직선성을 나타내는 것을 확인할 수 있습니다.

### 재현성 결과 비교

RapidFire 400-MS/MS와 LC-MS/MS를 이용한 분석법에 대한 정밀성 확인을 위해, 저농도 Warfarin 표준액을 5회 반복 분석하였습니다. Warfarin(타겟 물질)의 면적 값을 Tolterodine 내부표준액(ISTD)의 면적 값으로 나눈 비율에 대하여 상대표준편차(%RSD)를 통해 분석 반복성에 대한 결과를 비교하였고 그 결과는 표 3에서 확인할 수 있습니다.

표 3. 5회 반복 분석에 대한 재현성 비교.

주입 횟수	타겟/ISTD 비	
	LC-MS/MS	RapidFire 400-MS/MS
1	0.00030	0.00140
2	0.00030	0.00132
3	0.00031	0.00127
4	0.00031	0.00126
5	0.00030	0.00125
평균	0.00030	0.00130
표준편차	0.00001	0.00006
상대표준편차	2.06	4.87

5회 반복 분석에 사용된 Warfarin 표준액은 1ppb(ng/mL)로 내부표준물질인 Tolterodine 25ppb(ng/mL)가 포함되어 있습니다. 반복 분석 결과 LC-MS/MS 분석의 경우 2.06%, RapidFire 400-MS/MS 분석의 경우 4.87%의 우수한 재현성을 확인할 수 있습니다. RapidFire 400은 기존 LC와 달리 화합물이 컬럼을 거치지 않고 SPE의 원리로 카트리지를 통해 용리되기 때문에 일반적인 LC-MS/MS 분석보다 더 큰 상대표준편차 값을 나타냅니다.

### 상관관계 결과 비교

RapidFire 400-MS/MS 분석법이 기존의 LC-MS/MS 분석을 대체할 수 있는지 확인하기 위하여, 실제 HLM에서 처리된 *In vitro* MMS assay 시료를 이용하여 두 분석의 결과를 비교하였습니다. 본 실험은 상기 분석 재현성 및 직선성에 사용된 Warfarin 화합물을 포함하여 실제 약효 평가를 위한 화합물 72종을 이용하였습니다. LC-MS/MS는 기존에 사용하던 Agilent 1290 Infinity II UHPLC와 Agilent 6470 Triple Quadrupole을 이용하여 분석하였고, RapidFire 400-MS/MS는 RapidFire 400에 Ultivo Triple Quadrupole을 결합하여 분석에 사용하였습니다. 시료는 같은 조건에서 동일하게 처리하여 동량을 96 well plate에 분취하여 주입하였습니다. *In vitro* MMS assay 후 60분 후에 남아있는 화합물의 잔량을 백분율로 환산하여 총 72종 화합물에 대한 RapidFire 400-MS/MS와 LC-MS/MS의 상관관계를 비교하였고, 그 결과는 그림 2에서 확인할 수 있습니다.

그림 2에서와 같이 RapidFire 400-MS/MS 결과와 LC-MS/MS 결과 사이의 상관계수( $R^2$ )는 0.9376으로 두 분석 시스템이 동등한 결과를 산출했음을 나타냅니다. 또한 RapidFire 400-MS/MS를 이용할 경우, 기존 분석 대비 Cycle Time이 10배 이상 감소하였을 뿐만 아니라, 대사 안정성 평가를 위한 전체적인 워크플로우의 효율성이 극대화되었습니다. 이를 통해 RapidFire 400-MS/MS 시스템이 기존 LC-MS/MS 분석을 대체할 수 있음을 알 수 있습니다.

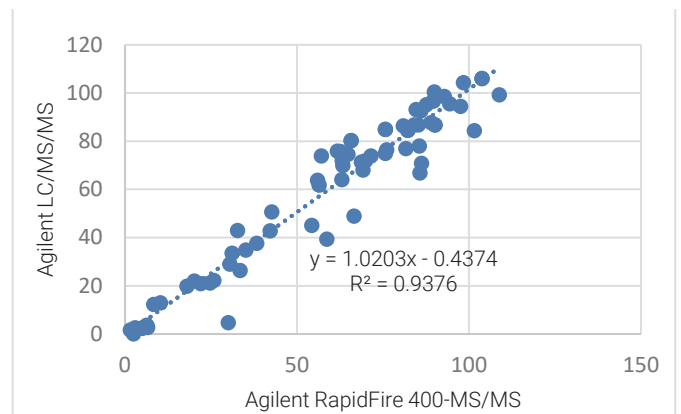


그림 2. RFMS 결과와 LCMS 결과의 상관관계.

## 결론 및 고찰

72종의 다양한 성분들이 사람의 간 마이크로솜 내에서 대사 안정성 테스트가 수행되었습니다. 본 분석은 Agilent RapidFire 400-MS/MS 시스템과 Agilent LC-MS/MS 시스템에 의해 분석되었고, 두 시스템 결과에 대한 상관관계를 비교하였습니다. 결과는 RapidFire 400-MS/MS 시스템에서 분석결과에 대한 처리량이 10배 이상 증가하면서 LC-MS/MS와 동등한 결과를 얻을 수 있는 것을 확인하였습니다. 이러한 결과는 RapidFire 시스템이 생산성을 향상시키며 전체 대사 안정성 분석의 효율성을 극대화할 수 있음을 시사합니다. 이 분석을 통해 RapidFire 400-MS/MS 시스템은 *in vitro* MMS assay를 비롯한 유사한 *in vitro* ADME 분석에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있습니다.

## 참고 문헌

1. Ultrafast Analysis of Metabolic Stability Assays Using Agilent RapidFire High-Resolution MS, Agilent Technologies Technical Overview, 5990-8344EN, 2019.
2. High-Throughput *in vitro* ADME Analysis with Agilent RapidFire/MS System: Permeability Assays, Agilent Technologies Technical Overview, 5990-9081EN, 2021.
3. Di, Li et al. Application of High Throughput Microsomal Stability Assay in Drug Discovery. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2008, 11(6), 469-476.
4. Di, Li et al. Optimization of a Higher Throughput Microsomal Stability Screening Assay for Profiling Drug Discovery Candidates. *Journal of Biomolecular screening*, 2003, 8(4), 453-62.

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

RA44498.0393865741

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

©Agilent Technologies, Inc.2021  
2021년 11월 1일, 한국에서 발행  
5994-4240KOKR

한국에질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,  
A+ 에셋타워 9층, 06621  
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)  
팩스: 82-2-3452-2451  
이메일: [korea-inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)