

# 대사체학 및 지질체학을 위한 엔드투엔드 비표적 LC/MS 워크플로

## 저자

Sierra D. Durham,  
Karen E. Yannell,  
Cate Simmermaker,  
Genevieve Van de Bittner,  
Lee Bertram,  
Daniel Cuthbertson 및  
Chris Klein  
Agilent Technologies, Inc.

## 개요

비표적 대사체학 및 지질체학 LC/MS 분석은 생물학적 시스템에 대한 통찰력을 얻고자 하는 연구자들에게 중요한 발견 기술입니다. 이 응용 자료에서는 동일한 혈장 또는 포유류 세포 시료에서 대사체학과 지질체학을 위한 시료 전처리, 기기 분석 및 비표적 데이터 분석 솔루션을 제공하는 엔드투엔드 워크플로를 제시합니다. Agilent Bravo Metabolomics 시료 전처리 플랫폼과 극성 대사산물과 지질 분획을 분리하는 Agilent Captiva EMR-Lipid 플레이트를 함께 사용하여 자동화된 시료 전처리를 수행했습니다. 대사체학을 위한 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 컬럼과 지질체학을 위한 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 컬럼을 결합한 Agilent 1290 Infinity II bio LC 시스템을 사용하여 크로마토그래피 분리를 수행했습니다. Agilent 1290 Infinity III bio LC에서도 동등한 성능이 기대되며, 여기에 설명된 모든 분석법은 Infinity II 및 Infinity III Bio LC 시스템 모두와 완벽하게 호환됩니다. 대사산물과 지질 검출은 뛰어난 분해능, 동위원소 충실도, 질량 정확도를 제공하는 Agilent Revident Quadrupole Time-of-Flight LC/MS 시스템 (LC/Q-TOF)을 사용하여 수행했습니다. 비표적 데이터 분석은 Agilent MassHunter Explorer를 사용하여 수행했고, 맞춤형 라이브러리 구축 및 큐레이션은 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 또는 Agilent MassHunter Lipid Annotator와 Agilent ChemVista 라이브러리 관리자를 함께 사용하여 관리했습니다. 남아 있는 미지 물질을 식별하기 위한 추가 분석에는 SIRIUS와 CSI:FingerID를 사용했습니다. 연구 결과는 다양한 화합물 계열에서 대사산물과 지질을 안정적으로 추출, 분획, 분리, 검출, 분석 및 식별하는 데 이러한 비표적 워크플로를 사용할 수 있음을 보여줍니다. 구현이 쉬운 이 워크플로는 모든 실험실에서 오믹스 방법론을 도입하는 데 필요한 시간을 줄여줍니다.

## 소개

생명과학과 응용과학 분야의 연구자들은 생물학적 시스템의 기능에 대한 광범위한 통찰력을 얻기 위해 대사체학 및 지질체학 기술을 점차 빠르게 도입하고 있습니다. 대사체학과 지질체학 연구는 세포 대사, 치료가 생물학적 경로에 미치는 효과, 환경 독소의 영향에 대한 상세한 정보를 제공합니다. 이러한 연구의 효과를 극대화하려면 연구자에게는 구현하기 쉽고 견고한 워크플로가 필요합니다. 대사체학이나 지질체학 실험에서 가장 중요한 과제 중 하나는 분석 대상 물질을 확실하게 식별하는 것입니다. 이 응용 자료에서는 대사체학 및 지질체학을 위한 **Agilent Revident Quadrupole Time-of-Flight LC/MS 시스템 (LC/Q-TOF)**을 사용하여 시료 전처리, 분석 물질 분리, 검출, 통계 데이터 분석 및 미지 스펙트럼 식별을 모두 아우르는 엔드투엔드 워크플로를 제시합니다.

대사체학 및 지질체학 실험은 일반적으로 표적, 반표적 또는 비표적 발견 접근법으로 분류됩니다. 애질런트는 이전에 Agilent 6495 QQQ LC/MS(LC/TQ)를 사용하여 500개 이상의 대사산물과 650개 이상의 지질을 포괄하는 표적 워크플로 솔루션을 발표했습니다.<sup>12</sup> 여기에서는 연구자들이 분석 범위를 전체 발견 접근 방식으로 확장할 수 있도록 하는 보완적인 비표적 Q-TOF LC/MS 워크플로를 소개합니다. Revident LC/Q-TOF는 빠른 수집 속도에서도 고 분해능을 제공하여 견고한 통합, 확장된 측정 범위, 동위원소 충실도를 구현함으로써 확실한 식별을 가능하게 합니다.

비표적 워크플로는 자동화된 시료 전처리<sup>3,6</sup> 및 LC/TQ 워크플로와 동일한 강력한 HILIC 분리<sup>7</sup>를 사용합니다. 이 과정은 500개 이상의 대사산물과 650개 이상의 지질에 대한 정확한 질량, MS/MS 스펙트럼, 해당 크로마토그래피 분석법에 대한 머무름 시간을 포함하는 엄선된 라이브러리를 통해 지원됩니다. 더욱이 지질 라이브러리에는 직교 실험을 통해 확인된 상당한 양의 심층적인 구조 주석 정보가 포함되어 있습니다. 재현 가능한 분리와 함께 이 기능을 통해 연구자들은 더욱 완벽한 지질 정보를 얻을 수 있습니다.<sup>8,9</sup>

이러한 모든 도구를 결합하면 대사산물과 지질을 확실하게 식별하고 생물학적 통찰력을 빠르게 얻을 수 있습니다. 비표적 데이터로 Agilent MassHunter Explorer에서 feature 찾기, 식별 및 통계 분석을 수행하고, SIRIUS와 CSI:FingerID에서 추가적인 화합물을 식별합니다.<sup>10</sup> 이 포괄적인 LC/Q-TOF 워크플로는 생물학 연구자들이 극성 대사산물과 지질의 비표적 분석을 시작하는 출발점을 제공하며, 각 구성 요소는 모든 대사체학 또는 지질체학 실험에 가치를 더해줍니다.

## 애질런트의 엔드투엔드 오믹스 솔루션

시료 전처리	 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Bravo Metabolomics 시료 전처리 플랫폼</li> <li>- Captiva EMR-Lipid 플레이트</li> </ul>
분리	 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1290 Infinity II/III bio LC</li> <li>- InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 컬럼</li> <li>- ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 컬럼</li> </ul>
검출	 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Revident LC/Q-TOF</li> </ul>
데이터 분석	 <ul style="list-style-type: none"> <li>- MassHunter Qualitative Analysis</li> <li>- MassHunter Lipid Annotator</li> <li>- MassHunter Explorer</li> <li>- ChemVista</li> <li>- SIRIUS와 CSI:FingerID</li> </ul>

**그림 1.** 엔드투엔드 비표적 분석 워크플로는 세포 또는 혈장의 자동화된 시료 전처리, 극성 대사산물 분리를 위한 견고하고 재현 가능한 HILIC 크로마토그래피 또는 Agilent 1290 Infinity II 또는 Infinity III bio LC 시스템을 사용한 지질의 C18 크로마토그래피, 확실한 비표적 분석을 위한 Agilent Revident Quadrupole Time-of-Flight LC/MS 시스템(LC/Q-TOF), 통계 및 자동 분석을 위한 Agilent MassHunter 소프트웨어, MS/MS 스펙트럼에서 미지 물질의 구조 식별과 온라인 데이터베이스 검색을 위한 SIRIUS와 CSI:FingerID에 중점을 둡니다.

## 실험

### 시료 전처리

시료는 Agilent Bravo Metabolomics 시료 전처리 플랫폼과 Agilent Captiva EMR-Lipid 플레이트를 사용하여 준비했습니다. 이러한 도구를 결합하면 동일한 혈장 시료에서 대사산물, 지질 및 단백질 분획을 분취하여 시료를 절약하고 동일한 분취량에서 직접적인 생물학적 비교를 보다 효과적으로 수행할 수 있습니다.<sup>3-6,11</sup> 이 실험을 위해, 그림 2와 같이 마우스 혈장(생물학적 반복 실험, 수컷 n = 20, 암컷 n = 20, well 당 20µL)에서 대사산물과 지질을 추출했습니다. Bravo Metabolomics 시료 전처리 플랫폼을 사용하면 자동화되고 사용하기 쉬운 시료 전처리가 가능하므로 회수율이 높아지고 시료 전처리 시간이 단축됩니다. 중요한 점은 이 단계의 자동화를 통해 변동성을 최대 50%까지 줄일 수 있다는 것입니다. 그 결과 변동 계수가 낮아져 이후 분석의 통계적 신뢰도가 향상됩니다.<sup>11</sup> 이전에 설명한 것과 유사한 워크플로를 사용하여 세포 시료에서 대사산물과 지질을 동시 분획할 수도 있습니다.<sup>4</sup>

대사산물과 지질 분획 모두 보관을 위해 건조시켰습니다. 대사산물 분획은 70% 아세토니트릴, 20% 물, 10% 메탄올(시료당 100µL)로 재용해하고, 품질 관리 평가를 위한 내부 표준으로 안정 동위원소 표지 분석물을 첨가했습니다. 지질 분획은 90% 메탄올, 10% 클로로포름(시료당 100µL)으로 재용해하고, 재용해를 돕기 위해 초음파 처리와 오비탈 진탕을 결합하여 사용했습니다.



**그림 2.** Agilent Captiva EMR-Lipid 플레이트는 단백질 침전물을 걸러내고, 흡착제에 지질을 포집하고, 극성 대사산물을 수집 플레이트로 용출하는 데 사용됩니다. 두 번째 용매 세트는 지질을 별도의 수집 플레이트로 방출하여 동일한 혈장 또는 세포 분취액에서 극성 대사산물과 지질을 모두 추출할 수 있게 해줍니다. Agilent Metabolomics Bravo 시료 전처리 플랫폼은 통합 벤치탑 액세서리를 사용하여 96웰 플레이트 형식으로 이러한 고체상 추출을 수행할 수 있습니다.<sup>3,4</sup>

### 분리

표준화된 구성의 Agilent 1290 Infinity II bio LC를 사용하여 극성 대사산물과 지질 모두에 대해 확립된 크로마토그래피는 이전에 자세히 설명되었습니다.<sup>1,7</sup> 간략하게 설명하면, 극성 대사산물은 Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z 컬럼 (2.1 × 150mm, 2.7µm)을 사용하여 총 분석 시간이 24분인 분석법으로 분리했습니다. 지질 분리는 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 컬럼 (2.1 × 100mm, 1.8µm)을 사용하여 16분 동안 수행했습니다. 두 크로마토그래피 분석법 모두 Agilent 1290 Infinity III bio LC와 완벽하게 호환되며, 두 시스템 모두에서 동일한 결과를 기대할 수 있습니다.

자동화된 시료 전처리와 견고하고 표준화된 크로마토그래피를 통합하여 복잡한 매트릭스에서 대사산물과 지질을 검출하는 신뢰할 수 있고 완벽하게 검증된 분석법을 제공합니다. 이러한 접근 방식을 사용하면 예측 가능하고 기록된 머무름 시간을 얻어 식별의 신뢰도를 높일 수 있습니다.

### 검출

Revident LC/Q-TOF를 사용하여 비표적 대사산물과 지질 분석을 수행했습니다. 비표적 분석은 가장 어려운 질량 분석 분야 중 하나로, 뛰어난 분석을 위해 정교한 기기가 필요합니다. Revident LC/Q-TOF는 이러한 목적에 맞춰 특별히 개발되었으며, 넓은 측정 범위, 높은 분해능, 동위원소 충실도, 질량 정확도, 높은 실험 정밀도를 동시에 제공합니다. 이 모든 요소가 갖춰졌을 때, 통계 분석을 통해 통계적으로 관련 있는 feature를 명확하게 식별할 수 있습니다.

### 반복적 데이터 의존 수집 (Iterative data dependent acquisition):

기존의 데이터 의존 (Auto) MS/MS 데이터 수집의 경우, 크로마토그래피 용출 중에 조각화를 위해 선택할 수 있는 전구체 수가 제한 요소로 작용하며, 이로 인해 존재비 편향이 발생하고 종종 존재비는 낮지만 중요한 분석 항목을 놓치게 됩니다. 반복 MS/MS 분석은 순차적으로 전구체를 제외하는 자동화된 워크플로를 통해 이러한 한계를 극복하고, 순차적 주입을 통해 존재비가 낮은 분석 물질을 분할할 수 있습니다. Revident Q-TOF LC/MS 시스템에서는 내장된 자동화된 intelligent reflex 워크플로를 통해 반복적인 분석이 용이합니다. 이 워크플로를 사용하면 블랭크를 분석하여 반복적 제외 목록에 추가할 수 있으므로 생물학적 식별에 더 풍부한 데이터가 생성됩니다.

앞서 언급한 크로마토그래피를 사용하여 풀링된 시료 추출물에 대해 반복적 대사체학 및 지질체학 분석을 수행했으며, Q-TOF 소스 및 수집 파라미터는 이전 애질런트 발행물에 기술되어 있고 표 1 및 2에 요약했습니다.<sup>12,13</sup> 양이온 및 음이온 모드에서 별도의 반복 분석을 수행했으며, 각 극성에 대해 지질과 대사산물 모두 8번 반복 수집했습니다. 이 반복 데이터는 해당 시료 세트에 맞춘 머무름 시간으로, 사용자 정의 대사산물 및 지질 데이터베이스를 구축하는데 사용되었으며, MS1 데이터 분석 중에 이를 적용했습니다.

MS1 분석은 해당 반복 분석 없이도 수행할 수 있습니다. 그러나 반복 분석과 맞춤형 데이터베이스 구축을 추가하면 MS1 데이터에서 화합물을 더 풍부하게 식별할 수 있으므로 권장됩니다.

**MS1:** 각 마우스 혈장 시료의 해당 추출물에 대해 대사체학 및 지질체학 분석을 수행했으며, 최적의 Revident LC/Q-TOF 성능을 보장하기 위해 표 1과 2에 명시된 약간의 수정 사항을 포함하여 이전에 발표된 분석법을 따랐습니다.<sup>1,2</sup> MS1 대사체학 분석은 각 극성에 대해 시료당 2회 주입하여 수행했습니다. 이 연구에서는 광범위한 지질 분류를 위해 양이온 MS1 분석만 사용했지만, 추가적인 음이온 MS1 분석은 보완적인 커버리지를 제공하며 지질 식별을 최대화하려는 경우 권장됩니다.

표 1. Agilent Jet Stream(AJS) 소스 조건은 fragile 분석 물질의 HILIC 대사체학 분석과 C18 지질 분석에 최적화되었습니다.

Agilent Jet Stream (AJS) Source Parameters		
	HILIC 대사체학	C18 지질체학
이온 모드	AJS, 양이온/음이온	AJS, 양이온
가스 온도	225°C	320°C
건조 가스 유량	9L/분	8L/분
네블라이저 가스	30psi	45psi
Sheath Gas 온도	375°C	350°C
Sheath Gas 유량	12L/분	11L/분
캐필러리 전압	3,000V	3,500V
노즐 전압	500V	1,000V

표 2. fragile 분석 물질의 HILIC 대사체학 분석과 C18 지질 분석을 위한 Agilent Revident Quadrupole Time-of-Flight LC/MS 시스템(LC/Q-TOF)의 수집 파라미터.

Revident LC/Q-TOF MS 조건		
	HILIC 대사체학	C18 지질체학
튜닝	<i>m/z</i> 1,700, fragile ion	<i>m/z</i> 1,700, stable ion
수집 범위	MS1: <i>m/z</i> 60 - 1,000 MS2: <i>m/z</i> 20 - 1,000	MS1: <i>m/z</i> 50 - 1,700 MS2: <i>m/z</i> 20 - 1,700
수집 속도	MS1: 4Hz MS2: 6Hz	MS1: 3Hz MS2: 3Hz
Fragmentor 전압	100V	175V
스키머 전압	45V	45V
Octopole 1 RF Vpp	750V	400V
참조 이온	Purine 및 HP-921	Purine 및 HP-921

### 데이터 분석

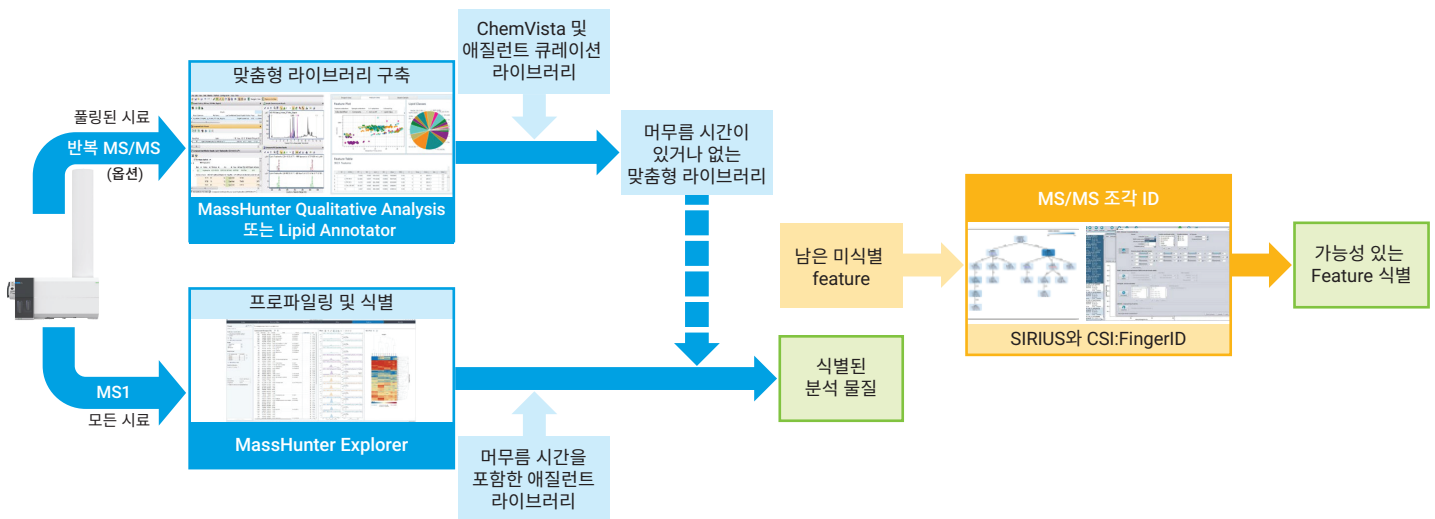
발견 대사체학 및 지질체학 워크플로에서 데이터 독립적 수집은 뚜렷한 이점이 있습니다. 하지만 이 기술을 사용하면 복잡한 데이터 파일이 생성됩니다. 그림 3에서 볼 수 있듯이, 이러한 복잡한 파일을 단순화하고 확실한 분석 물질 식별을 제공하는 소프트웨어 솔루션이 있습니다.

**질량 스펙트럼 라이브러리 관리를 위한 Agilent ChemVista:**  
표적 분석을 위한 개인 화합물 데이터베이스 라이브러리(PCDL)를 구축하는 데 **Agilent ChemVista** 라이브러리 관리 소프트웨어가 사용되었습니다. ChemVista는 식별을 위한 MS/MS 스펙트럼을 갖춘 광범위한 화합물 라이브러리를 지원합니다. 이 소프트웨어는 화학정보학적 토대를 바탕으로 한 화합물 중심의 데이터 모델을 활용하여 중복 없이 화합물을 포함시키고 여러 라이브러리를 효율적으로 병합할 수 있도록 해줍니다. 대사체학 분석을 위해, 머무름 시간을 포함한 500개 이상의 대사산물로 큐레이션된 Agilent HILIC Metabolomics PCDL과 함께 METLIN 대사산물 및 화학물질 라이브러리가 사용되었습니다. 지질 분석을 위해서는 머무름 시간을 포함해 650개 이상의 지질로 큐레이션된 Agilent Lipidomics PCDL이 사용되었습니다. 또한 ChemVista를 사용하면 MoNA(Mass Bank of North America)<sup>15</sup>, Mass Bank of Europe<sup>16</sup> 및 EPA 라이브러리와 같은 소스에서 사용 가능한 타사 스펙트럼을 가져와 화합물 목록을 큐레이션할 수 있습니다.

이 응용 자료에서는 MS1 및 머무름 시간 기반 식별을 위해 데이터베이스를 사용했고, 라이브러리는 스펙트럼 매칭을 위해 MS/MS 데이터를 포함하였습니다. 때로는 MS/MS 스펙트럼을 포함하는 PCDL이 식별 과정 중에 참조되는 정보 유형에 따라, 다양한 식별 워크플로에서 라이브러리와 데이터베이스 역할을 모두 수행할 수 있습니다.

**맞춤형 라이브러리 구축을 위한 MassHunter Qualitative Analysis 및 MassHunter Lipid Annotator:** 반복 데이터의 대사산물 분석에 **MassHunter Qualitative Analysis** 소프트웨어를 사용하여 Auto MS/MS 데이터 추출을 수행하고 METLIN 대사산물 및 화학물질 라이브러리를 통해 라이브러리를 식별했습니다. 관심 분석 물질에 따라 METLIN 라이브러리에 추가하여, 또는 이를 대체하여 ChemVista의 다른 확장 라이브러리를 포함시킬 수 있습니다. MassHunter Qualitative Analysis 12.0은 또한 식별된 feature의 머무름 시간을 스펙트럼 라이브러리로 내보내어 쉽게 업데이트할 수 있도록 해줍니다.

반복적 데이터의 지질 분석에 **MassHunter Lipid Annotator** 소프트웨어를 사용하여 프로세스를 간소화했습니다. 이 소프트웨어는 Kind 등이 처음 개발하고 Tsugawa 등이 추가적으로 개선한 LipidBlast의 수정된 버전인 in silico 라이브러리를 사용하여 feature를 추출하고 식별합니다.<sup>14</sup> 추출 및 식별 후, Lipid Annotator는 해당 맞춤형 지질 데이터베이스를 내보내는 작업을 도와줍니다. 특히, Lipid Annotator는 과도한 주석(over-annotation) 처리를 피하기 위해 데이터 품질과 주석을 고려하여 지질 식별을 큐레이션합니다.



**그림 3.** 비표적 대사체학 및 지질체학을 위한 수집 및 분석 워크플로. 각 개별 시료의 MS1 데이터를 Agilent MassHunter Explorer 소프트웨어에서 수집 및 분석하여 빠르고 쉽게 feature를 추출하고 통계를 도출합니다. 풀링된 시료에 대한 추가적인 반복 MS/MS 워크플로를 수행하여 실험 시료 세트에 맞는 맞춤형 데이터베이스를 구축할 수 있습니다. 반복적인 지질 데이터는 Agilent MassHunter Lipid Annotator에서 분석합니다. 반복적인 대사산물 데이터는 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 12.0에서 분석되며, Auto MS/MS 스펙트럼을 추출하고 Agilent ChemVista 스펙트럼 데이터베이스의 라이브러리 입력을 통해 식별합니다. 식별되지 않은 나머지 요소에 대해서는 SIRIUS와 CSI:FingerID로 스펙트럼을 분석하여 추가적인 feature 식별 정보를 얻을 수 있습니다.

대사산물과 지질에 대해 풀링된 시료를 반복 분석한 결과는 해당 시료 세트에 맞춰 큐레이션된 머무를 시간 포함 맞춤형 데이터베이스를 구축하는데 사용되었습니다. 그런 다음 중요한 feature를 식별하기 위한 비표적 MS1 데이터 분석에 이 데이터베이스를 적용했습니다. 화합물 식별을 최대화하려면 반복 분석과 맞춤형 데이터베이스 큐레이션 단계를 포함하는 것이 좋습니다. 그러나 워크플로의 반복적 부분을 수행하지 않더라도 기존 라이브러리를 사용한 MS1 분석으로 화합물을 식별할 수 있습니다.

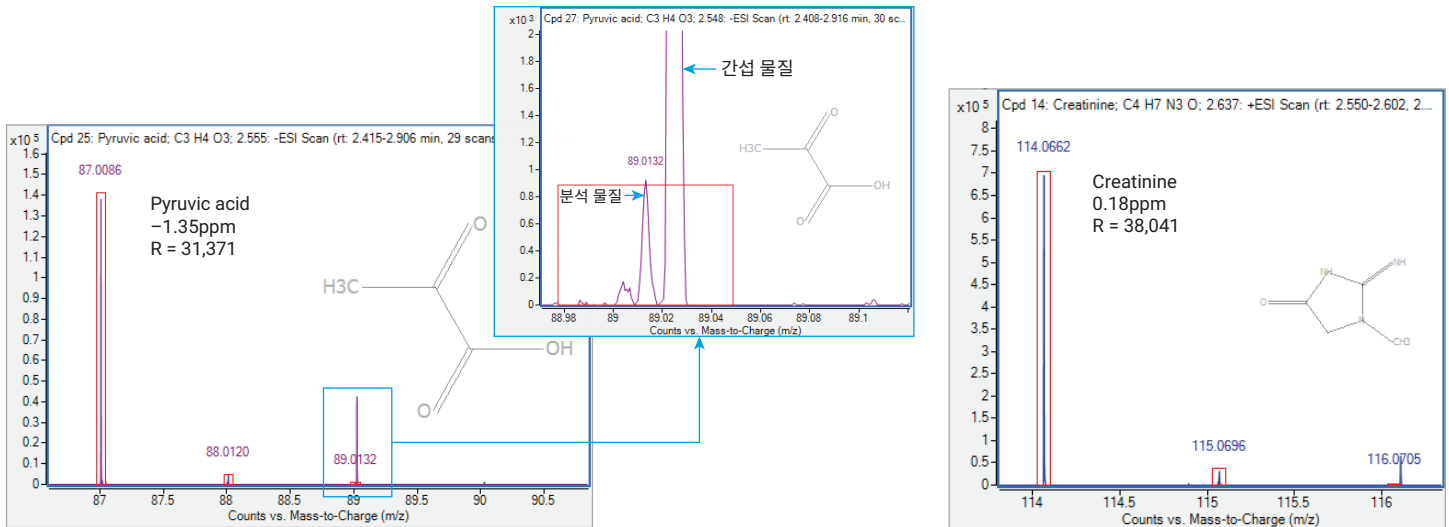
**프로파일링 및 식별을 위한 MassHunter Explorer: MassHunter Explorer**를 사용하여 비표적 MS1 데이터에서 feature를 찾고 식별했습니다. 이 도구는 feature 추출, 통계 분석 및 식별을 직관적인 단계별 인터페이스를 갖춘 단일 애플리케이션으로 통합합니다. MassHunter Explorer를 사용한 feature 찾기는 MassHunter Acquisition 12.0을 통한 수집 후 feature 추출 변환 (post-acquisition feature extraction conversion)을 사용하여 빠르게 시작할 수 있으며, 이 기능은 데이터가 수집되는 동안 분자 feature 추출의 첫 단계를 수행합니다. MassHunter Explorer에서는 여러 데이터베이스를 활용하여 더 폭넓은 화합물을 식별할 수 있습니다.

**SIRIUS와 CSI:FingerID를 이용한 미지 물질 분석:** SIRIUS와 CSI:FingerID는 feature 찾기 과정에서 발견되었지만 스펙트럼 라이브러리 검색에서는 식별되지 않은 알려지지 않은 미지 feature를 가능한 구조로 변환함으로써 비표적 분석 워크플로를 보완합니다. 추가적인 MS/MS 실험에서 얻은 스펙트럼을 SIRIUS 인터페이스로 드래그 앤 드롭하여 구조 예측 알고리즘을 통해 대략적인 식별 결과를 얻고, 이어 온라인 데이터베이스에서 검색이 이루어집니다.<sup>10</sup>

## 결과 및 토의

### 확실한 발견을 위한 Revident LC/Q-TOF

Revident LC/Q-TOF는 복잡한 매트릭스 시료의 비표적 분석에서 확실한 식별에 필수적인 뛰어난 동위원소 충실도, 질량 정확도 및 측정 범위를 결합하고 있습니다. 높은 동위원소 충실도 덕분에 근접한  $m/z$  간섭이 존재하더라도 분석 물질을 확실하게 식별할 수 있습니다(그림 4). 그림 5에서 볼 수 있듯이, 지속적인 질량 정확도는 여러 날에 걸친 분석에서 분석물을 확실하게 식별하는데 매우 중요합니다. 넓은 스펙트럼 내 측정 범위 덕분에 높은 존재비의 동시 용출 분자가 존재하는 경우에도 존재비가 낮은 중요한 분석 물질 검출이 쉬워집니다(그림 6).



**그림 4.** Agilent Revident Quadrupole Time-of-Flight LC/MS 시스템(LC/Q-TOF)을 사용하여 복잡한 매트릭스에서 대사산물을 확실하게 식별한 두 가지 예입니다. 탁월한 정확한 질량 측정 결과 외에도, 이론적 동위원소 패턴(빨간색)과 중첩된 분석 물질 신호는 분석 물질에 대한 뛰어난 동위원소 충실도를 보여줍니다. 고분해능 질량 정확도는 피루브산 분석에 특히 유용하며, 이는 근접 질량 간섭(삽입 그림)으로부터 동위원소 중 하나를 분리하는 것을 가능하게 합니다.

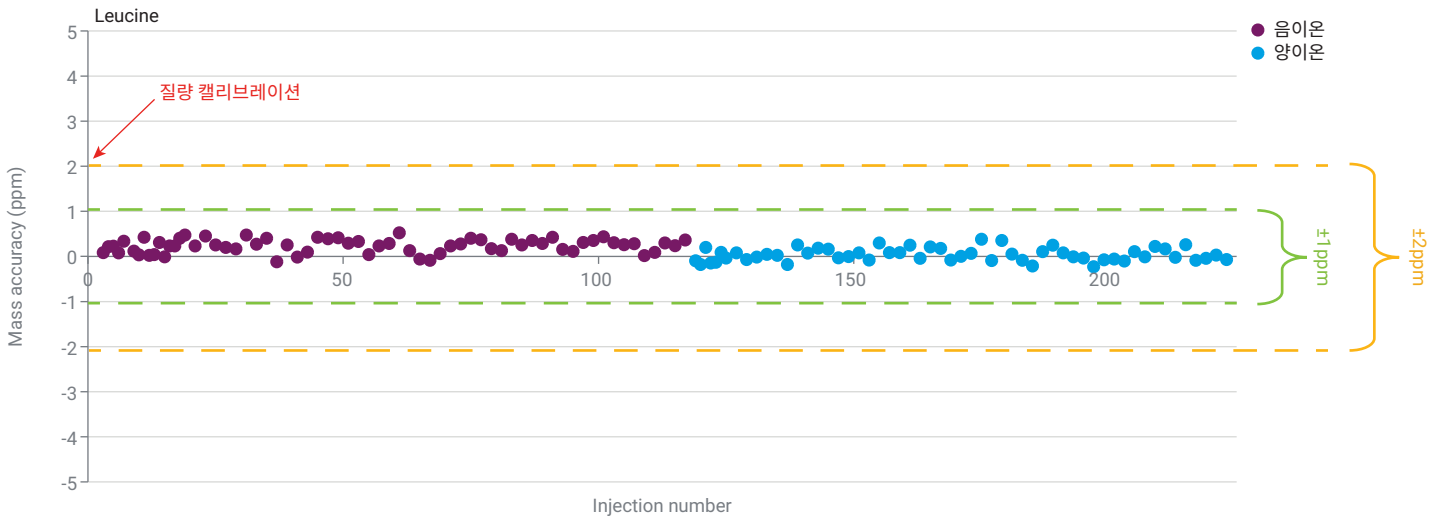


그림 5. 질량 정확도는 화합물 식별에 직접적인 영향을 미치므로 스펙트럼 품질에 중요한 파라미터입니다. 류신을 이용해 7일 동안 225회 주입하는 동안 질량 정확도(<math>\pm 1\text{ppm}</math>)를 모니터링했습니다.

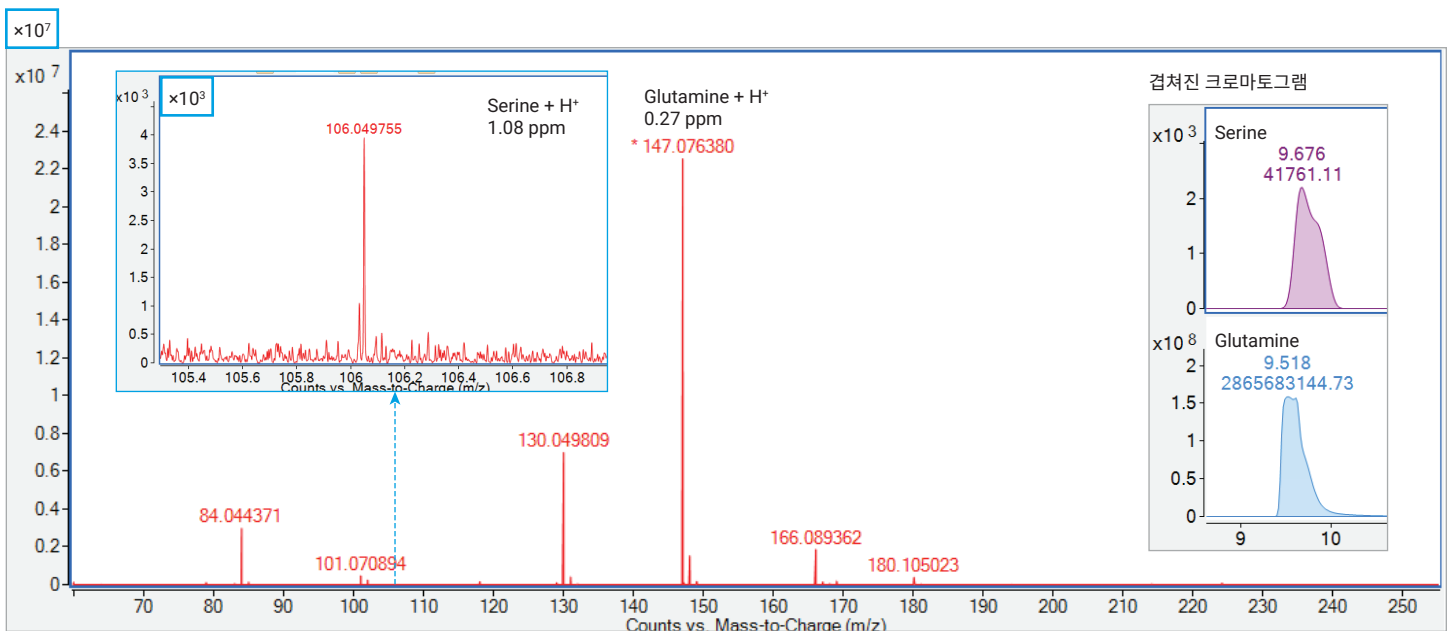


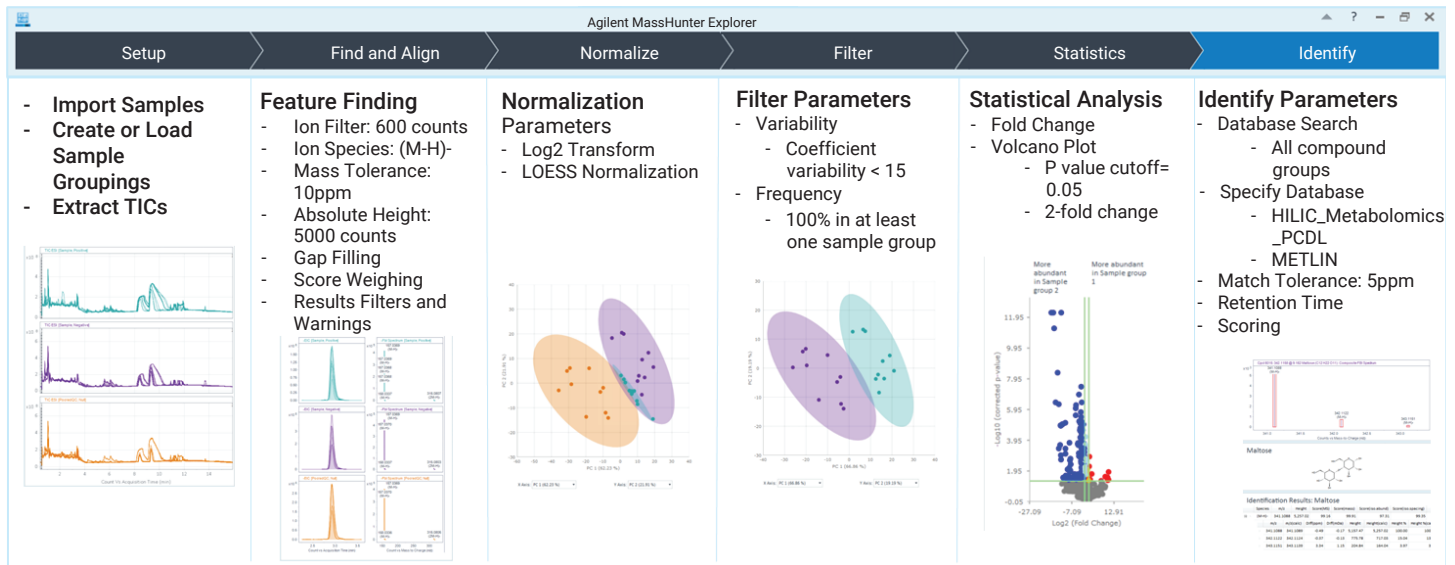
그림 6. Agilent Revident Quadrupole Time-of-Flight LC/MS 시스템(LC/Q-TOF)은 전체 스펙트럼에서 5 자릿수의 측정 범위를 실현합니다. 이 그림은 글루타민 + H<sup>+</sup>와 세린 + H<sup>+</sup>를 사용하여 4 자릿수 이상이 얻어진 모습을 보여줍니다. 특히, 2,000만 카운트 이상의 존재비로 글루타민 + H<sup>+</sup>의 포화도가 높음에도 불구하고 질량 정확도는 여전히 높습니다. 이러한 결과는 다양한 존재비 수준에서 피크 대칭성을 개선하여 일관된 질량 정확도를 제공하는 새로운 Revident 검출기 덕분입니다. 삽입된 크로마토그램은 두 개의 겹쳐진 피크가 이 검출기의 품질과 잘 일치함을 보여줍니다.

**미지 물질 식별 워크플로**

**라이브러리 구축:** METLIN 라이브러리와 MassHunter Qualitative Analysis를 사용하여 풀링된 대사산물 시료에 대한 반복 MS/MS 데이터를 분석하여 이 시료 세트에 대한 맞춤형 대사산물 데이터베이스를 생성했습니다. 식별된 물질에는 양이온 대사산물 693개와 음이온 대사산물 773개가 포함되었습니다.

MassHunter Lipid Annotator는 풀링된 지질 시료의 반복 MS/MS 데이터에 대한 병렬 분석에 사용되었습니다. LipidBlast의 수정된 버전인 in silico 라이브러리<sup>14</sup>를 사용해 양이온 지질 269개, 음이온 지질 81개를 식별하여 이 시료 세트의 맞춤형 지질 데이터베이스에 추가했습니다.

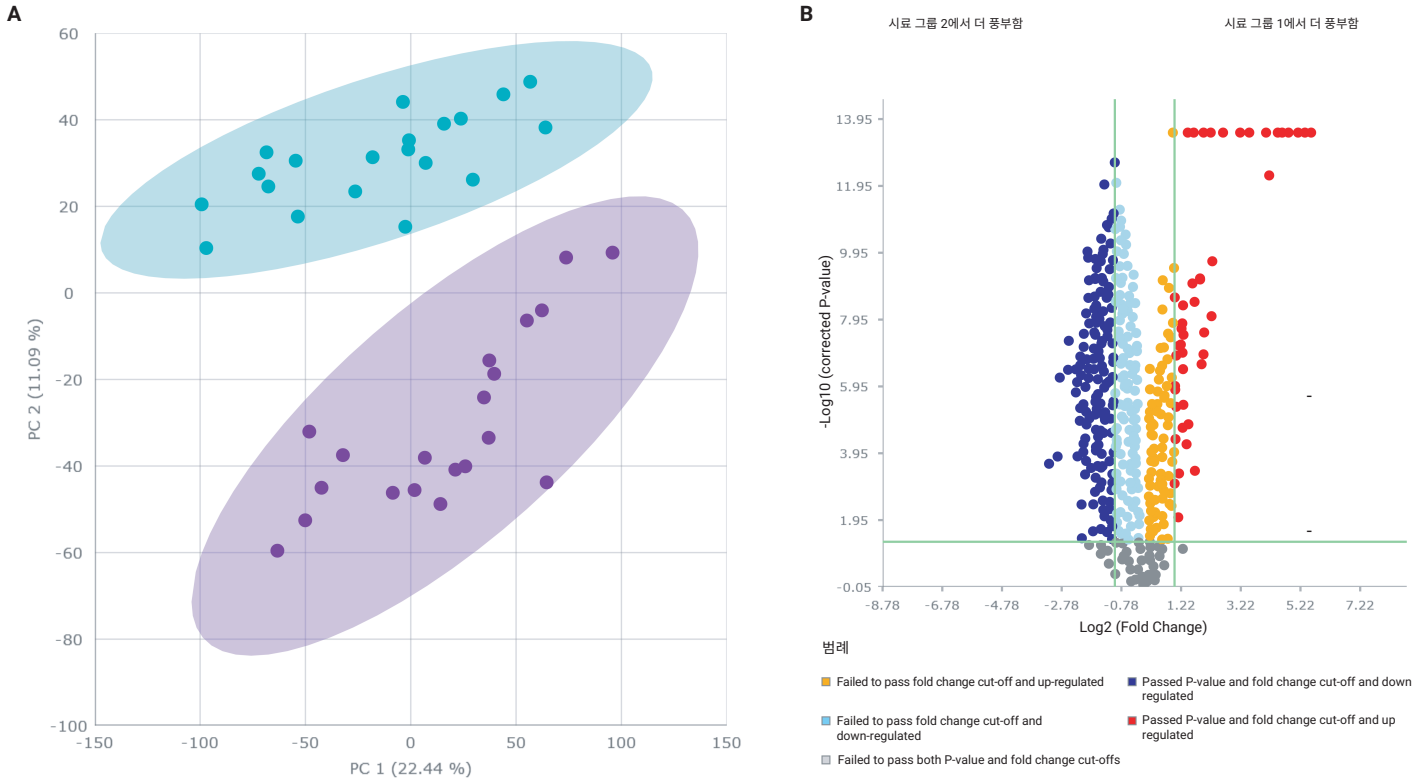
**feature 찾기, 프로파일링, 통계 및 식별:** MassHunter Explorer는 빠르고 사용하기 쉬운 feature 추출, 데이터 정규화 및 통계 분석을 제공하며, 기존 맞춤형 데이터베이스를 적용하여 분석 물질을 식별합니다(그림 7). 각 실험에서 40마리의 마우스 혈장 시료에 대한 데이터를 약 1시간 만에 처리했으며, 그 결과 각 대사산물과 지질 데이터 세트에서 10,000개 이상의 feature를 발견했습니다.



**그림 7.** Agilent MassHunter Explorer를 사용한 차등 분석 또는 바이오마커 분석을 위한 발견 워크플로. 미지 물질이 여전히 존재하는 경우, 해당 분석 물질의 MS/MS 데이터를 SIRIUS와 CSI:FingerID로 분석할 수 있습니다. 이를 통해 MS/MS 데이터에서 분자 지문을 생성하고 온라인 화학 구조 데이터베이스에서 계산된 분자 지문을 검색할 수 있습니다.

MassHunter Explorer를 사용하여 중요한 feature를 평가한 결과, 수컷과 암컷 마우스 혈장 시료 간에 유의미한 차이( $\alpha = 0.05$ )가 있는 1,094개의 양이온 및 582개의 음이온 대사산물 요소가 얻어졌습니다(그림 8A). 이러한 중요 feature 중 414개의 양이온 대사산물과 336개의 음이온 대사산물은 머무름 시간을 포함한 Agilent HILIC 대사체학 PCDL과 MassHunter Qualitative Analysis를 사용한 해당 반복 데이터 분석을 통해 구축된 맞춤 데이터베이스를 결합 사용하여 식별했습니다.

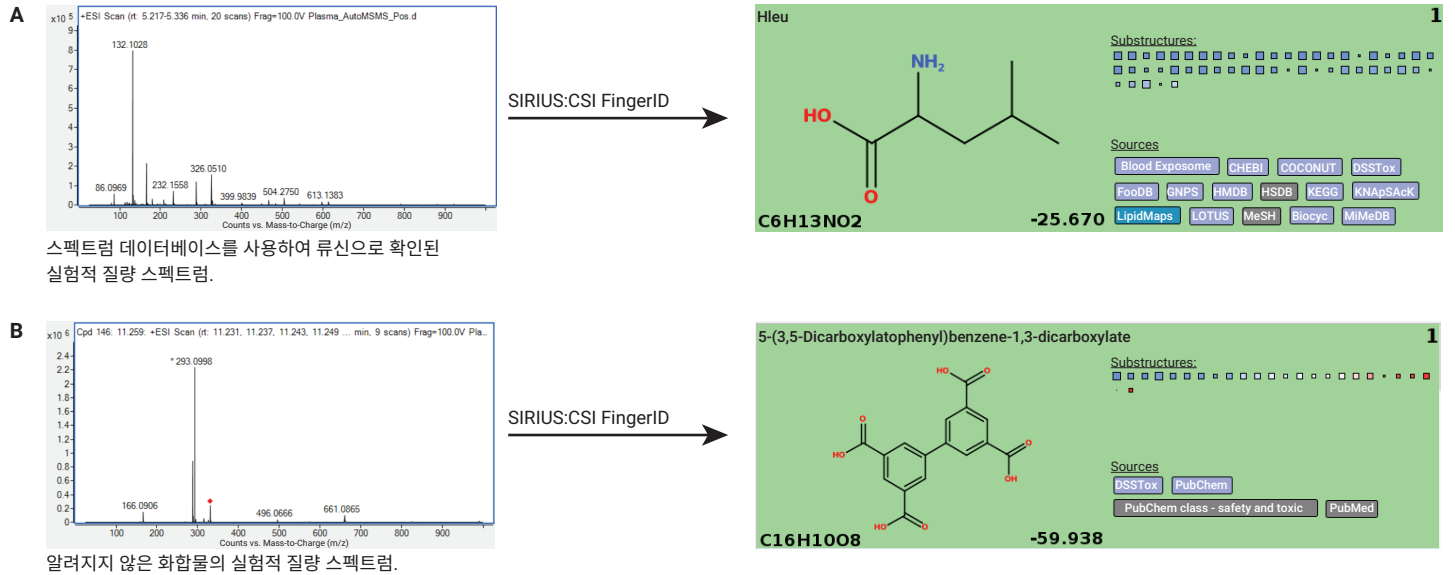
마찬가지로, MassHunter Explorer를 사용하여 지질 데이터 세트에서 각각 하나 이상의 이온을 포함하는 10,470개의 화합물 그룹을 검출했으며, 두 마우스 집단 간에 612개의 feature가 유의미하게 달랐습니다(그림 8B). 머무름 시간을 포함한 애질런트 지질체학 라이브러리와 MassHunter Lipid Annotator를 이용한 반복 MS/MS 데이터 분석을 통해 구축된 맞춤형 데이터베이스를 사용하여 식별한 결과, 55개의 중요한 지질 ID가 도출되었습니다.



**그림 8.** Agilent MassHunter Explorer는 데이터 분석으로부터 의미 있고 즉시 게재 가능한 플롯을 생성합니다. 대사산물에 대한 PCA 플롯(A)은 수컷과 암컷 집단 사이에 내재된 차이가 있음을 보여줍니다. 지질에 대한 화산 플롯(B)은 2배 이상의 변화율(fold change)과 유의 수준( $p$ -값) 0.05를 기준으로 지질이 상향 및 하향 조절되었음을 보여줍니다.

**미지 물질의 구조 식별 및 데이터베이스 검색:** SIRIUS와 CSI:FingerID는 사용하기 쉬운 분자식 및 구조 생성 기능을 제공하며, 이를 통해 MassHunter Explorer의 비표적 데이터 분석 워크플로를 완료한 후에도 식별되지 않은 중요 feature에 대한 식별 결과를 확장할 수 있습니다. SIRIUS는 실험 스펙트럼을 동위원소 패턴 및 조각화 트리와 비교하여 de novo 분자식 일치 결과를 생성합니다. CSI:FingerID는 실험 질량 스펙트럼을

기반으로 예측된 분자 지문을 PubChem, HMDB, KEGG를 포함한 대규모 공개 구조 데이터베이스에서 생성된 분자 지문과 비교하여 구조 매칭 결과를 생성합니다. SIRIUS와 CSI:FingerID를 결합하면 간소화된 화합물 분자식과 구조 매칭이 제공되어 화합물 식별을 확인하거나 미지 화합물에 대한 가능성 높은 화학식과 구조를 식별할 수 있습니다(그림 9).



**그림 9.** SIRIUS와 CSI:FingerID는 실험으로 얻은 MS/MS 스펙트럼을 사용하여 분자식과 구조 매칭을 생성합니다. 이는 스펙트럼 데이터베이스를 사용하여 식별된 화합물의 품질 관리(A) 및 미지 물질 식별(B)에 모두 사용할 수 있습니다.

## 결론

애질런트 솔루션은 LC/MS를 위한 포괄적인 비표적 대사체학 및 지질체학 워크플로를 제공하여 연구자들이 높은 신뢰도로 생물학적 통찰력을 쉽게 얻을 수 있도록 합니다. Agilent Bravo Metabolomics 시료 전처리 플랫폼과 Agilent Captiva EMR-Lipid 플레이트를 결합하면 동일한 혈장 시료에서 극성 대사산물과 지질을 효율적으로 추출할 수 있습니다. Agilent 1290 Infinity II bio LC 시스템을 사용한 견고한 분리 성능과 Agilent Revident LC/Q-TOF의 높은 질량 정확도, 동위원소 충실도 및 분해능을 결합하여 재현 가능한 분석과 높은 분석 물질 식별 신뢰도를 얻을 수 있었습니다. 이러한 분석법은 Agilent 1290 Infinity III bio LC에서도 유사한 성능이 기대됩니다. MassHunter Qualitative Analysis 또는 Lipid Annotator를 이용한 데이터베이스 구축과 MassHunter Explorer의 feature 찾기, 데이터 필터링, 통계 분석 및 화합물 식별 기능을 결합하면 비표적 데이터 분석이 용이해지고, SIRIUS와CSI:FingerID를 통해 남아 있는 미지 물질을 추가로 식별할 수 있습니다. 이러한 워크플로는 사용자가 다양한 연구 질문에 답할 수 있는 유연성을 제공하도록 사용자 정의할 수 있으며, 구현하기 쉬운 분석법을 통해 연구 결과를 더욱 빠르게 도출할 수 있습니다.

Agilent Revident LC/Q-TOF 기능과 기타 대사체학 솔루션 및 지질체학 솔루션에 대해 자세히 알아보세요.

## 참고 자료

- Huynh, K.; *et al.* 혈장 지질체의 상세한 분석을 위한 종합적이고 선별된 고처리량 분석법. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-3747KO, **2021**.
- Yannell, K. E.; *et al.* 엔드투엔드 표적 대사체학 워크플로. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-5628KO, **2023**.
- Van de Bittner, G. C.; *et al.* Automated Fractionation of Low-Volume Plasma Samples for LC/MS Multi-Omics. *Agilent Technologies 기술 개요*, 발행 번호 5994-7357EN, **2024**.
- Van de Bittner, G. C.; *et al.* An Automated Dual Metabolite + Lipid Sample Preparation Workflow for Mammalian Cell Samples. *Agilent Technologies 기술 개요*, 발행 번호 5994-5065EN, **2022**.
- Sartain, M.; *et al.* 생물에너지 측정과 LC/MS 오믹스를 결합하여 약물 치료에 대한 세포 및 분자 수준의 반응 조명. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-7449KO, **2024**.
- Agilent Captiva EMR-Lipid Manual Fractionation of Low-Volume Plasma Samples for LC/MS Multi-Omics. *Agilent Technologies 분석법 가이드*, 발행 번호 5994-7482EN, **2024**.
- Yannell, K. E.; *et al.* Mastering HILIC-Z Separation for Polar Analytes. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-5949EN, **2023**.
- Sartain, M.; *et al.* An Interlaboratory Evaluation of a Targeted Lipidomics Method in Plasma. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-6830EN, **2024**.
- Huynh, K.; *et al.* High-Throughput Plasma Lipidomics: Detailed Mapping of the Associations with Cardiometabolic Risk Factors. *Cell Chem. Biol.* **2019**, 26(1), 71–84.e4.
- Duhrkop, K.; *et al.* Searching Molecular Structure Databases with Tandem Mass Spectra Using CSI:FingerID. *PNAS* **2015**, 112(41), 12580–12585.
- Sartain, M.; *et al.* Enabling Automated, Low-Volume Plasma Metabolite Extraction with the Agilent Bravo Platform. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-2156EN, **2020**.
- Mohsin, S. B.; *et al.* 비표적 고분해능 지질체학 데이터의 표적화된 데이터 마이닝 및 주석 처리: 포괄적이고 신뢰도가 높은 워크플로. *Agilent Technologies 응용 자료*, 발행 번호 5994-7588KO, **2024**.
- Yannell, K. E.; *et al.* A Comprehensive Untargeted Metabolomics LC/Q-TOF Workflow with and Unknowns Identification Strategy to Identify Plasma Metabolite Shifts in a Mouse Model. *ASMS Poster*, **2022**.
- Lipidomics Analysis with Lipid Annotator and Mass Profiler Professional. *Agilent Technologies 기술 개요*, 발행 번호 5994-1111EN, **2020**.
- MassBank of North America, <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/>.
- MassBank of Europe, <https://massbank.eu/MassBank/>.

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

DE-007519

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2025  
2025년 6월 16일, 한국에서 인쇄  
5994-8371KO

한국애질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,  
DF타워 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)

 **Agilent**  
Trusted Answers