

의약품 생물학적 분석에서 2D-LC/MS/MS의 이점

매트릭스 영향 피하기 - 검출 감도 증가

저자

Jonas Dinser
Daiichi-Sankyo Europe GmbH
Munich, Germany

Sonja Krieger
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료에서는 약물동태학 연구의 의약품 및 의약품 대사체 분석을 위해 Agilent 6495 QQQ LC/MS와 함께 사용한 Agilent InfinityLab 2D-LC 솔루션에 대해 설명합니다. 2D-LC를 사용하면 동시 용리가 일어나지 않아 복합 시료의 1차원 분석에서 발생할 수 있는 크로스토크 위험 및 신호 억제를 줄여줍니다. 2차원의 2D-LC/MS/MS 분석법을 사용하면 분석물질을 보다 적합한 용리액으로 MS 소스에 도입하여 질량 분석 검출의 신호 강도를 개선할 수 있습니다.



서론

지난 10년 동안 LC/MS/MS는 약물동태학 연구에서 의약품 및 의약품 대사체 분석을 위한 기술로 자리를 잡았습니다. 높은 선택성 및 분석 감도, 피크 할당 또는 분자량 정보와 같은 이 기술의 명확한 이점과 더불어 잘 알려진 문제도 있습니다. 혈장 또는 세포 배양 배지와 같은 복합 매질을 사용한 생물학적 시료 분석을 예로 들 수 있습니다. 동중원소의 동시 용리로 인한 크로스토크, 소스 내 조각 대사체, 동시 용리 매트릭스 성분으로 인한 신호 억제와 같은 문제입니다. 신호 억제는 농도가 매우 낮은 분석물질의 정량에서 특히 문제가 될 수 있으며, 정량 한계가 불충분하게 나올 수 있습니다.

이 응용 자료에서는 생물학적 연구 환경에서 Agilent 6495 QQQ LC/MS와 함께 Agilent InfinityLab 2D-LC 솔루션을 사용하여 앞에서 언급한 이러한 문제를 극복하는 방법에 대한 2가지 예를 자세하게 설명합니다.

- 복합 분석물질 혼합물을 처리할 때 2차원 분리를 사용하여 동시용리 및 크로스토크 또는 신호 억제의 위험을 제거하는 방법
- 2차원 분리를 사용하여 용리액 조건을 변경하는 방식으로 질량 분석 검출의 신호 강도를 향상하고, 보다 적합한 용리액으로 분석물질을 MS 소스에 도입하여 정량 한계를 크게 향상하는 방법

실험

장비

Agilent 1290 Infinity II 2D-LC 시스템은 다음 모듈로 구성되었습니다.

- Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프 (G7120A) 2개
- 냉각기(옵션 #100)가 장착된 Agilent 1290 Infinity II Multisampler(G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 다중 컬럼 온도 조절 장치(G7116B)
- Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브 (G1170A), 2-포지션/4-포트 듀오 밸브(2D-LC 밸브 1,300bar: 부품 번호 5067-4244)
- 40µL 루프가 장착된 Multiple heart-cutting 밸브(G4242-64000)를 포함한 두 개의 Agilent 1290 Infinity 밸브 드라이브(G1170A)
- Agilent Jet Stream ESI 소스 (G1958-65538)를 장착한 Agilent 6495 QQQ LC/MS가 질량 분석 검출에 사용되었습니다.

소프트웨어

- Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition Rev. C.01.07 SR2 [263] 및 2D-LC 소프트웨어 버전 A.01.03 [025].
- Agilent MassHunter 워크스테이션 소프트웨어 LC/MS 데이터 획득, 버전 B.08.00, Build 8.0.8023.5 SP1
- Agilent MassHunter 워크스테이션 소프트웨어 정량 분석, 버전 B.07.01, Build 7.1.524.0

화학품

LC/MS 등급 acetonitrile 및 methanol은 TH Geyer(Renningen, Germany)에서 구입하였습니다. LC/MS 분석을 위한 Formic acid 및 ammonium acetate는 Sigma-Aldrich(Steinheim, Germany)에서 구입하였습니다.

초순수는 0.2µm 멤브레인을 사용하는 카트리지가 장착된 ELGA Pureflex 2 정수 시스템으로 제조하였습니다(Veolia Water Technologies Deutschland GmbH, Celle, Germany).

시료 및 분석법

신호 억제 및 크로스토크를 피하기 위한 도구로서의 2D-LC

의약품 후보의 대사에 관여하는 핵심 효소를 파악하기 위해 *시험관내* 세포 현탁액 기반 분석을 수행하였습니다. 의약품 후보(저분자) 및 다중 효소 특정 프로브 기질을 해당 효소 억제제와 함께 세포 현탁액에 배양하였습니다. 정의한 시간이 지난 다음에 시료를 수집하고 대사체 형성을 분석하였습니다. 신호 억제 또는 크로스토크를 피하기 위해 존재비가 높은 기질 및 억제제를 크로마토그래피로 분리하였습니다. 주입된 용액에는 세포 상등액 혼합물과 안정적인 동위원소 표지 내부 표준물질이 포함되었습니다. 분석법 파라미터는 표 1을 참조하십시오.

용매 교체를 통해 MS 검출 감도를 증가시키기 위한 2D-LC

배양 배지 및 세포에서 모화합물(의약품 후보) 및 3가지 주요 대사체의 농도를 평가하기 위해 *시험관내* 세포 배양 기반 분석을 수행하였습니다. 사전 정의된 배양 시간이 지난 후 시료를 수집하고, 주입하기 전에 비 안정화 동위원소 표지 내부 표준물질을 추가하였습니다. 분석법 파라미터는 표 2를 참조하십시오.

표 1. 신호 억제를 피하기 위한 2D-LC용 분석법 파라미터

1차원 분석 및 2D-LC 분석의 1차원	
컬럼	C18 컬럼, 2.1 × 150mm, sub-2µm
용매	A) Water + 0.1% formic acid B) Methanol
그레디언트	0분 - 15%B 2분 - 30%B 20분 - 70%B 23분 - 95%B 27분 - 95%B 27.5분 - 15%B
유속	0.300mL/분
온도	40°C
검출	¹ D 분석: Agilent 6495 QQQ LC/MS 2D-LC 분석: ¹ D 분리 후 검출 없음
주입	주입량: 2µL 시료 온도: 10°C 니들 세척: water/methanol(50/50, v/v)에서 3초
2차원	
컬럼	PFP 컬럼, 2.1 × 50mm, sub-2µm
용매	A) Water + 0.2% formic acid B) Methanol + 0.2% formic acid
그레디언트	0.00분 - 40%B 0.70분 - 90%B ² D 그레디언트 정지 시간: 0.90분 ² D 주기 시간: 1.35분
유속	0.600mL/분
온도	40°C
검출	Agilent 6495 QQQ LC/MS
2D-LC	
2D-LC 모드	Heart-cutting 1차원 머무름 시간에 따라 heart-cuts(샘플링 표) 세트에 시간 기반 multiple heart-cutting을 수행하였습니다.
Agilent 6495 QQQ LC/MS 파라미터	
	극성: 양이온 및 음이온 스캔 유형: 예정된 MRM 건조 가스 온도: 140°C 건조 가스 유속: 15L/분 분무 압력: 40psig Sheath 가스 온도: 385°C Sheath 가스 유속: 12L/분 Agilent MassHunter Source Optimizer를 사용하여 각 화합물에 대해 소스 전압 및 iFunnel RF를 개별적으로 최적화하였습니다.

표 2. 증가한 MS 검출 감도에 대한 2D-LC용 분석법 파라미터

1차원 분석	
컬럼	Hybrid silica C18 컬럼, 2.1 × 100mm, sub-2µm
용매	A) 0.1% Formic acid in water B) 0.1% Formic acid in acetonitrile
그레디언트	0.0분 - 5%B 0.5분 - 5%B 4.5분 - 40%B 6.5분 - 90%B 정지 시간: 8.0분 평균 시간: 1.5분
유속	0.500mL/분
온도	40°C
검출	Agilent 6495 QQQ LC/MS
주입	주입량: 5µL 시료 온도: 10°C 니들 세척: water/methanol(50/50, v/v)에서 10초
2D-LC 분석의 1차원	
컬럼	Hybrid silica C18 컬럼, 2.1 × 50mm, sub-2µm
용매	A) 0.1% Formic acid in water B) 0.1% Formic acid in acetonitrile
그레디언트	0.00분 - 15%B 1.50분 - 40%B 2.10분 - 90%B 2.50분 - 90%B 2.53분 - 15%B
유속	0.900mL/분
온도	40°C
검출	¹ D 분리 후 검출 없음
주입	주입량: 1µL 시료 온도: 10°C 니들 세척: water/methanol(50/50, v/v)에서 10초
2차원	
컬럼	Non-encapped silica C18 컬럼, 2.1 × 50mm, sub-2µm
용매	A) 5mM ammonium acetate and 5% methanol in water B) Methanol
그레디언트	0.00분 - 40%B 0.50분 - 95%B ² D 그레디언트 정지 시간: 0.60분 ² D 주기 시간: 1.00분
유속	0.600mL/분
온도	40°C
검출	Agilent 6495 QQQ LC/MS
2D-LC	
2D-LC 모드	Heart-cutting 1차원 머무름 시간에 따라 heart-cuts(샘플링 표) 세트에 시간 기반 multiple heart-cutting을 수행하였습니다. 스마트 피크 파킹 기능을 사용하였습니다.
Agilent 6495 QQQ LC/MS	
MS 파라미터	극성: 양이온 스캔 유형: MRM 건조 가스 온도: 200°C 건조 가스 유속: 14L/분 분무 압력: 20psig Sheath 가스 온도: 400°C Sheath 가스 유속: 11L/분 캐필러리 전압: 3,500V 노출 전압: 0V 고압 RF: 90V 저압 RF: 60V

결과 및 토의

신호 억제 및 크로스토크를 피하기 위한 도구로서의 2D-LC

효소 기질 및 억제제가 존재할 때 다양한 대사체를 함유하는 *시험관내* 세포 현탁액 기반 분석의 세포 상등액은 복합 혼합물을 제공합니다. 그림 1은 세포 상등액을 LC/MS/MS 분석한 결과를 보여줍니다.

표시된 대사체 M1은 기질 및 억제제의 농도가 더 높을 때 동시용리됩니다. 이 LC/MS/MS 분석에서 존재비가 더 높은 기질 및 억제제의 동시용리 때문에 대사체 M1의 신호 억제가 발생할 수 있습니다. 구조적으로 관련된 화합물의 경우 크로스토크도 관찰될 수 있습니다.

신호 억제와 크로스토크를 피하기 위해 기질 및 억제제에서 대사체 분리가 가능한 크로마토그래피 분석법이 세포 상등액 분석에 필요합니다.

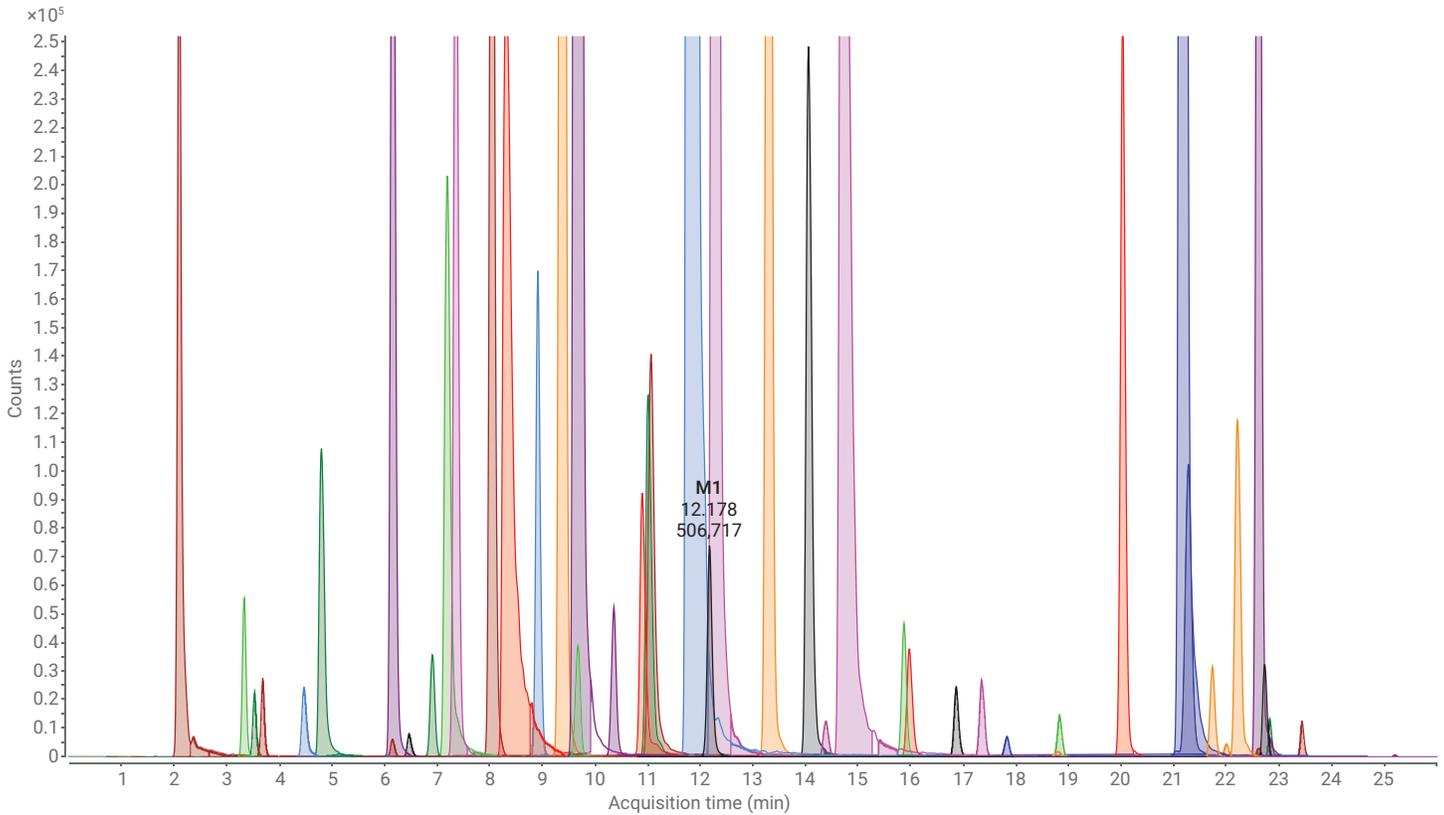


그림 1. 세포 상등액 LC/MS/MS 분석

동시 용리되는 기질 및 억제제에서 대사체 M1을 분리하기 위해 multiple heart-cutting (MHC) 2D-LC를 사용하였습니다. 대사체 M1은 시간 기반 모드에서 heart-cut되어 선택성이 다른 2차원(2D) 분리로 옮겨졌습니다. 2D에서 대사체 M1은 그림 2에서 확인할 수 있는 것처럼 존재비가 더 높은 기질 및 억제제에서 잘 분리되었습니다. 존재비가 더 높은 기질 및 억제제에서 대사체 M1을 분리하면 신호 억제 및 크로스토크를 피할 수 있습니다. 시료 매트릭스에서 표적 화합물을 추가로 분리하는 방법으로 신호 억제를 줄이는 것은 이전 응용 자료¹에서도 확인할 수 있습니다.

시간 기반 MHC 2D-LC를 사용해 16가지 표적 대사체를 1D에서 2D로 옮겼습니다. 이를 통해 기질 및 억제제를 추가로 분리하였으며, 총 분석 시간은 35분입니다. 기질 및 억제제에서 16가지의 표적 대사체를 1차원 분리하기 위해 각 분석 시간이 25분인 6가지 다른 방법을 개발하였습니다 (데이터는 표시되지 않음). 이와 같이, MHC 2D-LC를 사용하여 시간 및 시료를 크게 절약할 수 있었습니다.

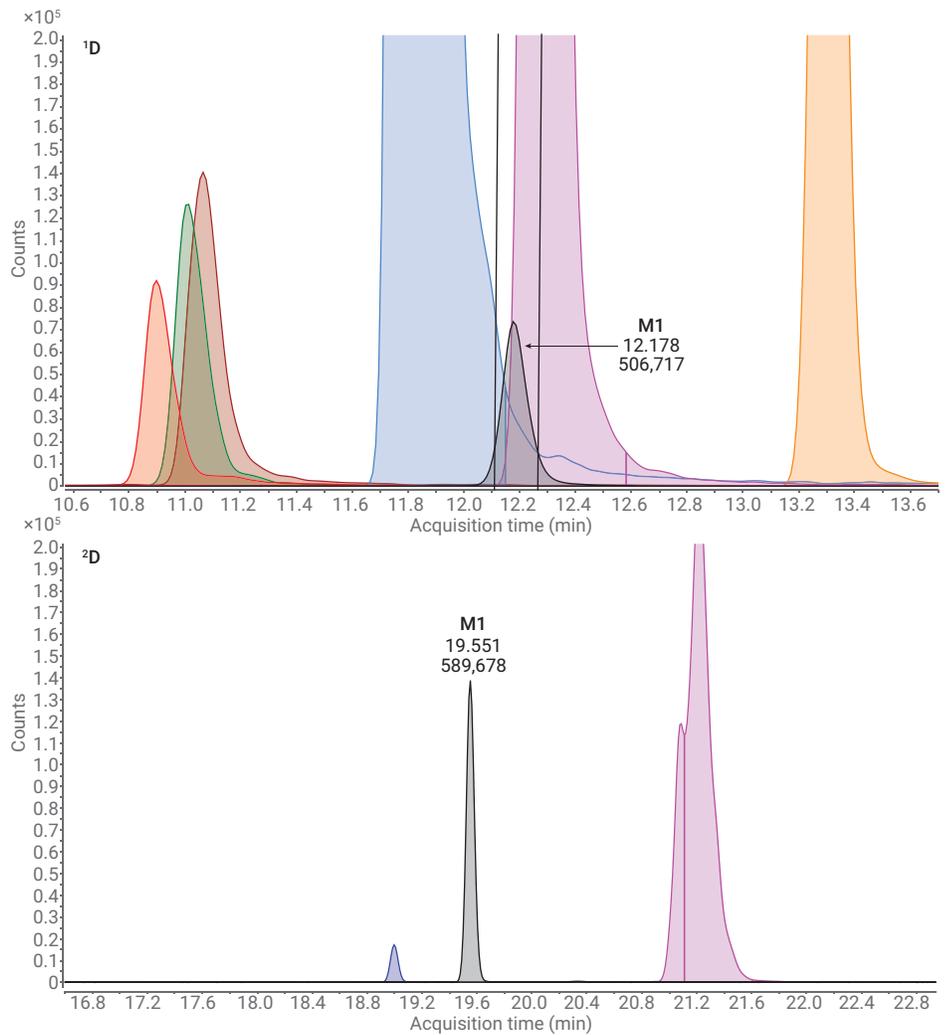


그림 2. 세포 상등액 2D-LC/MS/MS 분석

용매 교체를 통해 MS 검출 감도를 증가시키기 위한 2D-LC

시험관내 세포 배양 기반 분석에서 한 가지 모화합물과 한 가지 대사체는 내부 표준물질을 사용하는 외부 검량을 기반으로 정량하였습니다. 두 가지 추가 대사체의 경우 분석 표준물질을 이용할 수 없었기 때문에 상대 정량하였습니다. 그림 3은 기존 1차원 LC/MS/MS 분석법을 사용하는 분석을 보여줍니다.

분석법 최적화 과정에서 다양한 컬럼 및 용매 조합을 조사하였습니다. 그림 4는 분석법 최적화 동안 확보한 두 가지 LC/MS/MS 크로마토그램을 보여줍니다. 그림 4A에서는 그림 3에서 확인할 수 있는 기존 LC/MS/MS 분석법과 비슷한 조건을 사용하였습니다. 이러한 조건 하에서 세 가지 모든 대사체 (M1-M3)를 모화합물과 내부 표준물질에서 각각 분리했지만, 사용한 용매로 인해 MS 검출 감도가 저하되었습니다. 이동상에서

ammonium acetate 및 methanol을 사용하여 MS 검출 감도를 크게 향상하였지만, 그림 4B에서 확인할 수 있는 것처럼 대사체 M1-M3, 모화합물, 내부 표준물질 분리는 저하되었습니다. 3가지 대사체가 동일한 질량 전이를 나타내기 때문에 대사체 M1 및 M3의 동시용리가 매우 중요하고, 크로마토그램을 이용해 분리해야 합니다.

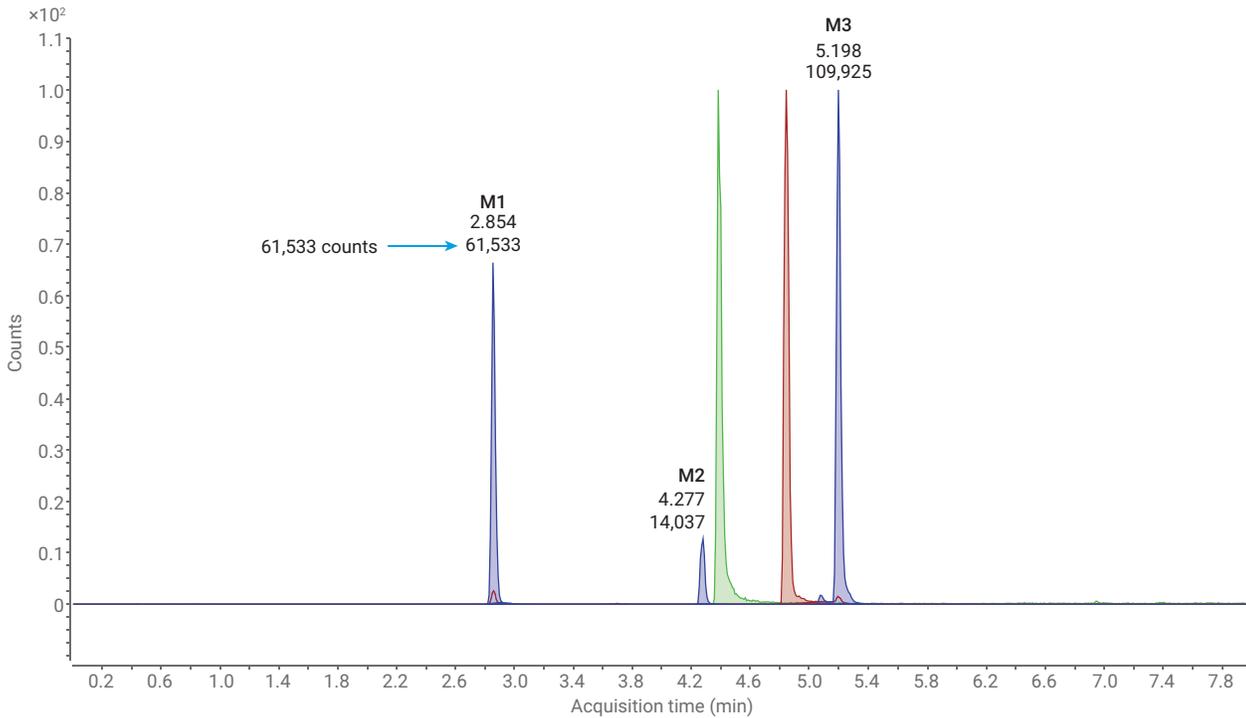
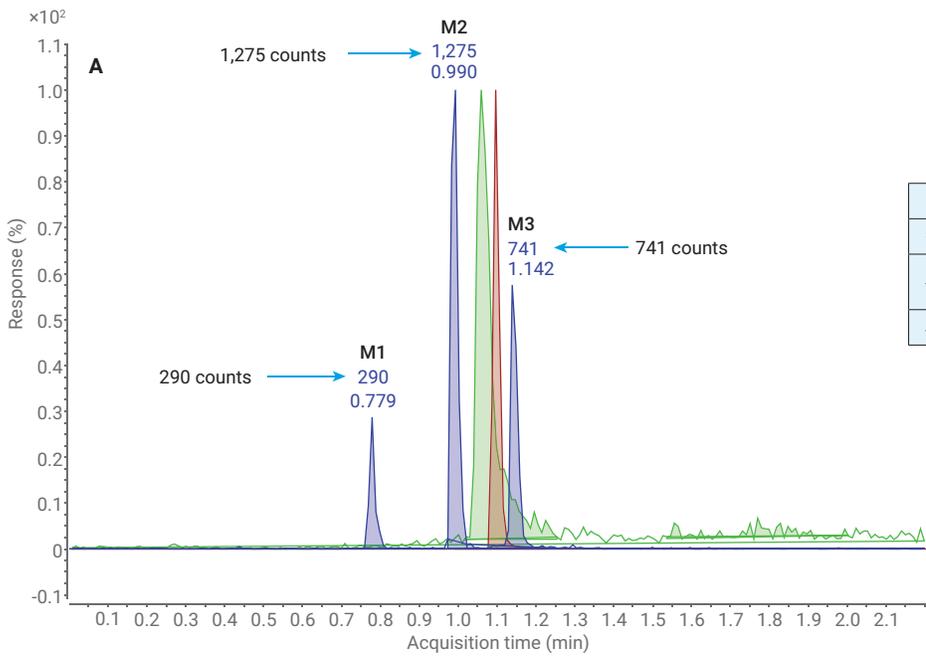
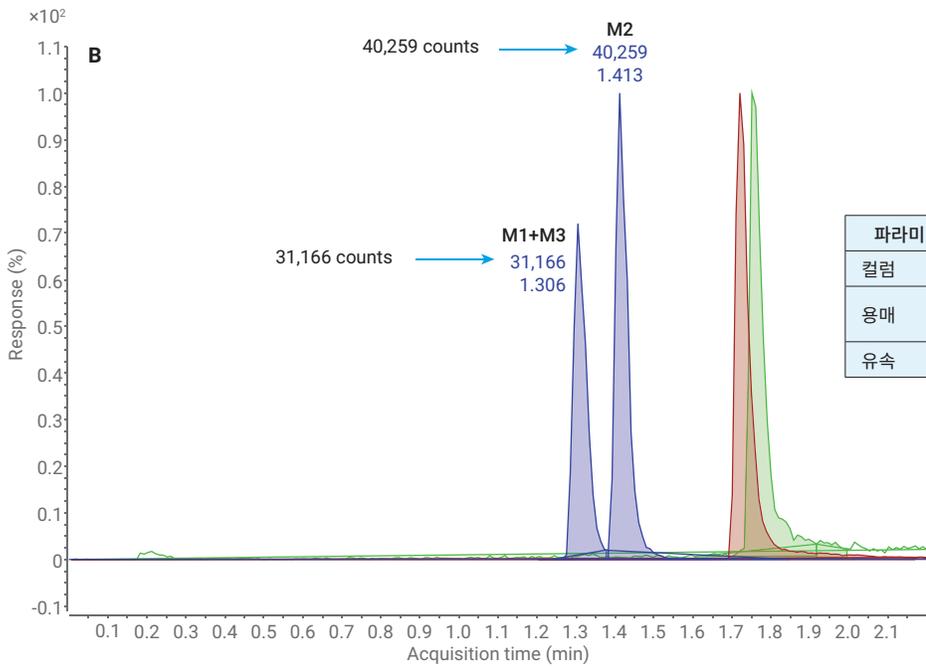


그림 3. 시험관내 세포 배양 기반 검사 시료에서 한 가지 모화합물(갈색 극미량), 세 가지 대사체(M1-M3, 파란색 극미량), 한 가지 내부 표준물질(녹색 극미량)에 대한 LC/MS/MS 분석



파라미터	값
컬럼	Hybrid silica C18 컬럼, 2.1 × 50mm, sub-2 μ m
용매	A) 0.1% Formic acid in water B) 0.1% Formic acid in acetonitrile
유속	0.500mL/분



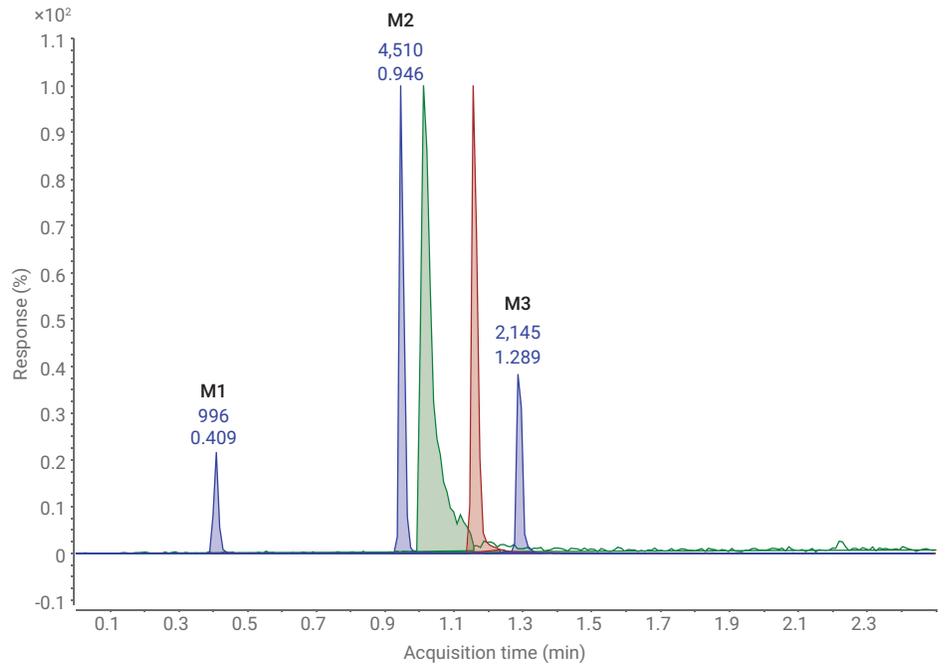
파라미터	값
컬럼	Non-encapped silica C18 컬럼, 2.1 × 50mm, sub-2 μ m
용매	A) 5mM ammonium acetate and 5% methanol in water B) Methanol
유속	0.500mL/분

그림 4. LC/MS/MS 분석법 개발 동안 확보한 크로마토그램

물에 formic acid와 이동상에 acetonitrile를 사용하여 분리를 하고, 이동상에 ammonium acetate 및 methanol을 사용하여 MS 검출 감도를 향상하는 이 두 가지 이점을 활용하기 위해 multiple heart-cutting을 사용하여 2D-LC 설정으로 두 가지 분리를 결합하였습니다. 1D에서 분석 속도를 높이기 위해 유속을 0.9mL/분으로 증가시켰습니다. 그림 5는 최종 1D 분리를 보여줍니다.

시간 기반 heart-cutting을 사용하여 5가지 표적 성분 피크를 2D로 이동시켰습니다. 2D의 경우 2D 컬럼에 화합물을 모아 2D 주기 시간 1분 내의 고속 그레디언트를 수행하였으며 검출 감도를 높이기 위해 MS용 2D 용매로 용리하였습니다. 그림 6은 시험관내 세포 배양 기반 분석에서 나온 시료를 2D-LC/MS/MS 분석한 후 확보한 2D 크로마토그램을 보여줍니다.

대사체 M1(그림 3)에 대한 신호 강도가 61,533회인 원래 1D-LC/MS/MS 분석법과 비교하면 2D-LC/MS/MS 분석법은 대사체 M1(그림 6)에 대한 신호 강도가 191,646회로 5µL에서 1µL로 주입량 감소를 고려해 계수 15를 사용하여 MS 검출 감도를 높일 수 있었습니다. 2D-LC/MS/MS 분석에 대한 총 분석 시간은 9.5분에서 6.5분으로 감소하였습니다.



파라미터	값
컬럼	Hybrid silica C18 컬럼, 2.1 × 50mm, sub-2µm
용매	A) 0.1% Formic acid in water B) 0.1% Formic acid in acetonitrile
유속	0.900mL/분

그림 5. 2D-LC/MS/MS 분석법 개발 동안 확보한 1D 크로마토그램

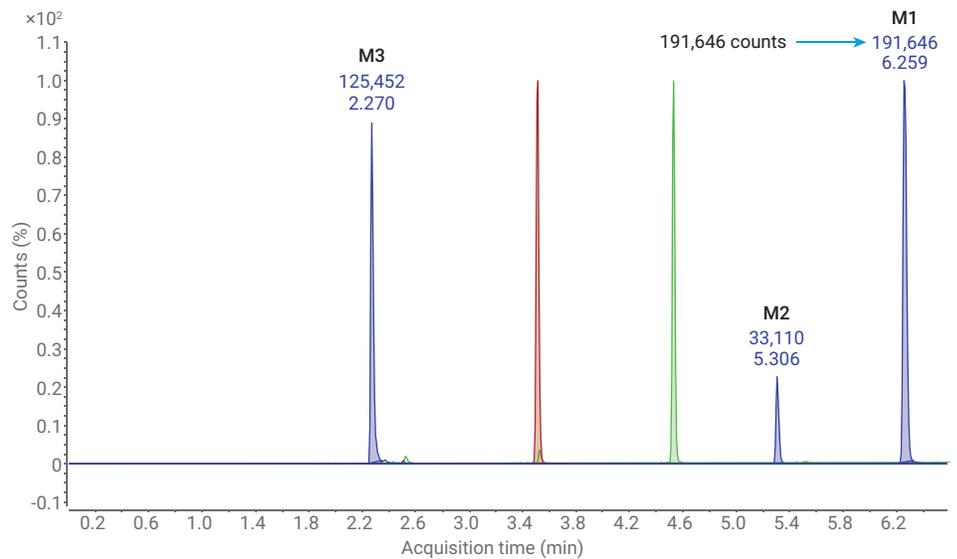


그림 6. 시험관내 세포 배양 검사 시료에서 한 가지 모화합물(갈색 극미량), 세 가지 대사체(M1-M3, 파란색 극미량), 한 가지 내부 표준물질(녹색 극미량)에 대한 2D-LC/MS/MS 분석

결론

약물동태학 연구에서 의약품 및 의약품의 대사체를 분석할 때 2D-LC/MS/MS를 적용하면 2차원 분리가 가능해지기 때문에 이러한 복합 시료에 대한 동시용리 및 크로스토크 위험을 제거할 수 있습니다. 이는 *시험관내* 세포 현탁액 기반 분석에서의 세포 상등액 분석을 위해 입증되었습니다. 2D-LC를 사용하면 분리가 잘 되기 때문에 16개 표적 대사체를 총 분석 시간 35분 내에 분석하는 것이 가능합니다. 표적 대사체 1D-LC/MS/MS 분석에 필요한 6가지 다양한 분석법을 사용했을 때와 비교하면 시간과 시료를 크게 절약할 수 있습니다.

2차원 2D-LC/MS/MS 분석법을 사용해 MS 검출의 신호 강도를 성공적으로 개선하였습니다. 이러한 설정에서 타겟 분석물의 분리를 가능하게 하는 조건을 1차원에서 사용했고, 뛰어난 MS 검출 감도에 도움이 되는 조건을 2차원에서 선택하였습니다. MS 소스에 대해 보다 적합한 용리액에 분석물질을 도입하여 정량 한계를 크게 향상하였습니다.

참고 문헌

1. Vanhoenacker, G.; *et al.* Two-Dimensional LC/MS/MS to Reduce Ion Suppression in the Determination of Cannabinoids in Blood Plasma. 법의학 용도. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5991-7859EN, **2017**.

www.agilent.com/chem

연구 용도로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2018
2018년 5월 1일, 한국에서 인쇄
5991-8839KO

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

