

고분해능 GC/Q-TOF를 이용해 식별한 헴프 오일 내 화합물 기반 천연 제품 Accurate Mass 라이브러리

저자

Sofia Nieto, Matthew Curtis
Agilent Technologies, Inc.

개요

이 응용 자료에서는 헴프 CBD 오일의 포괄적인 GC x GC 데이터에 기초한 GC/Q-TOF MS용 천연 제품의 Accurate Mass 라이브러리의 생성에 대해 설명합니다. 1차원(1D) GC 분리보다 복합 매트릭스의 더 우수한 크로마토그래피 분리를 성취하기 위해 포괄적인 GC x GC 접근법을 사용하였습니다. 라이브러리는 헴프 CBD 오일 시료로부터 직접 구축되기 때문에 화합물을 올바르게 식별하고 깨끗한 스펙트럼을 추출하기 위해 GC x GC 접근법이 필요했습니다. 이 연구는 또한 GC/Q-TOF 전자 이온화(EI) 천연 제품 스펙트럼 라이브러리를 사용한 표적 및 비표적 스크리닝 워크플로의 사례를 제공합니다.

서론

헴프 및 CBD 오일은 전 세계적으로 직접 사용 제품 또는 타 제품의 구성 성분으로서 인기를 얻어가고 있습니다. 헴프 식물(*Cannabis sativa*)은 텍스타일 섬유, 건축자재, 기타 응용 등 매우 용도가 많은 천연 자원입니다.^{1,2} 헴프에서 생성된, 잠재적으로 생물활성을 띠는 화학물질 그룹으로는 칸나비노이드(cannabinoids), 테르펜(terpenes), 플라보노이드(flavonoids) 등이 있습니다.³ 헴프 및 헴프 제품의 화학적 분석에서 가장 중요한 방향 중 하나는 여러 헴프 품종의 화학적 조성을 살펴보고 특정 화학적 특성의 화합물을 식별하는 것입니다.

헴프로부터 추출한 농축 CBD 오일은 복잡한 시료이며, 일반적으로 단일 1D 구성에서 350~560개의 크로마토그래피 피크를 생성합니다. 그러므로 포괄적인 GC x GC 접근법은 개별 성분의 크로마토그래피 분리를 보장하는 이점이 있을 수 있으며, 고분해능 Accurate Mass GC/MS는 화학적 식별의 모호성을 줄여줍니다. 이 응용 자료에서는 Agilent 7250 GC/Q-TOF를 이용해 이러한 유형의 시료에 대해 머무름 인덱스(RI)를 기초로 한 TI Accurate Mass 라이브러리를 개발하는 것에 대해 설명합니다. 이 라이브러리는 전체 데이터 분석 시간을 단축하고 이 시료 유형의 고유한 성분에 집중하는 것을 도울 것으로 기대됩니다.

실험

시료 및 추출

이 연구에 사용된 시료는 개 사료에 사용된 5종의 헴프 CBD 오일입니다.

데이터 수집 및 데이터 처리

CBD 오일 시료 및 대마초 추출물은 고분해능 7250 GC/Q-TOF MS를 이용해 분석했습니다. 시료는 1D GC 및 포괄적인 GC x GC 구성에서 분리되었으며, Zoex ZX2 Thermal Modulator (그림 1) 및 Agilent 7890B GC를 사용하였습니다. 1D GC 데이터 수집에는 Agilent J&W DB-5ms Ultra Inert 30m 컬럼이 사용되었습니다. GC x GC 구성은 1차 컬럼으로 Agilent DB-5ms Ultra Inert 30m 컬럼을, 2차 컬럼으로 2.8m Agilent J&W DB-HeavyWAX를 갖추고 있었습니다. 데이터는 TI 모드, 70eV에서 수집하였습니다. 데이터 수집 파라미터는 표 1에 나와 있습니다. RI는 알케인 래더(ladder)를 기초로 계산하여, 화합물 식별과 라이브러리 큐레이션을 보조하였습니다.

GC/Q-TOF 데이터는 Agilent MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어 10.2의 Agilent Unknowns Analysis 소프트웨어 도구를 이용해 처리하였으며, Agilent MassHunter Qualitative Analysis 소프트웨어 10 및 GC Image GC x GC 소프트웨어 2.9도 사용하였습니다. 초기 화합물 식별에는 NIST 17 및 NIST 20 라이브러리를 사용하였습니다.

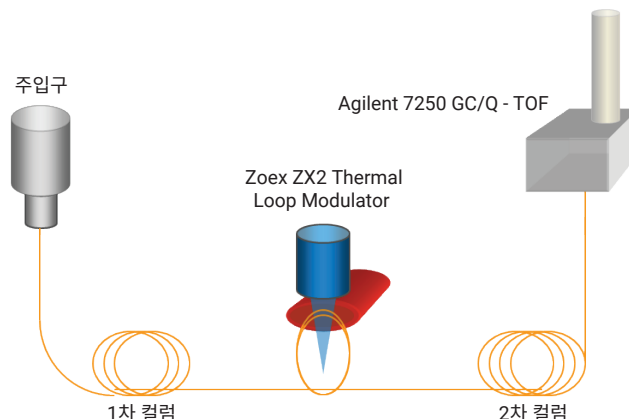


그림 1. Zoex ZX2 Thermal Modulator의 개요도.

표 1. 데이터 수집 파라미터.

GC 및 MS 조건	2D	1D
MS	Agilent 7250 GC/Q-TOF	
GC	Agilent 7890B GC	
주입구	멀티모드 주입구, 4mm Agilent Ultra Inert 주입구 라이너, 단일 테이퍼 및 유리솜	
주입구 온도	280°C	
주입량	1µL	
컬럼	1차: Agilent J&W DB-5ms Ultra Inert, 30m x 0.25mm, 0.25µm	Agilent J&W DB-5ms Ultra Inert, 30m x 0.25mm, 0.25µm
	2차: Agilent J&W DB-HeavyWAX, 2.8m x 100µm, 0.1µm	-
오븐 온도 프로그램	60°C에서 5분간 가열, 그 후 3°C/분의 속도로 290°C까지, 25분간 유지	60°C에서 5분간 가열, 그 후 4°C/분의 속도로 300°C까지, 7분간 유지
운반 가스	헬륨	
컬럼 유속	1mL/분(일정 유속)	
변조(Modulation) 기간	6초	-
냉각 제트(Jet) 유속	13L/분	-
고온 제트(Jet) 온도	300°C	-
고온 제트(Jet) 시간	320ms	-
이송 라인 온도	280°C	
사중극자 온도	150°C	
소스 온도	200°C	
전자 에너지	70eV	
방출 전류	5µA	
스펙트럼 수집 속도	50Hz	5Hz
질량 범위	m/z 40~650	

결과 및 토의

천연 제품의 Accurate Mass 라이브러리 생성

이 연구의 목표는 표준 1D GC 구성에서 높은 신뢰도의 빠른 스크리닝을 위해 헴프 CBD 오일 시료에 기초한 포괄적인 Accurate Mass 개인 화합물 데이터베이스 및 라이브러리(PCDL)을 생성하는 것이었습니다. 이 복잡한 시료의 적절한 크로마토그래피 분리를 성취하기 위해, 포괄적인 GC x GC 구성을 사용해 데이터를 수집했습니다. 동일한 시료 세트를 1D 구성을 이용해 분석하여 Accurate Mass 라이브러리와 스크리닝 접근법의 유효성을 확인하였습니다.

GC x GC 데이터는 GC Image GC x GC 소프트웨어를 사용해 시각화하였으며, 화합물은 NIST 17과 NIST 20 라이브러리를 사용해 잠정 식별하였습니다. 1차 Kovats RI는 $C_8 \sim C_{30}$ 의 알케인 래더를 사용해 계산하였으며, 추가 화합물 식별에 사용되었습니다. 2D 플롯에서 상이한 화합물 등급의 분리를 확실하게 볼 수 있습니다(그림 2).

2D 머무름 시간(RT)은 화합물의 화학적 등급 확인을 통해 한층 더 확실한 화합물 식별을 도왔습니다.

또한 조각 이온의 Accurate Mass와 정확한 동위원소비도 가능성 있는 원소 조성의 수를 줄여 CBD 오일 시료의 성분 식별의 신뢰도를 높이는 데 사용되었습니다. 화합물 스펙트럼의 Fragment formula annotation(FFA)은 MassHunter Qualitative Analysis 소프트웨어를 사용해 수행하였습니다(그림 3A). 주석이 달린 스펙트럼은 PCDL로 내보내기하였으며, 측정된 m/z 는 개별 이온의 원소 조성에 기초하여 이론적 값으로 자동 변환되었습니다(그림 3B). 이성질체를 명확하게 식별할 수 없는 경우에는 화합물에 이름 대신 색인 분자식이 할당됩니다. 현재 PCDL에는 약 350개 화합물 스펙트럼이 포함되어 있으며, 그 중 260개 이상의 항목에 이름과 구조가 할당되어 있습니다.

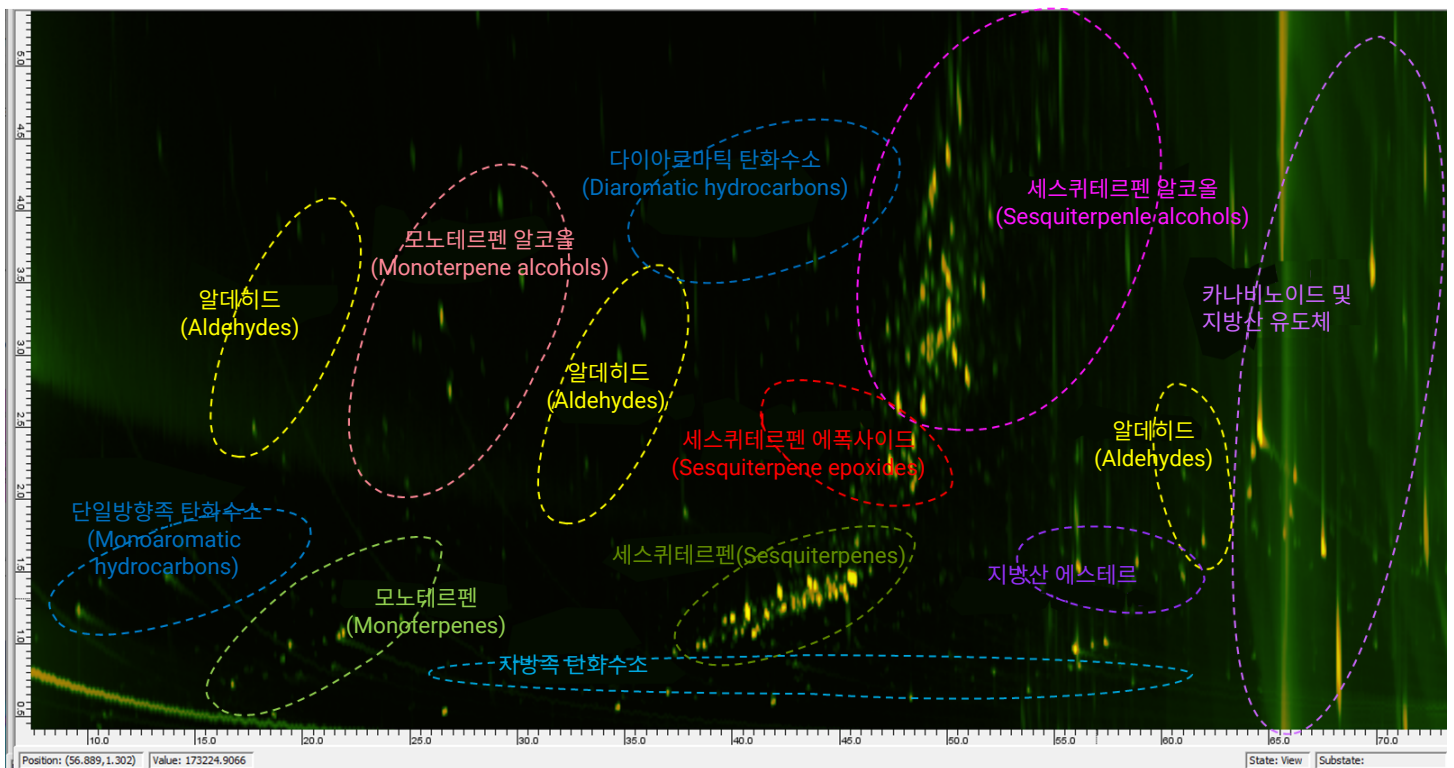
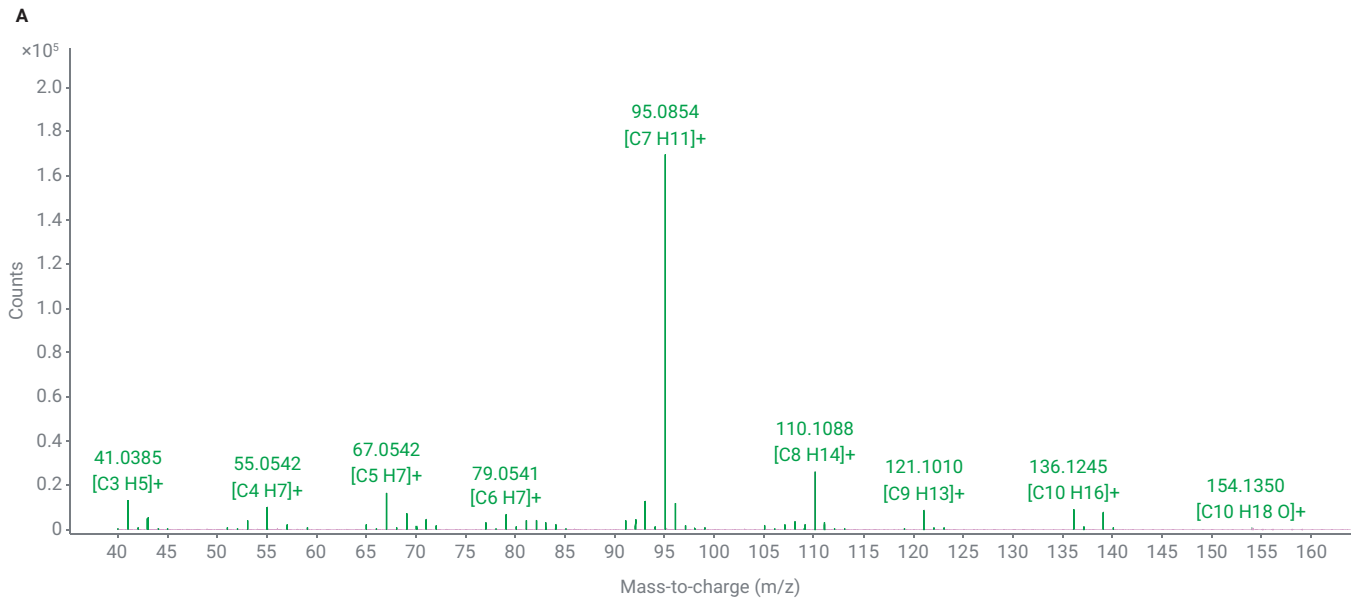


그림 2. CBD 오일 시료의 GC x GC/Q-TOF 크로마토그램에 맵핑된 화합물 등급.



B

Name	Formula	Mass	Retention Time	Retention Index	Cation	Anion	CAS
C11H18-1	C11H18	150.14085	15.03	1134			
C10H16O-2	C10H16O	152.12012	15.13	1137			
cis-2-Nonenal	C9H16O	140.12012	15.508	1147			
Acetic acid, 2-propylpentyl ester	C10H20O2	172.14633	15.535	1148			
C11H18-2	C11H18	150.14085	15.7	1152			
C10H14-4	C10H14	134.10955	15.735	1153			
5-Methylundecane	C12H26	170.20345	15.85	1156			
n-Pentyl benzene	C11H16	148.1252	15.9	1157			
Dihydrocarvone	C10H16O	152.12012	15.9	1157	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	7764-50-3
trans-2-Nonenal	C9H16O	140.12012	15.99	1160	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	18829-56-6
endo-Borneol	C10H18O	154.13577	16.45	1171	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	507-70-0
C10H16O-4	C10H16O	152.12012	16.58	1175	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	00-00-0

+EI MS1 QTOF FV=70

m/z	Retention Time
55.05423	6.05
67.05423	9.55
79.05423	4.07
95.08553	100.00
110.10900	15.40
136.12465	5.37

그림 3. (A) 스펙트럼의 조각 분자식 추적 작업은 고품질 Accurate Mass 라이브러리 생성에서 중요한 단계입니다. (B) 헴프 및 천연 제품의 PCDL에는 머무름 시간과 머무름 인덱스가 모두 포함되어 있습니다. 모든 스펙트럼에는 조각 이온의 이론적 m/z 가 포함되어 있습니다.

가능한 경우에는 모두 분자식으로도 식별되는 것을 포함해, PCDL 내 여러 화합물 등급의 분포는 그림 4에 나타나 있습니다. PCDL에 포함된 총 스펙트럼 수의 반 이상이 모노테르페노이드(monoterpenoid), 세스퀴테르페노이드(sesquiterpenoid) 및 기타 다양한 알코올 종류입니다.

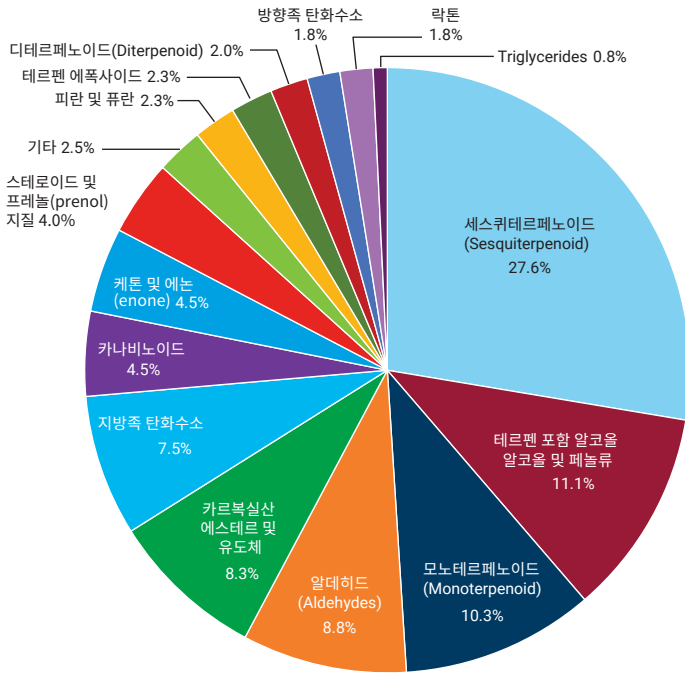


그림 4. PCDL의 화합물 등급.

Accurate Mass 라이브러리를 이용한 표적 및 비표적 워크플로

햄프 CBD 오일 시료에서 수집한 1D GC/Q-TOF 데이터 및 천연 제품 PCDL을 사용해 표적 및 비표적 워크플로를 모두 평가하였습니다. 비표적 분석은 Unknowns Analysis 소프트웨어를 이용해 수행하였습니다(그림 5). 매트릭스에서 개별 성분을 분리하기 위해 Accurate Mass(SureMass)를 위한 deconvolution 알고리즘을 사용하였으며, 화합물 식별에는 새로운 천연 제품 PCDL을 사용하였습니다. 놀랍게도 관찰된 성분 RI와 검색 일치 결과 간의 차이는 1D와 2D GC 분석법의 오븐 프로그램 차이에도 불구하고 작았습니다(그림 5B).

표적 스크리닝은 MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어에서 GC 스크리너 알고리즘을 사용해 수행하였습니다(그림 6) 이 워크플로는 의심 물질 스크리닝을 원활하게 하며, 동시에 표준물질을 사용할 수 있을 때 표적 정량도 가능하게 합니다. 이 접근법의 또 다른 장점은 사용자가 화합물별로 파라미터를 설정할 수 있기 때문에, 높은 유연성을 가진다는 것입니다. 스크리닝 조건은 각 워크플로에 따라 개별적으로 최적화되어, 위양성(false positive)과 위음성(false negative)을 최소화하였습니다.

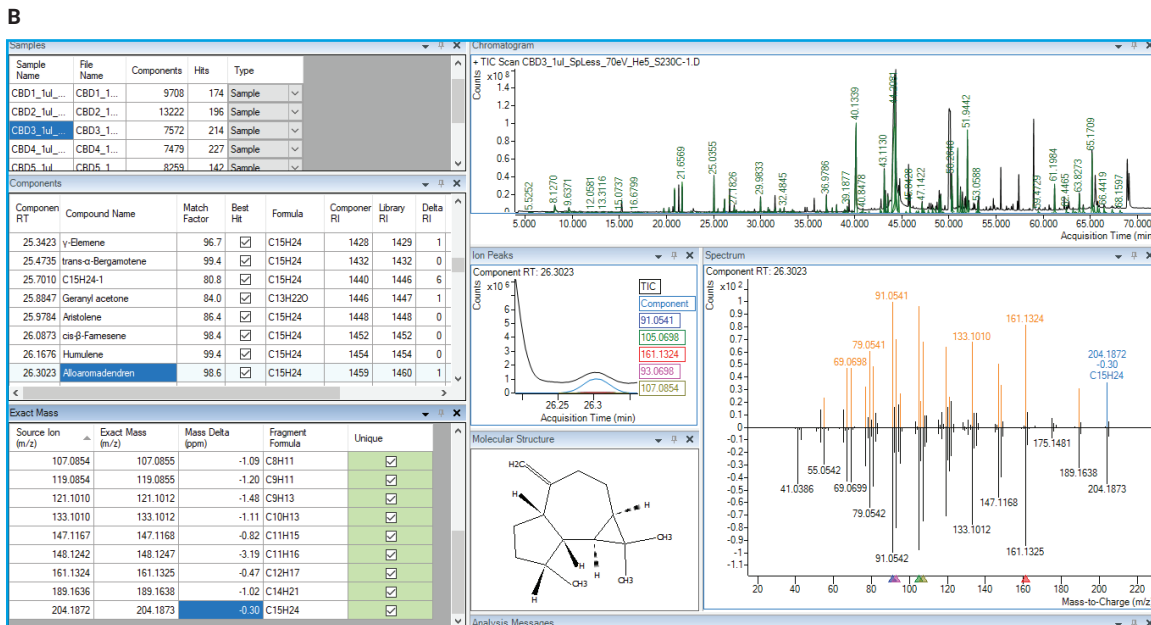
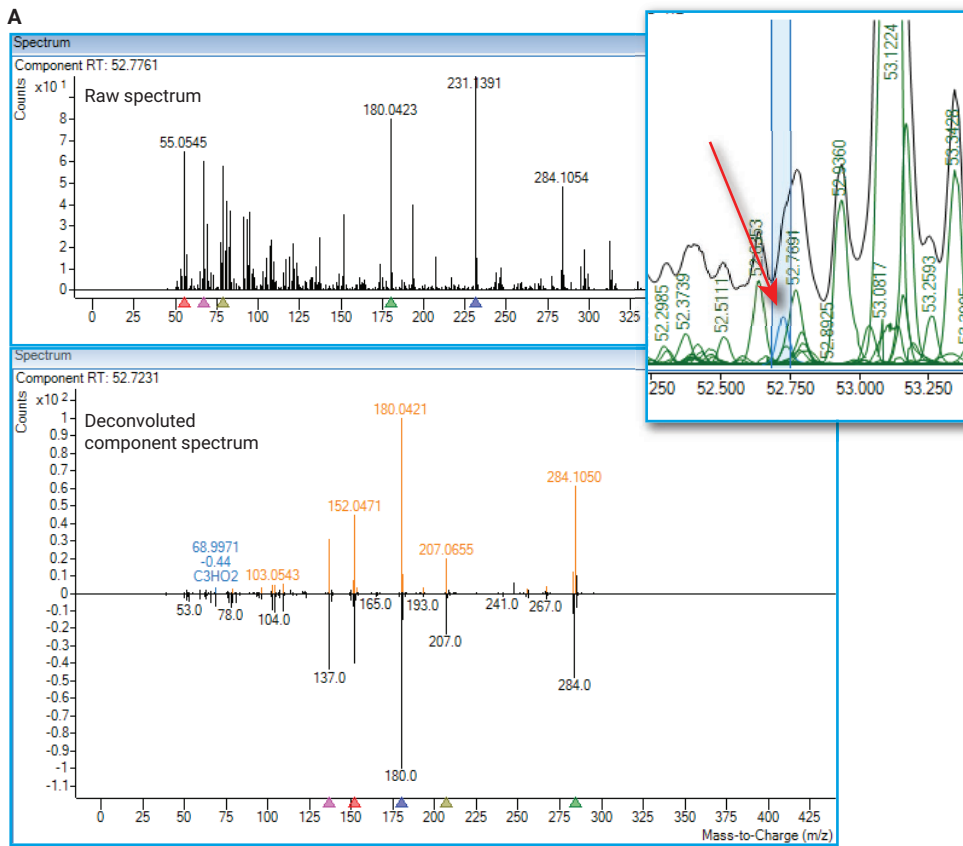


그림 5. Agilent MassHunter Unknowns Analysis 소프트웨어에서 비표적 스크리닝. (A) SureMass는 단일 성분 스펙트럼을 효율적으로 추출할 수 있는 Accurate Mass deconvolution 알고리즘입니다. (B) ExactMass 기능은 검색 결과의 분자식 하위 세트와 일치하는 스펙트럼의 Accurate Mass 이온을 조사함으로써 위양성 방지를 돕습니다.

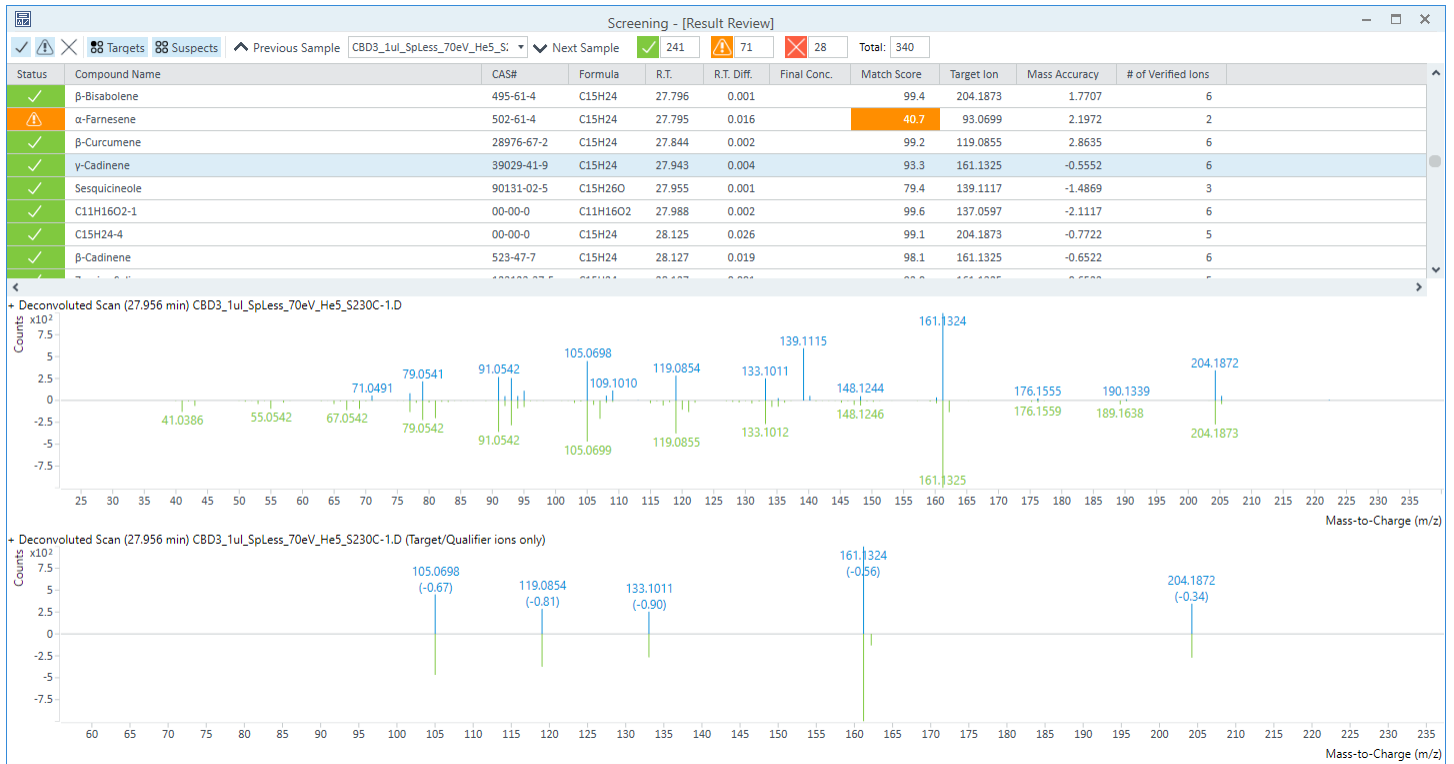


그림 6. Agilent MassHunter Quantitative Analysis 소프트웨어의 표적 스크리닝 요약 창.

두 사례에서 모두 대부분의 검색 일치 결과(수동 검증을 통해 확인됨)가 >80의 높은 라이브러리 매치 스코어(LMS)로 검출되었습니다(표 2와 3). 비표적 접근법 사용 시, <80의 LMS로 나타난 검색 일치 결과의 수는 표적 스크리닝에 비해 현저히 높았습니다. 그러나 표적 스크리닝 사용 시에는 거의 모든 검색 일치 결과가 >90의 LMS를 나타냈습니다. LMS 임계값은 스크리닝 방법의 주요 파라미터 중 하나이므로, 두 접근법의 차이를 기억하고 개별 응용에 따라 최적화하는 것이 도움이 될 것입니다.

전체적으로 보았을 때 천연 제품 Accurate Mass PCDL을 사용한 표적 및 비표적 스크리닝 워크플로는 표적 스크리닝이 모든 시료에서 약간 더 높은 검색 일치 결과를 나타냈음에도, 유사한 수의 화합물을 식별해냈습니다(그림 4).

표 2. CBD 오일 및 대마초 시료의 LMS로 비표적 스크리닝을 수행하여 관찰 및 확인된 화합물 백분율.

매치 스코어	CBD1	CBD2	CBD3	CBD4	CBD5	CBD6	대마초 추출물
90 이상	45.4	48.5	42.5	39.2	41.5	49.3	45.2
80~90	20.1	20.4	24.8	24.2	24.6	23.3	18.3
<80	34.5	31.1	32.7	36.6	33.8	27.4	36.5

표 3. CBD 오일 및 대마초 시료의 LMS로 표적 스크리닝을 수행하여 관찰 및 확인된 화합물 백분율.

매치 스코어	CBD1	CBD2	CBD3	CBD4	CBD5	CBD6	대마초 추출물
90 이상	69.0	63.8	71.4	76.3	64.4	63.1	50.4
80~90	20.5	19.1	16.9	12.1	16.7	20.9	23.9
<80	10.5	17.0	11.7	11.6	19.0	16.0	25.6

표 4. 검색 일치 결과 수, 표적 vs 비표적 스크리닝 접근법의 비교.

워크플로/시료명	CBD1	CBD2	CBD3	CBD4	CBD5	CBD6	대마초 추출물
표적 스크리닝	187	201	230	233	169	172	112
비표적 스크리닝	174	196	214	227	142	146	104

결론

이 응용 자료에서는 GC × GC/Q-TOF MS를 사용해 헴프 CBD 오일 시료가 포함된 여러 천연 제품 및 대마초 재료에 대한 새로운 Accurate Mass 라이브러리를 생성하는 것에 대해 설명하였습니다. 이 라이브러리는 1D GC/Q-TOF 데이터에서 사용하도록 설계되었으며, 요청 시 무료로 이용 가능합니다. 표적 및 비표적 워크플로는 모두 천연 제품 PCDL과 호환되며, 표적 스크리닝 접근법이 조금 더 감도가 높은 것으로 나타났습니다.

면책고지

애질런트 제품 및 솔루션은 국가 및 각 주별 법률에 따라 사용이 허용되는 실험실에서 대마초 품질 관리 및 안전 시험에 사용하도록 설계되었습니다.

참고 문헌

1. Andre, C. M.; Hausman, J.; Guerriero, G. Cannabis Sativa: The Plant of the Thousand and One Molecules. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 19. DOI: 10.3389/fpls.2016.00019
2. Gallily, R.; Yekhtin, Z.; Hanus, L.O. The Anti-Inflammatory Properties of Terpenoids from Cannabis. *Cannabis Cannabinoid Res.* **2018**, *3*(1), 282–290. DOI: 10.1089/can.2018.0014
3. Flores-Sanchez, I. J.; Verpoorte, R. Secondary Metabolism in Cannabis. *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 615–639.

www.agilent.com

DE00519179

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2022
2022년 11월 2일 한국에서 인쇄
5994-5468KO

한국애질런트테크놀로지스(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