

LC/TOFMS를 이용한 생체시료의 내인성 대사체 분석법 개발

이인선* · 김진호 · 조수열 · 심선보 · 박혜진 · 이진희 · 이지현

황인선 · 김성일 · 이정희 · 조수연 · 최돈웅 · 조양하

식품의약품안전청 식품의약품안전평가원 독성평가연구부 첨단분석팀

Method Development for the Profiling Analysis of Endogenous Metabolites by Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight(Q-TOF) LC/MS

Insun Lee*, Jinho Kim, Sooyeul Cho, Sun Bo Shim, Hye Jin Park, Jin Hee Lee, Ji Hyun Lee, In Sun Hwang, Sungil Kim, Jung Hee Lee, Su Yeon Cho, Donwoong choi, and Yang Ha Cho

Korea Food & Drug Administration, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Toxicological Evaluation and Research Department, Advanced Analysis Team, 194 Tongil-ro, Eunpyung-gu, Seoul 122-704, Korea

(Received July 6, 2010/Revised October 8, 2010/Accepted November 30, 2010)

ABSTRACT - Metabolomics aims at the comprehensive, qualitative and quantitative analysis of wide arrays of endogenous metabolites in biological samples. It has shown particular promise in the area of toxicology and drug development, functional genomics, system biology and clinical diagnosis. In this study, analytical technique of MS instrument with high resolution mass measurement, such as time-of-flight (TOF) was validated for the purpose of investigation of amino acids, sugars and fatty acids. Rat urine and serum samples were extracted by selected each solvent (50% acetonitrile, 100% acetonitrile, acetone, methanol, water, ether) extraction method. We determined the optimized liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry (LC/TOFMS) system and selected appropriated columns, mobile phases, fragment energy and collision energy, which could search 17 metabolites. The spectral data collected from LC/TOFMS were tested by ANOVA. Obtained with the use of LC/TOFMS technique, our results indicated that (1) MS and MS/MS parameters were optimized and most abundant product ion of each metabolite were selected to be monitored; (2) with design of experiment analysis, methanol yielded the optimal extraction efficiency.

Therefore, the results of this study are expected to be useful in the endogenous metabolite fields according to validated SOP for endogenous amino acids, sugars and fatty acids.

Key words: *Metabolomics, LC/TOFMS, solvent extraction*

인간의 체내에 존재하는 내인성 대사체들은 식생활, 환경, 유전, 질병, 의약품 등과 같은 요인에 의하여 변화한다. 인간의 대사산물을 연구하는 분야인 대사체학(Metabolomics)을 통하여 생리작용이나 병리작용과 직접 관련되는 생화학적 대사 물질 변화를 예측할 수 있다¹⁾. 오믹스(Omics)의 분야인 유전체학(genomics), 전사체학(transcriptomics), 단백질체학(proteomics)은 분석에 많은 시간과 노력이 소요되고, 유전자나 단백질의 수가 약 40,000개 및 150,000개 이상 추정되어 분석 후 해석에 많은 어려움이 존재하지만, 대사체학의 경우 분석 대상 물질 수가 약 2,500개 이하로 상

대적으로 적어 해석이 용이하다. 따라서 현재 질병 진단표지 대사체 및 약물 반응에 대한 대사조절물질 발굴을 위하여 생물학적 평가에서 'endpoint'의 단계인 대사체학의 연구가 각광을 받고 있다²⁾.

일반적으로 대사체학은 다양한 첨단분석기기 및 통계 알고리즘을 이용하여 생체 내에 존재하는 저분자 내인성 대사체의 구성 및 변화 등을 체계적으로 정성 및 정량하는 대사체군의 다양한 생리, 병리, 유전 상태와 연관되어 있다³⁾. 대사체 분석기법 중 하나인 Global metabolomic profiling 방법은 특정한 그룹을 정하지 않고 총체적으로 대사체들을 분석하는 방법을 일컫는다. Targeted metabolomic profiling 방법을 이용하여 분석하고자 하는 물질을 미리 정한 후 시료에 존재하는 target 물질이 여러 조건 중에서 어떻게 증감되는지 판단할 수 있다⁴⁾. 대사체 분석에 대한 연구는 현재 기술 수준에서는 미흡하기 때문에, 핵자기공명장치(NMR),

*Correspondence to: Insun Lee, Food & Drug Administration, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Toxicological Evaluation and Research Department, Advanced Analysis Team, 194 Tongil-ro, Eunpyung-gu, Seoul 122-704, Korea
E-mail : islee20@korea.kr

액체크로마토그래프/질량분석기(LC/MS), 기체크로마토그래프/질량분석기(GC/MS) 등을 이용하여 대사체를 분석하는 연구도 더욱 활발히 진행되어야 할 필요가 있다⁵⁾. Yang et al. 의 연구에 의하면, NMR을 이용하여 one-dimensional NMR과 two-dimensional NMR 방식을 이용하여서 인간의 뇨에서 histidine, glycine, alanine 등의 필수아미노산 methyl기 유도체화한 미지물질 등 70가지 이상 대사체 산물들을 밝혀냈다⁶⁾. 하지만, NMR은 민감도가 낮고, NMR 데이터 분석할 때 숙련된 전공자가 필요하는 등 소요시간이 오래 걸린다는 단점을 지니고 있다⁷⁾.

질량분석법(MS)는 고감도 분석법으로서 소량의 샘플로부터 분석물질의 많은 정보를 얻을 수 있고 광범위한 분자량을 지니는 대사물 분석을 할 수 있다⁸⁾. TOFMS는 모든 이온들이 가속장에서 같은 에너지를 받고 검출기까지 가속화되면서 가벼운 이온은 먼저, 무거운 이온은 나중에 검출되는 중력원리에 의하여 분석되어 진다. 최근 연구에 따르면, GC/TOFMS를 이용한 대사체 분석시 샘플에서 대사체 추출 및 농축을 위한 적절한 전처리를 하여 랫드 뇨 등 생체시료에서 고감도 또는 고속분석처리가 가능해짐을 규명하였다⁹⁾. 하지만, GC분석을 할 경우 비휘발성 분석물질을 메톡실화 및 실릴화를 하여 유도체화(derivitization)을 시켜야 하는 전처리의 번거로움이 있으며 유도체화된 기에 의

해서 원료물질의 변화가 발생하는 단점이 있다¹⁰⁾.

LC/MS의 특성은 컬럼의 선택, 이동상의 조합 등에 의하여 여러 가지 분리기술과 검출기의 조합이 가능하다는 것이다. 순상 및 역상컬럼 등 다양한 종류의 컬럼들 중에서 친수크로마토그래피컬럼(HILIC column)을 이용하여서 이온억제의 최소화 및 고극성물질 피크가 분리되어 대사체 분석을 용이하게 할 수 있다¹¹⁾. 따라서 본 연구에서는 국내에서 시도 되지 않았던 대사체 물질의 비행시간(Time of flight, TOF)을 이용한 LC/TOFMS를 사용하여 생체 내의 아미노산, 당, 지방산 등의 내인성 대사체를 분석하는 방법을 개발하였다.

실험방법

시약 및 기기

분석에 사용되어진 용매 및 이동상은 HPLC급 시약이며, Acetonitrile, Methanol, Acetone, Ether, Water, Formic acid, Ammonium formate, Ammonium Acetate, Sodium Sulfate (Anhydrous)은 Sigma-Aldrich사(MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 이동상의 용매와 증류수는 Millipore membrane filter 시스템을 통해 Whatman사(Maidstone, UK)의 nylon membrane filter (0.2 µm)로 여가한 후 10분간 탈기하여 사용하였다.

Table 1. The LC/TOFMS system for analysis of amino acids

LC 기기명	Agilent Technologies 1200 series		
Column	SP HILIC column; 5 µm, 150 × 2.0 mm		
Flow rate (ml/min)	0.3		
	A - 0.1% formic acid in DW		
	B - 100% ACN		
Mobile phase	time(min)	A(%)	B(%)
	3.0	20	80
	13.0	60	40
	16.0	90	10
	20.0	20	80
	30.0	20	80
Injection volume (ul)	1		
Column temperature (°C)	40		
MS 기기명	Agilent Technologies 6530 Accurate-Mass		
Ionization mode	ESI + Agilent Jet Stream		
Gas temperature (°C)	350		
Gas flow (l/min)	6		
Nebulizer (psi)	15		
Sheath gas temperature (°C)	400		
Sheath gas flow (l/min)	11		
Ion polarity	Positive		
Skimmer (V)	65		
Fragmentor voltage (V)	110		
Collision energy (V)	2		

Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) LC/MS 분석기기 및 조건

생체시료 분석에 사용한 Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) LC/MS로는 Agilent (CA, USA)사의 Agilent Technologies 6530 Accurate-Mass 모델을 사용하였으며, HPLC 및 펌프는 Agilent 1200 시리즈(CA, USA) 모델과 함께 autosampler를 사용하였다.

아미노산 분석을 위하여 MS조건에서 질량분석기의 이온화 방식에는 전기분무 이온화(electrospray ionization, ESI) 법을 사용하였으며 분무된 이온화를 모아서 빠르게 전달해주는 Jet Stream방식을 이용하였다. Positive 이온화 모드에서 gas temperature는 350°C, skimmer voltage는 65V, Fragmentor voltage는 110V로 설정하였다. HPLC 조건에서 이동상 A는 0.1% formic acid in DW와 이동상 B는 100% 아세트니트릴을 사용했으며, 처음 3분에서 13분까지 20:80(v/v)에서 60:80(v/v)로 linear gradient조건을 사용하였고, 13분에서 16분까지는 90:10(v/v)조성을 변화시켰고, 20분까지는 20:80(v/v)로 사용하고 남은 10분동안 같은 조성을 유지하였다. 분석에 사용한 컬럼은 Shiseido사(Tokyo, JAPAN)의 SP Hilic column (150 × 2.0 mm, 5 μm)을 사용하였으며, 유속은 0.3 ml/min, injection volume은 1 μl, 컬럼온도는 40°C로 하였다(Table 1).

당 분석을 위하여 MS조건은 ESI + Jet Stream방식을 이

용하였으며, Negative 이온화 모드에서 gas temperature는 350°C, skimmer voltage는 65V, Fragmentor voltage는 100V로 설정하였다. HPLC조건은 이동상 A는 5 mM Ammonium Formate (pH 4.0)와 이동상 B는 0.1% formic acid in ACN을 사용했으며, 처음 8분동안 10:90(v/v)에서 90:10(v/v)으로 linear gradient조건을 사용하였고 8분에서 9분까지는 5:95(v/v)로 조성으로 변경하고 9분에서 10분까지는 10:90(v/v)로 사용하고 남은 10분동안 계속 같은 조성을 유지하였다. 분석에 사용한 컬럼은 Waters사(MIT, USA)의 Atlantis Hilic column (150 × 2.0 mm, 5 μm)을 사용하였으며, 유속은 0.3 ml/min, injection volume은 1 μl, 컬럼온도는 40°C로 하였다 (Table 2).

지방산 분석을 위하여 MS조건은 ESI + Jet Stream방식을 이용하였으며, Negative 이온화 모드에서 gas temperature는 350°C, skimmer voltage는 65V, Fragmentor voltage는 110V로 설정하였다. HPLC조건은 이동상 A는 200 mM Ammonium Acetate (pH 6.8)와 이동상 B는 100% ACN을 사용했으며, 처음 2분에서 8분까지 A:B = 5:95에서 A:B = 90:10으로 linear gradient조건을 사용하였고, 처음 2분에서 8분까지 5:95(v/v)에서 90:10(v/v)로 linear gradient조건을 사용하였고, 8분에서 11분까지는 5:95(v/v)조성을 변화시켰고, 20분까지 같은 조성을 유지하였다. 분석에 사용한 컬럼은 Waters사(MIT,

Table 2. The LC/TOFMS system for analysis of sugars

LC 기기명	Agilent Technologies 1200 series		
Column	Atlantis HILIC column; 5 μm, 150 × 2.0 mm		
Flow rate (ml/min)	0.3		
Mobile phase	A - 5 mM Ammonium Formate (pH 4.0)		
	B - 0.1% formic acid in ACN		
	time(min)	A(%)	B(%)
	0	10	90
	8.0	90	10
9.0	5	95	
10.0	10	90	
20.0	10	90	
Injection volume (ul)	1		
Column temperature (°C)	40		
MS 기기명	Agilent Technologies 6530 Accurate-Mass		
Ionization mode	ESI + Agilent Jet Stream		
Gas temperature (°C)	350		
Gas flow (l/min)	6		
Nebulizer (psi)	30		
Sheath gas temperature (°C)	400		
Sheath gas flow (l/min)	11		
Ion polarity	Negative		
Skimmer (V)	65		
Fragmentor voltage (V)	100		
Collision energy (V)	1		

USA)의 Atlantis Hilic column (150 × 2.0 mm, 5 μm)을 사용하였으며, 유속은 0.3 ml/min, injection volume은 1 μl, 컬럼 온도는 40°C로 하였다(Table 3).

실험동물 준비

실험동물은 Male Sprague-Dawley (SD)계 랫드(5주령)으로 식품의약품안전평가원 실험 동물실에서 최소한 일주일 이상의 온도 23 ± 2°C, 습도 55 ± 10, 환기횟수 10-18 회/hr, 명암 12시간 조명주기 (7시 전등~19시 소등), 조도 150~300 Lux의 조건을 유지하면서 순화시킨 후 실험에 사용하였으며, 본실험 시 체중 275 ± 25 g의 랫드를 사용하였다. 동물실에서 사육하는 동안 사료와 물은 제한 없이 공급하였다. 일주일 이상 순화시킨 랫드를 동물크기에 적절한 냉장 대사케이지를 선택하여 각각 한 마리씩 옮겨 24시간 노를 채취하였다. 채뇨를 할 때는 노 이외의 사료 부스러기, 음수 및 분변 등이 채뇨용기에 혼입되지 않게 주의하였으며, 각각의 노는 모두 pooling하고 소분한 다음 실험 분석시까지 -80°C에 보관하였다. 도태직전에 CO₂로 마취하여 (1 gage, 30-60초) 마취된 랫드를 수술용 가위로 절개한 다음 혈관이 손상되지 않도록 복대동맥으로 전혈을 취하였다. 채혈한 혈액은 즉시 vacutainer tube (no additive, tube interior coating-silicone)에 tube 벽면을 따라 조심히 넣고 약 30분 정도 실온에 방치한 후, centrifuge에 3000 rpm, 4°C 조건에

서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후, 분리된 혈청은 모두 pooling하여 소분한 다음 실험 분석시까지 -80°C에 보관하였다.

시료 전처리

노, 혈청 중의 아미노산, 당, 지방산 추출을 위하여 용매 Cold 50% acetonitrile, 100% acetonitrile, methanol, acetone은 공통으로 사용되어졌으며, water는 아미노산, 당 분석시 사용하였고, ether는 지방산 분석시 사용하였다. 단백질을 aggregation하여서 침강시키고, 분석 물질이 용이하게 추출되기 위하여 추출용매를 변형하여서 실험을 실시하였다. 200 μl의 노(혈청) 샘플에 600 μl의 cold acetone (50% acetonitrile, 100% acetonitrile, methanol, water)를 넣고 3분간 vortexing하였다. 4°C에서 30분간 방치 후, 14,000 g, 4°C에서 20분간 centrifuge시킨다. 500 μl의 상등액을 취해 질소 가스 농축시킨다. 1 mL 50% acetonitrile을 넣고 20분간 vortexing한 후 추출액은 PTFE membrane filter (0.2 μm)로 filtration한 후 LC vial에 담았다. 지방산 추출시, 200 μl의 노(혈청) 샘플을 6N HCl을 이용하여 pH 1-2를 맞춘 후, 600 μl의 ether를 넣은 후 3분간 vortexing한다. 14,000 g, 4°C에서 5분간 centrifuge시킨 후, 상등액을 취해 vial에 옮긴 후, anhydrous sodium sulfate를 넣는다. 상등액 250 μl을 취해 질소 가스를 이용해서 evaporation 시킨다. 시료에 1 mL의 50% acetonitrile

Table 3. The LC/TOFMS system for analysis of fatty acids

LC 기기명	Agilent Technologies 1200 series		
Column	Atlantis HILIC column; 5 um, 150 × 2.0 mm		
Flow rate (ml/min)	0.3		
Mobile phase	A - 200 mM Ammonium Formate (pH 6.8)		
	B - 100% ACN		
	time(min)	A(%)	B(%)
	2.0	5	95
8.0	90	10	
11.0	5	95	
20.0	5	95	
Injection volume (ul)	1		
Column temperature (°C)	40		
MS 기기명	Agilent Technologies 6530 Accurate-Mass		
Ionization mode	ESI+Agilent Jet Stream		
Gas temperature (°C)	350		
Gas flow (l/min)	6		
Nebulizer (psi)	30		
Sheath gas temperature (°C)	400		
Sheath gas flow (l/min)	11		
Ion polarity	Negative		
Skimmer (V)	65		
Fragmentor voltage (V)	110		
Collision energy (V)	1		

을 넣고 20분간 vortexing한 후 추출액은 PTFE membrane filter (0.2 µm)로 filtration한 후 LC vial에 담는다. 동일한 방법으로 200 µl의 시료에 각 표준액을 spiking하여 실험을 실시하였다.

데이터 처리

데이터는 Masshunter Mass Profiler Software (CA, USA)을 이용하여 처리하였다. 용매를 변경하여서 전처리하는 방법에 대한 데이터는 ANOVA를 이용하여서 서로의 유의성을 판단하였다.

결 과

MS mode를 위한 이온선택

아미노산, 당, 지방산의 최적의 MS 이온 모드 확립을 위해 각 성분별로 표준용액(1000ppb)를 사용하여 ESI positive 모드 및 negative모드, 각각에서의 MS 스펙트럼을 비교하였다. 아미노산은 ESI positive 모드, 당은 ESI negative 모드, 지방산은 ESI negative모드에서의 full scan spectrum에서 최상의 분자이온이 관찰되었다. 또한 collision energy를 변화시키며 full scan하여 이온이 조각되는 패턴을 분석하였다. Collision energy는 MS/MS에서 쪼개짐 이온(product ion)의 생성에 중요한 parameter이며, 본 연구에서 분석하는 아미노산, 당, 지방산은 분자량이 큰 물질이 아니므로 1V또는 2V의 collision energy를 주었다. Table 4와 같이 각 아미노산, 당, 지방산의 모이온(precursor ion)과 쪼개짐이온(product ion)을 구분할 수 있었으며, TOFMS의 high resolution mass spectrometry기법을

이용하여 소수점 넷째자리까지 규명하였다(Table 4).

희석용매 종류에 따른 전처리 비교

확립된 MS조건에 결합하는 최적의 전처리방법을 확립하기 위하여 유기용매 등의 조성, 종류등을 변화하여서 실험을 실시하였다. 동일한 샘플 (노와 혈청)을 50% acetonitrile, 100% acetonitrile, acetone, methanol, water, ether를 이용하여 추출하여서 각각에 따른 피크면적을 비교하였다. 실험은 3회이상 반복하였으며, 각각 용매에 따른 추출 농도는 서로 유의성을 나타냈다($P < 0.05$) (Table 5, Table 6).

고찰 및 요약

내인성 대사체 분석에서 LC/TOFMS 이용의 유효성

본 연구에서는 감도, 재현성, 질량정확성, 데이터 속도 등이 우수한 LC/TOFMS를 이용하여 대사체들의 분석을 실시하여 내인성 대사체의 global 및 targeting profile 방법을 제시하였다. LC/TOFMS는 high resolution mass spectrometry로서 추후에 약물반응 등으로 인하여 유발하는 생체 내의 내인성 대사체 변화를 측정하기 위해서 전체적인 내인성 대사체를 screening하여 검토할 수 있으며, 또한 특정 대사체를 선택하여서 변화 정도를 측정할 수 있다. 본 연구에서 아미노산, 당, 지방산의 내인성 대사체 동시 측정방법을 확립함으로써, 약물반응 예측용 생체지표 개발 가능성을 제시하였으며, 이에 따라 약의 처방에 따른 환자별 약물의 효과의 신속한 판단을 예상할 수 있다.

Table 4. Selected precursor and product ion masses of 17 endogenous metabolites used in MS/MS mode for Qualification

No.	compound	precursor ion (m/z) = [M + H] ⁺ or [M - H] ⁻	product ion (m/z)	Formula
1	glycine	76.0393	59.04788	C ₂ H ₆ NO ₂ ⁺
2	alanine	90.0550	70.00416	C ₃ H ₈ NO ₂ ⁺
3	serine	106.0499	88.03974	C ₃ H ₈ NO ₃ ⁺
4	proline	116.0706	70.06340	C ₅ H ₁₀ NO ₂ ⁺
5	valine	118.0863	72.08173	C ₅ H ₁₂ NO ₂ ⁺
6	threonine	120.0655	74.05905	C ₄ H ₁₀ NO ₃ ⁺
7	leucine	132.1019	86.09674	C ₆ H ₁₄ NO ₂ ⁺
8	asparagine	133.0608	87.05629	C ₄ H ₉ N ₂ O ₃ ⁺
9	glutamine	147.0764	130.05069	C ₅ H ₁₁ N ₂ O ₃ ⁺
10	methionine	150.0583	104.04958	C ₅ H ₁₂ NO ₂ S ⁺
11	histidine	156.0768	110.06903	C ₆ H ₁₀ N ₃ O ₂ ⁺
12	phenylalanine	166.0863	120.08069	C ₉ H ₁₂ NO ₂ ⁺
13	glucose	179.0561	84.00912	C ₆ H ₁₁ O ₆ ⁻
14	maltose	341.1089	161.04427	C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁ ⁻
15	decanoic acid	171.1391	168.83620	C ₁₀ H ₁₉ O ₂ ⁻
16	linoleic acid	279.2330	232.93521	C ₁₈ H ₃₁ O ₂ ⁻
17	oleic acid	281.2486	232.93481	C ₁₈ H ₃₃ O ₂ ⁻

Table 5. Peak area of urine samples extracted by each solvent (50% acetonitrile, 100% acetonitrile, acetone, methanol, water, ether)

No.	compound	50% acetonitrile	100% acetonitrile	acetone	methanol	water ¹⁾ or ether ²⁾
1	glycine	851090 ± 1587 ³⁾	53414 ± 253	437373 ± 131	1013230 ± 528	1003666 ± 532
2	alanine	40346 ± 313	167742 ± 78	649416 ± 199	752178 ± 35	34498 ± 15
3	serine	304358 ± 248	88018 ± 275	214428 ± 112	337472 ± 234	313462 ± 481
4	proline	1058034 ± 7845	502155 ± 123	1519025 ± 114	1596308 ± 28	1585193 ± 231
5	valine	7237360 ± 53563	3827886 ± 2082	9985635 ± 84	10629195 ± 201	10289609 ± 203
6	threonine	383217 ± 35	631912 ± 8021	879043 ± 97	486785 ± 241	405969 ± 201
7	leucine	789025 ± 641	683476 ± 548	1151065 ± 77	870874 ± 124	762940 ± 408
8	asparagine	838373 ± 229	135735 ± 51	411516 ± 206	927635 ± 122	899789 ± 411
9	glutamine	1763738 ± 212	259190 ± 50	1090227 ± 86	1831639 ± 476	1667834 ± 376
10	methionine	87049 ± 78	92466 ± 8	85790 ± 25	554767 ± 33	125907 ± 35
11	histidine	24500 ± 40	45840 ± 160	29890 ± 130	109500 ± 132	47370 ± 280
12	phenylalanine	238718 ± 437	534 ± 1	4984 ± 9	426636 ± 49	252512 ± 361
13	glucose	1156681 ± 151	962395 ± 133	1175007 ± 217	1220288 ± 194	1184702 ± 113
14	maltose	501440 ± 47	82742 ± 26	412119 ± 114	548816 ± 37	519987 ± 55
15	decanoic acid	153 ± 1	450 ± 6	1892 ± 15	230 ± 1	1864 ± 1
16	linoleic acid	7183 ± 51	13478 ± 51	12822 ± 19	14886 ± 122	11227 ± 9
17	oleic acid	6305 ± 33	6361 ± 17	7013 ± 25	10350 ± 52	7390 ± 4

¹⁾Water solvent used in case of 1~14 compound analysis²⁾Ether solvent used in case of 15~17 compound analysis³⁾Mean ± standard deviation of 3 replications**Table 6.** Peak area of serum samples extracted by each solvent (50% acetonitrile, 100% acetonitrile, acetone, methanol, water, ether)

No.	compound	50% acetonitrile	100% acetonitrile	acetone	methanol	water ¹⁾ or ether ²⁾
1	glycine	956301 ± 6997 ³⁾	667787 ± 135	648323 ± 5615	1487764 ± 104	1136661 ± 228
2	alanine	3676445 ± 2199	2113290 ± 276	2113055 ± 18301	4083973 ± 386	2885383 ± 519
3	serine	1956980 ± 1025	891364 ± 785	1152889 ± 9990	2149854 ± 596	1408936 ± 293
4	proline	3701422 ± 3312	2482177 ± 171	2336491 ± 2025	4232475 ± 662	2761348 ± 522
5	valine	4874186 ± 4270	3756952 ± 1056	3323734 ± 2882	5538459 ± 487	5764116 ± 3411
6	threonine	3116533 ± 2771	1404291 ± 200	2098686 ± 1817	3385382 ± 617	2135807 ± 514
7	leucine	6004626 ± 5203	4956823 ± 662	4245819 ± 3678	94494158 ± 713	1167 ± 5
8	asparagine	484052 ± 572	212459 ± 154	208674 ± 1816	560928 ± 177	328673 ± 24
9	glutamine	10273007 ± 9672	4594689 ± 761	5450485 ± 4725	11779308 ± 1606	7103435 ± 1418
10	methionine	716090 ± 700	465304 ± 22	417827 ± 3620	785825 ± 163	594221 ± 149
11	histidine	1203695 ± 1689	546428 ± 207	772042 ± 6737	1452210 ± 299	824462 ± 243
12	phenylalanine	1572374 ± 1609	1378081 ± 244	1144836 ± 9925	1861015 ± 349	1203102 ± 201
13	glucose	5833 ± 14	4844 ± 3	1380 ± 8	6700 ± 12	5199 ± 2
14	maltose	4772 ± 9	3173 ± 9	3348 ± 17	4956 ± 2	1750 ± 6
15	decanoic acid	75 ± 1	5224 ± 90	78 ± 1	3618 ± 10	91 ± 2
16	linoleic acid	2723 ± 6	19002 ± 169	12504 ± 18	77722 ± 124	394 ± 4
17	oleic acid	3506 ± 9	9863 ± 16	13423 ± 13	81005 ± 130	366 ± 6

¹⁾Water solvent used in case of 1~14 compound analysis²⁾Ether solvent used in case of 15~17 compound analysis³⁾Mean ± standard deviation of 3 replications**용매에 따른 비교 및 metabolites profiling**

여러 가지 용매를 이용하여 생체시료 (뇨 및 혈청) 내에 있는 단백질을 aggregation하여 제거하고, 효과적으로 metab-

olites를 profiling (아미노산, 당 및 지방산 성분별)하는 방법을 도출하였다.뇨에서 아미노산을 추출하기 위하여 methanol과 acetone, 당을 추출하기 위하여 methanol, 지방

Table 7. The optimized solvents for analyzing endogenous metabolites of urine and serum by LC/TOFMS

Solvents	amino acids	sugars	fatty acids
Urine	Methanol	Methanol	Methanol
Serum	Methanol	Methanol	Methanol

산을 추출하기 위하여 methanol과 ether에서 추출율이 효과적임을 확인하였다. 또한 혈청에서는 아미노산, 당, 지방산을 추출하기 위하여 methanol의 추출방법이 유용하였다. 각각의 데이터를 비교하여 아미노산, 당, 지방산 각각의 최적 추출조건을 정리한 결과, 뇨와 혈청 모두에서 Methanol을 최적의 추출용매로 선정할 수 있었다(Table 7). 시료 전처리 등 분석은 각각 3회 이상 반복하였으며, peak area에 따른 비교는 ANOVA test를 이용하여 추출시험법에 대한 유의성을 확인하였다($P < 0.05$). 따라서, 생체시료 중에서 아미노산, 당, 지방산의 정성 및 정량분석을 실시하기 위해서는 각 시료를 Methanol로 추출한 후, 분석을 실시하면 효과적임을 판단할 수 있었다.

분석법 활용

본 연구에서 개발된 내인성 대사체 분석법은 향후 대사체의 기능 및 질병과 관련된 독성, 의약품 및 질환의 생리학, 미생물 분야 등에 매우 유용한 분석법으로 사료된다. LC/TOFMS를 이용한 프로파일링 기법을 이용하여 아미노산, 당, 지방산의 대사체 변화 양상을 추측하여 분석함으로써 신약개발, 질환 연구 등의 기본 자료로 활용되어질 것으로 판단된다.

참고문헌

- Nicholson, J.K., Lindon, J.C. and Holmes, E.: 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*, **29**, 1181-1189 (1999).
- Lindon, J.C., Holmes, E., Nicholson, J.K.: Metabonomics techniques and applications to pharmaceutical research&development. *Pharm Res*, **23**(6), 1075-1088 (2006).
- Romero, R., Espinoza, J., Gotsch, F., Kusanovic, J.P., Frie, L.A., Erez, O., Mazaki-TOvi, S., Than, N.G., Hassan, S., Tromp, G.: The use of high-dimensional biology (genomics, transcriptomics, proteomics, and metabolomics) to understand the preterm parturition syndrome. *BJOG*, **113**(3), 118-135 (2006).
- Jeoung, B.C.: The metabolomics in research of diseases. *Molecular and Cellular Biology News*, **18**(1), 17-27 (2006).
- Di, L.A., Claudino, W., Colangiuli, D., Bessi, S., Pestrin, M., Biganzoli, L.: New strategies to identify molecular markers predicting chemotherapy activity and toxicity in breast cancer. *Annals of Oncology*, **18**(12), 128-134 (2007).
- Yang, W., Wang, Y., Zhou, Q., Tang, H.: Analysis of human urine metabolites using SPE and NMR spectroscopy. *Sci China Ser B-Chem*, **51**(3), 218-225 (2008).
- Kim, K.B., Chung, M.W., Um, S.Y., Oh, J.S., Kim, S.H., Na, M.A.: Metabolomics and biomarker discovery : NMR spectral data of urine and hepatotoxicity by carbon tetrachloride, acetaminophen, and D-galactosamine in rats. *Metabolomics*, **4**, 377-392 (2008).
- Whitfield, P.D., German, A.J., Noble, P.J.M.: Metabolomics : an emerging post- genomic tool for nutrition. *British Journal of Nutrition*, **92**, 549-555 (2004).
- Xia, J., Liang, Q., Ping, H., Wang, Y., Luo, G.: Recent Trends in Strategies and Methodologies for Metabonomics. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, **37**(1), 136-143 (2009).
- Halket, J.M., Waterman, D., Przyborowska, M.A., Pate, R.K.P., Fraser, P.D., Bramley M.P.: Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 219-243 (2005).
- Onorato, J.M., Langish, R., Bellamine, A., Shipkova P.: Applications of HILIC for targeted and non-targeted LC/MS analyses in drug discovery. *Journal of Separation Science*, **33**, 923-929 (2010).