

# Application News

No. 04-AD-0291-K

Natural Product / LCMS-9030 / LabSolutions Insight Explore™

## LCMS-9030의 DDA 방법 및 LabSolutions Insight Explore를 사용하여 인동덩굴 꽃의 천연 성분에 대한 신속한 프로파일링

Quick Profiling and Identification of Natural Product Components in Honeysuckle Flower by DDA Method on LCMS-9030 with LabSolutions Insight Explore

### 사용자 활용 포인트

- ◆ LCMS-9030 Q-TOF의 data-dependent acquisition (DDA)은 인동덩굴 꽃 추출물의 주요 성분을 프로파일링 및 정성에 효과적으로 사용된다.
- ◆ LabSolutions Insight Explore 소프트웨어는 Analyze, Screen, Precursor, Library Search, Formula 및 Assign 기능을 사용하여 표적 및 비표적 스크리닝, 정성, 구조 규명을 위한 매우 유연하고 심층적인 데이터 분석 도구를 제공한다.

### ■ 서론

천연물 및 한약재의 프로파일링 및 정성을 위하여 LC-Q-TOF와 같은 LC-HRMS의 사용은 품질 관리, 새로운 활성 화합물의 연구 및 발견에 중요하고 효과적인 접근법이다<sup>[1]</sup>. data-dependent acquisition(DDA) 또는 data-independent acquisition (DIA)을 통해 얻은 정확한 질량 (1 ppm) 및 풍부한 MS/MS 데이터를 통해 연구자는 표적 또는 비표적 스크리닝을 수행할 수 있을 뿐만 아니라 미지성분을 정성 할 수 있다. 이 뉴스레터에서는 중국 전통 의약품(TCM)인 인동덩굴 꽃(*Lonicera japonicae*) 추출물에 적용하여 DDA 분석 접근법을 설명한다. Analyze, Screen, Precursor, Formula Predictor, Library Search 및 Assign을 포함한 다양한 도구를 활용하여 스크리닝 및 정성을 위한 포괄적인 소프트웨어인 LabSolutions Insight Explore를 사용하여 심층적인 데이터 분석을 시연한다. *Lonicera*는 고대부터 질병을 치료하는 약초로 사용되어 왔으며, 이는 중국 약전(2005년 판)에 기록되어 있다. 인동덩굴 꽃 추출물에 존재하는 주요 성분을 프로파일링하고 정성하여 품질 관리 및 연구 목적으로 활용하는 것은 매우 흥미로운 일이다.

### ■ 분석 방법

#### 시약 및 시료 준비

LC-MS 등급 아세토니트릴, 메탄올 및 포름산은 상용 공급 업체에서 구입했다. 건조된 인동덩굴 꽃은 현지 한약 판매점에서 구입했다. 건조된 인동덩굴 꽃 1 g을 저온(액체 질소)에서 250 rpm으로 1분간 혼합했다. 100 mg의 인동덩굴 꽃에 10 mL의 추출 용매(1:1 Milli-Q 물과 메탄올)를 첨가했다. 추출은 45°C에서 45분 동안 150 rpm으로 진탕하면서 진행하였다<sup>[2]</sup>. 그런 다음 추출물을 0.22 µm PTFE 필터로 여과하고 분석을 위해 HPLC 샘플 바이알에 옮겼다.

#### LC-Q-TOF 분석 조건

이 분석에는 Shimadzu LCMS-9030, Q-TOF 시스템을 사용하였으며, 분석 조건의 세부 사항은 표 1에 나타내었다.

표 1. 인동덩굴 꽃 추출물의 LCMS-9030 Q-TOF 분석조건

LC Conditions (Nexera™ UHPLC)	
Column	Shim-Pack™ GIST-HP C18 column (3.0 x 150 mm, 3 µm)
Flow Rate	0.4 mL/min
Mobile Phase	A: 0.1% Formic Acid in Water B: 0.1% Formic Acid in Acetonitrile
LC program	B: 0-2 min, 15% → 20 min, 44% → 23-25 min, 95% → 26 min, 15% → 30 min, stop
Oven Temp.	40 °C
Injection Vol.	2 µL
Interface and MS Conditions (LCMS-9030)	
Interface	Heated ESI
Interface Temp.	300 °C
DL Temp.	250 °C
Heat Block Temp.	400 °C
Nebulizing Gas	3 L/min
Heating Gas Flow	10 L/min
Drying Gas Flow	10 L/min
MS & DDA Mode	MS: m/z 250 - 800 (Positive) DDA: m/z 100 - 800 with CE 35V (±) 17V Loop time: 0.2 sec

#### Data-Dependent Acquisition (DDA)

Data-Dependent Acquisition (DDA) 모드는 18V - 52V 범위의 spread CE로 MS/MS 데이터를 수집하였다. MS/MS 데이터 수집은 사전 설정된 감도 임계값 (10,000)과 이전 실험의 MS 데이터로 생성된 전구체 목록 (639개 이온)을 기반으로 설정하였다. 스펙트럼 품질을 위해 더 높은 감도 수준에서 MS/MS 데이터를 얻을 수 있도록 DDA에 3초의 지연 시간을 적용하였다. 위의 DDA 설정은 최적화 테스트를 기반으로 하였다. DDA 모드는 감도, 데이터 수집 속도, 노이즈 간섭, LC 분리 등과 같은 다양한 요인으로 인해 중요한 전구체를 놓칠 수 있다. 한 가지 효과적인 방법은 선호하는 전구체 이온을 특정 머무름 시간 범위로 설정하는 것인데, 이는 DDA 적용 범위를 크게 향상시킬 수 있다 (Ref1).

■ 결과 및 토의

Insight Explore를 이용한 데이터 분석 워크플로우

인동덩굴 꽃 추출물 샘플의 LC-MS TIC 및 DDA 크로마토그램은 그림 1에 나타내었다. 데이터 분석은 LabSolutions Insight Explore를 사용하여 처리하였다. 이 소프트웨어에는 스크리닝, 정성 및 구조 해석의 심층적인 데이터 분석을 위한 여러 기능이 있다. 일반적인 워크플로우(그림 2)는 다음과 같다.

- 1) DDA 데이터 파일을 **Analyze** 창으로 전송한다. 모든 DDA 스펙트럼을 가져오려면 MS와 MS/MS를 모두 선택한다.
- 2) **Analyze**를 적용하면 각 DDA 스펙트럼 포함한 모든 전구체 이온이 나열된다.
- 3) **Screen**을 적용하면(모든 대상 성분 포함), 일치하는 성분이 나열된다.
- 4) 모든 전구체는 **Precursor Pane**에 표시되며, 사용자는 모든 전구체의 XIC (RT), DDA 스펙트럼을 볼 수 있다.
- 5) 관심있는 전구체의 DDA 스펙트럼을 선택하고 **Library Search**로 보낸다.
- 6) 데이터베이스(ChemSpider 또는 PubChem) 검색 및 조각 이온의 피크 주석을 위해 DDA 스펙트럼을 **Assign**으로 보낼 수 있다.

표적 화합물을 위한 "Screen" 기능

위의 Step 3)의 **Screen**은 표적 스크리닝을 위한 기능이다. 다양한 인동덩굴 꽃 종에서 147종의 화합물이 분리된 것으로 문헌에 보고되었다<sup>[3]</sup>. 현재 방법으로 설정한 질량 범위 m/z 250-800에서 147개 화합물 중 85개(이성질체 포함) 화합물을 엑셀로 정리하여 **Screen**을 통해 직접 검색할 수 있다(Ref2). **Screen** 검색 기준은 질량 정확도이며, <3 ppm으로 설정하였다.

그림 3a에 나타난 바와 같이, 인동덩굴 꽃 추출물 샘플에서는 각각 DDA 스펙트럼을 갖는 총 1209개의 전구체가 검출되었다. 85개의 대상 성분에 대해 **Screen**을 적용한 결과 250개가 확인되어 나열된다. 선택한 전구체인 chlorogenic acid (m/z 355.1028, 7.98분)은 빨간색 사각형으로 표시되며, DDA 스펙트럼과 XIC 피크는 **Precursor Pane** 창 하단에 표시된다(그림 3b 및 3c). DDA 스펙트럼을 NIST Library Search로 전송하고, 결과는 chlorogenic acid (3-O-caffeoylquinic acid) 와도 일치했다. 그러나 XIC를 전체 용리 시간으로 확인해보면(그림 3d), 각각 5.29분과 9.69분에 두 개의 추가 피크가 나타났다. 이 피크의 DDA 스펙트럼은 7.98분의 스펙트럼과 거의 동일하며 이는 이성질체임을 나타낸다. Lian-Wen Qi이 보고한 바와 같이<sup>[1]</sup>, caffeoylquinic acid (phenolic acid group)의 3가지 이성질체는 **Flos Looniceræ Japonicæ** 샘플에 다른 머무름 시간으로 존재한다. 머무름 정보를 참고하여 세 가지 전구체 이성질체에 해당하는 세 개의 피크는 다음과 같다. (a) 5.29분의 5-O-caffeoylquinic acid (neochlorogenic acid, CAS# 906-33-2), (b) 7.98분의 3-O-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid, CAS# 327-97-9) (c) 9.69분의 4-O-caffeoylquinic acid (CAS# 905-99-7) (Ref 3).

Quercetin(C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>O<sub>7</sub>)은 플라보노이드에 속하는 인동덩굴 꽃의 또 다른 표적성분이다<sup>[1]</sup>. **Screen** 검색으로 2개의 주요 피크를 확인하였고, 13.2분과 13.9분의 전구체 m/z 303.0503 이다(그림 4). 그러나, 실제 전구체는 13.2분에서 m/z 611.1617, 13.9분에서 m/z 465.1033 인 것으로 밝혀졌기 때문에 둘 다 Quercetin이 아니다.

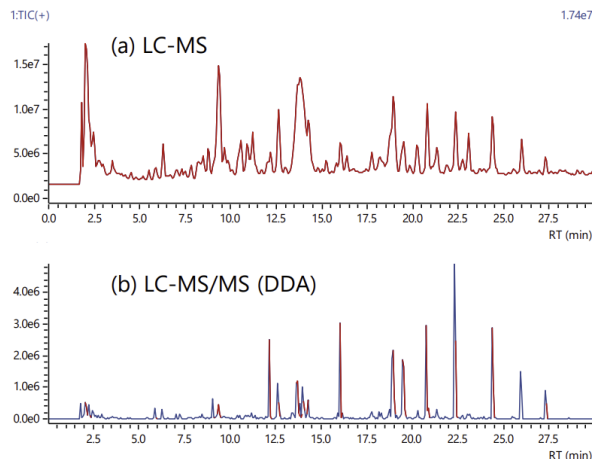


그림 1. 인동덩굴 꽃 추출물의 LC-MS 크로마토그램 (MS, DDA)

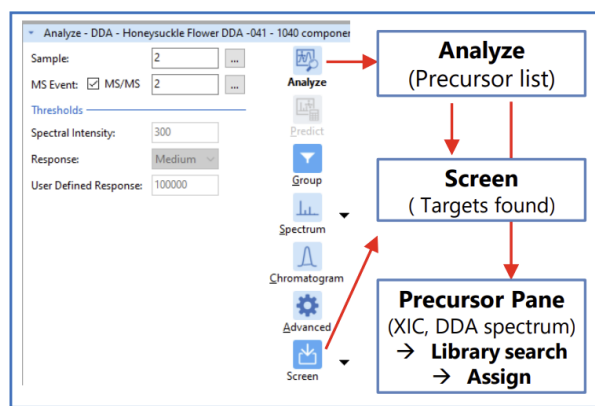


그림 2. LabSolutions Insight Explorer 소프트웨어의 DDA 데이터 분석을 위한 일반적인 워크플로우

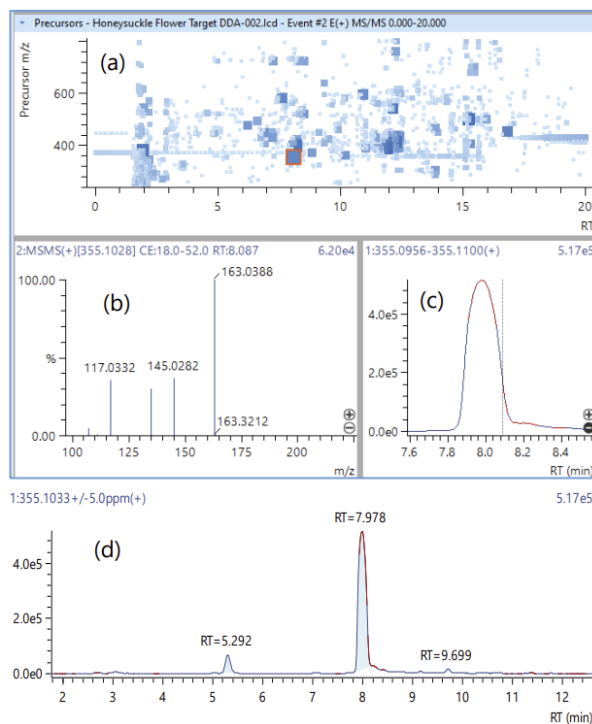


그림 3. (a) Precursor Pane에 표시된 1209개의 전구체 (b) m/z 355.1028의 DDA 스펙트럼 (c) 7.96분의 XIC 피크 (d) 전체 범위에서 서로 다른 RT의 XIC - 3개의 구조 이성질체 피크

표 2. LCMS-9030의 Screen 및 NIST Library Search를 통한 인동덩굴 꽃 추출물에서 발견된 화합물 요약

S/N	Target (Screen)		Found Compound					
	Name of Target	Formula	RT (min), (observed)	Precursor m/z (+) (observed)	Fragments of precursor m/z (+) - DDA			Error (ppm)
1	Adenosine	C10H13N5O4	2.65	268.1044	136.06	119.03	182.08	1.53
2	Guanosine	C10H13N5O5	2.86	284.0991	152.06	135.03	110.03	0.63
3	Luteolin	C15H10O6	14.60	287.0551	153.02	229.05	121.03	0.14
4	Spiraeoside	C21H20O12	7.90	303.0504	257.05	229.05	153.02	0.33
5	Quercetin	C15H10O7	14.92	303.0501	229.05	153.02	137.02	-0.53
6	5-O-caffeoylquinic acid (Isochlorogenic acid or Cis-Chlorogenic acid)	C16H18O9	5.28	355.1024	163.04	135.04	117.24	0.17
7	3-O-caffeoylquinic acid (Chlorogenic acid)	C16H18O9	7.96	355.1028	163.04	145.03	117.03	1.13
8	4-O-caffeoylquinic acid (Neochlorogenic acid)	C16H18O9	9.72	355.1025	163.04	135.04	117.03	0.34
9	Sweroside	C16H22O9	10.15	359.1341	197.08	179.07	127.04	1.31
10	3-Ferulicoylquinic	C17H20O9	11.61	369.1181	177.05	145.03	117.03	0.33
11	Syringin	C17H24O9	11.05	373.1494	141.05	211.09	179.07	0.24
12	Secologanin*	C17H24O10	10.96	389.1446	195.06	177.05	151.04	0.85
13	7-Epi vogeloside (Epi-vogeloside)*	C17H24O10	11.66	389.1447	195.06	177.05	151.04	1.21
14	Ketologanin*	C17H24O10	11.94	389.1450	195.06	177.05	151.04	1.95
15	Vogeloside*	C17H24O10	12.26	389.1448	195.06	177.05	151.04	1.54
16	Loganin	C17H26O10	11.11	391.1592	179.07	193.09	167.07	-1.79
17	Kingiside	C17H24O11	6.86	405.1394	151.04	211.06	125.03	0.62
18	Secoxyloganin	C17H24O11	8.59	405.1391	211.06	193.04	125.03	-0.07
19	Astragalin	C21H20O11	13.85	449.1086	287.06	153.02		1.65
20	Kaempferol 3-O-β-d-glucopyranoside	C21H20O11	15.38	449.1084	287.06	153.02		1.16
21	Chrysoeriol 7-O-β-d-glucopyranoside	C22H22O11	16.15	463.1242	301.07	286.05	258.06	1.51
22	Quercetin 3-O-β-d-glucopyranoside	C21H20O12	7.89	465.103	303.05	257.05	229.05	0.45
23	Hyperoside (Hyperin)	C21H20O12	13.22	465.1026	303.05	229.05	153.02	-0.32
24	Isoquercitrin	C21H20O12	13.95	465.1033	303.05	229.05		1.23
25	Isorhamnetin 3-O-β-d-glucopyranoside	C22H22O12	15.68	479.1188	317.07	302.04	153.02	0.88
26	3,5-O-dicaffeoylquinic acid (Isochlorogenic acid A)*	C25H24O12	14.55	517.1348	319.08	163.03	145.03	1.35
27	4,5-O-dicaffeoylquinic acid (Isochlorogenic acid C)*	C25H24O12	15.19	517.1348	319.08	163.03	145.03	1.53
28	3,4-O-dicaffeoylquinic acid (Isochlorogenic acid B)*	C25H24O12	15.53	517.1347	319.08	163.03	145.03	1.31
29	1,3-O-dicaffeoylquinic acid*	C25H24O12	15.88	517.1345	163.03	145.03	135.04	0.93
30	Rhoifolin	C27H30O14	15.28	579.1720	271.06			1.97
31	Lonicerin, Kaempferol 3-O-β-d-rutinoside	C27H30O15	13.27	595.1666	449.11	287.06		1.34
32	Chrysoeriol-7-O-neohesperidoside	C28H32O15	15.71	609.1821	301.07	286.05		1.21
33	Rutin	C27H30O16	13.22	611.1617	303.05			1.64

\* DDA MS/MS 스펙트럼은 라이브러리 검색으로 이성질체를 구별할 수 없다.

m/z 303.0503은 glycoside의 중성 손실 이온이다. Library search (NIST)에서는 13.22분은 rutin (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>)이고, 13.9분은 hyperoside (hyperin, C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>)일 가능성이 있다고 제안하였다. 14.9분의 매우 작은 피크는 quercetin (m/z 303.0501)에 의한 것일 수 있다. 구조적 유사성 (glycoside)으로 인해 rutin과 hyperoside는 ESI 이온화 단계에서 쉽게 중성 손실(neutral loss, NL)을 겪어 m/z 303.0503의 공통 이온을 형성한다(그림 5).

위의 Screen 기능은 표적 스크리닝에 대한 빠른 접근 방식을 제공한다. 표 2는 인동덩굴 꽃 샘플의 정성 결과를 요약한 것이다. 이러한 결과는 기본적으로 NIST HR 라이브러리 결과와 일치한다. 그러나, Library search로는 이성질체를 구별할 수 없다. 예를 들어, XIC m/z 287.0552의 경우 각각 13.77, 13.90, 14.61, 15.38분에 4개의 피크가 나타났으며, 해당 DDA 스펙트럼은 대부분 정성되었다.

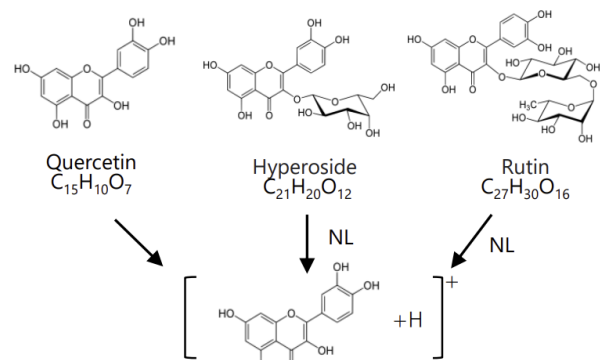


그림 5. 인동덩굴 꽃 추출물에서 발견되는 플라보노이드의 구조. Glycoside는 ESI 동안 중성 손실(NL)을 겪어 [M-NL+H]<sup>+</sup> 형태로 m/z 303.0503을 형성하는 경향이 있다.

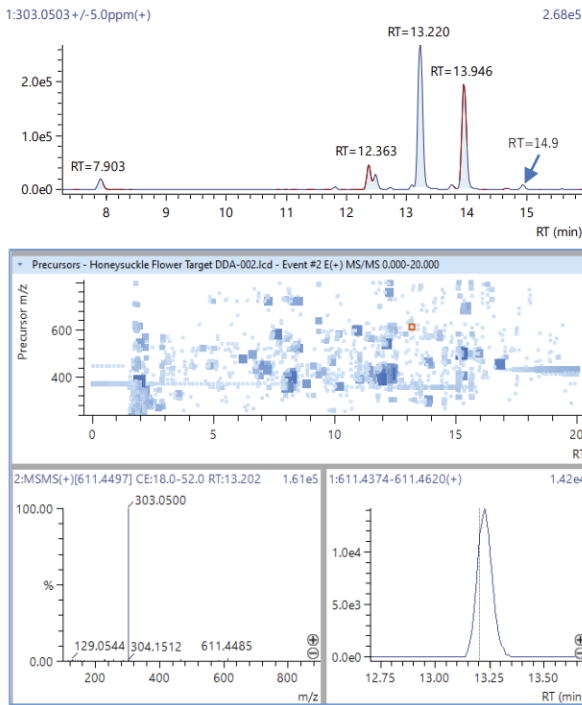


그림 4. m/z 303.0503의 XIC (상단); 13.2분의 DDA 스펙트럼을 보여주는 Precursor 화면(하단).

그러나, Library search는 luteolin (CAS# 491-70-3), kaempferol (CAS# 520-18-3) 및 datiscetin (CAS# 480-15-9) 등 중에서 이러한 이성질체(C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>)를 구별할 수 없어서 추가 정성 연구 필요하다.

### 미지물질의 정성

Screen과 Library search 기능을 사용한 표적 스크리닝 외에도 아직 정성되지 않은 전구체가 많이 남아 있다. Insight Explore의 Assign 프로그램은 화학식 예측, 데이터베이스 검색 및 조각 피크 주석을 통해 알려지지 않은 전구체를 정성 할 수 있는 기능을 제공한다. 여기에서는 이 과정을 보여 주는 두 가지 대표적인 예를 설명한다.

그림 6은 8.18분의 미지물질 전구체 m/z 397.1111을 나타내었다. DDA 스펙트럼의 Library search (NIST) 결과에서 ketologanic acid (C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>, CAS# 170382-11-3) 또는 swertiamarin (C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>, CAS# 7388-39-5)일 가능성이 높다고 제안한다.

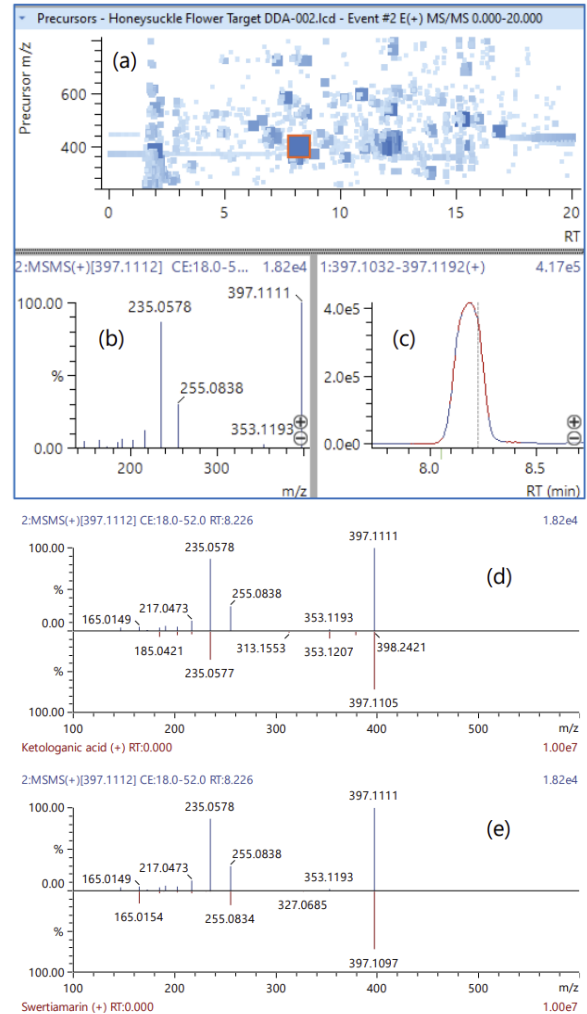
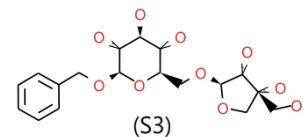
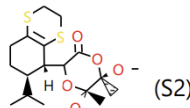
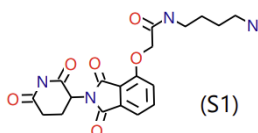


그림 6. (a) 미지물질 전구체 m/z 397.1111 (8.18분)의 Precursor 화면, (b) DDA 스펙트럼, (c) XIC, (d&e) NIST Library search로 매칭된 결과

전구체 m/z 397.1111은 Formula Predictor로 전송되고, 가장 유력한 후보 역시 C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>10</sub>이다. 그러나 ChemSpider database를 사용한 Assign 기능으로는 합리적인 결과가 나타나지 않았다. 또 다른 예는 15.26분의 전구체 m/z 403.1605이며, 이는 [M+H]<sup>+</sup> 형태인 것으로 확인되었다. 그러나, DDA 스펙트럼의 Library search에서는 일치하는 결과가 없었다. Formula Predictor는 표 3에 나타난 것처럼 가장 가능성이 높은 후보 3개를 생성했다.

표 3. 15.26분의 미지물질 전구체 m/z 403.1605에 대한 후보 화합물

#	Meas. m/z	Formula Predictor				Assign	
		Formula (M)	Ion	Diff. (ppm)	DBE	Candidate	Structure
1	403.1605	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	-1.8	11	N-(4-Aminobutyl)-2-[[2-(2,6-dioxo-3-piperidinyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-isoindol-4-yl]oxy]acetamide	S1
2	403.1605	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	-0.6	5	(5R,6R)-3-[(5S,6R)-6-Isopropyl-2,3,5,6,7,8-hexahydro-1,4-benzodithiin-5-yl]-5,6-dimethoxy-5,6-dimethyl-1,4-dioxan-2-one	S2
3	403.1605	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>10</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	1.5	6	Icariside F2	S3



DDA 스펙트럼을 각 화학식과 함께 Assign으로 보내면, ChemSpider 데이터베이스로부터 일치하는 여러 구조가 나타난다. 각 화학식에 대한 구조 중 하나만 표 3에 나열하였다 (S1, S2, S3). 그림 7은 ChemSpider 데이터베이스 검색에서 얻은 구조 S3에 대한 조각 스펙트럼 주석을 보여주는 Assign 화면이다. 결과는 결론이 아니라 가능한 구조의 참고 자료로 고려해야 한다. 따라서 결론을 도출하기 위해서는 추가적인 구조 규명 연구가 필요하다.

### ■ 결론

이 연구에서는 LabSolutions Insight Explore 소프트웨어를 이용하여 LCMS-9030의 천연물 추출물(인동덩굴 꽃) 분석에 DDA법을 사용하였다. 중요한 모든 전구체의 DDA 스펙트럼을 얻기 위해 최적화된 DDA 파라미터를 설정하였다. Insight Explore 소프트웨어는 표적 및 비표적 스크리닝, 미지물질 정성 등을 위한 Analyze, Screen, Precursor, Library Search, Formula, Assign을 포함한 매우 유연하고 효과적인 기능을 제공한다. 이 종합적인 소프트웨어를 사용하면 사용자는 복잡한 DDA 데이터에 대한 표적 스크리닝을 쉽게 수행할 수 있다. HRMS Library search를 통해 추가로 정성 할 수 있다. 이 접근 방식은 빠르고 쉬우며 매우 효율적이다. 그러나 이성질체와 중성 손실(glycoside)의 존재로 인해 위의 정성이 혼동되거나 잘못된 결과를 초래할 수 있다. 따라서 모든 화합물에 대해 데이터를 주의 깊게 확인하는 것이 필요하다. Insight Explore에서는 Formula predictor와 Assign 기능을 사용하여 미지물질에 대한 정성도 가능하다. 이러한 기능을 최대한 활용하면 결론을 도출할 수 없더라도 미지물질의 확인 및 구조 규명을 용이하게 한다.

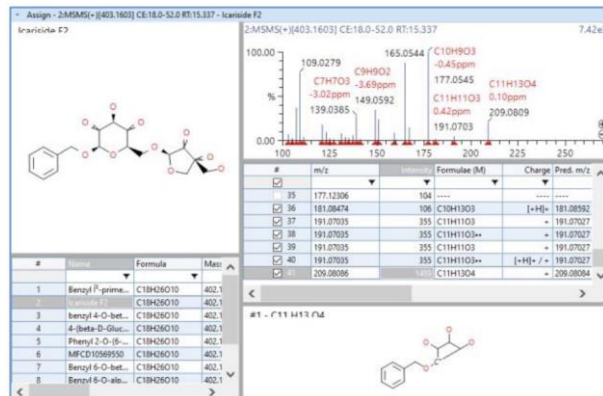


그림 7. ChemSpider 데이터베이스 검색에서 얻은 구조(Icariside F2)의 조각 스펙트럼 주석을 위한 Assign 프로그램

### ■ 참고문헌

1. Lian-wen Qi, Chun-Yun Chen, Ping Li, Rapid Commun. Mass. Spectrom., 2009; 23: 3227-3242.
2. Jiangbo Hao, Zhisheng Wu, Weidong Li, Zhongshuang Zhang, Jinrui Gu, J. Tradit. Chin. Med., 2022, 5: 199-202.
3. Xiaofei Shang, Hu Pan, Maoxing Li, Xiaolou Miao, Hong Ding, J. Ethnopharmacol. 2011, 138, 1-21.

