

Application News

No. 01-00679-K

High Performance Liquid Chromatograph Mass Spectrometer LCMS-8060NX

Shim-pack™ Mix-HILIC을 이용한 친수성 대사체 분석

Comprehensive Analysis of Hydrophilic Metabolites Using Shim-pack™ Mix-HILIC

Yutaka Umakoshi

사용자 활용 포인트

- ◆ Shim-pack Mix-HILIC은 친수성 대사물질에 대한 종합적인 분석을 제공한다.
- ◆ 대장균, 혈장 등 생물학적 시료에 적용 가능하다.

■ 서론

대사체학(Metabolomics)은 살아있는 유기체의 대사물질을 종합적으로 분석하는 기술이다. 대사물질은 다양한 물리화학적 성질을 갖고 있어 단일 방법으로 분석하는 것은 어렵다. 고정상에 C18 및 PFPP(Pentafluorophenylpropyl) 그룹이 있는 역상 컬럼과 HILIC 컬럼은 LC/MS에서 대사물질을 측정하는 데 자주 사용된다. 그러나 생체 분석에 중요한 아미노산, 핵염기, 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드, 조효소, 유기산을 동시에 분석하는 것은 어렵다. 이온쌍 시약은 C18 컬럼에서 극성이 높은 화합물을 유지하고 분리하는 데 사용할 수 있다. 그러나 양이온과 음이온의 동시 분석은 원칙적으로 어려우며, 이온쌍 시약의 농도가 높을 경우 장비 오염이 발생할 수 있다.

이 뉴스레터는 Shim-pack Mix-HILIC 컬럼을 통한 친수성 대사물질의 종합적인 분석을 소개한다. 이 컬럼을 사용하면 아미노산, 핵염기, 뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드, 조효소, 유기산 등 49개 성분을 분석할 수 있다(그림 1). *Escherichia coli* (*E. coli*) 및 사람의 혈장 분석의 예를 나타냈다.

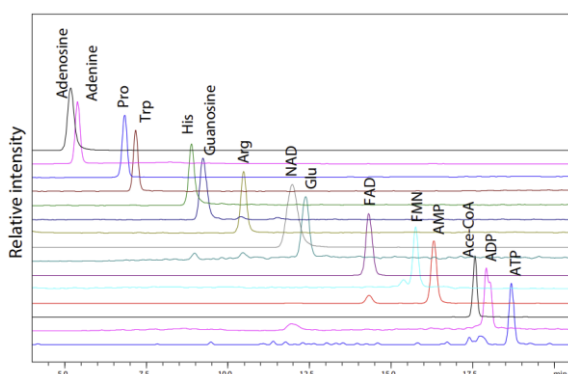


그림 1. MRM 크로마토그램
(표준 용액, 일부 대사물질 추출, 각 피크에 대한 배율 변경)

■ Shim-pack Mix-HILIC

Shim-pack Mix-HILIC은 표면이 1차, 2차, 3차 아민과 4차 암모늄기로 변경된 폴리메타크릴레이트 폴리머 기반의 컬럼이다. 컬럼은 고도로 가교된 폴리머 입자에 아민 및 암모늄 그룹을 도입하여 특징적인 친수성 및 이온 상호 작용을 나타낸다. 압력 상한은 35 MPa이며, 사용 가능한 pH 범위는 2-13으로, 염기성 이하의 이동상 조건에서도 컬럼을 사용할 수 있다.

■ 분석 조건

사용된 기기는 Nexera™ X3 및 LCMS-8060NX 이며, 분석 조건을 표 1에 나타내었다. 이동상 A는 초순수 1L에 중탄산암모늄 3162 mg과 28% 암모니아 용액 10mL를 첨가하여 조제하였다. 아래의 용리 조건에서 친수성 상호작용이 지배적인 분리 모드와 음이온 교환이 지배적인 분리 모드가 순차적으로 작용한다. 두 가지 유형의 연속 분리 모드를 통해 다양한 물리화학적 특성을 지닌 화합물을 분석할 수 있다.

표 1. 분석 조건

[HPLC] Nexera X3

Column	: Shim-pack Mix-HILIC (150 mm × 2.1 mm I.D., 5 µm) P/N: 227-32751-01
Oven Temp.	: 40 °C
Mobile Phase A	: Water + 40 mmol/L ammonium bicarbonate (pH 9.7)
Mobile phase B	: Acetonitrile
Rinse	: Methanol
Gradient	: B conc. 95% (0-0.5 min) → 40% (15.5 min) → 0% (16.5-26.5 min) → 95% (27.5-35 min)
Flow Rate	: 0.4 mL/min
Injection Vol.	: 5 µL

[MS] LCMS-8060NX

Ionization	: ESI (IonFocus™)
Mode	: MRM
Nebulizing gas flow	: 2.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL temp.	: 250 °C
BH temp.	: 400 °C
Interface temp.	: 300 °C
CID Gas Pressure	: 270 kPa

분석 수행 시 주의사항

LC 유형에 따라 사용 가능한 pH 범위는 9.7 미만일 수 있다. 분석하기 전에 기기의 사용 가능한 pH 범위를 확인한다. 분석이 끝나면 염 침전을 방지하기 위해 컬럼의 용매를 용매 B 80%로 교체한다. 장기간 보관할 경우에는 사용 설명서를 따르며, 저장 용매(아세트오닐트릴/(물 + 40 mmol/L 중탄산암모늄 + 6 mmol/L 포름산) = 40/60(v/v))로 교체한다. 컬럼을 제거한 후 용매 A를 초순수로 교체하고 시스템 전체를 세척한다.

■ 시료 및 전처리 방법

액체 LB 배지에서 자란 *E. coli* 를 OD₆₀₀이 1이 되도록 희석하여 2 mL를 분석에 사용하였다. 원심분리 (3000 g, 4°C, 5 분)를 통해 배양 상층액을 제거하였다. PBS 1 mL로 2회 세척하고, PBS를 제거한 후 다음과 같은 전처리를 수행하였다.

• <i>E. coli</i>	
• Methanol	1000 µL
• Chloroform	400 µL
↓ Vortex 30 sec, Sonication 5 min	
↓ Centrifugation (13000 rpm, 4 °C, 5 min)	
• Supernatant	700 µL
• Chloroform	300 µL
• Ultrapure water	400 µL
↓ Vortex 30 sec	
↓ Centrifugation (13000 rpm, 4 °C, 5 min)	
↓ Centrifugal concentration of 500 µL of supernatant	
↓ Redissolved in 50 µL of water/methanol (1/1)	
LC/MS analysis	

사람의 혈장은 (주)고진바이오에서 구입하여 다음과 같은 전처리를 하였다.

• Plasma	50 µL
• Methanol	550 µL
↓ Vortex 30 sec, Sonication 5 min	
↓ Centrifugation (13000 rpm, 4 °C, 5 min)	
• Supernatant	500 µL
• Chloroform	500 µL
• Ultrapure water	400 µL
↓ Vortex 30 sec	
↓ Centrifugation (13000 rpm, 4 °C, 5 min)	
↓ Centrifugal concentration of 500 µL of supernatant	
↓ Redissolved in 50 µL of water/methanol (1/1)	
LC/MS analysis	

■ 분석 성분

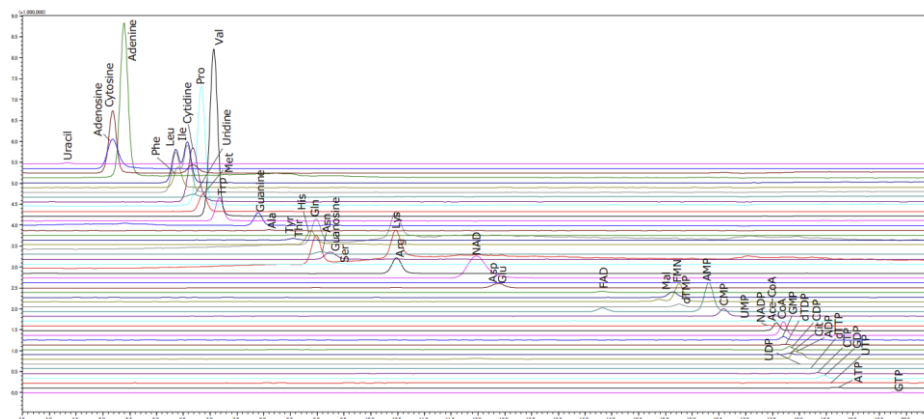
표 2는 분석 성분을 정리하였으며, *E. coli*와 혈장에서 검출된 대사물질을 표시하였다.

표 2. *E. coli* 및 혈장에서 검출된 분석 성분 및 대사물질

Abbreviation	Metabolite Name	Polarity	MRM	Retention time (min)	Collision Energy (V)	Classification	<i>E. coli</i>	Plasma
Ala	Alanine	+	90.1 > 44.1	8.1	-14	Amino acid	✓	✓
Arg	Arginine	+	174.9 > 70.2	10.5	-24	Amino acid	✓	✓
Asn	Asparagine	+	133.0 > 74.1	9.1	-17	Amino acid	✓	✓
Asp	Aspartic acid	+	134.0 > 74.0	12.2	-16	Amino acid	✓	✓
Gln	Glutamine	+	147.0 > 84.1	9	-19	Amino acid	✓	✓
Glu	Glutamic acid	+	147.8 > 84.1	12.4	-17	Amino acid	✓	✓
His	Histidine	+	155.9 > 110.1	8.9	-16	Amino acid	✓	✓
Ile	Isoleucine	+	132.1 > 86.2	6.6	-13	Amino acid	✓	✓
Leu	Leucine	+	131.9 > 86.2	6.4	-13	Amino acid	✓	✓
Lys	Lysine	+	146.9 > 84.2	10.5	-19	Amino acid	✓	✓
Met	Methionine	+	149.8 > 56.2	6.9	-18	Amino acid	✓	✓
Phe	Phenylalanine	+	166.1 > 120.1	6.4	-15	Amino acid	✓	✓
Pro	Proline	+	116.2 > 70.2	6.8	-17	Amino acid	✓	✓
Ser	Serine	+	105.8 > 60.2	9.4	-13	Amino acid	✓	✓
Thr	Threonine	+	120.2 > 74.2	8.6	-13	Amino acid	✓	✓
Trp	Tryptophan	+	205.2 > 188.1	7.2	-11	Amino acid	✓	✓
Tyr	Tyrosine	+	182.2 > 91.2	8.5	-29	Amino acid	✓	✓
Val	Valine	+	117.9 > 72.2	7.1	-13	Amino acid	✓	✓
Ace-CoA	Acetyl-Coenzyme A	+	810.1 > 303.2	17.6	-50	Coenzyme	✓	
CoA	Coenzyme A	+	768.0 > 261.1	17.7	-32	Coenzyme	✓	✓
FAD	Flavin adenine dinucleotide	-	784.0 > 437.1	14.3	28	Coenzyme	✓	✓
FMN	Flavin mononucleotide	+	456.9 > 439.1	15.8	-18	Coenzyme	✓	
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide	+	664.0 > 136.1	12	-52	Coenzyme	✓	
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	-	741.9 > 620.0	17.4	18	Coenzyme	✓	
Adenine	Adenine	+	136.2 > 119.0	5.4	-26	Nucleobase	✓	
Cytosine	Cytosine	+	111.9 > 95.1	5.2	-21	Nucleobase		✓
Guanine	Guanine	+	152.0 > 135.0	7.9	-22	Nucleobase	✓	
Uracil	Uracil	-	111.3 > 42.1	4.3	15	Nucleobase	✓	✓
Adenosine	Adenosine	+	268.0 > 136.0	5.2	-19	Nucleoside	✓	
Cytidine	Cytidine	+	243.8 > 112.1	6.7	-12	Nucleoside		
Guanosine	Guanosine	+	283.9 > 152.0	9.2	-15	Nucleoside	✓	
Uridine	Uridine	+	245.0 > 113.1	6.7	-11	Nucleoside		
AMP	Adenosine 5'-monophosphate	+	348.0 > 136.1	16.3	-21	Nucleotide	✓	✓
ADP	Adenosine 5'-diphosphate	+	428.0 > 136.1	17.9	-25	Nucleotide		
ATP	Adenosine 5'-triphosphate	+	508.0 > 410.0	18.7	-19	Nucleotide	✓	
CMP	Cytidine 5'-monophosphate	+	324.0 > 112.1	16.6	-14	Nucleotide	✓	
CDP	Cytidine 5'-diphosphate	+	404.0 > 112.1	17.8	-22	Nucleotide	✓	
CTP	Cytidine 5'-triphosphate	+	484.1 > 112.1	18.3	-24	Nucleotide	✓	
dTMP	Deoxythymidine 5'-monophosphate	+	322.8 > 81.0	15.8	-17	Nucleotide	✓	
dTDP	Deoxythymidine 5'-diphosphate	-	400.9 > 159.1	17.7	23	Nucleotide	✓	
dTTP	Deoxythymidine 5'-triphosphate	+	483.0 > 81.0	18.3	-38	Nucleotide		
GMP	Guanosine 5'-monophosphate	+	363.8 > 152.1	17.7	-17	Nucleotide	✓	
GDP	Guanosine 5'-diphosphate	+	444.0 > 152.0	18.4	-20	Nucleotide	✓	
GTP	Guanosine 5'-triphosphate	+	524.0 > 152.0	19.8	-31	Nucleotide	✓	
UMP	Uridine 5'-monophosphate	+	325.1 > 97.2	17	-17	Nucleotide		
UDP	Uridine 5'-diphosphate	+	405.0 > 97.2	18	-21	Nucleotide		
UTP	Uridine 5'-triphosphate	+	484.9 > 97.1	18.5	-28	Nucleotide		
Cit	Citric acid	-	191.2 > 111.0	17.8	11	Organic acid	✓	✓
Mal	Malic acid	-	133.2 > 115.0	15.6	15	Organic acid	✓	✓

머무름 시간은 시스템과 컬럼 로트에 따라 다르므로, 표준용액을 이용하여 확인한다.

■ 결과

그림 2. MRM 크로마토그램 (표준용액: 1 $\mu\text{mol/L}$)

표준물질 분석을 통해 얻은 크로마토그램은 그림 2에 나타내었다. 전하를 띠지 않거나, 양이온성, 양쪽성 이온 화합물인 아미노산, 핵염기, 뉴클레오시드는 수용성 용매 범위 최대 50% (0-12.8분)까지 용출되었다. 뉴클레오티드, 조효소, 유기산과 같은 음이온성 화합물은 수용성 용매 50% 이상(12.8분 후)에서 용출되었다.

이 뉴스레터에서는 예시로 *E. coli*와 혈장 시료를 분석하였다. 표 2에 나타난 바와 같이, 분석 성분 49개 중 44개가 *E. coli*에서, 25개가 혈장에서 검출되었다. 그림 3과 4는 각각의 MRM 크로마토그램을 나타내었다.

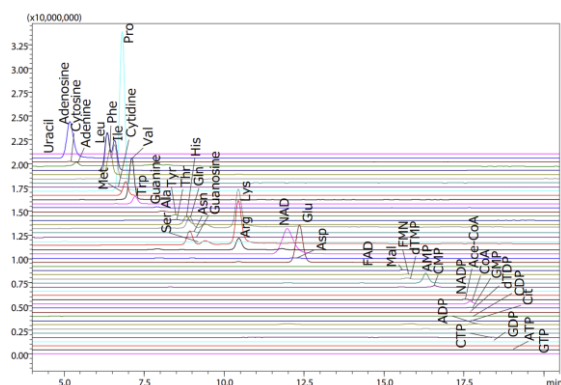
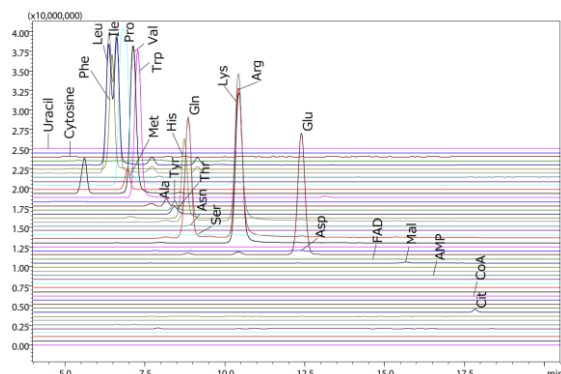
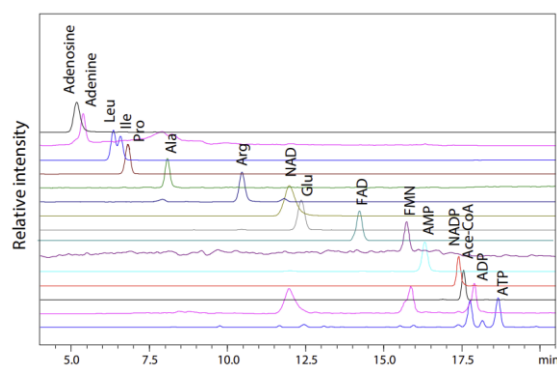
그림 3. MRM 크로마토그램 (*E. coli*)

그림 4. MRM 크로마토그램 (혈장)

*E. coli*에서 검출된 대사물질 중 일부를 그림 5에 나타내었다. 아미노산, 핵염기, 뉴클레오시드, 뉴클레오티드, 조효소 및 유기산을 포함하여 광범위한 화합물이 *E. coli*에서 검출되었다.

그림 5. MRM 크로마토그램
(*E. coli*, 일부 대사물질 추출, 각 피크의 배율 변경)

■ 결론

Shim-pack Mix-HILIC 컬럼은 아미노산, 핵염기, 뉴클레오시드, 뉴클레오티드, 조효소, 유기산 등 친수성 대사물질을 종합적으로 분석하는 데 사용할 수 있다. 해당 방법은 *E. coli*, 혈장 등 생물학적 시료에 적용할 수 있어 대사체 분석에 효과적인 도구가 될 것으로 기대된다.



SHIMADZU

Shimadzu Corporation
www.shimadzu.com/an/Shimadzu Scientific Korea
www.shimadzu.co.kr

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

This publication may contain references to products that are not available in your country. Please contact us to check the availability of these products in your country.

The content of this publication shall not be reproduced, altered or sold for any commercial purpose without the written approval of Shimadzu. See <http://www.shimadzu.com/about/trademarks/index.html> for details.

Third party trademarks and trade names may be used in this publication to refer to either the entities or their products/services, whether or not they are used with trademark symbol "TM" or "®".

Shimadzu disclaims any proprietary interest in trademarks and trade names other than its own.

The information contained herein is provided to you "as is" without warranty of any kind including without limitation warranties as to its accuracy or completeness. Shimadzu does not assume any responsibility or liability for any damage, whether direct or indirect, relating to the use of this publication. This publication is based upon the information available to Shimadzu on or before the date of publication, and subject to change without notice.

01-00679-K