

# Application News

No. 01-00757-K

High Performance Liquid Chromatograph Mass Spectrometer LCMS-9050

## LCMS-9050을 이용한 약물 대사체의 정성 분석

Qualitative Analysis of Drug Metabolites Using LCMS-9050

Yutaka Umakoshi

### 사용자 활용 포인트

- ◆ LCMS-9050 사중극자 비행시간 질량분석기(Q-TOF)와 LabSolutions Insight Explore™를 사용하여 약물 대사체의 정성 분석을 수행할 수 있다.
- ◆ LabSolutions Insight Explore의 Analyze 및 Target Screening 기능을 통해 후보 약물 대사체의 피크 추출이 가능하다.

### ■ 서론

약물이 체내에 섭취되면 산화, 환원, 가수분해, 결합 등의 다양한 반응을 통해 대사된다. 약물 대사체에 대한 예측은 대사체가 원래 약물의 효능 및 독성 면에서 다를 수 있기 때문에 중요하다.

이 뉴스레터에서는 LCMS-9050 사중극자 비행시간(Q-TOF) 질량분석기를 사용한 약물 대사체의 정성 분석 사례를 소개한다. 알려진 항암제인 렌바티닙(Lenvatinib)을 쥐에게 경구 투여한 후 간에서 대사체를 분석하였다. LabSolutions Insight Explore의 Analyze 기능을 사용하여 약물 대사체 피크를 추출하였으며, Target Screening 기능을 통해 약물 대사체 목록을 기반으로 후보 피크를 좁힌 후, MS 및 MS/MS 스펙트럼을 자세히 분석하였다.

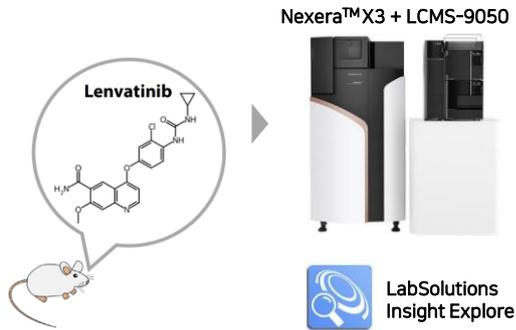


그림 1. 개요

### ■ 시료 전처리 방법 및 분석 조건

렌바티닙을 10 주 된 수컷 SD (Sprague Dawley) 쥐에게 5 일간 경구 투여 (4 mg/kg/day)한 후, 간을 적출하였다. 시료 전처리는 다음과 같이 수행하였다.

1. 약 60 mg 의 쥐의 간 무게를 측정하고, 메탄올을 추가하여 50 mg/mL 농도로 만든다.
2. 지르코니아 비드 3개 (3 mm)를 추가한 후 Bead Smash 12를 사용하여 분쇄한다 (냉각, 30초, 4,000 rpm).
3. 원심분리 (4°C, 5분, 13,000 rpm) 후 상층액 500 µL를 수집한다.
4. 원심 농축 후, 메탄올 50 µL으로 재용해 한다.

표 1에 분석 조건을 나타내었다. LCMS-9050을 사용해 측정을 진행하였고, 데이터는 Data Dependent Acquisition (DDA) 모드로 획득하였다. DDA 모드에서는 MS 측정에서 높은 감도를 가진 이온의 MS/MS 스펙트럼이 자동으로 얻어진다. 이 모드에서는 분자 조성 분석에 유용한 MS 스펙트럼과 구조 분석에 유용한 MS/MS 스펙트럼을 동시에 획득할 수 있다.

표 1. 분석 조건

[HPLC] Nexera X3	
Column	: Shim-pack Scepter™ C18-120 (100 mm x 2.1 mm I.D., 3 µm)*1
Column Temp.	: 40 °C
Solvent A	: Water + 0.1% Formic acid
Solvent B	: Acetonitrile + 0.1 % Formic acid
Rinse	: Acetonitrile + 0.1 % Formic acid
Gradient	: B conc. 5% (0 min) - 40% B (9.0 min) - 98% B (10.0-12.0 min) - 5% B (12.1-15.0 min)
Flow Rate	: 0.25 mL/min
Injection Volume	: 5 µL
[MS] LCMS-9050	
Ionization	: ESI positive
Nebulizing Gas	: 3.0 L/min
Drying Gas	: 10.0 L/min
Heating Gas	: 10.0 L/min
DL Temp.	: 250 °C
Heat Block Temp.	: 400 °C
Interface Temp.	: 300 °C
CID Gas Pressure	: 230 kPa
Mode	: DDA
MS Scan Range:	: m/z 50-1,000 (0.100 sec)
MS/MS Scan Range:	: m/z 50-1000 (0.100 sec x 10)
CE	: 35 ± 17 kV
DDA Threshold	: 3,000

\*1 P/N: 227-31014-05

### ■ 분석결과

그림 2는 대사체의 정성 분석을 위한 개요를 보여준다. 먼저, 렌바티닙에 의해 생성될 수 있는 대사체의 분자식 목록을 작성하였다. 이 분자식 목록은 이전 연구와 대사 반응 예측 소프트웨어를 사용하여 만들었다. 다음으로, LabSolutions Insight Explore의 Analyze 기능을 사용하여 피크 추출을 수행하였다. 그 후, Target Screening 기능을 통해 준비된 목록을 가져와 후보 피크를 좁혔다.

Name	Formula
Lenvatinib	C21H19ClN4O4
Demethylation	C20H17ClN4O4
Demethylation, Oxidation	C20H17ClN4O5
Hydrolysis	C17H14ClN3O3
Oxidation	C21H19ClN4O5
⋮	⋮

The screenshot shows the software interface with the 'Analyze' and 'Target Screening' tabs selected. The 'Analyze' tab displays a list of peaks with columns for RT, m/z, Response, Target Name, Target Formula, Target m/z, and Mass Error (mDa). The 'Target Screening' tab shows a list of peaks with columns for RT, m/z, and Target Name.

그림 2. 정성 분석의 개요

### ■ 검출된 화합물

위에서 설명한 개요에 따라 렌바티닙에서 유래한 것으로 보이는 여러 대사체들이 검출되었다. 검출된 화합물의 크로마토그램은 그림 3에 나타내었다. 렌바티닙(1) 외에도 탈메틸화(2), 가수분해(3), 탈아릴화(4), (5), (6), 산화(7) 반응에서 유래한 것으로 추정되는 화합물들이 검출되었다.

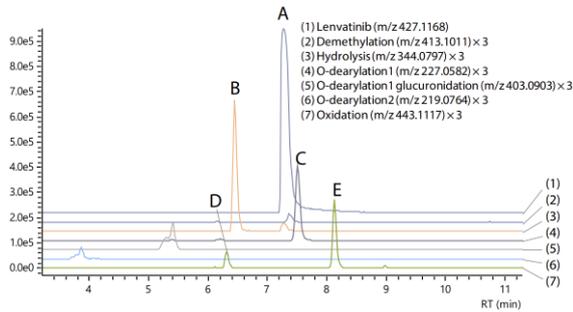


그림 3. 크로마토그램

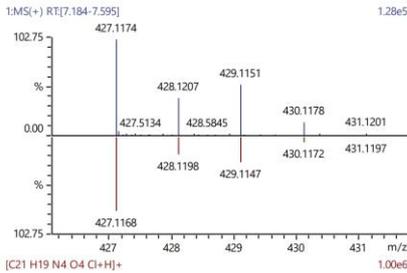
(렌바티닙을 제외한 모든 피크는 3배 확대하여 표시함)

렌바티닙의 피크 A와 더 높은 감도를 보이는 대사산물들의 피크 B-E에 대한 자세한 분석은 아래에 나타내었다.

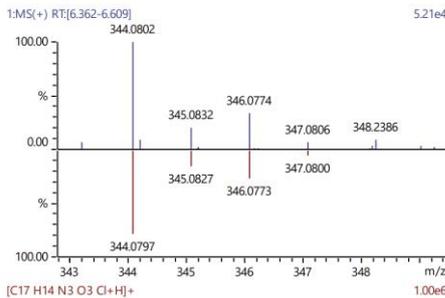
### ■ 측정된 MS 스펙트럼과 이론 MS 스펙트럼의 비교

그림 4는 측정된 MS 스펙트럼과 이론 MS 스펙트럼을 보여준다. <sup>35</sup>Cl과 <sup>37</sup>Cl의 동위 원소 비율은 약 3:1이었으며, 피크 A부터 E까지 모든 피크가 MS 스펙트럼에서 염소의 자연적인 동위 원소 비율을 반영하는 것이 확인되었다. 또한, 측정된 단일 동위 원소 질량과 이론적 단일 동위 원소 질량의 차이가 모두 1 mDa 이내임이 확인되었다.

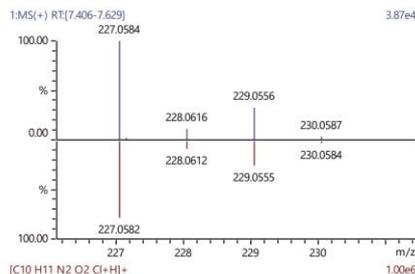
A: Lenvatinib (C21H19ClN4O4) Mass Error: 0.63 mDa



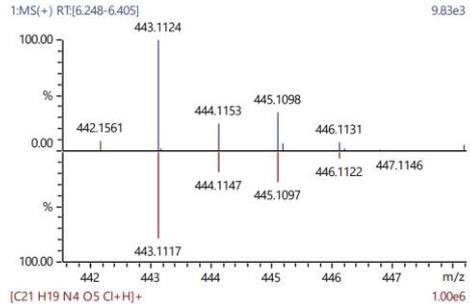
B: Hydrolysis (C17H14ClN3O3) Mass Error: 0.54 mDa



C: O-dearylation1 (C10H11ClN2O2) Mass Error: 0.24 mDa



D: Oxidation (C21H19ClN4O5) Mass Error: 0.72 mDa



E: Oxidation (C21H19ClN4O5) Mass Error: 0.72 mDa

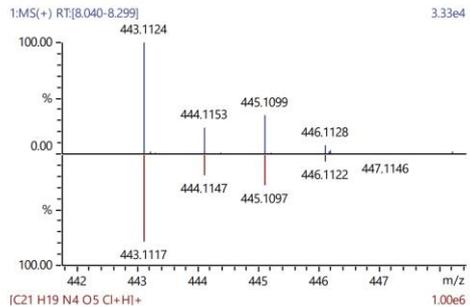


그림 4. MS 스펙트럼

(위: 측정된 MS 스펙트럼, 아래: 이론 MS 스펙트럼)

### ■ MS/MS 스펙트럼

그림 5에는 DDA 모드에서 획득한 MS/MS 스펙트럼을 나타내었다. LabSolutions Insight Explore의 Assign 기능을 사용하여 예측된 절단 위치를 표시하였다. 이전 뉴스레터에 Assign 기능에 대한 자세한 정보가 정리되어 있다.<sup>1),2)</sup>

A: Lenvatinib (C21H19ClN4O4)

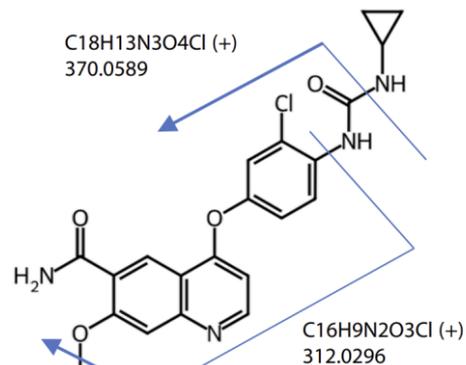
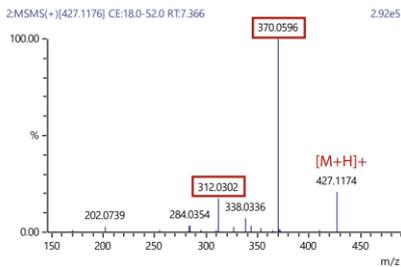
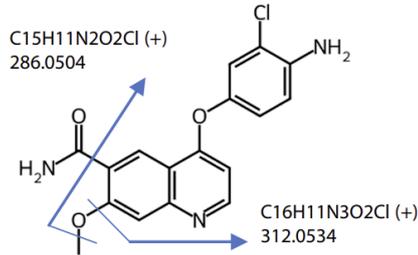
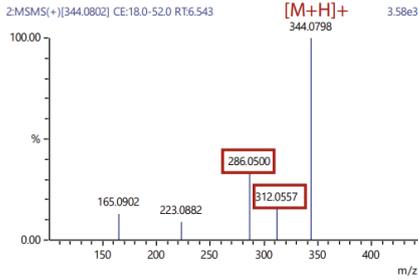
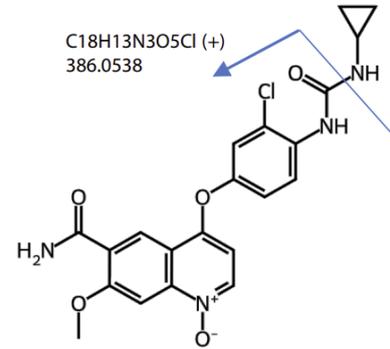
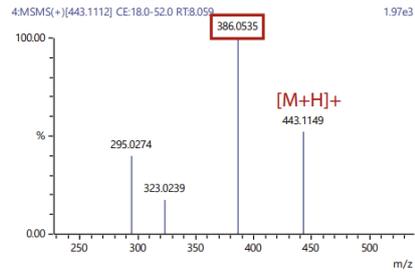


그림 5. MS/MS 스펙트럼 및 예상 절단 위치

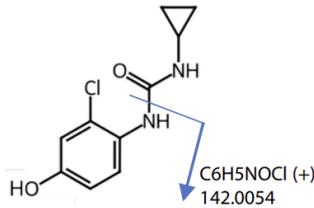
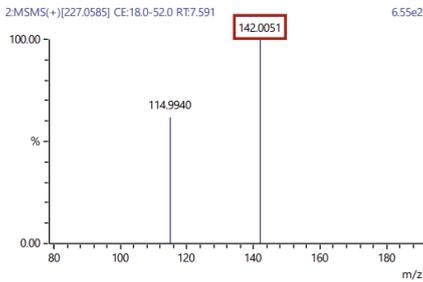
B: Hydrolysis (C17H14ClN3O3)



E: Oxidation (C21H19ClN4O5)



C: O-dearylation1 (C10H11ClN2O2)



D: Oxidation (C21H19ClN4O5)

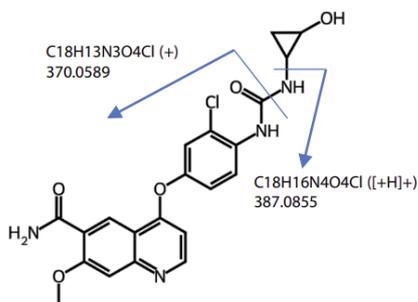
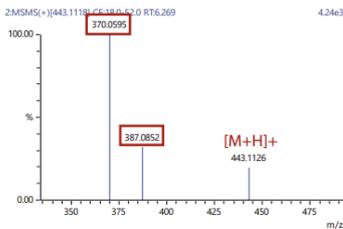


그림 5. MS/MS 스펙트럼 및 예상 절단 위치

피크 D와 E의 자세한 산화 위치는 MS/MS 스펙트럼으로부터 결정할 수 없었기 때문에, 추정된 구조가 제시되었다.

산화에 의해 생성된 두 가지 대사산물, 피크 D와 E가 검출되었다. 가장 높은 감도의 생성 이온, 피크 D는 C18H13N3O4Cl (+)로, 이는 렌바티닙과 일치하였다. 반면, 가장 높은 감도의 생성 이온, 피크 E는 C18H13N3O5Cl (+)로, 이는 렌바티닙과 달랐다. 따라서 피크 D와 E는 서로 다른 산화 위치를 가진 것으로 추정되었다.

■ 결론

렌바티닙에서 유래한 여러 대사산물이 LCMS-9050 사중극자 비행시간 질량분석기와 LabSolutions Insight Explore를 통해 검출되었다. 약물 대사산물 목록을 준비함으로써 후보 대사산물 피크를 쉽게 추출할 수 있었다. 이 분석 방법은 렌바티닙 외의 약물 대사산물 분석에도 적용할 수 있다.

<관련 응용자료>

1. Analysis of Impurities in Pharmaceuticals Using LCMS-9030 Quadrupole Time-of-Flight Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer 01-00017-EN
2. Screening Analysis of Metabolites in Red Wine 01-00329-EN