

## Accurate mass 및 isotope ratio 측정을 위한 GC-TOF 질량분석기에서의 화학적 이온화방법

정주희 · 나운철 · 황금숙 · 신정화 · 안윤경★

한국기초과학지원연구원 서울센터 분석연구부  
(2010. 12. 31. 접수, 2011. 1. 10. 승인)

### Development of chemical ionization method in a GC-TOF mass spectrometer for accurate mass and isotope ratio measurement

Joo Hee Chung, Yun-Cheol Na, Geum-Sook Hwang, Jeoung Hwa Shin and Yun Gyong Ahn★

Seoul Center, Korea Basic Science Institute, Seoul, 136-701, Korea

(Received December 31, 2010; Accepted January 10, 2011)

**요약:** 본 연구에서는 미지 대사물질 동정을 위해 GC-TOF/MS의 양이온 화학적 이온화 방법(positive chemical ionization, CI<sup>+</sup>)을 이용, 정확한 질량 값(accurate mass)과 동위원소 비(isotope ratio) 측정을 위한 최적 조건을 확립하였다. 분자이온 [M+H]<sup>+</sup> 세기를 증가시킬 수 있는 high mass tune 방법이 사용되었으며, 화합물들의 분리 및 감도에 따른 검출조건이 고려되어 졌다. 24종의 trimethylsilyl (TMS)기로 유도체화된 표준 대사물질들을 분석한 결과 [M+H]<sup>+</sup>의 경우 이론 값과의 절대평균오차는 6.8 ppm이었으며, 동위원소 비(M+1/M, M+2/M)의 경우는 각각 1.5%와 1.7%였다. 얻어진 질량 값과 동위원소 비를 원소조성 알고리즘에 적용한 결과 21개의 화합물의 구조식이 2순위 내에서 일치하였다.

**Abstract:** An accurate mass and isotope ratio were determined using a gas chromatography/time of flight mass spectrometer in CI positive mode for the identification of unknown metabolites. High mass tune was used to improve the ion intensity of [M+H]<sup>+</sup>. Chromatographic resolution and dynamic range enhancement were performed to obtain more reliable accurate masses and correct isotope abundance ratios. Average absolute errors of mass and isotope ratios for 24 reference metabolite -TMS (trimethylsilyl) derivatives were 6.8 ppm, 1.5% of (M+1/M ratio) and 1.7% of (M+2/M ratio), respectively. The correct formulas of twenty one compound were retrieved within top-2 hit from the heuristic algorithm for elemental composition using each accurate mass and isotope abundance ratio.

**Key words:** accurate mass, isotope ratio, GC-TOF/MS, positive CI, metabolites

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-920-0786 Fax : +82-(0)2-920-0708

E-mail : ygahn@kbsi.re.kr

www.kci.go.kr

## 1. 서 론

생체 내 존재하는 저분자 대사물질은 고감도와 선택성으로 기체크로마토그래피/질량분석기가 주로 사용되고 있으며, 대부분의 경우에는 전자충격이온화(Electron ionization; EI)방법을 통하여 화합물에 대한 정보를 얻는다.<sup>1</sup> 이는 표준화된 이온화 조건으로부터 NIST08<sup>2</sup>과 같은 질량스펙트럼의 데이터베이스의 활용이 쉬울 뿐만 아니라 GC 크로마토그램상의 머무름 정보(retention index; RI)를 추가하여 재현성 있게 많은 물질을 확인할 수 있기 때문이다. 그러나 대사체 연구 분야에 있어서 검출된 대사물질 중 2/3가량은 미지 물질로써, 조사된 연구결과에 따르면 애기 장대 잎 추출물로부터 검출된 326개의 대사체 중 164개의 화합물만이 동정이 되었으며<sup>3</sup> 비슷한 결과로써 아미노산 생성 미생물인 코리네박테리움 그루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)에서 추출된 대사물질은 330개 중 164개만을 확인 할 수 있었다.<sup>4</sup> 한 중앙 세포와 관련한 대사물질의 변화 연구에 있어서도 총 291개의 대사체 중 39.1%에 해당하는 114개 물질만을 확인할 수 있었다.<sup>5</sup> 따라서 전체적인 대사현상을 설명하기 위해서는 빠른 대사체의 프로파일링(profiling) 뿐 아니라 미지 대사물질에 대한 동정이 필수적으로 요구된다. 생체 시료 중 이러한 미지 대사물 동정의 어려움에는 (i) DB 라이브러리 상에 물질의 질량스펙트럼이 존재하지 않거나 (ii) 시료 중 방해물질로 인해 순수한 물질의 스펙트럼을 얻지 못하는 경우 (iii) 낮은 감도로 인해 중요한 질량 값을 얻지 못하거나 노이즈(noise)로 인한 스펙트럼의 일치성이 떨어지는 경우 등을 볼 수 있다. 또한 GC/MS 에서 휘발성과 감도를 높이기 위한 trimethylsilylation (TMS) 유도체화 과정은 널리 알려진 방법으로써 유도체화물 형태에 대한 고려도 필요하다.<sup>6,9</sup>

일반적으로 미지 물질의 확인을 위해서는 물질마다 고유의 질량 값과 동위원소 비를 가지고 있기 때문에 고 분해능 질량분석기를 통한 정확한 질량의 측정, 동위원소 비에 대한 정보가 분자구조식을 예측할 수 있는 중요한 단계가 된다. GC/MS에서 분자 이온을 확인하기 위한 방법으로는 연성 이온화법(Soft ionization)인 화학적 이온화 방법(Chemical ionization, CI)이 사용되고 있으며 CI의 경우 반응기체를 사용하여 양성자화 된 이온과 분자간의 화학적 반응을 통하여  $[M+H]^+$  생성, 분자이온을 확인할 수 있다.<sup>10-11</sup> 이 밖에 고전기장에 의한 전계 이온화 방법(Field ionization;

FI)이나 두개 또는 그 이상의 자외선(ultraviolet) 광자(photon) 흡수에 의해 기화된 물질을 이온화하는 광이온화(Photo ionization) 방법이 사용되기도 하며 오일 성분 분석에 주로 활용되어져 왔다.<sup>12-15</sup> 동위원소비의 측정은 accurate mass와 함께 예측 가능한 원소조성의 수를 다시 확인할 수 있도록 하여 준다. 실제 질량 오차(mass error)가 5 ppm (part per million)이내에서 측정된 분자량 500 Da (molecular mass)에서 예측 가능한 분자구조 수는 수백 개에 이르는 것으로 보고되고 있다.<sup>16</sup> 그러나, 동위원소비 오차로 범위를 5% 이내로 좁히면 90%의 가능한 원소조성 수를 줄일 수 있어 미지 물질의 원소조성 확인에 동위원소 비 측정이 활용되고 있다.<sup>17</sup> 최근에는 빠른 미지 화합물의 확인을 위하여 얻어진 결과 값으로부터 예측 가능한 원소조성수를 줄여 주는 소프트웨어나 알고리즘의 개발 연구가 활발하게 진행 중이다.<sup>18-20</sup>

본 연구의 목적은 미지 대사물질의 동정을 위한 첫 단계인 원소조성 예측을 위하여 accurate mass와 동위원소 비를 측정하기 위한 조건을 확립하는데 있으며, 이러한 조건으로부터 대표적인 대사물질 아미노산, 지방산, 유기산, 당류 표준물질의 TMS 유도체 화물 24종에 대해 적용하였다. 얻어진 질량 값과 동위원소 비를 통해 원소조성 알고리즘<sup>21</sup>에 동시에 적용한 결과 21개의 화합물의 구조식이 2순위 내에서 일치함을 짧은 시간 내 확인하였다. 따라서 앞으로 미지 물질에 대한 동정은 accurate mass 및 동위원소 비 측정과 이러한 알고리즘의 적용을 통해 보다 빨라질 것으로 본다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약 및 기구

모든 유기용매는 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)사의 특급 잔류농약 분석용 시약을 사용하였고, 표준 시약들(Alanine, Valine, Serine, Nicotinic acid, Succinic acid, 4-hydroxyproline, Salicylic acid, Aspartic acid, Methionine, alpha keto glutaric acid, Glutamic acid, Asparagine, Putrescine, Shikimic acid, Citric acid, Glucose, Lysine, Stearic acid, Arachidic acid, Serotonin, Adenosine, Cholesterol)과 알데히드와 케톤기를 보호하고 환원당의 고리구조 형성 억제를 위한 유도체화(methoximation) 과정<sup>22</sup>에 사용된 O-methylhydroxylamine hydrochloride는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 1 mg의 표준시약들은 1 mL의 메탄올/물/이소프

로판올(2:5:1 v,v)에 녹인 후 희석하여 사용하였다. 20 mg의 O-methylhydroxylamine hydrochloride은 0.5 mL의 피리딘(Sigma-Aldrich에서 구입; St. Louis, MO, USA)에 녹여 사용하였다(methoximation 용액). 표준용액은 완전히 건조시킨 후 10 µL의 methoximation 용액을 첨가하고 thermomixer (neoLab GmbH, Heidelberg, Germany)를 이용 30 °C에서 90분간 반응시켰다. 그 후 TMS (trimethylsilylation)유도체화 과정으로는 Pierce (Rockford, IL, USA)사의 1% trimethylchlorosilane을 포함한 N-methyl-N-trifluoroacetamide를 90 µL 넣고 37 °C에서 30분간 thermomixer를 이용 다시 반응시켰다. 반응이 끝난 용액은 2 mL의 갈색 바이알에 옮겨 분석을 수행하였다.

## 2.2. GC-TOF 질량분석기의 분석조건

분석에 사용된 기기는 Agilent 6890N 기체크로마토그래프(Palo Alto, CA, USA)와 Waters사의 Micromass TOF (time-of-flight) 질량분석기(Milford, MA, USA)가 연결되어 있는 장비를 사용하였다. 분리용 컬럼은 J&W Scientific사 (Palo Alto, CA, USA)제품의 DB-5MS 용융 실리카 모세관 컬럼을 사용하였으며, 분리를 위한 컬럼의 승온 속도 등은 Table 1에 자세히 기술하였다. 질량분석기의 경우 positive CI (PCI)모드를 사용하였으며, 분해능은 Perfluorotributylamine

(PFTBA)의 m/z 614에서 측정된 결과 7,000이상이었다. CI의 반응가스로는 메탄이 사용되었으며 이때 gas flow는 90%를 유지하였다. 소스의 안(inner)과 밖(outer)의 조건들은 Table 1에 간략히 기술 하였다. Tune은 두 가지 방식으로 수행되었으며 일반적인 tune의 방법은 PFTBA의 base peak인 m/z 69를 기준으로 나머지 이온의 감도를 높이는 outer 소스의 조건(beam steering, focus 1,2,3)을 선택하였으며, high mass tune의 경우는 PFTBA의 m/z 264와 502의 이온세기를 높일 수 있도록 outer 소스의 조건을 맞추었다.

Accurate 측정을 위한 calibration은 PFTBA를 이용 m/z 50 ~ 620사이의 영역에서 27개 이온으로 수행되어 졌으며 2차 다항식 회귀에 의한 평균 잔차값(RMS : mean residual value)이 0.0008 amu이하로써 전체적인 질량 값의 오차는 < 10 ppm 범위 내였다. 분석 중의 mass drift는 2,4,6-tris(trifluoromethyl)-1,3,5-Triazine (TTT, lock mass)의 m/z 286.0027[M+H]<sup>+</sup>에 의해 보정되었으며 이때 시간당 이온의 카운트 수(cps, counts per second)는 1,500에 맞추었다. 스펙트럼 데이터는 centroid 모드에 의해 얻어졌으며 스캔 속도는 5.5 spectra/sec에 맞추어 사용하였다. 분석은 DRE (Dynamic range enhancement) 모드에서 수행하였으며 사용되어진 소프트웨어는 MassLynx 4.1이었다.

Table 1. Conditions of GC-TOF/MS

Agilent 6890 N gas chromatograph	
Injection	Split (2:1), 1 µL
Injector Temp.	250 °C
Carrier gas	He, 1 mL/min
GC Column	DB-5MS : 5% phenylmethylpolysiloxane 30 m (length) × 0.25 mm (I.D.) × 0.25 µm (film thickness)
Temp. program	① 50 °C (1 min)-20 °C/min-330 °C (5 min) (run time; 20 min) ② 50 °C (1 min)-10 °C/min-170 °C (1 min)-5 °C/min-220 °C (1 min) -20 °C/min-330 °C (5 min) (run time; 35.5 min)
Waters Micromass GCT Premier time-of-flight (TOF) mass spectrometer	
Ionization mode	Chemical ionization positive mode (CI <sup>+</sup> )
Source Temp.	200 °C
Inner source	Electron energy (40 eV), Rhenium filament current (200 µA)
Outer source	Beam steering (0.3 AU), Focus 1 (75.0 AU), Focus 2 (14.0 AU), Focus 3 (35.0 AU)
MS CI gas	Methan (90% flow)
External calibration	Perfluorotributylamine (PFTBA) RMS (mean residual value) < 10 ppm
Internal reference	2,4,6-tris(trifluoromethyl)-1,3,5-triazine(TTT) lock mass m/z 286.0027
Reference reservoir	50 °C
Mass range	m/z 85 ~ 800
Resolution	> 7,000 (m/z 614)
Data acquisition	scan time; 0.15 sec, inter scan delay time; 0.03 sec

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. High mass tune의 적용

분자량을 알기위한 분자이온의 측정은 전자충격이온화 방법에 있어서 일반적으로 낮은 이온 세기를 얻게 된다. 따라서 연성이온화 방법인 화학적 이온화 방법의 사용이 일반적이다. 화학적 이온화에 사용되는 시약 가스로는 메탄, 암모니아, 이소부탄이 이용되고 있으며 본 연구에서는  $Cl^+$ 에서 메탄가스를 사용하였다. 이온원에서는 메탄가스로부터 주로  $CH_5^+$ 이온이 형성되고 시료 분자는  $CH_5^+$ 이온과의 반응으로  $[M+H]^+$  (protonated molecular ion)을 생성하게 된다. 그러나  $Cl^+$ 의 경우에도 이온세기를 최대화하기 위한 최소의 이온화 에너지가 필요하고, 탄소-탄소의 단일결합이 348 kJ/mol 혹은 3.6 eV의 에너지를 가진 것으로 볼 때 여전히 조각이온의 생성을 예상할 수 있다.<sup>23</sup> 또한 TMS로 유도체화 된 대사물질의 경우 메틸기가 떨어져 나간  $[M-15]^+$ 이온이 매우 쉽게 형성이 되기 때문에 가능한 한  $[M+H]^+$ 세기를 증가시킬 수 있는 조건이 필요하다. Fig. 1은

TMS로 유도체화 된 nicotinic acid를 high mass tune 방법 (a), 일반적인 tune 방법 (b)과 EI 모드 (c)에서 분석한 질량스펙트럼을 비교한 것이다. High mass tune 방법의 경우 outer 소스의 조건 중 beam steering과 focus lens를 높은 질량 영역의 이온들이 분석관으로 도달할 수 있도록 조건을 맞추어 줌으로써 질량스펙트럼 상에서 가장 큰  $[M+H]^+$ 의 이온세기를 얻을 수 있었으며, 더불어 메탄가스에 의한  $C_2H_5^+$ 와  $C_3H_5^+$ 이온이 첨가된  $[M+29]^+$ 와  $[M+41]^+$ 의 첨가이온(adduct ion)을 스펙트럼 상에서 동시에 확인함으로써 분자 질량에 대한 정보를 구체적으로 얻을 수 있었다. Fig. 1(b)의 경우 일반적인 tune을 사용했을 때의 질량스펙트럼으로써 첨가이온인  $[M+H]^+$ ,  $[M+C_2H_5]^+$ ,  $[M+C_3H_5]^+$ 이 보이지만 high mass tune인 Fig. 1(a)에서 보다 이온세기가 적었으며,  $[M-15]^+$ 이온이 base peak으로 나타나 EI의 질량 스펙트럼인 Fig. 1(c)와 유사함을 볼 수 있었다. 이 결과로부터  $Cl^+$  모드에서 high mass tune 방법을 사용하였을 때 일반적인 tune 방법에서 보다  $[M+H]^+$ 의 이온세기를 약 10배 정도 증가시킬 수 있었다.

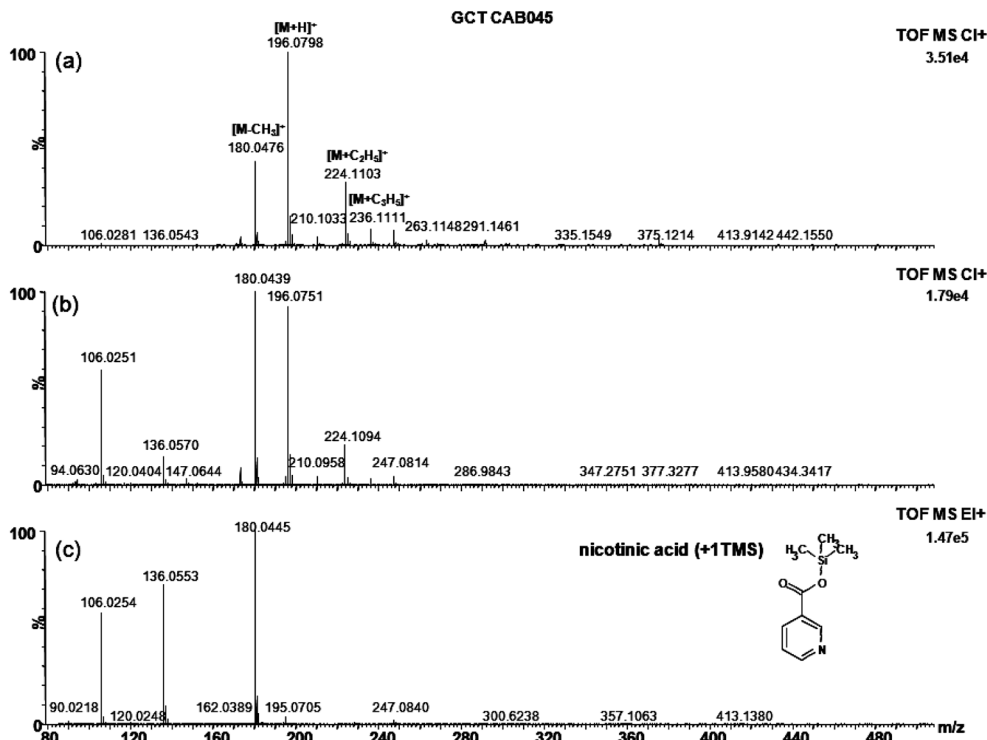


Fig. 1. Mass spectra of nicotinic acid-TMS derivative obtained by (a) high mass tune in CI mode, (b) normal tune in CI mode, and (c) electron ionization (EI)

3.2. GC-TOF 질량분석기의 조건

다량의 분석이 요구되는 대사체 분석의 경우 빠른 분석 시간이 요구되어 지며, 이에 따라 시료 내 화합물의 크로마토그램 상에서의 co-elution 현상은 흔히 일어날 수 있다. 하지만 미지 화합물의 accurate mass

와 동위원소 비 측정의 경우는 이로 인한 영향을 받기 때문에 GC 칼럼상의 분리조건이 고려되어야 한다. Fig. 2(a)는 빠른 분석을 위해 적용된 일반적인 GC 조건(runtime; 20분)<sup>24</sup>에서 4가지 화합물인 salicylic acid, asparatic acid, methionine, 4-hydroxyproline이 분

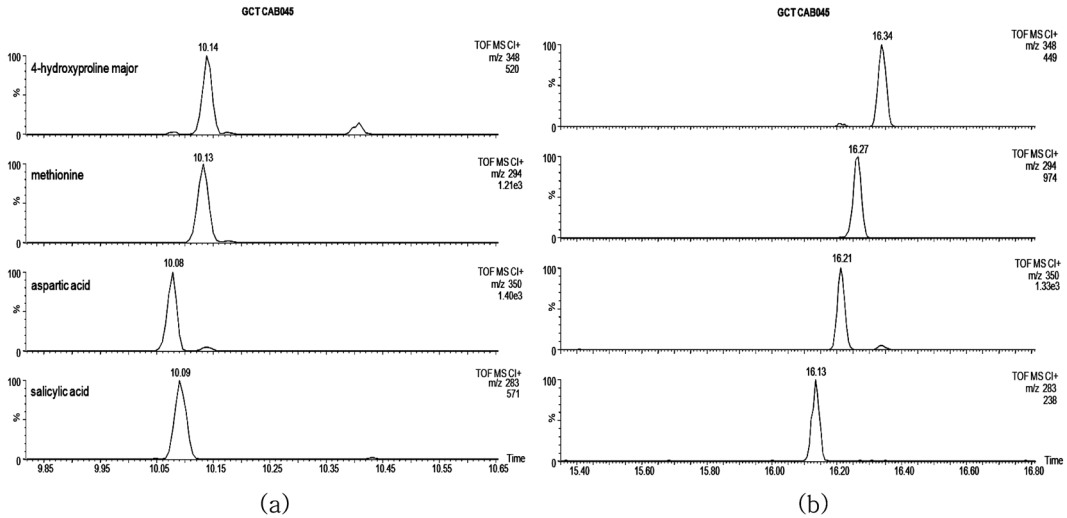


Fig. 2. Extracted ion chromatograms of 4-hydroxyproline, methionine, asparatic acid, and salicylic acid -TMS derivatives according to GC condition (a) run time : 20 min (b) run time : 35.5 min.

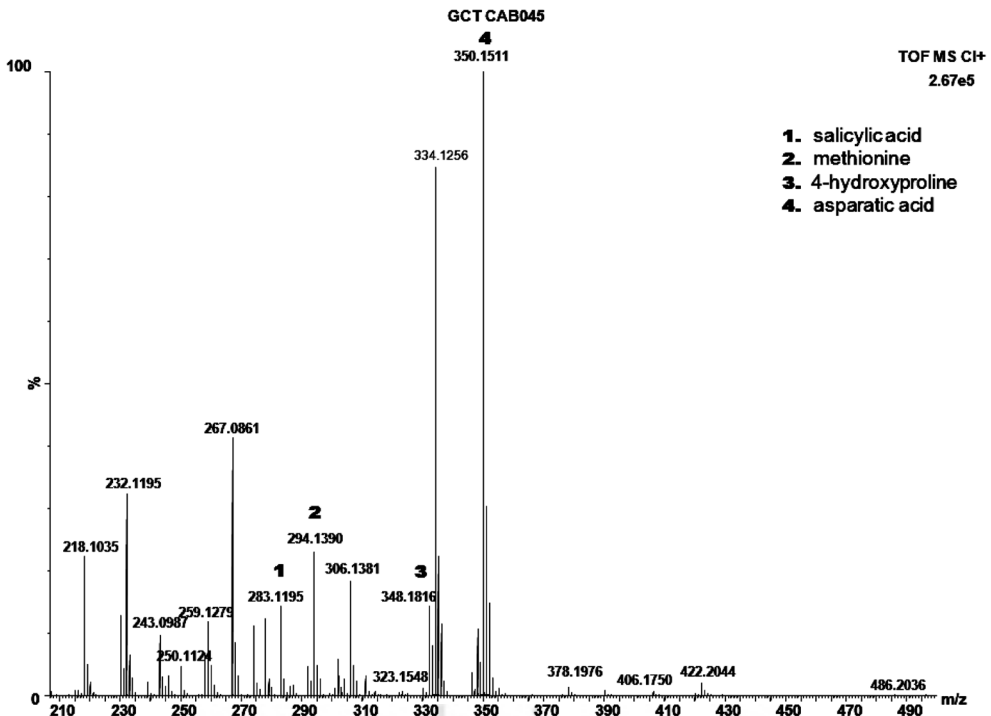
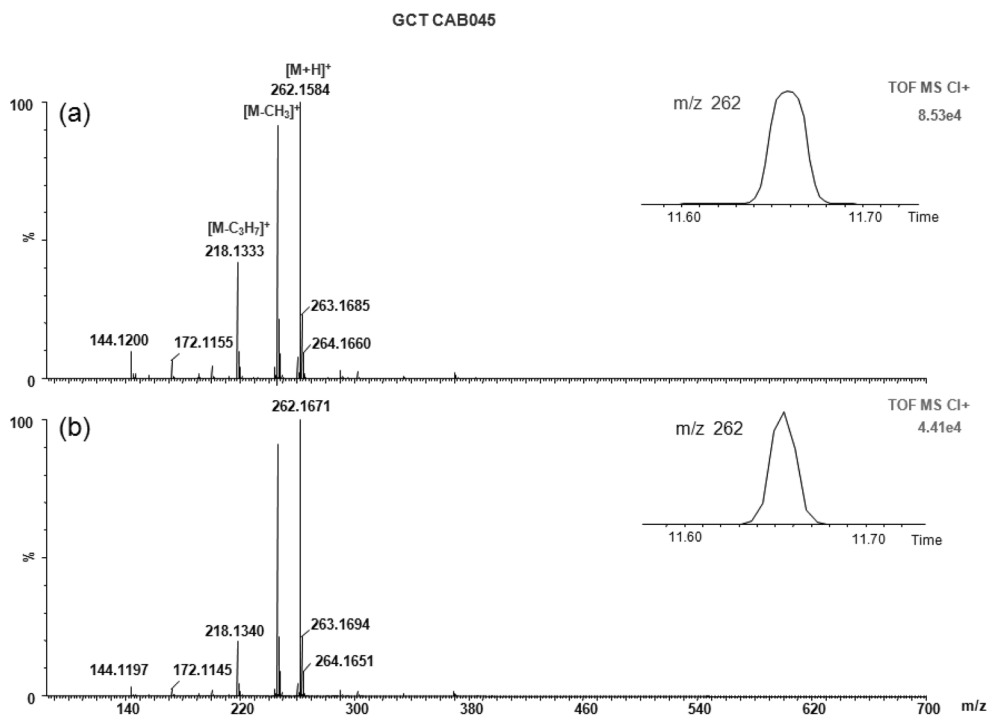


Fig. 3. Mass spectrum of not completely resolved asparatic acid-(TMS) in chromatogram.

Table 2. Comparison of error for mass and isotope ratio according to GC separation

Compound	Before the separation			After the separation		
	Mass error (ppm)	Isotope ratio error		Mass error (ppm)	Isotope ratio error	
		M+1(%)	M+2(%)		M+1(%)	M+2(%)
(1) salicylic acid	-3.3	7.1	6.4	0.3	1.2	-0.2
(2) methionine	-3.6	3.1	2.6	-1.3	0.0	0.6
(3) 4-hydroxyproline	8.8	5.7	3.3	-3.3	-0.1	-0.2
(4) aspartic acid	36.6	1.3	2.5	4.0	1.8	1.2

$$\text{ppm} = \frac{M_{\text{theoretical}} - M_{\text{measured}}}{M_{\text{theoretical}}} \times 10^6$$

Fig. 4. Mass spectra of valine-(TMS)<sub>2</sub> obtained (a) without DRE (b) with DRE.

리되지 못하고 이온 추출 크로마토그램(extracted ion chromatogram, EIC)을 통해서 화합물을 확인할 수 있었으나 Fig. 3에서와 같이 질량 스펙트럼에서 4가지 화합물의 [M+H]<sup>+</sup>을 동시에 볼 수 있었다. 그러나 Fig. 2(b)에서와 같이 4가지 화합물이 분리될 수 있도록 GC 조건(run time : 35.5 분)을 고려한 경우는 각 개별 화합물의 질량 스펙트럼을 얻을 수 있었다. Table 2는 두 가지 조건으로부터 얻은 결과 값으로써 aspartic acid의 경우 36.6 ppm의 높은 질량 오차 값을 보였으며 동위원소비 오차도 5% 이상을 나타내었다. 그러나 GC 칼럼 상에서 분리된 경우 질량 오차는

5 ppm 이내였으며, 동위원소비 오차도 5% 이내 값을 얻을 수 있었다.

시료 내에 존재하는 화합물에 대한 농도는 예측하기 어려우며 화합물 마다 기기감도에 대한 차이가 있기 때문에 검출기의 상태는 정확한 질량의 측정에 영향을 준다. 고농도의 화합물에 의해 생성된 이온빔은 검출기내의 이온 포화현상을 가져오기 때문에 광범위한 농도영역 내에서 정확한 측정이 가능한 조건이 필요하다.<sup>25</sup> Dynamic range enhancement (DRE) 기능은 검출기의 이온 포화를 막아 보다 정확한 질량을 측정할 수 있도록 해 주는데 이는 Z-포커스 렌즈의 전압

조절을 다양하게 하여 저 농도에서는 고 전이 상태 (high transmission state)에서 측정을 하고, 고농도의 경우처럼 검출기 포화 영역 내에서는 이온빔을 1/5로 줄여줌으로써 가능하다. Fig. 4는 500 ng/ $\mu$ L의 valine을 분석한 결과로써 DRE를 사용하지 않은 경우와 사용하여 분석한 추출 이온 크로마토그램에서의 질량스펙트럼을 나타낸 것이다. DRE를 사용하지 않은 경우 Fig. 4(a)처럼 EIC 상의 peak 형태로부터 검출기의 이온 포화상태를 예측할 수 있었으며 이때  $[M+H]^+$ 의 측정값과 이론값( $M_{theoretical}$ ;  $m/z$  262.1659)과의 차이는 -28.4 ppm이었다. 그러나 DRE 모드를 사용하여 분석한 결과 Fig. 4(b)에서처럼 질량 오차는 4.7 ppm으로써 검출기의 이온 포화로 인한 영향을 피할 수 있었다.

### 3.3. Accurate mass 및 isotope ratio 측정

위와 같은 분석 조건에서 대표적인 대사물질 아미노산, 지방산, 유기산, 당류 표준혼합물 50 ng/ $\mu$ L에서의 크로마토그램은 Fig. 5와 같았으며 각각의 accurate mass 및 동위원소 비는 Table 3에 나타내었다. 대부분의 물질들은 위 실험조건인 유도체화 조건에서 수소 결합 주게(H-bond donor) 숫자만큼 TMS화 되었지만 serine과 4-hydroxyproline의 경우는 완전하게 유도체

화 되지 않은 minor 성분도 같이 검출되었다. 동위원소비의 경우 cps (count per second)를 측정하여 얻어진 결과로써 TMS 유도체화의 경우는 Si로 인해 동위원소 M+1과 M+2의 비율이 높아진다. Table 4에서 보는 것처럼 alanine의 경우 유도체화를 통하여  $[M+1]/M$ 의 동위원소 비는 20%에 가까운 값으로 유도체화 전보다 높은 cps값에서 측정이 가능하다. 따라서 TMS 유도체화는 분석에 있어서 휘발성 및 감도의 증가뿐만 아니라 동위원소 측정을 보다 용이하게 하여 준다.

24개의 표준물질에 대한  $[M+H]^+$ 의 질량 오차는 Table 3에서처럼 절대 오차평균은 6.8 ppm이었고, lock mass ( $m/z$  286.0027)값과의 차이가 클수록 높아짐을 알 수 있었으며, 동위원소비의 경우 cps값이 5000이상의 경우 5%이내의 오차를 보였으며 낮은 경우 오차가 커짐을 알 수 있었다.

미지 물질의 동정을 위한 첫 단계인 원소조성 확인을 위해 소프트웨어 개발이 꾸준히 되어왔으나, 예측되는 원소조성 목록을 전체적으로 검토하는 것은 쉽지 않은 일이다. 이를 위해 최근 7가지 화학 규칙을 검토하여 예상되는 원소조성 수를 줄여 주어 짧은 시간 내에 최우선 순위별 원소조성을 제시해 주는 알고리즘(Seven golden rules)이 개발되었다.<sup>21</sup> 이에 따르면

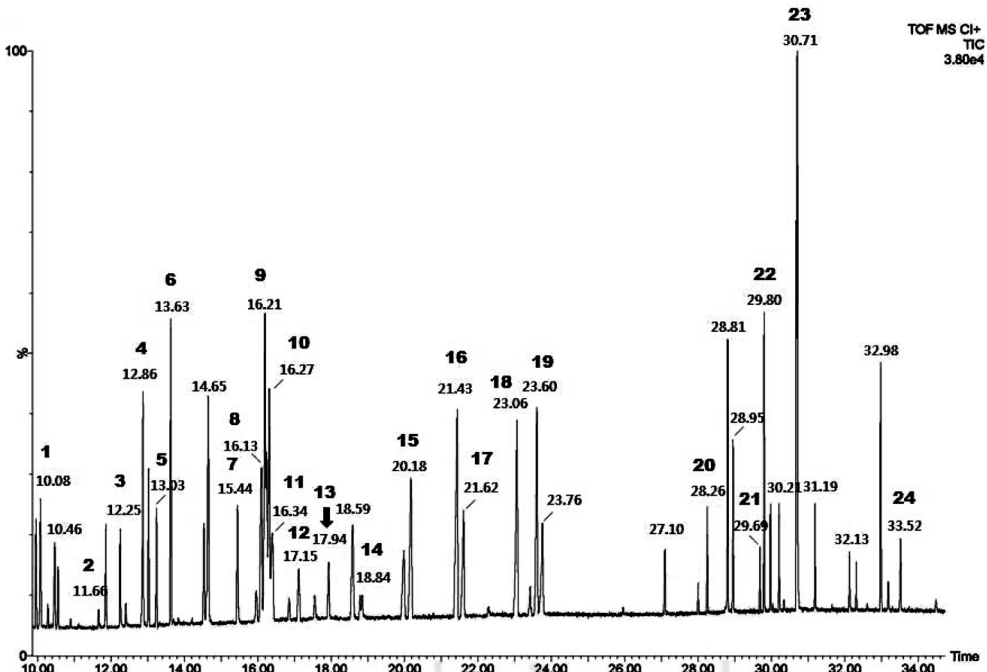


Fig. 5. Total ion chromatogram of 24 reference metabolite-TMS derivatives

Table 3. The error of mass and isotope ratio for reference metabolite-TMS derivatives and top-hit from Seven golden rules

RT (min)	Compound	Formula [M+H] <sup>+</sup>	cps (count per sec)	Exp. mass [M+H] <sup>+</sup>	Mass error (ppm)	Isotope ratio error		Seven rules Top-hit
						M+1 (%)	M+2 (%)	
10.08	Alanine	C <sub>9</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>2</sub> Si <sub>2</sub>	15405	234.1347	-0.6	0.0	-0.1	1
11.66	Valine	C <sub>11</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>2</sub> Si <sub>2</sub>	1656	262.1657	0.6	-2.8	2.6	2
12.25	Serine minor	C <sub>9</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>3</sub> Si <sub>2</sub>	13550	250.1285	3.9	1.1	0.1	1
12.86	Nicotinic acid	C <sub>9</sub> H <sub>14</sub> NO <sub>2</sub> Si	53917	196.0798	-2.1	0.8	0.1	1
13.03	Succinic acid	C <sub>10</sub> H <sub>23</sub> O <sub>4</sub> Si <sub>2</sub>	5720	263.1129	2.2	0.2	-2.8	1
13.63	Serine major	C <sub>12</sub> H <sub>32</sub> NO <sub>3</sub> Si <sub>3</sub>	25490	322.1703	-4.0	1.9	1.0	1
15.44	4-hydroxyproline minor	C <sub>11</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>3</sub> Si <sub>2</sub>	28031	276.1458	-2.5	-0.1	-0.2	1
16.13	Salicylic acid	C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> O <sub>3</sub> Si <sub>2</sub>	20895	283.1185	0.3	1.2	-0.2	1
16.21	Aspartic acid	C <sub>13</sub> H <sub>32</sub> NO <sub>4</sub> Si <sub>3</sub>	48866	350.1625	4.0	1.8	1.2	2
16.27	Methionine	C <sub>11</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>2</sub> SSi <sub>2</sub>	38513	294.1383	-1.3	0.0	0.6	1
16.34	4-hydroxyproline major	C <sub>14</sub> H <sub>34</sub> NO <sub>3</sub> Si <sub>3</sub>	18761	348.1858	-3.3	-0.1	-0.2	1
17.15	Alpha keto glutaric acid	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>5</sub> Si <sub>2</sub>	7503	320.1367	-5.5	1.1	0.5	1
17.94	Glutamic acid	C <sub>14</sub> H <sub>34</sub> NO <sub>4</sub> Si <sub>3</sub>	5470	364.1827	-8.6	0.0	1.1	1
18.84	Asparagine	C <sub>13</sub> H <sub>33</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Si <sub>3</sub>	1210	349.1819	-5.7	-3.3	4.2	2
20.18	Putrescine	C <sub>16</sub> H <sub>45</sub> N <sub>2</sub> Si <sub>4</sub>	8709	377.2672	-3.2	-1.6	1.9	1
21.43	Shikimic acid	C <sub>19</sub> H <sub>43</sub> O <sub>5</sub> Si <sub>4</sub>	3229	463.2144	9.3	-2.9	-3.9	1
21.62	Citric acid	C <sub>18</sub> H <sub>41</sub> O <sub>7</sub> Si <sub>4</sub>	7958	481.2001	-14.9	0.7	0.2	>3
23.06	Glucose	C <sub>22</sub> H <sub>56</sub> NO <sub>6</sub> Si <sub>5</sub>	1377	570.3037	-14.6	3.6	-5.0	>3
23.60	Lysine	C <sub>18</sub> H <sub>47</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Si <sub>4</sub>	20845	435.2771	-13.0	-0.1	0.9	1
28.26	Stearic acid	C <sub>21</sub> H <sub>45</sub> O <sub>2</sub> Si	10259	357.3229	-11.2	0.7	-0.8	1
29.69	Arachidic acid	C <sub>23</sub> H <sub>49</sub> O <sub>2</sub> Si	6027	385.3558	-14.6	1.8	-0.6	>3
29.80	Serotonin	C <sub>22</sub> H <sub>45</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Si <sub>4</sub>	10648	465.2669	-12.9	-1.2	4.2	1
30.71	Adenosine	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> Si <sub>4</sub>	36761	556.2695	-12.2	2.4	3.3	2
33.52	Cholesterol	C <sub>30</sub> H <sub>55</sub> O <sub>2</sub> Si	1193	459.4078	-12.1	-5.4	4.6	1
Average of absolute error					6.8	1.5	1.7	

Table 4. Theoretical isotope ratio of alanine and alanine-(TMS)<sub>2</sub>

Alanine				Alanine-(TMS) <sub>2</sub>			
Molecular formula	Isotope ratio			Molecular formula	Isotope ratio		
	M (%)	M+1 (%)	M+2 (%)		M (%)	M+1 (%)	M+2 (%)
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub>	100	3.80	0.46	C <sub>9</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>2</sub> Si <sub>2</sub>	100	20.70	8.94

벤젠 고리나 이중결합 수(RDBE, rings-plus double-bonds equivalent), Lewis 와 Senior 규칙의 확인, 동위원소 비, 수소/탄소 원소 비, 질소산소인황(NOPS)의 비율, TMS유도체화에 의한 분자 구조 실제 유무 가능성과 같은 7가지 규칙이 이용되며, 동위원소 비 항목에서 원소조성 수를 가장 많이 줄여줄 수 있는 것으로 나타났다. 한 예로 측정된 sorbitol-(TMS)<sub>6</sub>의 분자량 m/z 614.3177 (C<sub>24</sub>H<sub>62</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>6</sub>; M<sub>theoretical</sub> = 614.3162)에서 질량 오차 5 ppm 범위에서 가능한 원소조성 수는 696개였으며, 동위원소 비의 오차범위를 5% 이내로 좁히면 668개의 후보물질들을 줄일 수 있는 결과를 얻었다.<sup>17</sup> 또한 7가지 규칙을 사용한 알고리즘을 통해

서 원소조성 1순위로 sorbitol-(TMS)<sub>6</sub> 확인이 가능하였다. 따라서 본 연구에서 얻어진 24개의 화합물의 accurate mass와 동위원소 비를 알고리즘에 적용하여 그 활용 가능성에 대해 알아보았다. Accurate mass 및 동위원소 오차 범위는 각각 15 ppm, 5% 이내로 24개 화합물에 대해 동시에 알고리즘에 적용한 결과 Table 3에서와 같이 24개 화합물중 21개 화합물을 우선 순위 (2순위 내)에서 일치함을 확인 할 수 있었다. 질량 오차가 14 ppm 이상인 3가지 화합물 citric acid, glucose, arachidic acid의 경우는 우선 순위에서 확인 할 수 없었으나, 나머지 5가지 화합물(lysine, stearic acid, serotonin, adenosine, cholesterol)의 경우에는 10



ppm 이상의 질량 오차에도 불구하고 동위원소 비에 의해 우선 순위 화합물로 구조식이 일치함을 알 수 있었다.

#### 4. 결 론

GC-TOF/MS의 양이온 화학적 이온화 방법을 이용하여 accurate mass와 동위원소 비 최적 측정 조건을 확립하였다. High mass tune 방법이 사용되었으며, 화합물들의 분리 조건 및 검출 조건으로 DRE 모드가 사용되었다. 미지 대사물질 확인을 위한 이러한 방법들의 적용 가능성을 알아보기 위해 24종의 TMS로 유도체화 된 표준 대사 물질을 이용하였다. 분석결과로 얻어진 accurate mass와 동위원소 비를 원소조성 알고리즘에 적용한 결과 질량 오차가 큰 화합물 3종을 제외한 21종에 대해 우선순위 화합물로 구조식이 일치하는 것을 확인할 수 있었고 제시된 방법으로 미지 물질의 원소조성 확인에 활용될 수 있을 것으로 본다.

#### 참고문헌

- G. V. Silas, S. Mas, M. Kesson, J. Smedsgaard and J. Nielsen, *Mass Spectrometry Reviews*, **24**, 613-646(2005).
- <http://www.nist.gov/srd/nist1a.cfm>
- O. Fiehn, J. Kopka, P. Drmann, T. Altmann, R. N. Trethewey and L. Willmitzer, *Nat. Biotechnol.* **18**, 1157-1161(2000).
- S. Strelkov, M. V. Elstermann and D. Schomburg, *Bio. Chem.*, **385**, 853-861(2004).
- C. Denkert, J. Budczies, T. Kind, W. Weichert, P. Tablack, J. Sehouli, S. Niesporek, D. Koensgen, M. Dietel and O. Fiehn, *Cancer Res.*, **66**(22), 10795-10804(2006).
- J. Liseč, N. Schauer, J. Kopka, L. Willmitzer and A. R. Fernie, *Nature Protocols* **1**, 387-396(2006).
- D. Y. Lee and O. Fiehn, *Plant Methods*, **4**, 1-13(2008).
- D. Herebian and B. Hanisch, F.-J. Marner, *Metabolomics*, **1**(4), 317-324(2005).
- V. V. Tolstikov, *Methods Mol. Biol.*, **544**, 343-353(2009).
- A. Gordin, A. B. Fialkov and A. Amirav, *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **22**(17), 2660-2666(2008).
- R. Flamini, A. D. Vedova, D. Cancian, A. Panighel and M. D. Rosso, *J. Mass Spectrom.*, **42**(5), 641-646(2007).
- Q. Kuangnan, D. J. Gary and E. E. Kathleen, *Int. J. Mass Spectrom.*, **265**, 230-236(2007).
- R. C. Jose and P. R. Paul, *Organic Geochemistry*, **30**, 279-286(1999).
- W. Welthagen, S. Mitschke, F. Mühlberger and R. Zimmermann, *J. Chromatogr. A.*, **1150**, 54-61(2007).
- Z. Ralf, W. Werner and G. Thomas, *J. Chromatogr. A.*, **1184**, 296-308(2008).
- T. Kind and O. Fiehn, *BMC Bioinformatics*, **7**, 234, 1-10(2006).
- T. Kind and O. Fiehn, *BMC Bioinformatics*, **8**, 115, 1-20(2007).
- Y. Wang and M. Gu, *Anal Chem.*, **82**(17), 7055-62(2010).
- J. C. Erve, M. Gu, Y. Wang, W. DeMaio and R. E. Talaat, *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.*, **20**(11) 2058-69(2009).
- M. Gu, Y. Wang, X. G. Zhao and Z. M. Gu, *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **20**(5), 764-70(2006).
- [http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/Seven\\_Golden\\_Rules/](http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/Seven_Golden_Rules/)
- T. Kind, G. Wohlgemuth, D. Y. Lee, Y. Lu, M. Palazoglu, S. Shahbaz and O. Fiehn, *Anal. Chem.*, **81**(24), 10038-10048(2009).
- O. Masaki, Y. Hiroyuki, F. Hirohiko, K. Satoshi, Y. Daisuke, O. K. Koji, M. Eizi, S. Kazuhiko and U. Nobuo, *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B* **236**(1) 377-382(2005).
- T. Kind, V. V. Tolstikov, O. Fiehn and R. H. Weiss, *Anal. Biochem.*, **363**, 185-195(2007).
- S. Abate, Y. G. Ahn, T. Kind, T. Cataldi and O. Fiehn, *Rapid Commun Mass Spectrom.*, **24**, 1172-1180(2010).