

## Application News

# No.C215K

### Liquid Chromatography Mass Spectrometry

## Quadrupole Time-of-Flight MS LCMS-9030™을 이용한 핵산치료제 분자량 측정 및 정량성 확인

Determination of Molecular Mass and Quantification  
of Oligonucleotide Therapeutics Using Quadrupole  
Time-of-Flight Mass Spectrometer LCMS™-9030

#### ■ 개요

핵산치료제는 각종 질환의 원인이 되는 표적 유전자 또는 표적 단백질에 결합함으로써 약효를 발휘하는 합성 올리고뉴클레오타이드입니다. 지금까지 8개의 핵산치료제가 승인되었으며 그 중 대부분은 20개 정도의 염기서열을 가지고 있습니다.

여기에서는 Q-TOF 질량분석기 LCMS-9030을 이용한 분석 사례를 소개합니다. 핵산치료제로는 20개의 염기를 가진 2'-MOE 수식 올리고뉴클레오타이드를 사용하였습니다. LCMS-9030 질량분석기는 3 mDa (0.05ppm)의 오차로 치료제의 분자량을 측정하였고 MRM 모드로 검량선을 작성했을 때 1~1000 ng/mL의 범위에서 직선성을 확인할 수 있었습니다.

N. Kato

#### ■ 핵산치료제 분석 방법

핵산치료제의 구조는 질량분석법, NMR, UV 스펙트럼 등으로 확인하였으나 최근에는 특이성과 범용성이 뛰어나고 약물과 대사물을 동시에 분석할 수 있는 LC-MS/MS 방식이 주목받고 있습니다.

20개 정도의 염기를 가지는 핵산치료제는 분자량이 6,000 이상으로 분자량 확인을 위해 Q-TOF과 같은 고성능 질량분석기가 필요합니다. 한편 정량분석에는 일반적으로 정량 범위가 폭넓은 Triple Quadrupole 질량분석기(TQ-MS)가 이용됩니다.

#### ■ LC-Q/TOF-MS

LC-Q/TOF-MS는 고성능 액체크로마토그래프와 사중극자 질량분석기 및 비행시간형 질량분석기(TOF)를 결합한 고속 액체크로마토그래프 질량분석기입니다.

시마즈 최초의 사중극자 비행시간형 질량분석기인 LCMS-9030은 LCMS-8000 시리즈(TQ-LCMS)의 고속, 고감도 기술에 새롭게 개발된 TOF의 기술을 융합하였습니다. 고강도 미세격자 전극 UFgrating™, 이상적인 이온 굴절을 실현한 iRefTOF™, 고정밀 온도 컨트롤 시스템과 같은 시마즈만의 독자적인 기술들이 포함된 LCMS-9030은 항상 안정된 질량 정밀도를 유지하면서 고감도와 고분해능의 데이터를 취득할 수 있습니다.

#### ■ 시료

Sequence: 5'-mG-mC\*-mC\*-mU\*-mC\*-dA-dG-dT-dC\*-dT-dG-dC\*-dT-dT-dC\*-mG-mC\*-mA-mC\*-mC\*-3'

(m) 2'-O-(2-Methoxyethyl) nucleoside (2-MOE)

(\* ) 5-methylated derivatives of C and U

(d) 2'-deoxyribonucleoside

Monoisotopic mass : 6431.7239

#### ■ 분석조건

HPLC와 MS의 분석 조건은 표 1과 같습니다. 올리고뉴클레오타이드 역상분리는 이온페어 시약이 사용되며 아민계 시약으로는 TEA<sup>\*1</sup>이 일반적으로 사용됩니다.

여기에서는 보다 고감도로 측정을 할 수 있는 HFIP<sup>\*2</sup> 와 DIPEA<sup>\*3</sup>를 이동상으로 사용했습니다.

표 1. 분석조건

[HPLC conditions] (Nexera™)	
Column	: Shim-pack Scepter™ C18 (2.0 × 75, 1.9 μm)
Mobile phases	: A) 50 mmol/L HFIP and 10 mmol/L DIPEA B) Acetonitrile
Gradient Program	: B 5 % (0-0.5 min) – 15 % (0.5-6 min)
Flow rate	: 0.2 mL/min
Column Temp.	: 50 °C
Injection volume	: 5 μL
[MS conditions] (LCMS-9030)	
Ionization	: ESI (Negative mode)
Probe Voltage	: -3 kV
Mode	: Full scan (m/z 500 – 3000) MRM (803.4626 > 94.9358)
Nebulizing gas flow	: 3.0 L/min
Drying gas flow	: 10.0 L/min
Heating gas flow	: 10.0 L/min
DL Temp.	: 250 °C
Heat Block Temp.	: 400 °C
Interface Temp.	: 350 °C

\*1 Triethylamine

\*2 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol

\*3 N,N-diisopropylethylamine



Q-TOF mass spectrometer LCMS™-9030

## ■ 다가이온 분석 소프트웨어를 이용한 디콘볼루션

그림 1은 스캔 모드 데이터에서 추출한 질량 스펙트럼을 보여줍니다. m/z 1071.6, 918.4, 803.5 등의 다가이온이 검출되었습니다. 이러한 다가이온의 스펙트럼은 LabSolutions Insight Explore™ 소프트웨어의 옵션인 "ReSpect" 알고리즘을 이용하여 디콘볼루션을 실시하였습니다.

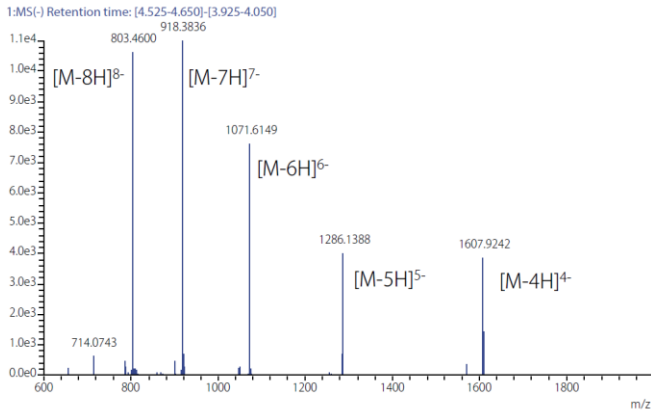


그림 1. 핵산치료제의 질량스펙트럼

그림 2는 분자량 계산 결과를 보여줍니다. 디콘볼루션 스펙트럼에서 볼 수 있듯이 monoisotopic mass는 6431.72로 확인되었습니다. 그 질량 오차는 3 mDa (0.05 ppm)입니다.

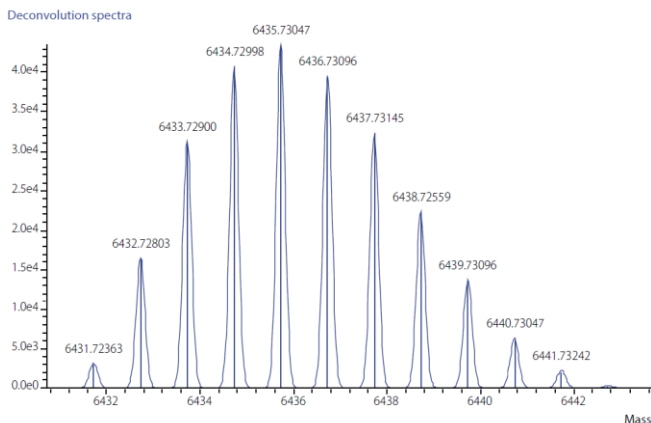


그림 2. 디콘볼루션 스펙트럼

## ■ 표준시료 분석

LCMS-9030에서는 Triple Quadrupole 질량분석기와 마찬가지로 MRM 모드를 사용하여 보다 고감도로 정량분석을 실시할 수 있습니다. precursor 이온은 8개의 m/z 803.4626, product 이온은 m/z 94.9358(PSO<sub>2</sub><sup>-</sup>)을 모니터 이온으로 사용했습니다. 그림 3은 MRM 모드에서의 대표적인 크로마토그램을 보여줍니다.

Q 803.4626>94.9358 (-)

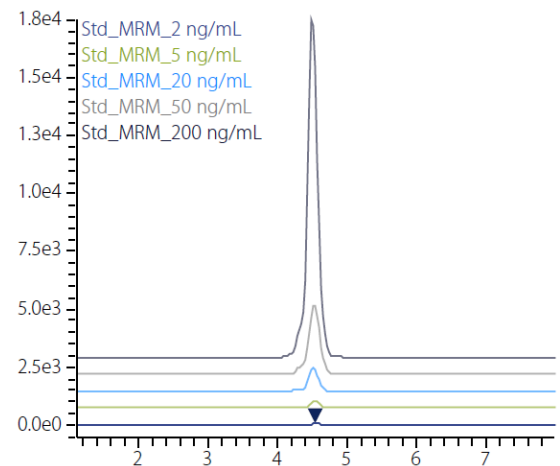


그림 3. 핵산치료제의 MRM 크로마토그램

## ■ 검량선

검량선은 그림 4와 같습니다. 1~1000 ng/mL의 범위에서 작성하였고 R<sup>2</sup>은 0.996이었습니다.

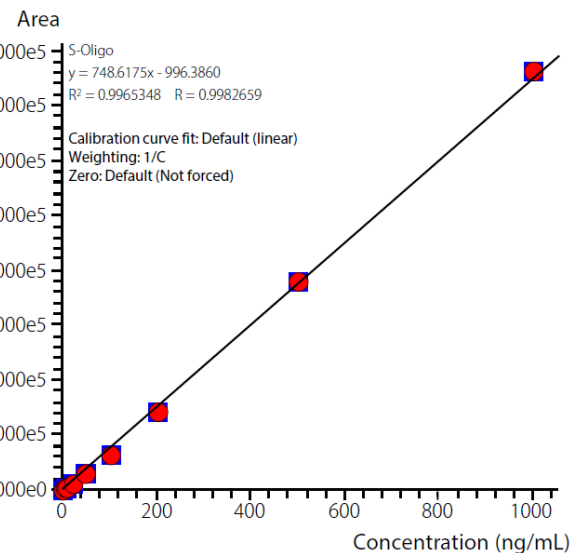


그림 4. 검량선

## ■ 결론

Q-TOF MS LCMS-9030을 사용하여 0.05 ppm의 오차로 분자량을 확인하였습니다. 또한 1~1000 ng/mL 범위에서 직선성을 확인할 수 있었습니다.

LCMS, UFgrating, iRefTOF, Nexera, Shim-pack Scepter and LabSolutions Insight Explore are trademarks of Shimadzu Corporation registered in Japan and/or other countries.