

# Application News

No. 04-AD-0242-K

Biopharma / LCMST<sup>TM</sup>-9030

## 올리고뉴클레오타이드의 분리 및 정성을 위한 이온-쌍 역상 LCMS-9030(Q-TOF) 분석법

Ion-Pair Reversed-Phase (IP-RP) LCMS-9030 (Q-TOF) Mass Spectrometer for Separation and Identification of Oligonucleotides

### ■ 서론

올리고뉴클레오타이드 (Oligonucleotide) 치료제는 광범위한 질병을 치료할 수 있는 잠재력이 있는 짧은 합성 DNA 또는 RNA 중합체이다. 현재 13개의 올리고뉴클레오타이드 치료제가 미국 식품의약국 (FDA)으로부터 신약 승인 (NDA)을 받았다. 2020년 12월 11일, 미국 FDA는 화이자-바이오엔텍 COVID-19 mRNA 백신의 첫번째 긴급 사용 승인(EUA)을 발표함에 따라 올리고뉴클레오타이드 치료제에 대한 관심이 더욱 높아지고 있다.

일반적인 올리고뉴클레오타이드 치료제는 40-60 개 염기인 앵타머(aptamer) 올리고뉴클레오타이드를 제외하고, 약 15-30개 염기이다. 반면, 보다 짧은 올리고뉴클레오타이드(20 개 미만 염기)는 HPLC로 쉽게 분석할 수 있지만, 더 긴 서열의 올리고뉴클레오타이드의 분리는 어려워진다.

이 뉴스레터는 올리고뉴클레오타이드의 고분해능 분리 및 고정밀 질량 분석을 위한 이온쌍 역상 (ion-pair reversed-phase, IP-RP) LC-MS 시스템을 소개한다.

### ■ 분석방법

#### 올리고뉴클레오타이드 시료 :

DNA 올리고뉴클레오타이드 래더 (Oligonucleotide ladder) 표준물질은 Integrated DNA Technologies (IDT)에서 구입하였으며, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 및 60 개의 염기를 갖는 8 개의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다 (표 1).

#### 시료 전처리 :

올리고뉴클레오타이드 래더 표준물질을 LC-MS 분석을 위해 Milli-Q® 초순수로 용해하여 5 µg/mL 용액으로 만들었다.

#### 분석 조건 :

HPLC 및 MS 분석 조건은 표 2와 같으며, 이 분석에서 트리에틸아민 (TEA) 및 헥사플루오로이소프로판올 (HFIP) 이온-페어링 시약은 올리고뉴클레오타이드의 최적의 역상 분리를 위한 이동상으로 사용되었다.

표 2. 분석 조건

HPLC conditions (Shimadzu Nexera <sup>TM</sup> UHPLC)	
Column	: Shim-pack <sup>TM</sup> Scepter HD-C18-80 (100 mm x 2.1 mm I.D.; 1.9 µm)
Column Temp.	: 60 °C
Flow rate	: 0.2 mL/min
Mobile phase A	: 15 mM TEA and 400 mM HFIP in 5% methanol
Mobile phase B	: 50% mobile phase A + 50% methanol
Gradient program	: B. Conc. 31% (0 min)→47% (20 min)→75% (21-22 min)→31% (23 min)
Injection volume	: 5 µL
MS conditions (Shimadzu LCMS-9030)	
Ionization	: ESI (Negative mode)
Mode	: MS (m/z 500 - 1400)
Probe voltage	: -3 kV
Gas flows (L/min)	: Nebulizing, 3; Drying, 12; Heating, 12
Temperatures (°C)	: Heat block, 400; DL, 250; Interface, 350

표 1. DNA 올리고뉴클레오타이드 래더 표준물질 (DNA oligonucleotide ladder standard)

Standards	Sequences	Formula	M.W. (Da)
10-mer	ATCGC GGATT	C98H124N37O59P9	3043
15-mer	GCTGC GACGA GGCTG	C146H183N61O88P14	4634
20-mer	ATCGC GGATT AGCAC TACGT	C195H246N75O118P19	6117
25-mer	ATCTC GGATT AGCAC TACGC ATCGG	C243H307N93O148P24	7642
30-mer	ATCGC GGATT AGCAC TACGC ATCGG TTACA	C292H368N113O177P29	9191
40-mer	ATCGC GGATT AGCAC TACGC ATCGG TTACA AACGA GTACC	C389H489N154O234P39	12274
50-mer	ATCGC GGATT AGCAC TACGC ATCGG TTACA AACGA GGACC TGATG CACTT	C487H612N191O295P49	15379
60-mer	ATCGC GGATT AGCAC TACGC ATCGG TTACA AACGA GGACC TGATG CACTT TGACA GCATG	C585H734N231O354P59	18493

**데이터 처리:**

MS 데이터는 Shimadzu LabSolutions version 5.99 SP2를 이용하여 처리하였다.

**■ 결과 및 토의**

**올리고뉴클레오타이드의 분리:**

올리고뉴클레오타이드는 TEA 및 HFIP를 포함하는 이온-페어링 버퍼 시스템을 사용하여 Shim-pack Scepter HD-C18-80 컬럼 (100 mm x 2.1 mmID; 1.9 μm)으로 분리하였다. 그림 1은 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 및 60-mer 올리고뉴클레오타이드를 농도구배 용리법 (gradient elution)으로 20분 내에 효과적인 분리를 한 크로마토그램을 보여준다.

**질량 정확도:**

올리고뉴클레오타이드의 고정밀 질량 분석을 위해 LCMS-9030 (Q-TOF) 질량분석기의 음이온 모드 (negative mode)를 사용하였다. 여덟 개의 분석 물질 모두 2.5 ppm 미만의 질량 정확도를 나타내며 성공적으로 확인되었다(표 3). 예를 들어, 그림 2는 질량 정확도가 1.96 ppm인 20-mer 올리고뉴클레오타이드의 질량 스펙트럼을 보여주고 있으며, 가장 많은 m/z는 763.5020 [M-8H]<sup>8-</sup>이다.

**■ 결론**

이 분석법은 10 - 60개 염기 올리고뉴클레오타이드를 분리하고 정성하는 것을 목표로 TEA 및 HFIP 이온 페어링 버퍼 시스템을 이용하여 LCMS-9030 (Q-TOF) 질량분석기로 개발하였다.

전반적으로 이 방법은 올리고뉴클레오타이드의 고분해능 분리와 2.5 ppm 미만의 질량 오차가 보장된 고정밀 질량 분석이 가능하였다.

표 3. LCMS-9030에서 올리고뉴클레오타이드의 질량 정확도

Standards	M.W. (Da)	Cal. m/z	Meas. m/z	ppm	Adduct ion
10-mer	3043	1013.1763	1013.1773	0.99	[M-3H] <sup>3-</sup>
15-mer	4634	925.7547	925.7557	1.08	[M-5H] <sup>5-</sup>
20-mer	6117	763.5005	763.5020	1.96	[M-8H] <sup>8-</sup>
25-mer	7642	954.1569	954.1585	1.68	[M-8H] <sup>8-</sup>
30-mer	9191	834.4997	834.5014	2.04	[M-11H] <sup>11-</sup>
40-mer	12274	817.1994	817.2013	2.33	[M-15H] <sup>15-</sup>
50-mer	15379	853.3599	853.3615	1.87	[M-18H] <sup>18-</sup>
60-mer	18493	1026.3331	1026.3349	1.75	[M-18H] <sup>18-</sup>

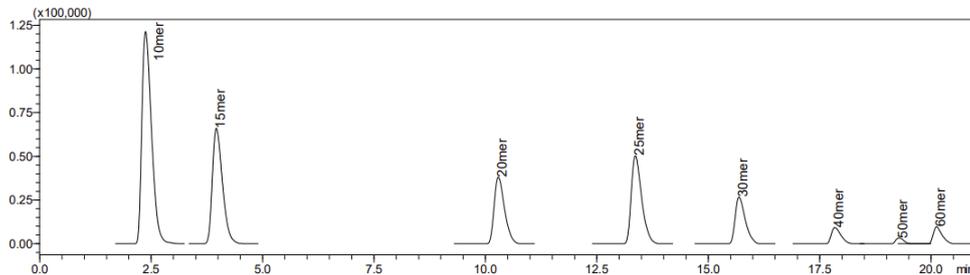


그림 1. 10-60-mer 올리고뉴클레오타이드의 분리 크로마토그램

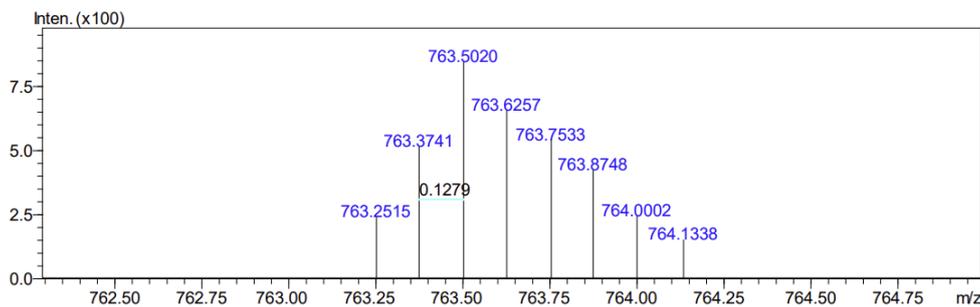


그림 2. 20-mer 올리고뉴클레오타이드의 고분해능 질량 스펙트럼

