

# LC-QTOF를 이용한 올리고뉴클레오타이드 정성/정량 분석

## 저자

정종목  
한국애질런트테크놀로지스 (주)

## 개요

바이오 제약분야에서 올리고뉴클레오타이드의 중요성이 더해가면서 이에 대한 분석법의 필요성도 증대되고 있습니다. 제약 원료로서 올리고뉴클레오타이드를 연구하고 생산할 때 수반되어야 할 정성/정량 분석은 LC나 Quadrupole 기반의 질량 분석기로는 원하는 결과를 얻기 어려운 경우가 많습니다. 이를 보완하기 위해 고분해능 질량 분석기인 LC-QTOF를 이용하여 올리고뉴클레오타이드 분석에 필수적인 정성/정량 분석법, 즉 표준품을 사용한 절대 정량법, 유효성분 및 불순물의 질량값을 통한 정성 확인법 및 핵산 서열의 확인법을 개발하였으며 해당 분석법의 유효성을 검토하였습니다.

## 서론

2018년 최초로 siRNA 기반 치료제가 미국 FDA의 승인을 받은 후 의약품으로서 올리고뉴클레오타이드의 관심과 중요성이 커지고 있습니다.<sup>1</sup> 의약품으로 만들어진 올리고뉴클레오타이드는 다른 합성 의약품과 마찬가지로 연구단계에서 약동력학을 수행하기 위한 정량분석이 필요합니다. 또한 대사체 정성분석, 생산과정에서 생성되는 불순물 동정도 해야 합니다. 무엇보다 고분자에 가까운 20mer(약 6500Da) 내외의 뉴클레오타이드 중합체가 정확한 서열로 합성되었는지 확인하는 분석도 필수적입니다. Sequencing이라 부르는 서열확인 작업이 요구되는데 올리고뉴클레오타이드에 적용된 다양한 변형들까지 정확하게 확인해야 하기 때문에 기존 PCR 기반의 서열분석기로는 한계가 있습니다.

이러한 여러가지 분석 요구사항을 만족시키기 위하여 본 응용 자료에서는 LC-QTOF를 사용하여 올리고뉴클레오타이드의 정량분석법, 그리고 불순물 동정 및 서열확인을 위한 정성분석법을 제안합니다.

## 실험

### 시료 정보

분석에 사용한 올리고뉴클레오타이드는 애질런트 올리고뉴클레오타이드 Resolution Standard(RNA, P/N 5190-9028)입니다. 해당 표준품은 14, 17, 20, 21mer RNA의 혼합물로 14, 17, 20mer RNA는 2uM, 21mer RNA는 4uM의 농도로 구성되어 있습니다. 그 외 실험에 사용된 모든 시약 및 용매는 LC-MS급으로 사용하였습니다.

### 시료 조제방법

정량분석을 위하여 표준품을 Agilent LC/MS grade water(P/N 5191-4498)를 사용하여 각각 2nM, 5nM, 10nM, 20nM, 50nM 농도(21mer의 경우 4, 10, 20, 40, 100nM)로 희석하여 분석하였습니다. 정성분석에는 표준품 원액 농도를 그대로 사용하였습니다.

### 분석 기기 및 조건

Agilent 1290 Infinity II UHPLC와 Agilent 6545 XT Q-TOF가 본 분석을 위해 사용되었습니다. UHPLC 분석 조건은 표 1에서 확인할 수 있습니다. MS 분석에 대한 조건은 표 2에서 확인할 수 있습니다.

표 1. UHPLC method 파라미터.

파라미터	Value																								
장비	Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프 (G7120A) Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B) Agilent 1290 Infinity II Integrated Column Compartment (G7116B) Agilent 1290 Infinity II 다이오드 어레이 검출기 (G7117B)																								
자동 시료 주입기 온도	4°C																								
주입 부피	5µL																								
DAD 파장	260nm																								
컬럼	Agilent AdvanceBio Oligonucleotide, 2.1x150mm, 2.7µm																								
컬럼 온도	65°C																								
이동상 A	15mM Hexylamine and 25mM HFIP in water (LC-MS grade)																								
이동상 B	100% ACN (LC-MS grade)																								
유속	0.4mL/min																								
그라디언트	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (min)</th> <th>이동상 A(%)</th> <th>이동상 B(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>15.0</td> <td>75</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>15.1</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>17.0</td> <td>5</td> <td>95</td> </tr> <tr> <td>17.1</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>20.0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	Time (min)	이동상 A(%)	이동상 B(%)	0.0	90	10	0.5	90	10	15.0	75	25	15.1	5	95	17.0	5	95	17.1	90	10	20.0	90	10
Time (min)	이동상 A(%)	이동상 B(%)																							
0.0	90	10																							
0.5	90	10																							
15.0	75	25																							
15.1	5	95																							
17.0	5	95																							
17.1	90	10																							
20.0	90	10																							

표 2. Agilent 6545XT LC-QTOF method 파라미터.

파라미터	Value
장비	Agilent 6545XT LC-QTOF
이온 소스	Electrospray Ionization (ESI)
스캔 모드	MS & MSMS
극성	Negative
건조 기체 온도	300°C
건조 기체 유속	8L/min
네블라이저 압력	35psi
Sheath gas 온도	350°C
Sheath gas 유속	8L/min
캐필러리 전압	5500V
노즐 전압	2000V
Fragmentor 전압	250V
스키머 전압	65V
MS & MSMS 질량 범위	600~3200m/z
MS & MSMS 스캔 속도	0.5~2spectra/sec
충돌 에너지	40, 60eV

## 결과

우선 본 응용자료에서는 LC-QTOF를 이용한 올리고뉴클레오타이드의 정량분석을 수행한 결과를 수록하였습니다. LC 분석법은 다양한 이온 페어링 시약을 테스트하여 감도와 분리도를 검토한 문헌<sup>2</sup>과 자사의 응용 자료<sup>3</sup>를 바탕으로 최적화하였습니다.

그림 1은 각 올리고뉴클레오타이드의 EIC(Extracted Ion Chromatogram)를 보여주고 있습니다. 추출 방식은 -5가에서 -2가의 각 전하 상태의 이온 동위체 클러스터에서 이론적으로 가장 높은 비율의 동위체 이온에 대해 10% 이상의 비율을 가지는 모든 동위체 이온들을  $\pm 10$ ppm 추출 범위로 추출하여 합했습니다.

그림 2는 각 올리고뉴클레오타이드의 다중 전하 상태를 보여주는 질량 스펙트럼입니다. 올리고뉴클레오타이드의 길이에 따라 다중 전하 상태의 분포 형태가 달라지는 것을 볼 수 있습니다. 일반적으로 길어질수록 더 높은 전하 상태를 나타냅니다.

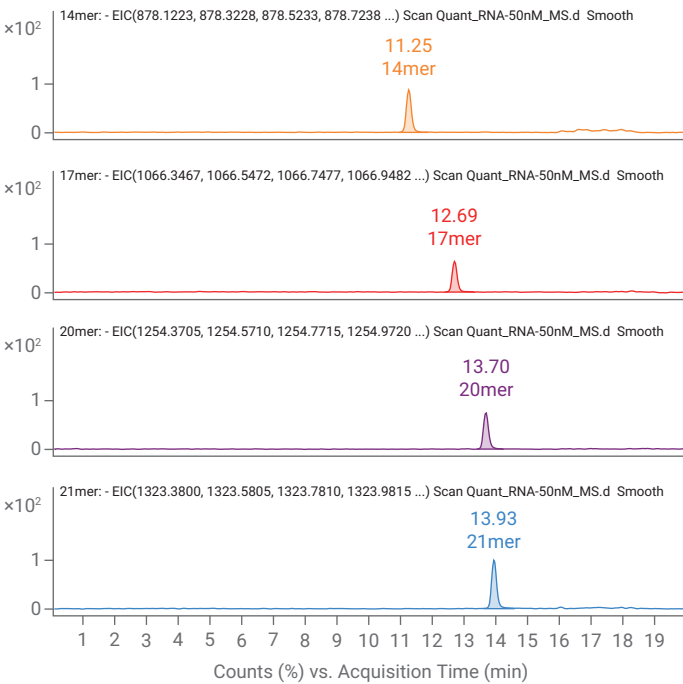


그림 1. 각 올리고뉴클레오타이드의 EIC(Extracted Ion Chromatogram).

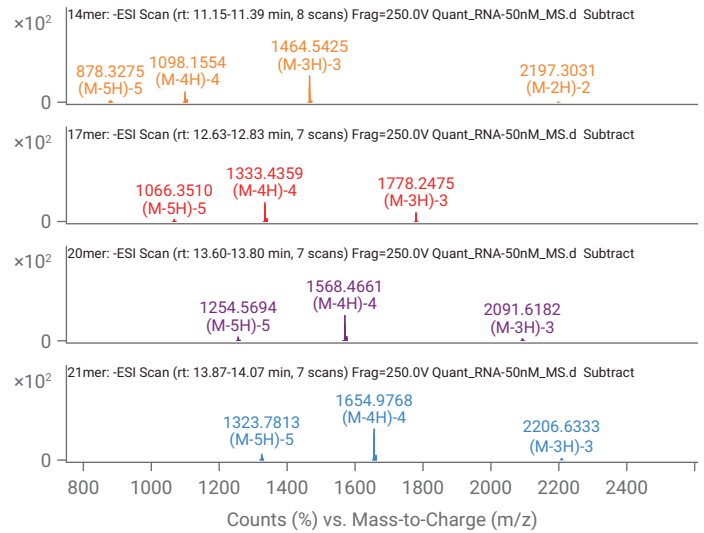
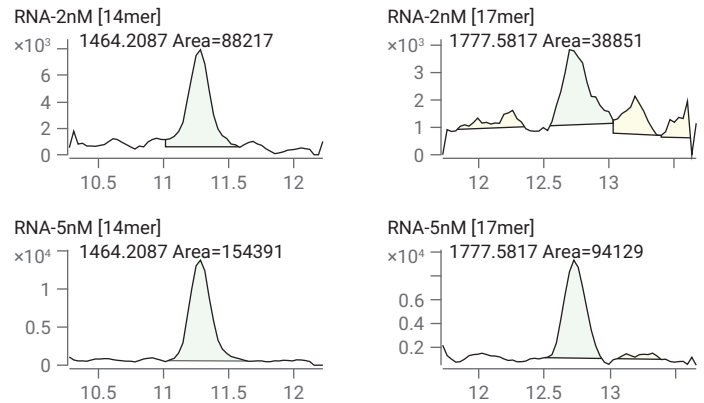


그림 2. 각 올리고뉴클레오타이드의 다중 전하 상태를 보여주는 질량 스펙트럼.

그림 3은 각각의 농도 표준품 시료에 포함된 올리고뉴클레오타이드의 크로마토그램(EIC)을 모두 기재한 것입니다. 위에서부터 아래로 2, 5, 10, 20, 50nM 농도이며 윗단은 14, 17mer이고 아랫단은 20, 21mer를 나타내고 있습니다. 2nM 농도까지 뚜렷하게 피크가 관찰되는 것을 확인할 수 있습니다.

그림 4는 정량을 위한 검량선을 그린 것입니다. Curve fit은 이차방정식으로, 가중치는  $1/x$ 로 설정하였습니다. 올리고뉴클레오타이드, 특히 단일 가닥의 RNA는 바이알이나 LC 시스템에 쉽게 흡착되는 문제가 있기 때문에 검량선이 직선이 아니라 곡선으로 나타나는 경우가 많습니다. 그림에서 보듯이 길이가 길어질수록 검량선이 더 크게 휘는 것을 확인할 수 있습니다. 그래서 올리고뉴클레오타이드를 정량할 때 Curve fit을 이차방정식으로 설정하기도 합니다.<sup>4</sup>



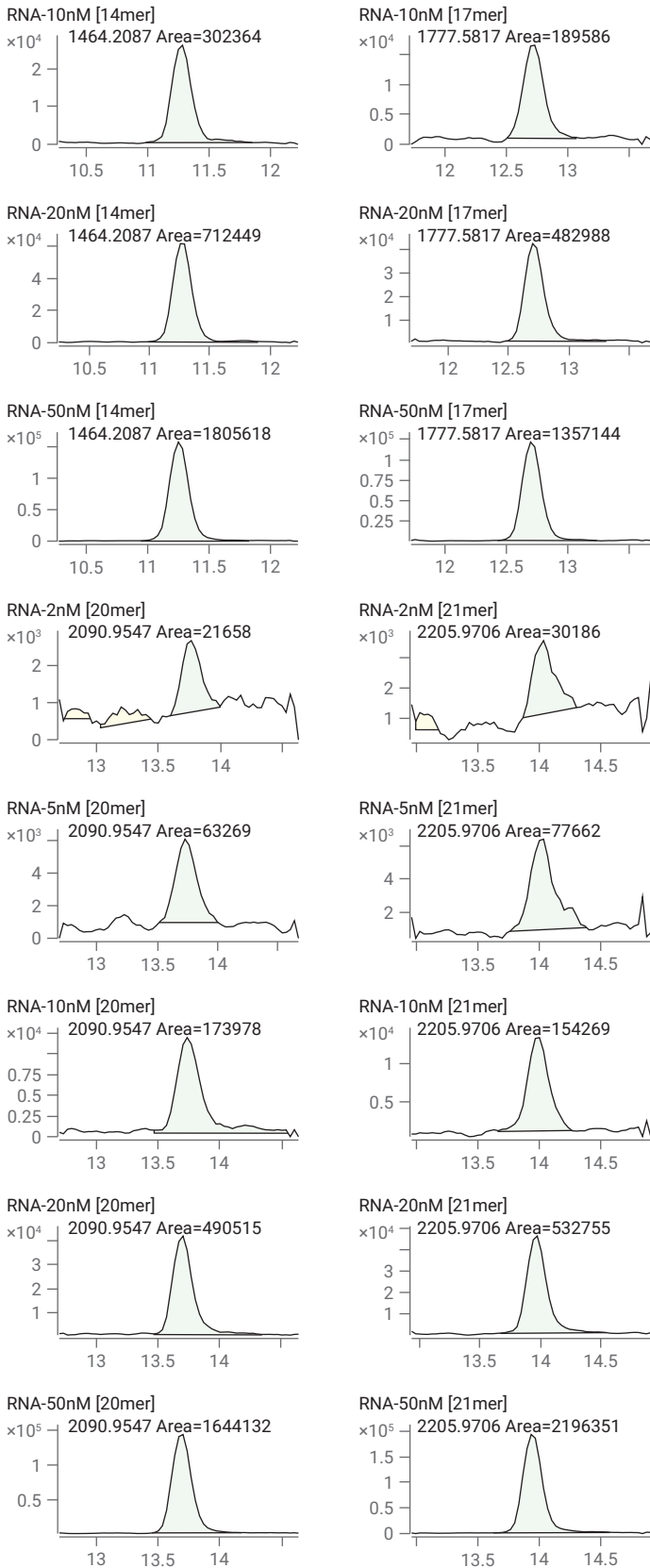


그림 3. 각 농도 별 올리고뉴클레오타이드의 크로마토그램(EIC).

각 검량선의 R<sup>2</sup>값은 0.996~0.998사이에 분포하는 것을 볼 수 있습니다.

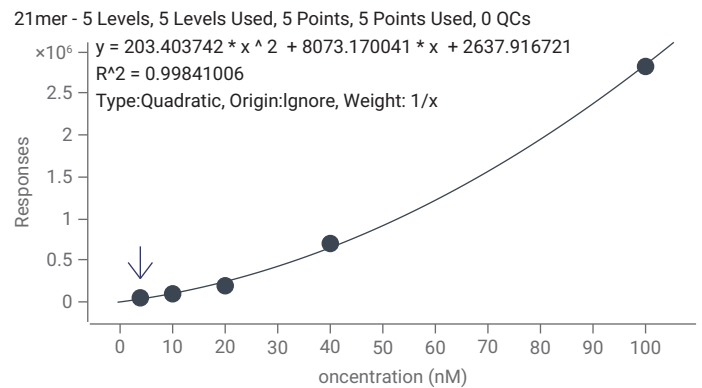
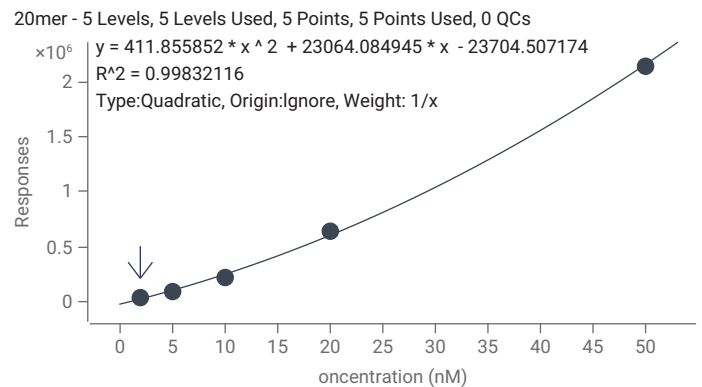
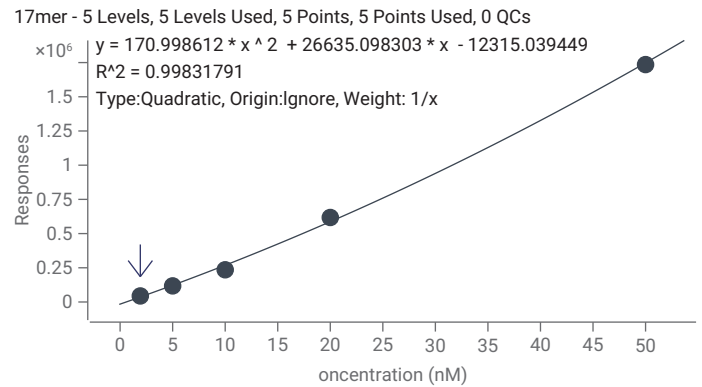
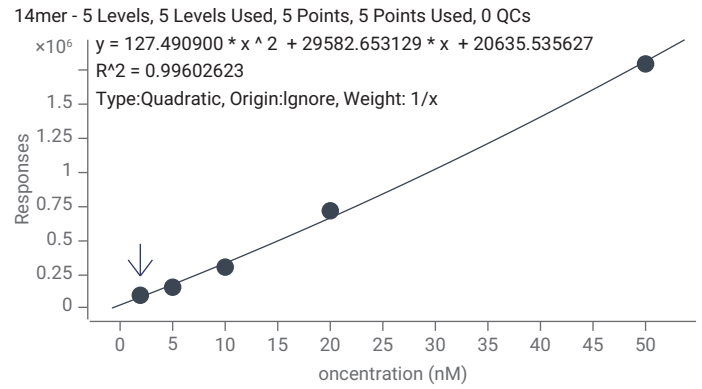


그림 4. 각 올리고뉴클레오타이드에 대한 검량선.

표 3은 표준품을 정량한 결과를 보여주고 있습니다. 표준품 농도별로 각 올리고뉴클레오타이드의 예상되는 농도(제조시에 만든 농도)와 측정된 농도 그리고 측정의 정확도를 기재하였습니다. 정확도는 88.4 ~ 113.1% 사이에 분포하고 있습니다.

표 3. 표준품 정량 결과.

시료명	14mer			17mer		
	예상 농도	측정 농도	정확도	예상 농도	측정 농도	정확도
RNA-2nM	2.00	2.26	113.1	2.00	2.05	102.7
RNA-5nM	5.00	4.44	88.7	5.00	5.11	102.2
RNA-10nM	10.00	9.16	91.6	10.00	9.11	91.1
RNA-20nM	20.00	21.41	107.1	20.00	20.84	104.2
RNA-50nM	50.00	49.70	99.4	50.00	49.85	99.7

시료명	20mer			21mer		
	예상 농도	측정 농도	정확도	예상 농도	측정 농도	정확도
RNA-2nM	2.00	2.21	110.3	4.00	4.47	111.8
RNA-5nM	5.00	4.67	93.5	10.00	9.67	96.7
RNA-10nM	10.00	9.19	91.9	20.00	17.67	88.4
RNA-20nM	20.00	20.97	104.8	40.00	41.91	104.8
RNA-50nM	50.00	49.85	99.7	100.00	99.77	99.8

표 4. 타겟 및 불순물 올리고뉴클레오타이드 서열 정보.

올리고뉴클레오타이드		서열	분자식	정확 질량
타겟	14mer	CACUGAAUACCAAU	C <sub>133</sub> H <sub>166</sub> N <sub>53</sub> O <sub>93</sub> P <sub>13</sub>	4395.6478
	17mer	UCACACUGAAUACCAAU	C <sub>161</sub> H <sub>201</sub> N <sub>63</sub> O <sub>114</sub> P <sub>16</sub>	5335.7669
	20mer	UCAUCACACUGAAUACCAAU	C <sub>189</sub> H <sub>236</sub> N <sub>73</sub> O <sub>135</sub> P <sub>19</sub>	6275.8861
	21mer	GUCAUCACACUGAAUACCAAU	C <sub>199</sub> H <sub>248</sub> N <sub>78</sub> O <sub>142</sub> P <sub>20</sub>	6620.9335
불순물	17mer-UCAC	ACUGAAUACCAAU	C <sub>124</sub> H <sub>154</sub> N <sub>50</sub> O <sub>86</sub> P <sub>12</sub>	4090.6066
	17mer-UC	ACACUGAAUACCAAU	C <sub>143</sub> H <sub>178</sub> N <sub>58</sub> O <sub>99</sub> P <sub>14</sub>	4724.7004
	20mer-UCAU	CACACUGAAUACCAAU	C <sub>152</sub> H <sub>190</sub> N <sub>61</sub> O <sub>106</sub> P <sub>15</sub>	5029.7416
	20mer-UC	AUCACACUGAAUACCAAU	C <sub>171</sub> H <sub>213</sub> N <sub>68</sub> O <sub>120</sub> P <sub>17</sub>	5664.8195
	21mer-AU	GUCAUCACACUGAAUACCA	C <sub>180</sub> H <sub>225</sub> N <sub>71</sub> O <sub>127</sub> P <sub>18</sub>	5969.8608

정량 분석에 이어 시료내에 포함된 불순물 올리고뉴클레오타이드 분석과 타겟 올리고뉴클레오타이드의 서열 확인을 위한 정성분석을 수행하였습니다. 정성분석을 위해서는 정확도를 높이기 위해 시료의 초기 농도(2uM)로 분석을 진행하였습니다. 표 4에서 타겟 올리고뉴클레오타이드의 서열과 분자식 정확 질량(exact mass)을 기재하였으며 더불어 검출된 불순물 올리고뉴클레오타이드에 대한 정보도 같이 기재하였습니다.

2uM 농도의 시료로 분석한 타겟과 시료에 포함된 불순물 올리고뉴클레오타이드의 deconvoluted 스펙트럼을 그림 5에서 확인할 수 있습니다. 6000Da 내외의 질량값을 가지는 물질들이지만 고분해능 Q-TOF에서 동위체들이 모두 분리되어 검출되었으며 정확한 질량에 해당하는 가장 앞에 나오는 동위체의 검출된 질량값이 이론값에 가깝게(5ppm 내외의 오차) 나오는 것을 볼 수 있습니다.

타겟 및 불순물 올리고뉴클레오타이드에 대한 크로마토그램 (EIC)은 그림 6에서 확인할 수 있습니다. 타겟 물질들 사이에서 불순물 피크들이 분포하며 EIC를 통해 서로 구별되게 확인이 가능합니다.

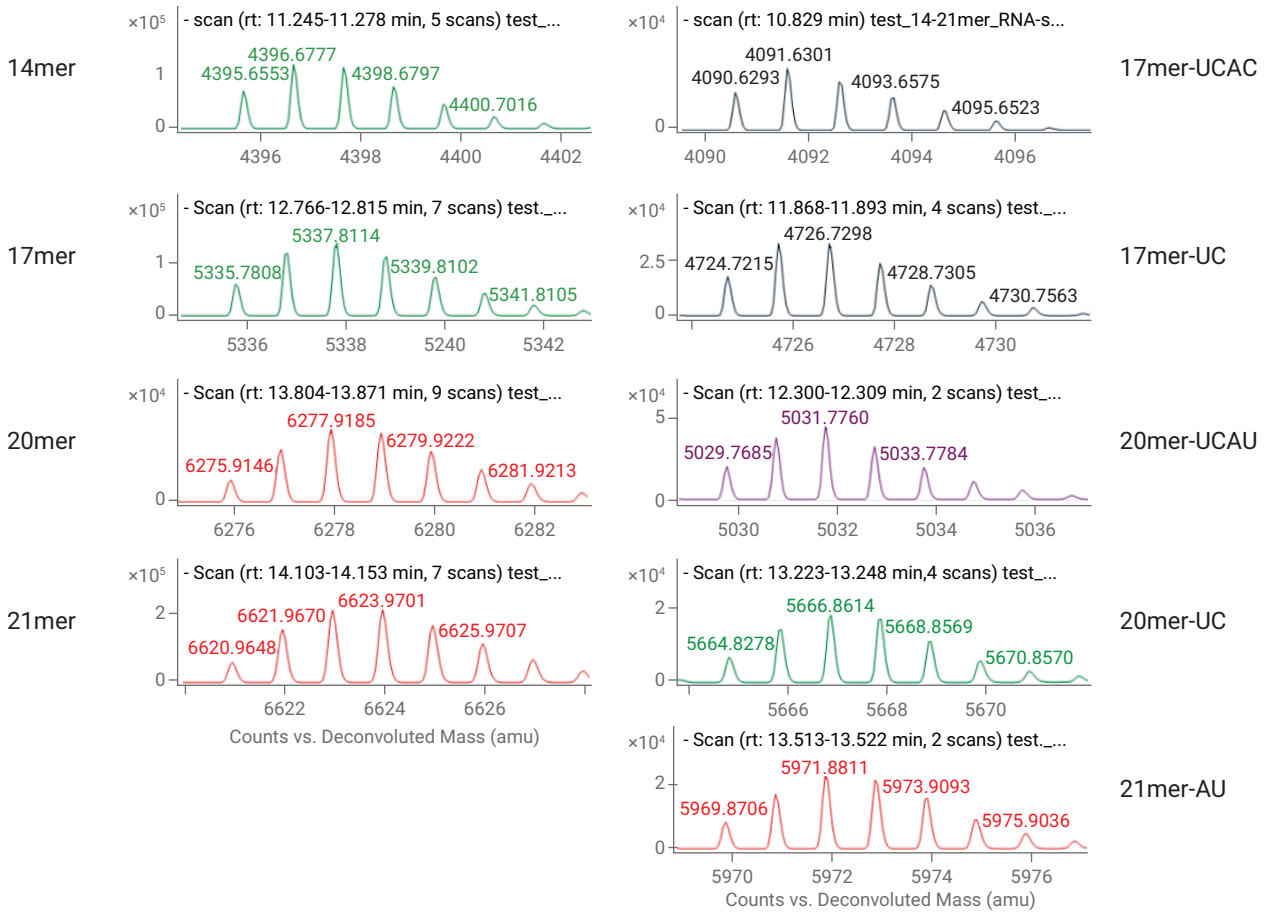


그림 5. 타겟 및 불순물 올리고뉴클레오타이드에 대한 deconvoluted 스펙트럼.

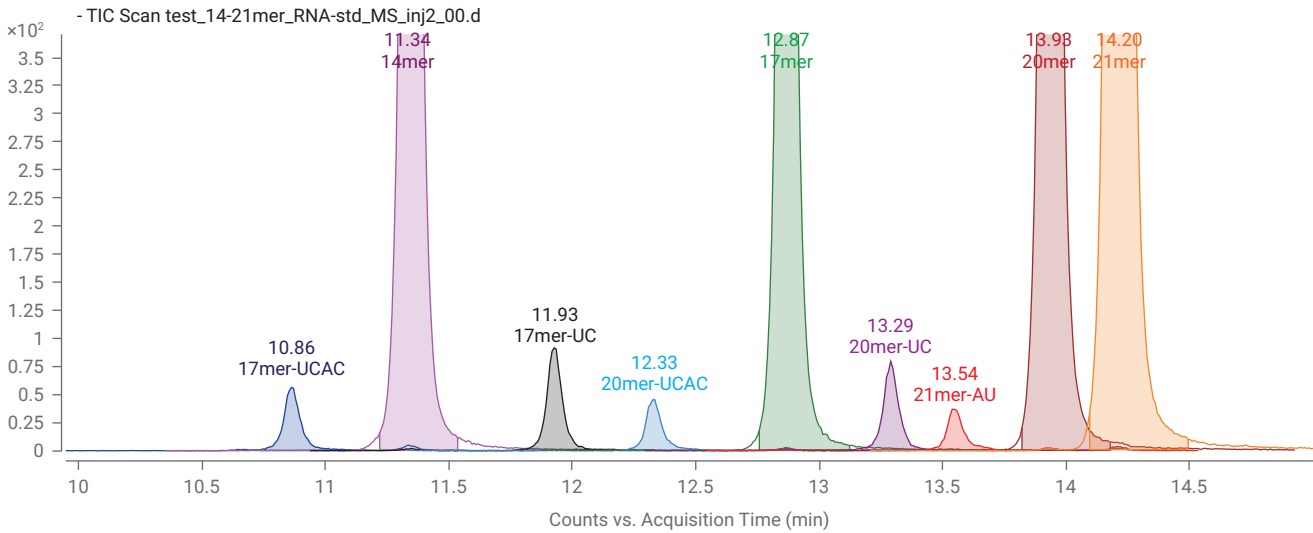


그림 6. 타겟 및 불순물 올리고뉴클레오타이드에 대한 크로마토그램(EIC).

또한 MSMS 스펙트럼으로부터 각 올리고뉴클레오타이드의 서열을 확인하는 작업을 수행하였습니다. 질량 분석기를 이용하여 올리고뉴클레오타이드 서열을 확인하는 원리는 MSMS 조건에서 조각 이온이 특정 패턴을 보이며 생성되는 현상을 이용합니다.<sup>5-6</sup> 이러한 특징적인 패턴의 조각 이온들을 a, b, c, d, w, x, y, z 이온이라고 부릅니다. 주어진 서열에서 예상되는 조각 이온 값과 실제 분석하여 얻은 조각 이온값을 비교하여 이론적인 서열에 부합하는 결과가 얻어졌는지 확인할 수 있습니다. 본 응용자료에서는 서열 확인 작업을 위해서 Protein Metrics 사의 소프트웨어인 BYOS를 사용하였습니다.

그림 7에서 보는 바와 같이 MSMS 스펙트럼 상에 있는 조각 이온값에 a, b, c, d, w, x, y, z 이온들이 표지되어 있습니다. 올리고뉴클레오타이드 서열 상의 위치와 전하 상태 정보까지 포함되어 있으며 창을 확대하면 촘촘하여 보이지 않던 표지들도 드러나게 됩니다. 우측 상단에 서열 정보 아래위로 빨간 꺾쇠와 파란 꺾쇠가 표시되어 있는데 이는 확인된 조각이온들의 커버리지(coverage)를 뜻합니다. 빨간색은 확인된 w, x, y, z 이온을 나타내고 파란색은 확인된 a, b, c, d 이온을 나타냅니다. 중간에 꺾쇠가 비어 있는 위치에서는 확인된 이온이 없음을 의미합니다. a, b, c, d 이온들과 w, x, y, z 이온들을 상호 보완하여 전반적으로 볼 때 100%의 커버리지를 나타내는 것을 알 수 있습니다.

## 결론 및 고찰

Agilent의 고분해능 질량 분석기인 LC-QTOF(6545XT)와 데이터 처리를 위한 소프트웨어인 MassHunter Qualification, BioConfirm 그리고 Protein Metrics 사의 BYOS를 사용하여 올리고뉴클레오타이드의 정량 및 정성 분석 가능 여부를 검토하였습니다.

정량분석으로는 2nM 수준까지 올리고뉴클레오타이드의 정량이 가능하였고, 물질의 특성상 검량선이 휘어지는 경향이 나타나 이차방정식의 curve fit을 사용하였으며 일반적으로 용인되는 80~120% 범위 이내인 89~113% 범위의 측정 정확도를 얻었습니다. 정성분석으로는 타겟 및 불순물의 이론적인 질량값을 deconvoluted 스펙트럼을 통해 5ppm 내외의 오차로 측정할 수 있었으며, MSMS 스펙트럼을 이용하여 4종의 타겟 올리고뉴클레오타이드의 서열 확인 작업을 수행하였을 때 100% 커버리지를 얻을 수 있었습니다.

위의 분석 내용을 종합적으로 볼 때 본 응용 자료에서 제시하는 분석법으로 20mer 내외의 올리고뉴클레오타이드의 정성/정량 분석이 가능함을 확인하였으며 상기 분석법이 향후 의약품 및 연구용 올리고뉴클레오타이드의 품질 관리 및 연구 개발에 기여할 것으로 기대합니다.

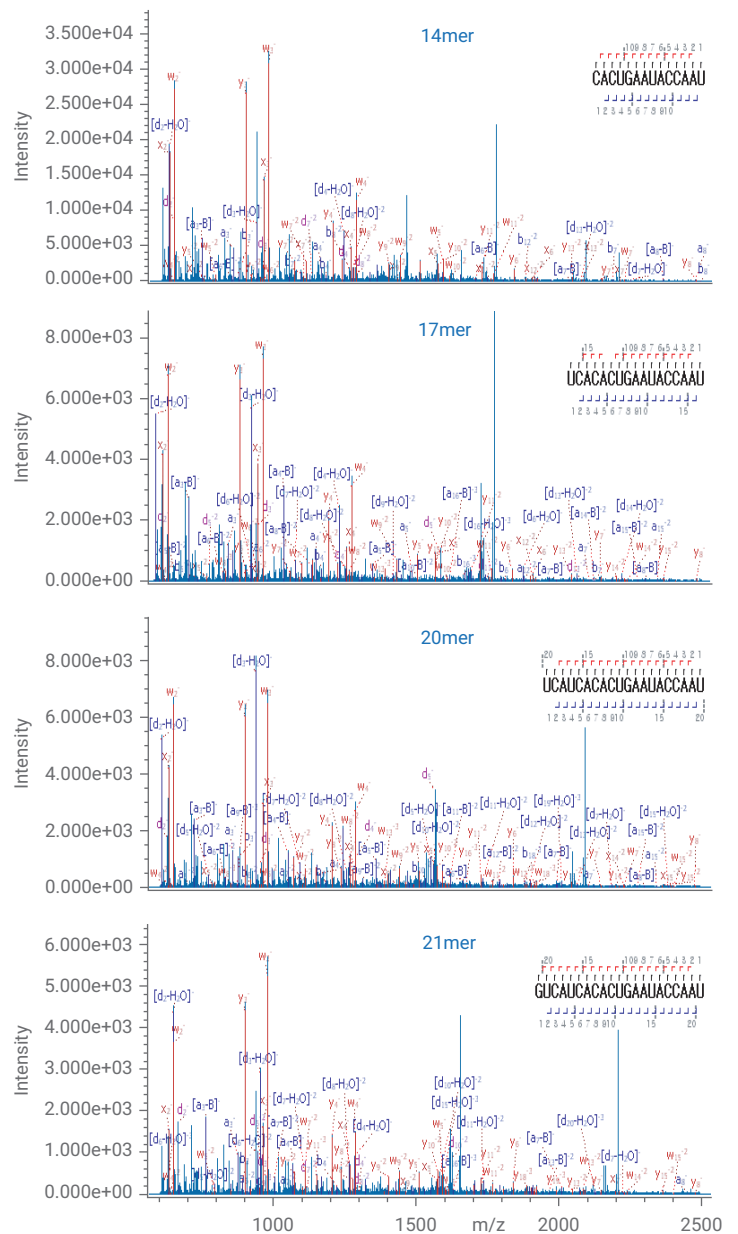


그림 7. 각 올리고뉴클레오타이드의 서열 확인 결과.

## 참고 문헌

1. FDA approves first-of-its kind targeted RNA-based therapy to treat a rare disease. FDA NEWS RELEASE. August 10. 2018.
2. Babak Basiri, Michael G Bartlett. LC-MS of Oligonucleotides: applications in biomedical research. Bioanalysis. 2014, 6(11), 1525-1542.
3. Gerd Vanhoenacker, et al. Evaluation of Different Ion-Pairing Reagents for LC/UV and LC/MS Analysis of Oligonucleotides, Agilent Technologies application note, publication number 5994-2957EN, 2021.
4. Lakshmi Ramanathan, Helen Shen. LC-TOF-MS methods to quantify siRNAs and major metabolite in plasma, urine and tissues. Bioanalysis. 2019, 11(21), 1983-1992.
5. Robert L. Ross, et al. Mapping Post-Transcriptional Modifications onto Transfer Ribonucleic Acid Sequences by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Biomolecules. 2017, 7, 21.
6. Ning Zhang, et al. A general LC-MS-based RNA sequencing method for direct analysis of multiple-base modifications in RNA mixtures. Nucleic Acids Research, 2019, Vol. 47, No. 20.

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

DE68491779

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

©Agilent Technologies, Inc. 2022  
2022년 4월 29일, 한국에서 발행  
5994-4883KOKR

한국에질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,  
A+ 에셋타워 9층, 06621  
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)  
팩스: 82-2-3452-2451  
이메일: [korea-inquiry\\_lsca@agilent.com](mailto:korea-inquiry_lsca@agilent.com)