

## Agilent Pro iQ Plus에서 이온쌍 대체 방법을 사용한 올리고뉴클레오타이드 분석



### 저자

Lee Bertram 및 Brian Rivera  
Agilent Technologies, Inc.

### 개요

이 응용 자료에서는 Agilent InfinityLab Pro iQ Plus LC/MS 시스템을 사용하여 합성 올리고뉴클레오타이드 분자를 중간에서 고처리량으로 확인하기 위한 실용적인 접근 방식을 제시합니다. 기존의 이온쌍 역상 LC/MS 분석법에는 전용 기기와 독성이 강하고 값비싼 시약이 필요한 경우가 많습니다. 이와 대조적으로, 여기서 설명한 분석법은 중탄산 암모늄 기반의 방법을 사용하여 이온쌍 시약의 필요성을 없애는 동시에 충분한 크로마토그래피 머무름과 MS 감도를 유지합니다. Agilent OpenLab CDS MS spectral deconvolution은 데이터 분석 워크플로를 간소화하여 최소한의 최적화로 자동 처리를 가능하게 합니다. 이 접근 방식은 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 siRNA를 포함한 다양한 올리고뉴클레오타이드 유형에 대해 견고한 LC/MS 성능을 제공합니다.

## 소개

올리고뉴클레오타이드는 mRNA를 억제하거나 분해함으로써 유전자 발현을 표적으로 삼고 조절하는 새로운 치료법입니다. mRNA 표적이 식별되면 전략적으로 도입된 화학적 변조를 통해 안티센스 서열을 최적화하여 약물동태학<sup>1</sup> 및 친화도를 개선하고 오프타겟팅 또는 불일치를 최소화<sup>2</sup>해야 합니다.

이온쌍 역상 LC/MS는 일반적으로 표적 올리고 서열의 분자량을 확인하여 합성이 잘 되었는지를 보장하는 데 사용됩니다. 그러나 알킬아민을 이온쌍 시약으로 사용하려면 전용 측정 기기가 필요한 경우가 많습니다. 더욱이, 최적의 크로마토그래피 분리과 MS 감도를 위해서는 HFIP(hexafluoroisopropanol)와 같은 독성이 강하고 비용이 많이 드는 과불화알코올이 필요합니다.

이 응용 자료에서는 올리고뉴클레오타이드의 분자 확인을 위해 대체 역상 방법을 사용했습니다. 이 분석법은 이온쌍 시약 대신 중탄산 암모늄을 사용하면서도 충분한 크로마토그래피 머무름과 MS 감도를 제공합니다. 분석법의 적용 가능성과 재현성을 보장하기 위해 3종류의 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 20회 반복 주입하고 하나의 siRNA를 5회 반복 주입했습니다.

## 실험

### 기기 구성

이 실험은 다음의 기기 구성을 사용하여 수행했습니다.

- Agilent InfinityLab Pro iQ Plus LC/MS 시스템(G6170A)
- Agilent Infinity II 1290 Bio Binary 펌프(G7120A)
- Agilent Infinity II 1290 Bio 멀티샘플러(G7167B)
- Agilent Infinity II 1290 Bio 컬럼 장치(G7116B)
- Agilent Infinity II 1260 다이오드 어레이 검출기 HS(G7117C)

이 분석에서는 Infinity II LC 구성을 사용했지만, 분석법 파라미터를 변경하지 않고 Infinity III LC 시스템에서도 비슷한 결과를 얻을 수 있습니다.

### 시료 전처리

모든 시료는 50µM 농도가 되도록 탈이온수(DI)에 재현탁하여 -80°C에 보관했습니다. 시료는 폴리프로필렌 바이알에 옮겨 담고 온도 조절이 되는 자동 시료 주입기에 최대 2일간 보관했습니다. 올리고뉴클레오타이드 시료의 서열은 표 1에 나와 있습니다.

표 1. 올리고뉴클레오타이드 시료의 서열.

올리고뉴클레오타이드 명칭	길이	서열
ASO-1	18	dU/MOErC//MOErA//MOErC/dUdUdU/MOErC//MOErA/dU/MOErA//MOErA/dU/MOErG/CdU/MOErG/G
ASO-2	20	dU/MOErC/dUdU/MOErG/TT/MOErA//MOErC//MOErA//MOErT//MOErG//MOErA//MOErA//MOErA/dU/MOErC//MOErC//MOErC/C
Fomivirsen	21	G*C*G*T*T*T*G*C*T*C*T*T*C*T*T*T*G*C*G
Givosiran	22 S	mC*mA*mGmAmAmAfGmAfGmUfGmUfCmUfCmA mUmCmUmUmA/L96/
	23 AS	mU*mG*mGfUmCfUmUfUfCmUfCfAmCfAmGfAmGf UmAmGfA*fA*mU

코드	설명
/MOErA/	Methoxyethoxy A
/MOErC/	Methoxyethoxy C
/MOErT/	Methoxyethoxy T
/MOErG/	Methoxyethoxy G
dU	Deoxyuridine
fA	2-fluoroadenosine
fC	2-fluorocytidine
fG	2-fluoroguanidine
fU	2-fluorouridine
*	Phosphorothioate bond
A	2'-deoxyribose adenine
C	2'-deoxyribose cytosine
G	2'-deoxyribose guanine
T	2'-deoxyribose thymine
mA	2'-O-methyl A
mC	2'-O-methyl C
mG	2'-O-methyl G
mU	2'-O-methyl U
rA	Ribose adenine
rC	Ribose cytosine
rG	Ribose guanine
rU	Ribose uracil

## LC/MS 분석

Pro iQ Plus 시스템의 소스 파라미터는 표 2에 나와 있고, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 파라미터는 표 3에 나와 있습니다.

표 2. Agilent Pro iQ Plus 시스템의 소스 파라미터.

질량 분석법 파라미터	
파라미터	값
MS	Agilent Pro iQ Plus
소스	Agilent Jet Stream Electrospray Ionization(AJS-ESI) 소스
건조 가스 유량	13.0L/분
가스 온도	300°C
네블라이저 압력	35psi
캐필러리 전압	3,000V
Sheath 가스 온도	250°C
Sheath 가스 유량	11mL/분
노즐 전압	1,500V
모드	Positive
스캔	m/z 700–2,800
스캔 시간	1,250ms
Fragmentor	180V
Gain Factor	5

표 3. 사용된 HPLC 파라미터.

파라미터	값														
컬럼	Agilent AdvanceBio oligonucleotide column, 2.1 × 50mm, 2.7µm														
샘플러 온도	8°C														
UV 검출	260/4nm (Ref 360/20nm) Peak width > 0.1min (2.5Hz)														
이동상 A	20 mM ammonium bicarbonate in DI water														
이동상 B	메탄올														
유량	0.7mL/분														
주입량	2µL														
Multiwash	20:80 물:메탄올; flush port; 5초 90:10 물:메탄올; flush port; 3초														
컬럼 온도	75°C														
Post Time	1.0분														
그라디언트 프로그램	<table> <tr> <td>시간(분)</td><td>%B</td></tr> <tr> <td>0</td><td>5</td></tr> <tr> <td>0.1</td><td>5</td></tr> <tr> <td>3.0</td><td>40</td></tr> <tr> <td>3.1</td><td>80</td></tr> <tr> <td>3.5</td><td>80</td></tr> <tr> <td>3.6</td><td>5</td></tr> </table>	시간(분)	%B	0	5	0.1	5	3.0	40	3.1	80	3.5	80	3.6	5
시간(분)	%B														
0	5														
0.1	5														
3.0	40														
3.1	80														
3.5	80														
3.6	5														

## 결과 및 토의

1997년에 개발된, 산성 조절제로서 퍼플루오르화 알코올을 함유하는 알킬아민 이온쌍은 올리고뉴클레오타이드의 LC/MS 분석에서 선호되는 이동상입니다.<sup>3</sup> 이는 크로마토그래피 성능과 전기분무 이온화 효율이 우수하기 때문이며, 아세트산염을 상대 이온으로 사용하는 이동상과 비교했을 때 특히 그렇습니다. 광범위한 연구를 통해 이 강력한 이온쌍 시스템을 사용하면 넓은 실험 설계 범위가 가능하다는 점도 추가적으로 입증되었습니다.<sup>4</sup>

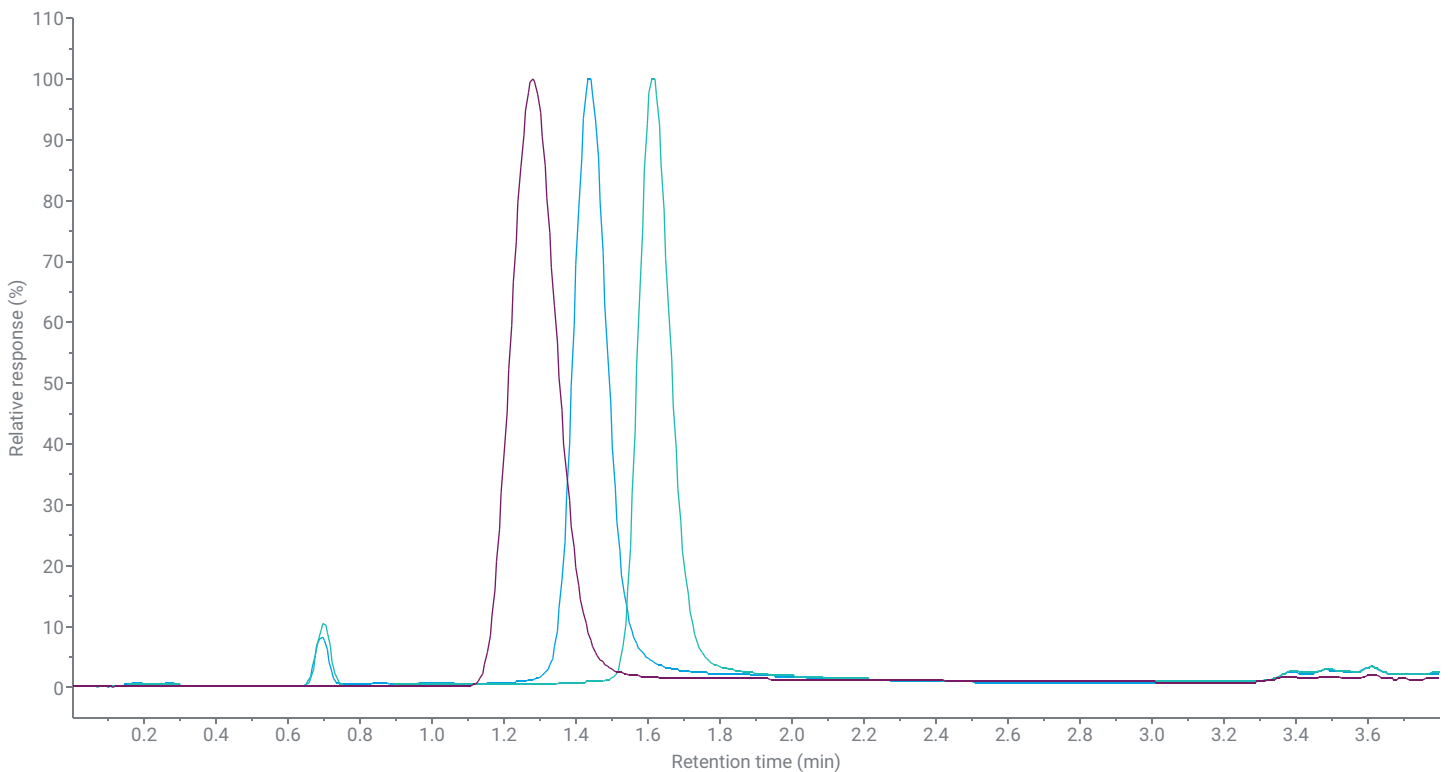
그러나 LC/MS 분석법에 알킬아민과 HFIP를 사용하면 몇 가지 문제가 발생합니다. 첫째, 올리고 서열 및 화학적 변형에 따라 전기분무 탈착과 크로마토그래피에 영향을 미치기 때문에 완충액 성분의 최적화가 필요합니다.<sup>5</sup> 두 번째로, 알킬아민은 이온화원과 LC 시스템을 오염시킬 수 있으며, 이로 인해 극성이 양전하 모드로 전환되면 백그라운드 피크가 발생할 수 있습니다. 따라서 LC 구성 요소와 이온화원 표면에 대한 광범위한 세척/부동태화가 필요합니다. 그럼에도 불구하고, 일부 실험실에서는 알킬아민의 흡착 문제로 인해 LC/MS 시스템을 음전하 모드 전용으로 사용하기도 합니다. 마지막으로, 알킬아민을 함유한 이동상은 아르곤 가스로 밀봉하여 보관하지 않으면 보관 수명이 짧기 때문에 일관된 분석법 성능을 보장하기 위해서는 이동상을 때로 매일 새로 만들어야 합니다.

많은 올리고를 분석하여 분자량 확인 워크플로를 수행하는 실험실의 경우, 이동상 조건을 최적화하기가 불가능할 수 있습니다. 또한, 기기 유지보수와 완충액의 일상적 준비로 인한 LC/MS 가동 중단으로 인해 시료가 제 때 처리되지 못하는 경우가 있는데, 이는 많은 실험실에서 상당한 문제가 될 수 있습니다. 따라서 보다 실용적인 접근 방식은 이온쌍 시약을 사용하지 않는, 역상 방법을 사용하는 것입니다.

최근 연구에서는 중탄산 암모늄(NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 완충액과 메탄올을 강용매로 사용하여 이온쌍에 대한 보다 실용적이고 비용 효율적인 대안을 제시합니다.<sup>6</sup> 이 방법은 이동상과 그라디언트를 최소한으로 최적화하더라도 ESI 감도와 크로마토그래피 성능이 충분히 확보되므로 분자량 확인에 유리합니다. 또한, 이 해당 문헌에서는 이산화탄소의 가스 방출이 물방울 형성을 촉진하고, 암모니아의 증발이 양성자 부가에 기여하여 양이온 모드 분석이 가능하다고 설명합니다. 따라서 시스템을 음이온 모드 분석 전용으로 운영할 필요가 없습니다.

올리고뉴클레오타이드는 극성이고 음전하를 띠기 때문에, 이온쌍 시약 없이는 이러한 분석 물질이 크로마토그래피적으로 유지되거나 분리되지 않을 수 있다는 우려가 있을 수 있습니다. 그러나 중탄산 암모늄 기반 분석법은 광범위한 올리고뉴클레오타이드를 유지하고 안티센스 올리고와 같은 변형된 올리고에서 특히 우수한 성능을 보입니다(ASO, 그림 1). 여기서 소개하는 분석법은 중간에서 고처리량 분석에 대한 개념 입증을 제공합니다. 이에 따라 그레디언트는 3분 동안 이동상 B를 5%에서 40%까지 증가시킵니다. 비교적 “급격한” 이 그레디언트는 뛰어난 머무름과 피크 모양을 제공하며, 0.7mL/분의 유량은 스펙트럼 품질이나 감도에 부정적인 영향을 미치지 않습니다.

여러 개의 이온화 가능한 작용기를 가진 대부분의 고분자와 마찬가지로 올리고는 ESI-MS로 분석하면 다중 전하 이온으로 나타납니다. 중요한 점은 알킬아민 이온쌍과 소스 파라미터에 따라 올리고의 전하 상태 분포가 달라질 수 있다는 것입니다.<sup>7</sup> 이는 가열된 이온화원의 경우 더 높은 전하 상태가 나타나는 경향이 있어 문제가 될 수 있습니다. 결과적으로, 스펙트럼의 deconvolution 시 이로 인해 오류와 잠재적으로 잘못된 식별로 이어질 수 있습니다. 반면, 중탄산 암모늄(ABC)은 낮은 전하 상태의 올리고를 생성하는 경향이 있습니다(그림 2).  $m/z$  값이 높을수록 매트릭스 간섭, 불순물 또는 기타 성분과의 스펙트럼 중첩이 적어 분석된 데이터의 신뢰도가 향상됩니다.



**그림 1.** 3개의 안티센스 올리고(ASO)에 대한 UV 크로마토그램. Fomivirsen은 2'-변형이 없는 21mer ASO입니다. 따라서 이 물질은 두 개의 더 짧고 완전히 티오화된 2'-변형 ASO 보다 일찍 용출됩니다.

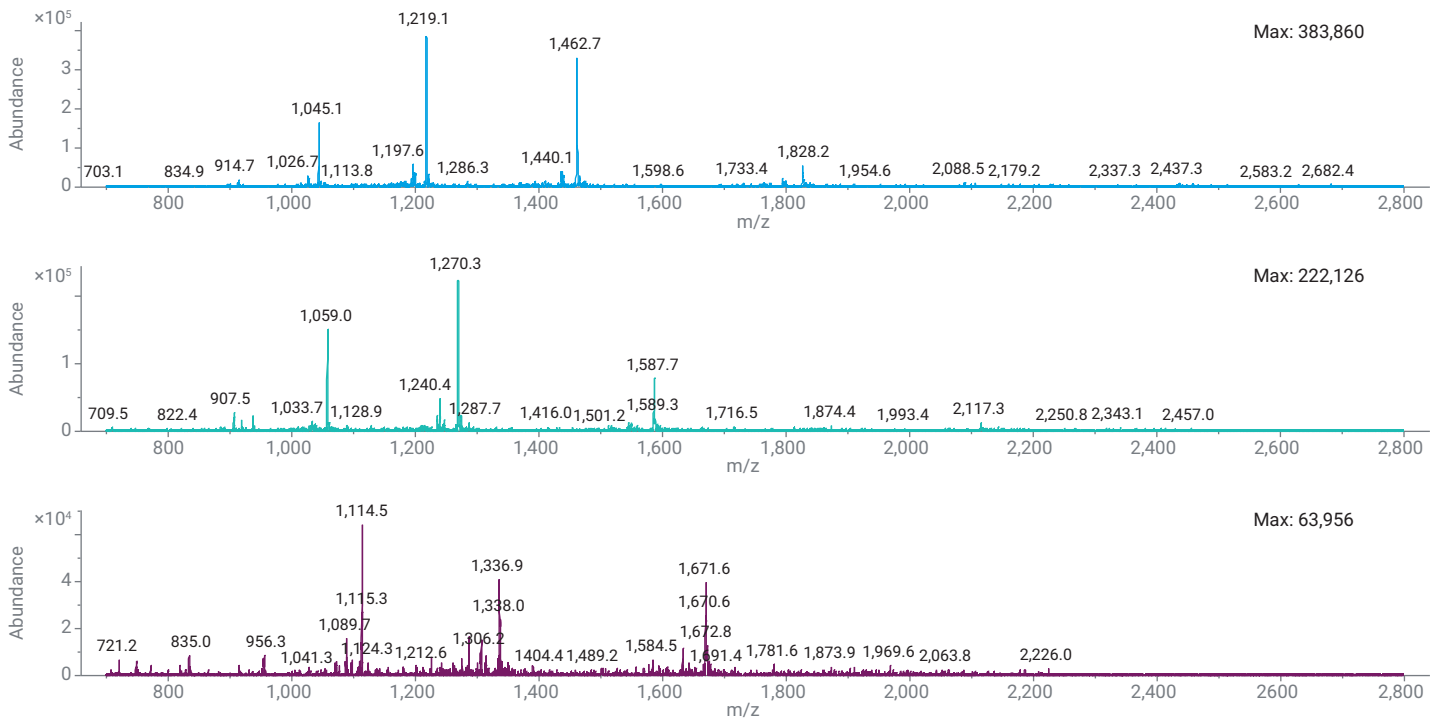


그림 2. 시료에 대한 전체 스캔 스펙트럼. 각 ASO에 대해 4에서 6의 전하 상태가 지배적입니다.

Agilent OpenLab CDS는 단위 질량 검출기에 최적화된 고유한 spectral deconvolution을 사용합니다. 최대 엔트로피는 노이즈를 최소화하면서 지배적인 특징을 증가시켜 스펙트럼에서 가장 가능성 있는 질량을 계산합니다. 이와 대조적으로, OpenLab CDS의 spectral deconvolution은 스펙트럼에서 이온을 단순 식별하고, 사용자 입력을 기반으로 이를 표적 질량과 일치시킵니다. 그런 다음 이러한 값을 선형 회귀에 적용하거나 중심화하여 분자량 평균을 계산합니다. 이러한 단순한 접근 방식은 일반적인 프로세싱 방법을 사용하여 분자량을 쉽게 확인할 수 있게 하며, 최소한의 최적화로 완전 자동화를 가능하게 합니다. 각 시료를 3회 주입한 결과는 거의 동일하며, 상대 표준 편차(%RSD)가 0.1% 미만으로 나타납니다. 데이터 수집에 사용된 자동 deconvolution 설정은 표 4에 나와 있고, deconvolution 결과 요약은 표 5에 나와 있습니다.

표 4. MS spectral deconvolution 설정.

파라미터	값
<b>Automatic Deconvolution Settings</b>	
Run Automatic Deconvolution	Enabled
RT Window	1-2.7분
TIC Peak Type	All peaks
TIC Top (n) Peaks	3
<b>Basic Settings</b>	
Use m/z Range	Disabled
Low/High Molecular Weight	3,000~10,000
Maximum Charge	10
Minimum Peaks in Set	3
<b>Advanced Settings</b>	
MW Agreement (0.01%)	10
Absolute Noise Threshold	100
Relative Abundance Threshold	10
MW Algorithm	Curve fit
MW Algorithm Threshold (%)	40
Envelope Threshold (%)	50

그림 3은 2'-MOE 변형이 포함된 18mer phosphorothioate인 ASO-1의 deconvoluted 스펙트럼을 보여줍니다. 성분 A는 전체 길이 생성물로 계산된 질량과 잘 일치합니다. 성분 B는 탈퓨린화(구아닌 손실)일 가능성이 높습니다. 성분 C는 나트륨 부가물로 추정됩니다. 이와 같이, 단위 질량 정확도와 단순한 deconvolution을 결합한 InfinityLab Pro iQ Plus는 올리고뉴클레오타이드를 모니터링하고 예상치 못한 불순물이나 성분을 식별할 수 있습니다. 추가적인 특성 규명은 고분해능 MS를 통해 수행할 수 있습니다.

표 5. 각 ASO의 20회 반복에 대한 deconvoluted 결과.

올리고뉴클레오타이드 명칭	계산된 질량(Da)	평균 측정 질량(Da)	Delta Mass (Da)
ASO-1	6,348.3	6,347.9	-0.4
ASO-2	7,309.2	7,308.8	-0.4
Fomivirsen	6,682.4	6,681.8	-0.6

이 분석법의 폭넓은 적용 가능성을 입증하기 위해 이중 tri-antennary GalNAc- conjugated siRNA(Givosiran)도 분석했습니다. 이중 접합체의 경우 LC/MS 파라미터에 약간의 수정이 필요했습니다. 구체적으로는, 센스 및 안티센스 가닥의 베이스라인 분리를 보장하기 위해 그레디언트 프로그램을 약간 조정했습니다(3분 동안 5%에서 45%로). 또한, 취약한 올리고당 접합체의 소스 내 조각화를 최소화하기 위해 fragmentor 전압을 120V로 낮추었습니다. 그림 4는 Givosiran을 5회 주입한 UV 크로마토그램을 오버레이시킨 모습입니다.

이온쌍 시약을 사용하지 않았음에도, ABC 이동상은 여전히 센스 및 안티센스 가닥의 베이스라인을 분리했습니다(그림 5). 이러한 분리가 필요한 이유는 스펙트럼이 겹치면 deconvolution에서 잘못된 식별이 발생할 수 있기 때문입니다. 그림 5는 이전에 언급한 ASO와 유사한 전하 상태 분포를 갖는 스펙트럼을 보여줍니다. 각 피크의 deconvoluted 스펙트럼을 분석한 결과, 안티센스 가닥이 센스 가닥보다 일찍 용출되는 것으로 나타났습니다. 흥미롭게도, 센스 가닥은 GalNAc 손실이 나타나는 경향을 관찰했습니다(그림 6). Givosiran의 분석 결과 요약은 표 6에 나와 있습니다.

표 6. 각 Givosiran 주입에 대한 deconvoluted 결과.

올리고뉴클레오타이드 명칭	계산된 질량(Da)	평균 측정 질량(Da)	Delta Mass (Da)
Givosiran, Antisense	7,563.8	7,563.1	0.7
Givosiran, Sense	8,736.5	8,735.6	0.9

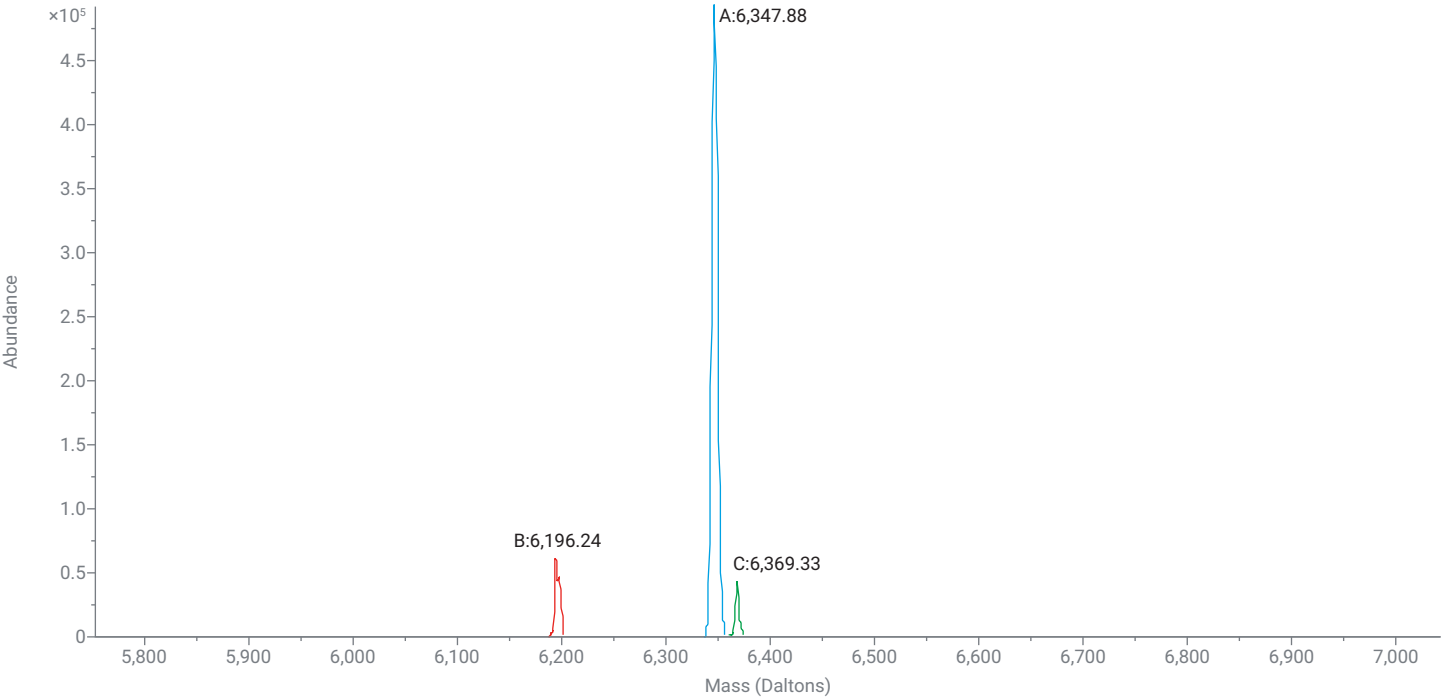


그림 3. ASO-1의 deconvoluted 스펙트럼.

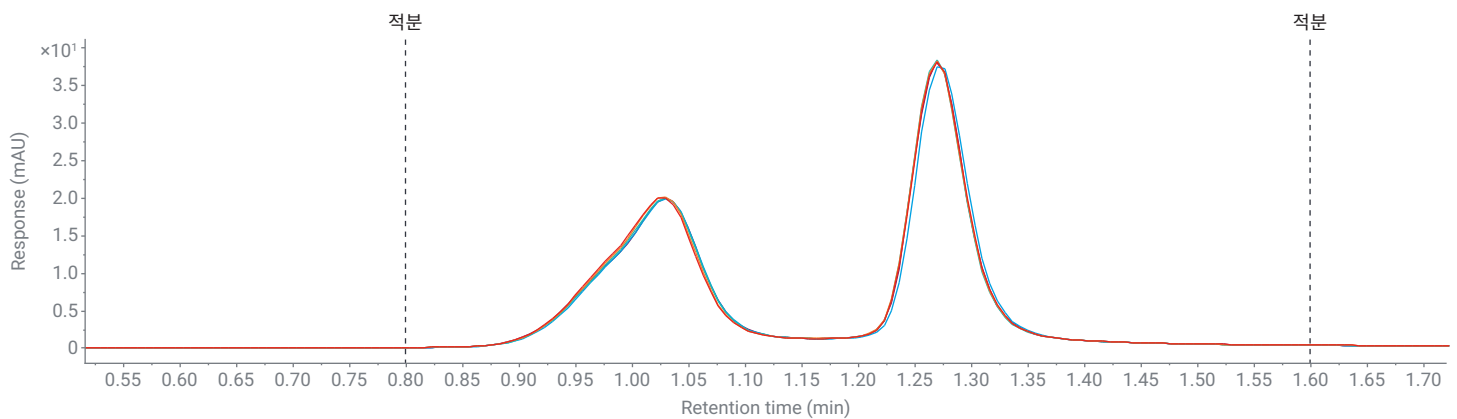


그림 4. Givosiran 5회 주입에 대한 UV 크로마토그램의 오버레이.

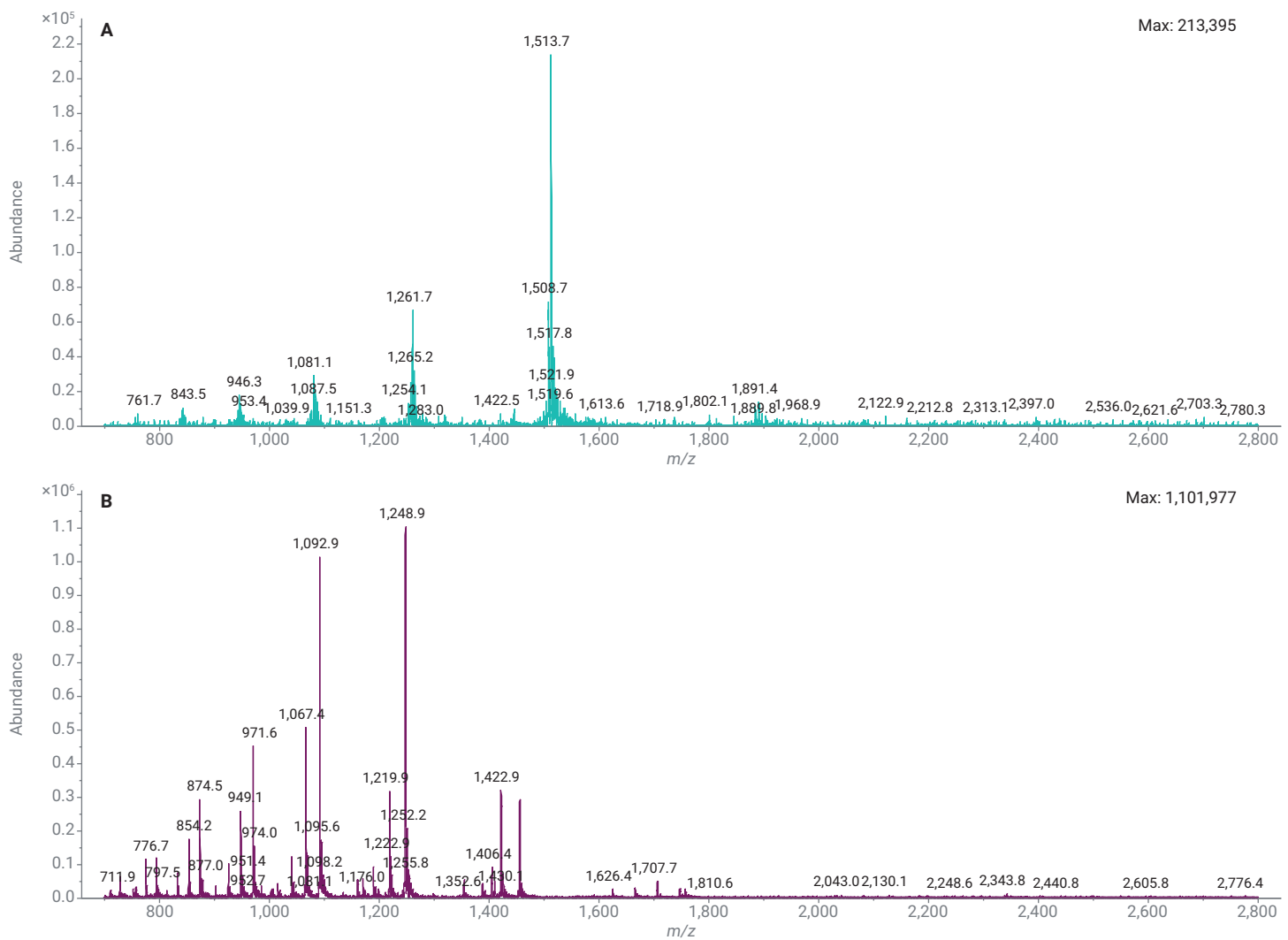


그림 5. 안티센스(A)와 센스(B) RNA 가닥의 스펙트럼. 전하 상태 분포는 비슷한 방법을 사용하여 분석한 안티센스 올리고의 분포와 유사합니다. 안티센스의 경우 5- 전하 상태가 가장 풍부하고, GalNAc이 결합된 센스 가닥에서는 6- 전하 상태가 가장 풍부하게 나타납니다.

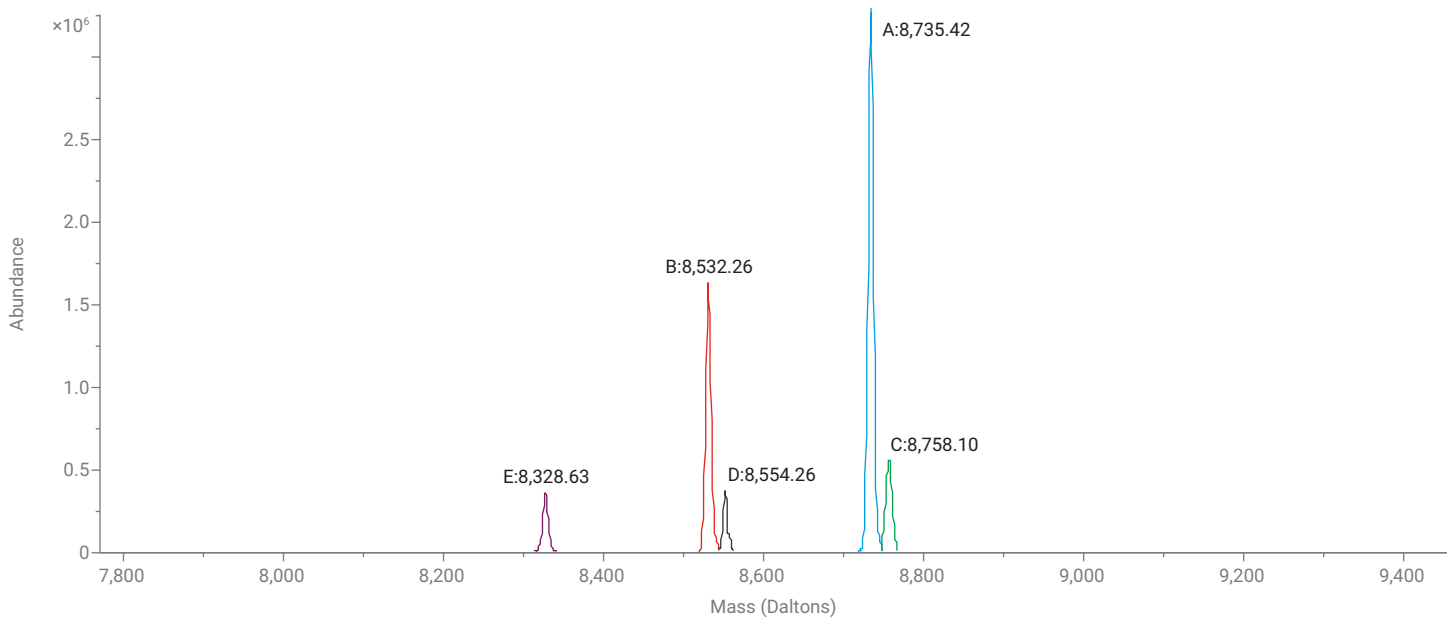


그림 6. Givosiran 센스 가닥에 대한 deconvoluted 스펙트럼. 관찰된 약 200Da의 이동은 GalNAc의 손실일 수 있습니다.

## 결론

이 응용 자료에 설명된 분석법은 합성 올리고뉴클레오타이드의 중간에서 고처리량으로 분자 확인을 위한 실용적인 접근 방식을 제공합니다. Agilent Pro iQ Plus는 단위 질량 검출기임에도, 높은  $m/z$  범위에서도 뛰어난 분해능과 감도를 보여주며, 이는 많은 SQ 검출기의 성능을 능가합니다. 이 분석법은 새로운 중탄산 암모늄 이동상을 사용하여 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 siRNA를 포함한 다양한 유형의 올리고를 분석하는 실험실에 충분한 LC/MS 성능을 제공합니다. 이 응용 자료에 설명된 LC 및 MS 결과는 재현성이 높습니다. Agilent OpenLab CDS MS spectral deconvolution을 사용하면 데이터 분석 워크플로가 간소화되며, 이는 최소한의 최적화만으로 프로세싱 방법을 자동화합니다.



## 참고 자료

1. Herkt, M.; Thum, T. Pharmacokinetics and Proceedings in Clinical Application of Nucleic Acid Therapeutics. *Mol. Ther.* **2021**, 29(2), 521–539. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.11.008.
2. Watts, J. K.; Corey, D. R. Silencing Disease Genes in the Laboratory and the Clinic. *J. Pathol.* **2012**, 226(2), 365–379. DOI: 10.1002/path.2993.
3. Apffel, A.; Chakel, J. A.; Fischer, S.; Lichtenwalter, K.; Hancock, W. S. Analysis of Oligonucleotides by HPLC–Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **1997**, 69(7), 1320–1325. DOI: 10.1021/ac960916h.
4. Guimaraes, G. J.; Bartlett, M. G. The Critical Role of Mobile Phase pH in the Performance of Oligonucleotide Ion-Pair Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Methods. *Future Sci. OA* **2021**, 7(10), FS0753. DOI: 10.2144/fsoa-2021-0084.
5. Basiri, B.; Murph, M. M.; Bartlett, M. G. Assessing the Interplay Between the Physicochemical Parameters of Ion-Pairing Reagents and the Analyte Sequence on the Electrospray Desorption Process for Oligonucleotides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2017**, 28(8), 1647–1656. DOI: 10.1007/s13361-017-1671-6.
6. Hayashi, Y.; Sun, Y. Overcoming Challenges in Oligonucleotide Therapeutics Analysis: A Novel Nonion Pair Approach. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2024**, 35(9), 2034–2037. DOI: 10.1021/jasms.4c00270.
7. Chen, B.; Mason, S. F.; Bartlett, M. G. The Effect of Organic Modifiers on Electrospray Ionization Charge-State Distribution and Desorption Efficiency for Oligonucleotides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2013**, 24(2), 257–264. DOI: 10.1007/s13361-012-0509-5.

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

DE-006128

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2025  
2025년 5월 6일 한국에서 인쇄  
5994-8337KO

한국애질런트테크놀로지스(주)  
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,  
DF타워 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)