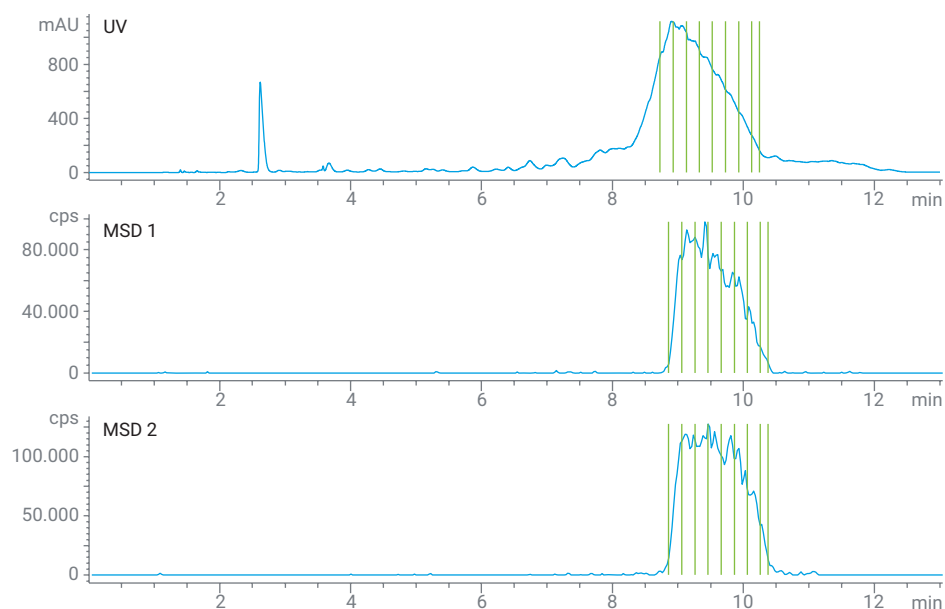


## Purificación rápida y selectiva de oligonucleótidos mediante HPLC/MS preparativa con software de apoyo



### Autor

Florian Rieck  
Agilent Technologies, Inc.

### Resumen

Los oligonucleótidos sintéticos con menos de 100 nucleótidos se suelen analizar y purificar mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Para mejorar la selectividad, se suele recurrir a la detección selectiva de masas (MSD), aunque esta técnica supone el uso de reactivos de alta pureza y caros, como el hexafluoroisopropanol (HFIP). En esta nota de aplicación se describe un método de purificación basado en el uso de dibutilamina (DBA) y tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), que permite la recogida de fracciones activada por una señal de MSD. El software de apoyo y las columnas para oligonucleótidos Agilent AdvanceBio con partículas superficialmente porosas permitieron mejorar la rapidez de la recogida de fracciones y la pureza de los compuestos de interés en comparación con los métodos convencionales.

## Introducción

En los últimos años, los oligonucleótidos sintéticos (como los aptámeros, el ARN guía, el ARN de interferencia pequeño y los oligonucleótidos) han despertado el interés de los campos de las ciencias de la vida y la investigación de pruebas diagnósticas. Por lo general, la longitud de la cadena de estas moléculas es inferior a 100 nucleótidos, lo que permite analizarlas mediante HPLC en fase inversa por formación de pares iónicos (IP-RP). Esta técnica también se ha utilizado con éxito para la purificación de oligonucleótidos<sup>1</sup>. Para mejorar la sensibilidad de los análisis en los que se utiliza la MSD, se emplean trietilamina (TEA) y HFIP como reactivos estándar para formación de pares iónicos. Sin embargo, a la hora de aumentar la escala de los métodos hacia las condiciones preparativas es necesario usar grandes cantidades de HFIP, que tiene un elevado coste, lo que puede convertirse en un factor limitante.

En esta nota de aplicación se presenta un método de purificación preparativa en el que se utilizan DBA y TRIS para la formación de pares iónicos y el ajuste del pH. Se ha comprobado que la DBA ofrece mayor resolución que la TEA para oligonucleótidos de cadena corta<sup>2</sup>, mientras que el TRIS se utiliza en lugar del HFIP, que tiene un elevado coste.

## Experimento

### Instrumentos

Todos los experimentos se llevaron a cabo en un sistema de LC/MSD preparativo de escala automática Agilent 1290 Infinity II compuesto por los siguientes módulos:

- Bomba binaria preparativa Agilent 1290 Infinity II (G7161B).
- Bomba cuaternaria Agilent 1260 Infinity II (G7111B) con lavado activo de los sellos y válvulas de entrada activas (opciones 030 y 032).

- Muestreador/colector preparativo de lecho abierto Agilent 1290 Infinity II (G7158B) con loop de muestra preparativo de 5 ml (opción 241).
- Detector de longitud de onda múltiple Agilent 1260 Infinity II (G7165A) con celda de flujo preparativa de 0,3 mm (opción 084).
- Detector de diodo array Agilent 1260 Infinity II WR (G7115A) con celda de flujo estándar de 10 mm (opción 018).
- Colector de fracciones preparativo de válvula Agilent 1260 Infinity II (G7166A).
- Modulador de flujo Agilent 1290 Infinity II para MS (G7170B).
- Controlador de válvula Agilent 1290 Infinity (G1170A) con una válvula de 2 posiciones y 14 puertos (G4738A).
- Compartimento de columna preparativa Agilent 1290 Infinity II (G7163B).
- Organizador de bobinas de retardo Agilent 1260 Infinity II (G9324A) con bobinas de retardo para flujos de 15 a 40 ml/min (opción 210).
- Sistema de LC/MSD XT de Agilent (G6135B).

### Columnas

- Columna analítica: Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 3 × 100 mm, 2,7 µm (referencia 695975-502).
- Columna preparativa: Columna para oligonucleótidos Agilent AdvanceBio, 21,2 × 150 mm, 4 µm (referencia 671150-702).

### Software

- Agilent OpenLab CDS ChemStation Edition para sistemas de LC y LC/MS, versión C.01.10 [287] o posterior.
- Software de purificación automatizada de Agilent para OpenLab ChemStation, versión A.01.08 [043] o posterior.

### Productos químicos y disolventes

El acetonitrilo (ACN) de calidad para gradiente de HPLC, el tris(hidroximetil)aminometano de pureza superior al 99,9 %, el ácido clorhídrico de calidad analítica (37 %), la dibutilamina (DBA) de calidad para HPLC y la hexilamina (HA) se adquirieron a VWR (Darmstadt, Alemania). El hexafluoroisopropanol (HFIP) de calidad analítica se adquirió a Merck (Darmstadt, Alemania). Se obtuvo agua ultrapura nueva a partir de un sistema Milli-Q Integral equipado con un cartucho de membrana con un tamaño de poro de 0,22 µm en el punto de consumo (Millipore Sigma, Darmstadt, Alemania).

### Muestras

Se utilizaron dos muestras de oligonucleótidos de ADN con una longitud de entre 30 y 50 bases proporcionadas por un cliente. Las concentraciones de las muestras fueron de 3,1 mM en PBS 20 mM, en el caso del oligonucleótido corto; y de 1,6 mM en agua, en el caso del oligonucleótido largo. Ambas muestras se inyectaron sin aplicar dilución ni métodos de preparación de muestras.

Antes de realizar la purificación, ambas muestras se analizaron mediante un método de separación por HPLC/MS (método con HA/HFIP; consulte la Table 1). Este método es un procedimiento habitual de control de calidad que permite obtener la pureza del producto sintetizado y la masa de interés necesarias para la purificación. Para posibilitar un aumento óptimo de la escala mediante el software de purificación automatizada, es necesario usar la misma fase móvil y fase estacionaria en los métodos analítico y preparativo. Con tal fin, se utilizó otro método (método con DBA-TRIS; consulte la Table 2) que no requiere usar el reactivo caro (HFIP) con el elevado valor de flujo utilizado para la purificación. Este segundo método no es compatible con la espectrometría de masas, ya que el tampón de TRIS no es volátil. No obstante, permite realizar una recogida de fracciones atendiendo a la masa, ya que se envía únicamente una pequeña parte del flujo al MSD mediante el uso de un divisor activo y un disolvente auxiliar volátil.

La elección de referencia para el análisis de oligonucleótidos de hasta 100 nucleótidos son las columnas para oligonucleótidos de la serie Agilent AdvanceBio. Estas columnas incorporan la tecnología Agilent InfinityLab Poroshell y cuentan con partículas superficialmente porosas (SPP) con un recubrimiento con pH alto (HPH). Además de garantizar la

compatibilidad con valores altos de pH y temperatura, todos los lotes de columnas para oligonucleótidos AdvanceBio se someten a un control de calidad para garantizar que consigan separar los oligonucleótidos con una resolución de  $n/(n-1)$ . Gracias a la adición de columnas de escala analítica y preparativas de 21,2 mm de diámetro interno a la familia

de columnas para oligonucleótidos AdvanceBio, ya resulta posible transferir métodos analíticos de alta resolución a la escala preparativa con mayor facilidad. El uso de la misma fase estacionaria en las escalas analítica y preparativa reduce los ajustes necesarios de los métodos e incrementa la fiabilidad de la transferencia de métodos.

## Configuración del método

**Tabla 1.** Condiciones cromatográficas de los experimentos analíticos (método HA/HFIP).

Parámetro	Experimentos analíticos
Fase móvil	A) Hexilamina 15 mM + HFIP 200 mM en H <sub>2</sub> O (pH aprox. de 8,3) B) Metanol
Flujo	0,8 ml/min
Gradiente	Tiempo (min) % B 0 50 7 71 8 100 9 100 9,5 50
Tiempo de parada	11 min
Volumen de inyección	2 µl
Preajuste del método del muestreador	Preajuste 1: Matriz polar de la muestra Loop de disolvente de 180 µl
Temperatura	Ambiente
Detección UV	260 nm Velocidad de adquisición de datos: 10 Hz
Detección por MS	Barrido de aniones Valores de $m/z$ de 500 a 3.000

**Tabla 2.** Condiciones cromatográficas de los experimentos a escala analítica y preparativa (método con DBA-TRIS).

Parámetro	Experimentos analíticos	Experimentos a escala preparativa
Fase móvil	A) TRIS-HCl, pH = 8,3, DBA 75 mM en ACN al 7,5 % B) TRIS-HCl, pH = 8,3, DBA 75 mM en ACN al 80 %	
Flujo	0,8 ml/min	25 ml/min
Gradiente	Gradientes de exploración y focalizados calculados por el software	
Volumen de inyección	2 µl	1.000 µl
Preajuste del método del muestreador	Preajuste 1: Matriz polar de la muestra Loop de disolvente de 180 µl	Preajuste 1: Matriz polar de la muestra Loop de disolvente de 800 µl
Temperatura	Ambiente	Ambiente
Detección UV	260 nm Velocidad de adquisición de datos: 10 Hz	
Detección por MS	Barrido de aniones Valores de $m/z$ de 500 a 3.000	Barrido de aniones Valores de $m/z$ de 500 a 3.000 EIC seleccionado por el software conforme a la masa de interés
Relación de split hacia el MSD	Flujo completo	500:1 (modo M1) Activa entre los 12 y los 24 min
Recogida de fracciones	No aplicable	Modo de fracciones atendiendo a los picos, señal UV combinada con la señal del MSD mediante el operador lógico Y umbral de UV: 10 mAU Pendiente ascendente (UV): 2 mAU/s Pendiente descendente (UV): 1 mAU/s Umbral de MSD: 2.000 cps

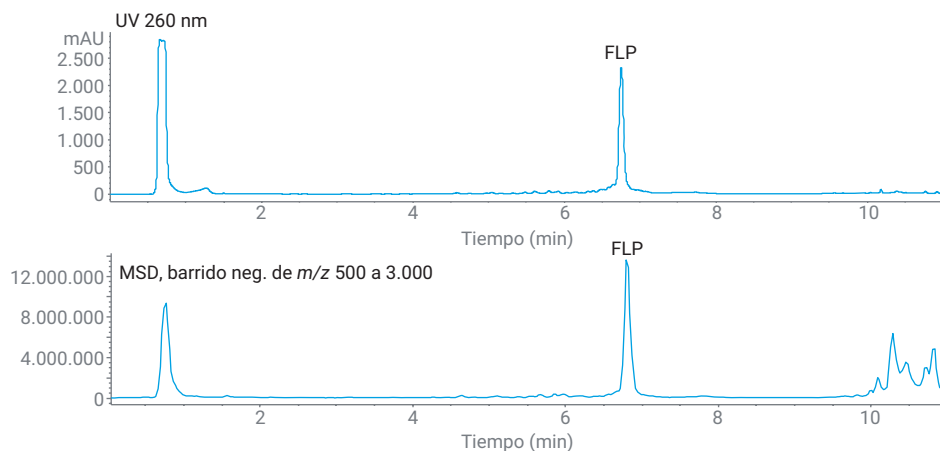
**Tabla 3.** Cámara de nebulización del MSD y configuración de la recogida de fracciones.

Parámetro	Valor
Disolvente auxiliar	Ácido fórmico al 0,1 % en metanol/agua (70/30)
Flujo del disolvente auxiliar	1,5 ml/min
Fuente de ionización	Fuente de ionización por electrospray (ESI) de Agilent
Presión del nebulizador	40 psig
Temperatura del gas de secado (TGS)	350 °C
Flujo de gas de secado	13,0 l/min
Voltaje del capilar	-3.000 V
Intervalo de barrido	Valores de $m/z$ de 500 a 3.000
Masa de interés ( $m/z$ )	Oligonucleótido corto: 2.674,7; 2.139,8 Oligonucleótido largo: 2.718,0; 2.264,1
Especies iónicas	[M-H] <sup>-</sup> , [M-2H] <sup>2-</sup> y [M-3H] <sup>3-</sup>

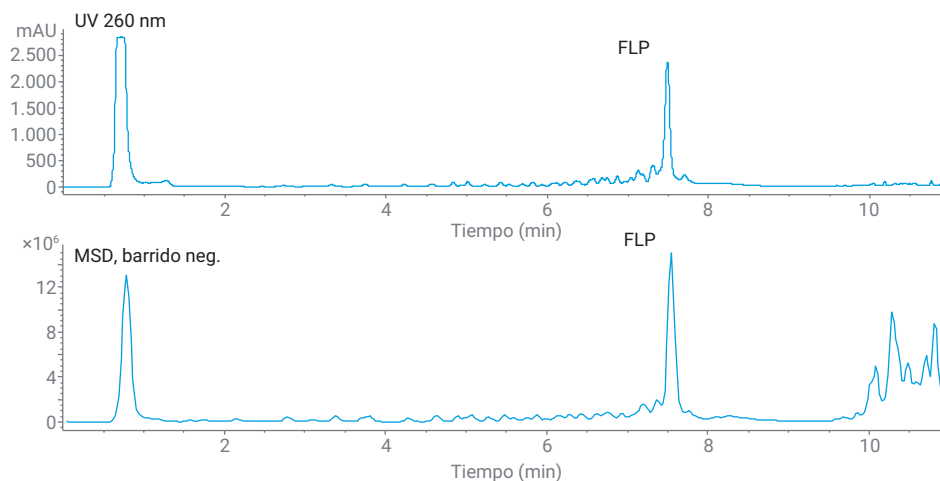
## Resultados y comentarios

Ambas muestras de oligonucleótidos se separaron con éxito a escala analítica mediante HPLC/MS y el uso de la ruta analítica del sistema de LC preparativo de escala automática 1290 Infinity II. El gradiente optimizado (50-71 % de B) separó el producto de secuencia completa (FLP) de los fragmentos incompletos de oligonucleótidos. En la Figure 1 se muestran un cromatograma de UV y el cromatograma de corriente iónica total (TIC) correspondiente a la separación del oligonucleótido corto. La separación del oligonucleótido largo se presenta en la Figure 2. La pureza del oligonucleótido largo es menor que la del oligonucleótido corto. No obstante, la separación de ambas muestras fue lo suficientemente buena como para identificar el FLP en cuestión. Tomando como base estas separaciones analíticas, se extrajeron los espectros de masas correspondientes al momento de la elución del FLP. La herramienta de deconvolución integrada en OpenLab ChemStation calculó el peso molecular de los FLP y asoció un número de carga a las señales del espectro (Figures 3 y 4). Esto permitió usar los iones con carga múltiple identificados para activar la recogida de fracciones en los experimentos a escala preparativa.

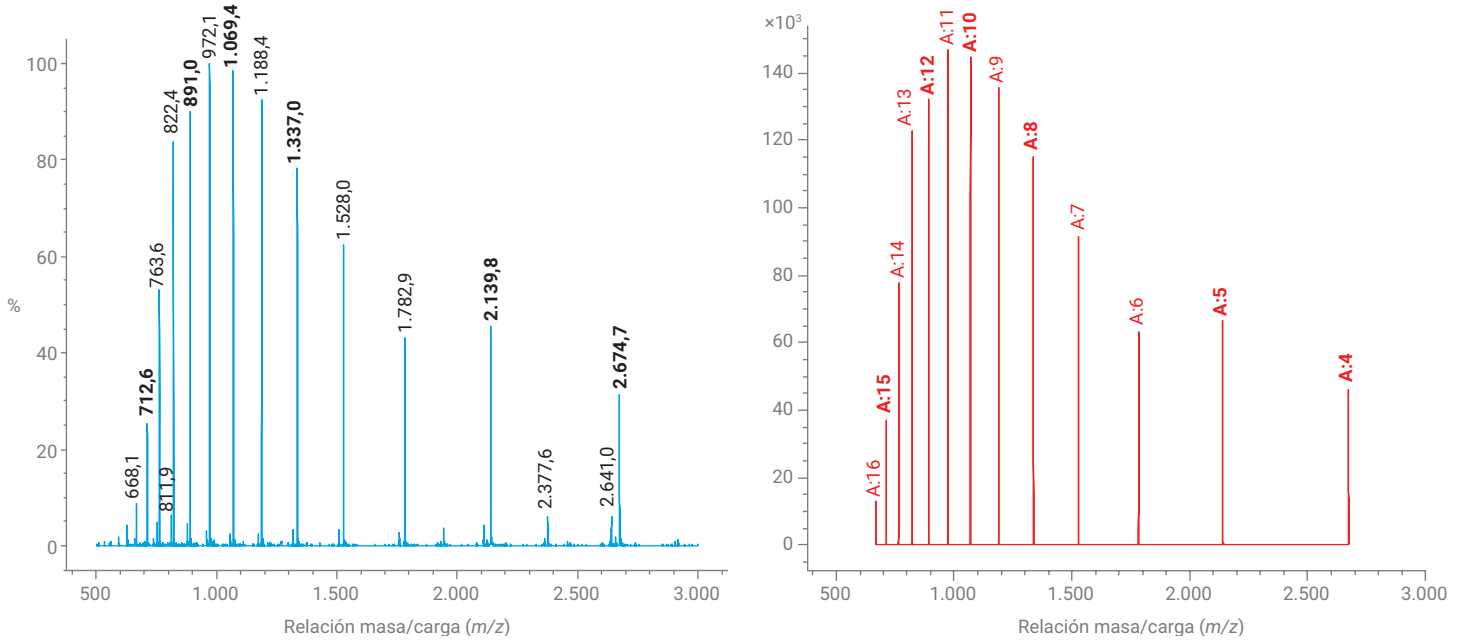
Para purificar ambos oligonucleótidos, el método se adaptó para usar fases móviles con DBA como reactivo de formación de pares iónicos y TRIS como tampón. A pesar de que el TRIS no es compatible con la MS, mediante MSD se detectaron y recogieron los oligonucleótidos de interés en el experimento a escala preparativa. Esto se consiguió mediante la división activa del flujo completo y la desviación del flujo dividido al instrumento de MS con un disolvente auxiliar compatible. El flujo se ajustó a 25 ml/min, teniendo en cuenta el mayor diámetro interno y tamaño de partícula de la columna preparativa. El gradiente también se modificó: se usó el software de purificación automatizada para crear un gradiente lineal para la exploración analítica. Asimismo, el software calculó un gradiente preparativo focalizado para optimizar la separación a partir de la selección de un pico de interés en los resultados analíticos.



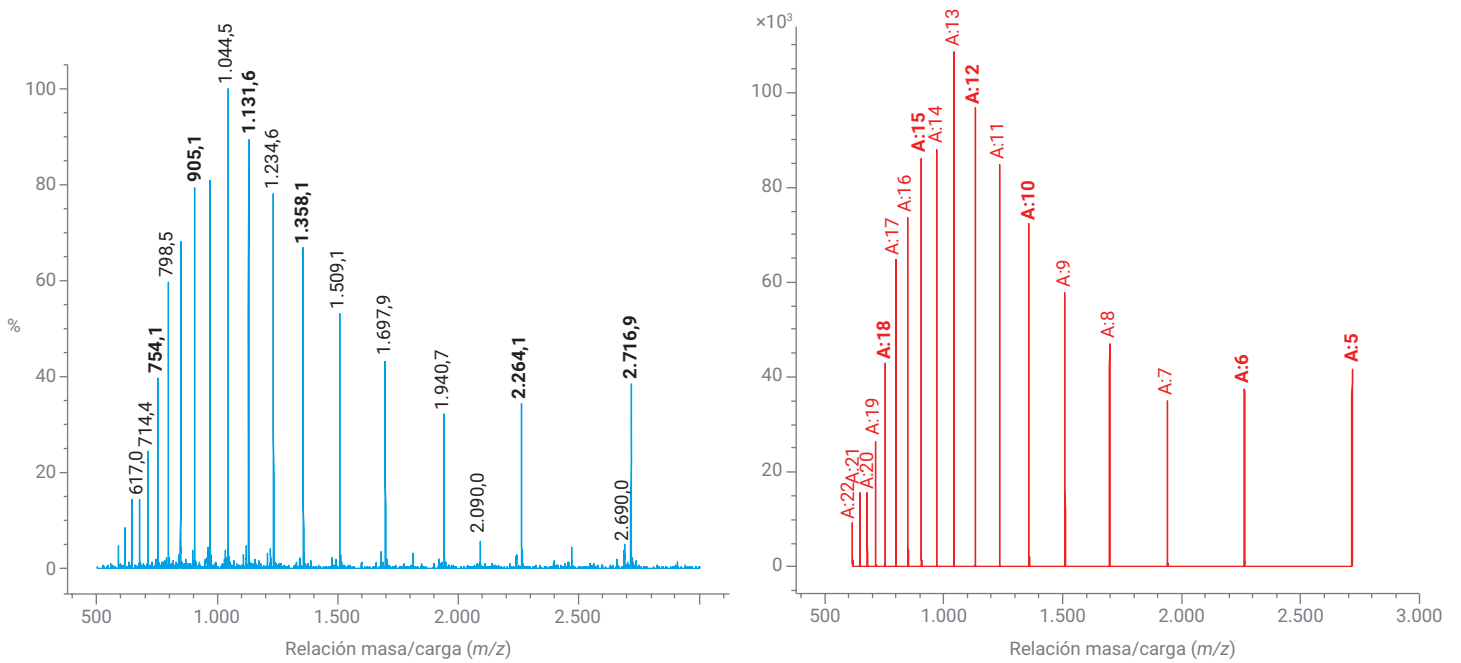
**Figura 1.** Separación del oligonucleótido corto mediante el uso de HA/HFIP y un gradiente optimizado.



**Figura 2.** Separación del oligonucleótido largo mediante el uso de HA/HFIP y un gradiente optimizado.

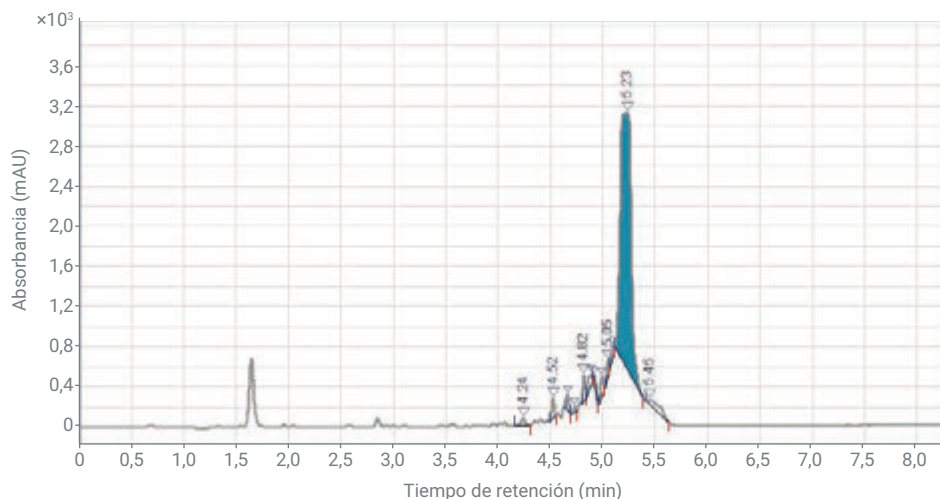


**Figura 3.** Espectro e iones con carga múltiple (A: número de carga) del oligonucleótido corto, calculados mediante deconvolución. El peso molecular calculado para el FLP fue de 10.704 Da. Los iones utilizados como activadores de las fracciones aparecen en negrita.

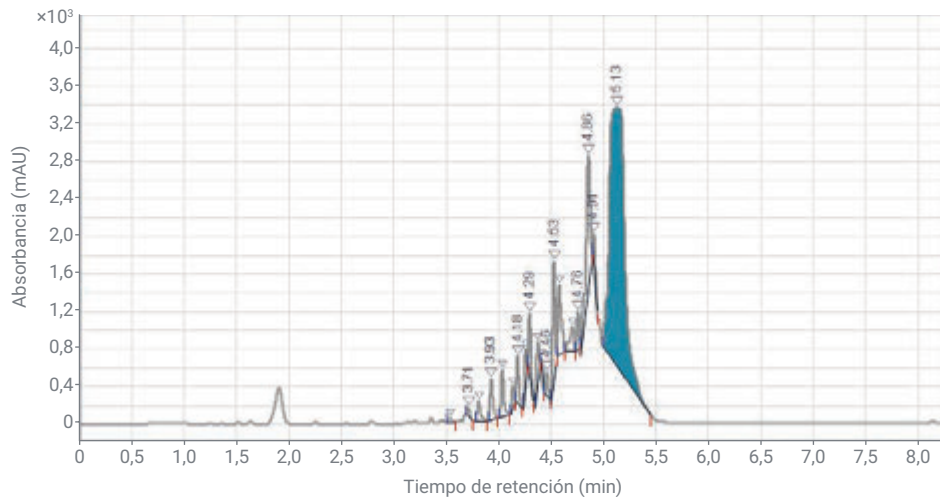


**Figura 4.** Espectro e iones con carga múltiple (A: número de carga) del oligonucleótido largo, calculados mediante deconvolución. El peso molecular calculado para el FLP fue de 13.592 Da. Los iones utilizados como activadores de las fracciones aparecen en negrita.

Los cromatogramas analíticos de la separación con DBA/TRIS se presentan en las Figures 5 y 6. Tenga en cuenta que el objetivo del gradiente analítico no fue conseguir una resolución máxima, sino determinar las condiciones del disolvente en el tiempo de retención del pico de interés. Para iniciar el cálculo, el usuario debe seleccionar el pico en el cromatograma y hacer clic en **Assign As Target** (Asignar como compuesto de interés). A continuación, el software de purificación automatizada calculará el punto de elución del pico de interés y, además, generará un gradiente completo para optimizar la separación del compuesto de interés. Existe la posibilidad de adaptar el gradiente; por ejemplo, para controlar si el compuesto de interés debe eluir en el punto central del gradiente focalizado o al final de este, con el fin de dejar más tiempo para las impurezas que eluyen primero. El gradiente utilizado para purificar el oligonucleótido corto se describe en la Figure 7.

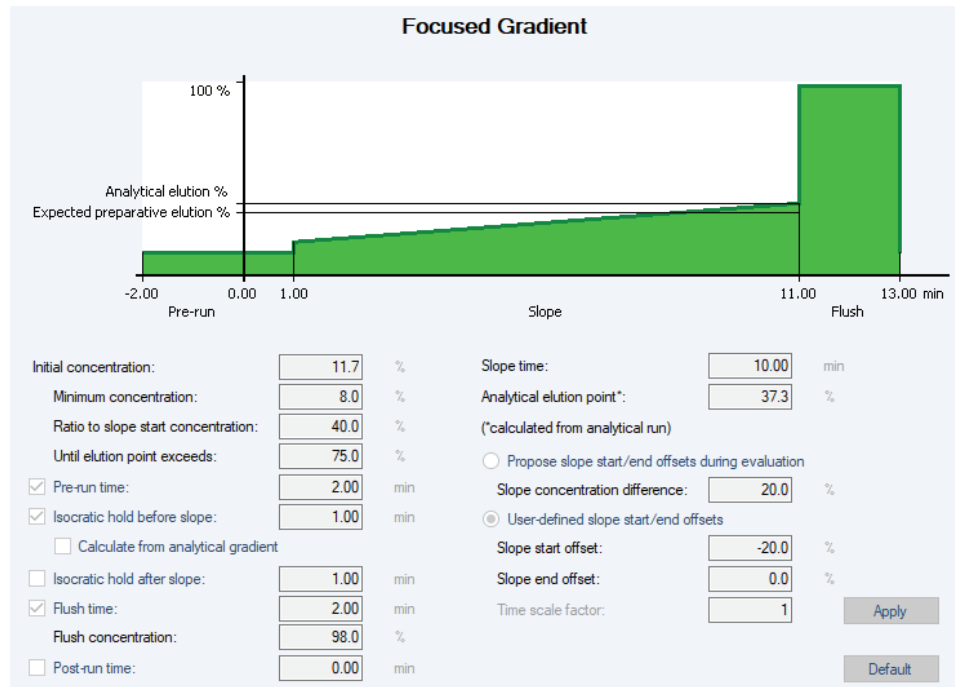


**Figura 5.** Separación del oligonucleótido corto mediante el uso de DBA/TRIS y un gradiente genérico. El FLP aparece marcado en azul.

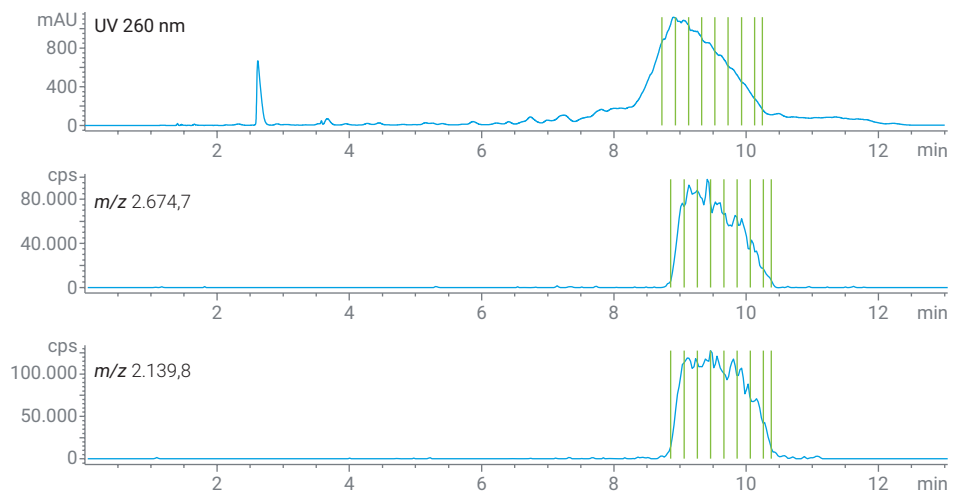


**Figura 6.** Separación del oligonucleótido largo mediante el uso de DBA/TRIS y un gradiente genérico. El FLP aparece marcado en azul.

Antes de iniciar el experimento de purificación con el gradiente focalizado, es necesario definir las masas de interés que activarán la recogida de fracciones. Se seleccionaron dos masas de interés para cada oligonucleótido: las correspondientes a las especies iónicas  $[M-4H]^{4-}$  y  $[M-5H]^{5-}$ , en el caso de oligonucleótido corto; y a las especies iónicas  $[M-5H]^{5-}$  y  $[M-6H]^{6-}$ , en el caso del oligonucleótido largo (consulte las Figures 3 y 4). La activación automatizada para masas de interés con doble y triple carga también conlleva que la recogida se active para las especies iónicas  $[M-8H]^{8-}$ ,  $[M-10H]^{10-}$ ,  $[M-12H]^{12-}$  y  $[M-15H]^{15-}$ , en el caso del oligonucleótido corto; y  $[M-10H]^{10-}$ ,  $[M-12H]^{12-}$ ,  $[M-15H]^{15-}$  y  $[M-18H]^{18-}$ , en el caso del oligonucleótido largo. En la Figure 8 se muestran la separación preparativa y la recogida de fracciones correspondientes al oligonucleótido corto. La señal del MSD consiguió recoger y activar correctamente ocho cortes de tiempo. La superposición con la señal de UV (marcas de fracciones corregidas según los diferentes tiempos de retardo) demuestra la mejora de la selectividad obtenida mediante MSD. Si únicamente se hubiera usado la señal de UV para la activación de las fracciones, la recogida habría comenzado demasiado pronto y se habrían recogido muchas de las impurezas. La activación con la señal del MSD reduce el número de fracciones que hay que cribar, agrupar y secar, lo que mejora la pureza de las fracciones y acorta la duración total del proceso de purificación. Los resultados obtenidos en el experimento de purificación del oligonucleótido largo fueron similares; se recogieron diez cortes de fracciones (no se incluyen imágenes). Gracias a la separación de la recogida en cortes de volumen o duración predefinidos, resulta posible reanalizar fracciones individuales y agrupar aquellas que contengan el producto y cumplan los requisitos de pureza<sup>3</sup>.



**Figura 7.** Perfil del gradiente focalizado calculado para el oligonucleótido corto, junto con las opciones de adaptación.



**Figura 8.** Experimento purificación a escala preparativa del oligonucleótido corto mediante el uso de DBA/TRIS y un gradiente focalizado. Las barras verdes representan los cortes de tiempo de la recogida de fracciones.

Los resultados del reanálisis de las fracciones para los ocho cortes recogidos durante el experimento de purificación del oligonucleótido corto se muestran en la Figure 9. El primer corte (línea azul) contiene una impureza, lo que queda patente por el pico dividido. La pureza del resto de los cortes es superior al 99 %, por lo que pueden incluirse en las fracciones agrupadas del producto final. Los diez cortes recogidos durante el experimento de purificación del oligonucleótido largo también se reanalizaron, y el resultado fue similar: el primer corte estaba parcialmente contaminado con impurezas, mientras que en el resto de los casos la pureza fue superior al 99 % (no se incluyen imágenes). Para incrementar aún más la recuperación del producto, podrían recogerse más cortes usando intervalos más cortos. Si se aplica un método cuantitativo de reanálisis, se puede elaborar una tabla de agrupación en la que figuren la pureza y el contenido de producto para usarla con el fin de optimizar el rendimiento para un determinado requisito de pureza<sup>3</sup>.

## Conclusión

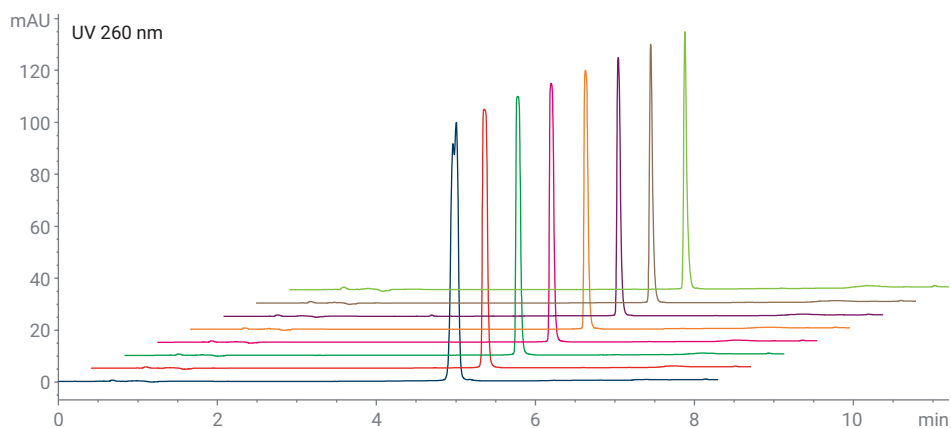
Dos muestras de oligonucleótidos con entre 30 y 50 nucleótidos se purificaron con éxito mediante HPLC preparativa con recogida de fracciones activada mediante señales de MSD. Ambas muestras se analizaron mediante un método compatible con la MS (HA/HFIP), que permitió obtener los espectros de masas necesarios para activar la recogida de fracciones de forma selectiva. Para la purificación preparativa se utilizó otro método con DBA/TRIS, lo que evitó el elevado coste asociado al uso de HFIP como reactivo. A pesar de que el TRIS no es compatible con la MS, el uso de un disolvente auxiliar adecuado en el flujo dividido enviado al MSD permitió realizar

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

DE68918377

Esta información está sujeta a cambios sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2022  
Impreso en EE. UU., 6 de diciembre de 2022  
5994-4877ES



**Figura 9.** Cromatogramas superpuestos de los análisis de las ocho fracciones recogidas durante el experimento de purificación del oligonucleótido corto.

una recogida de fracciones atendiendo a la masa con una elevada selectividad y fiabilidad. El software de purificación automatizada transformó un gradiente analítico genérico en un gradiente focalizado y optimizado para acortar la duración de los experimentos a escala preparativa y obtener los compuestos puros con mayor rapidez. Los cortes de fracciones de ambos oligonucleótidos se recogieron correctamente, lo que posibilitó el reanálisis y el agrupamiento selectivo de aquellas fracciones que cumplían los requisitos de pureza. Todos los experimentos se llevaron a cabo con columnas para oligonucleótidos Agilent AdvanceBio, que posibilitan un aumento de escala rápido y sencillo entre las aplicaciones analíticas y preparativas.

## Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo con el apoyo de la Fundación para el Conocimiento de Suecia (KKS) a través del proyecto SYNERGY de dicha fundación denominado "Improved Methods for Process and Quality Controls using Digital Tools" (beca n.º 20210021). El autor desea expresar su agradecimiento al Dr. Olle Ståhlberg, de Qiagen DNA Synthesis, por suministrar las muestras de oligonucleótidos.

## Referencias

1. Catani, M. *et al.* Oligonucleotides: Current Trends and Innovative Applications in the Synthesis, Characterization, and Purification. *Biotechnology Journal* **2020**, *15*, 8.
2. Evaluation of Different Ion-Pairing Reagents for LC/UV and LC/MS Analysis of Oligonucleotides. *Nota de aplicación de Agilent Technologies*, número de publicación 5994-2957EN, **2021**.
3. Purification of Single-Stranded RNA Oligonucleotides Using High-Performance Liquid Chromatography. *Nota de aplicación de Agilent Technologies*, número de publicación 5994-3514EN, **2021**.