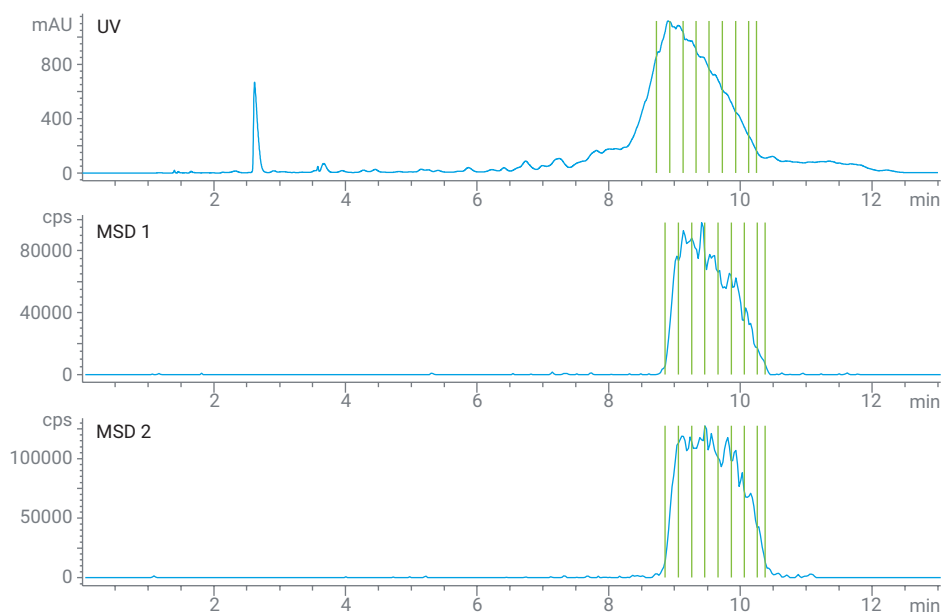


## 使用制备型 HPLC/MS 和软件支持 快速选择性纯化寡核苷酸



### 作者

Florian Rieck  
安捷伦科技公司

### 摘要

通常使用高效液相色谱法 (HPLC) 分析并纯化少于 100 个核苷酸的合成寡核苷酸。为了获得更高的选择性，通常需要质量选择性检测 (MSD)，但该技术需要高纯度的昂贵试剂，如六氟异丙醇 (HFIP)。本应用简报描述了一种基于二丁胺 (DBA) 和三(羟甲基)氨基甲烷 (TRIS) 的纯化方法，仍能实现由 MSD 信号触发的馏分收集。通过软件支持和 Agilent AdvanceBio 寡核苷酸表面多孔颗粒色谱柱，与常规方法相比，目标化合物收集更快、纯度更高。

## 前言

近年来，适配体、向导 RNA、小干扰 RNA、反义寡核苷酸 (ONs) 等合成 ONs 已成为生命科学和诊断研究的重点。这些分子通常显示链长小于 100 个核苷酸，因此可以使用离子对-反相 (IP-RP) HPLC 进行分析。该技术也已成功应用于 ONs 的纯化<sup>[1]</sup>。如需在 MSD 分析中获得更高的灵敏度，将三乙胺 (TEA) 和 HFIP 作为标准离子对试剂。然而，将方法扩大到制备条件需要大量昂贵的 HFIP，这可能是一个限制因素。

本应用简报介绍了一种使用 DBA 和 TRIS 进行离子配对和 pH 值调节的制备型纯化方法。研究证明，DBA 可比包含短链 ONs 的 TEA 产生更高的分离度<sup>[2]</sup>，而 TRIS 可用于替代昂贵的 HFIP。

## 实验部分

### 仪器

所有实验均在 Agilent 1290 Infinity II 自动制备型 LC/MSD 系统中进行，该系统由以下模块组成：

- Agilent 1290 Infinity II 制备型二元泵 (G7161B)
- Agilent 1260 Infinity II 四元泵 (G7111B)，配备主动密封清洗和主动入口阀 (选项 030 和 032)

- Agilent 1290 Infinity II 制备型 Open-Bed 进样器/收集器 (G7158B)，配备 5 mL 制备样品环 (选项 241)
- Agilent 1260 Infinity II 多波长检测器 (G7165A)，配备 0.3 mm 制备型流通池 (选项 084)
- Agilent 1260 Infinity II 二极管阵列检测器 WR (G7115A)，配备 10 mm 标准流通池 (选项 018)
- Agilent 1260 Infinity II 基于阀的制备型馏分收集器 (G7166A)
- Agilent 1290 Infinity II 质谱流路调制器 (G7170B)
- Agilent 1290 Infinity 阀驱动 (G1170A)，配备 2 位/14 通阀 (G4738A)
- Agilent 1290 Infinity II 制备型柱温箱 (G7163B)
- Agilent 1260 Infinity II 延迟线圈整理器 (G9324A)，配有 15–40 mL/min 的紧密延迟线圈 (210)
- 安捷伦 LC/MSD XT (G6135B)

### 色谱柱

- **分析柱：**Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C18, 3 × 100 mm, 2.7 μm (货号 695975-502)
- **制备柱：**Agilent AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱, 21.2 × 150 mm, 4 μm (货号 671150-702)

### 软件

- Agilent OpenLab CDS ChemStation 版，适用于 LC 和 LC/MS 系统，修订版 C.01.10 [287] 或更高版本
- 用于 OpenLab ChemStation 的安捷伦自动纯化软件，修订版 A.01.08 [043] 或更高版本

### 化学品和溶剂

HPLC 梯度级乙腈 (ACN)、三(羟甲基)氨基甲烷 (TRIS) > 99.9%、分析级盐酸 (37%)、HPLC 级二丁胺 (DBA) 和己胺 (HA) 购自 VWR (Darmstadt, Germany)。分析级六氟异丙醇 (HFIP) 购自 Merck (Darmstadt, Germany)。新制超纯水产自配置 0.22 μm 膜式终端过滤器 (Millipore Sigma, Darmstadt, Germany) 的 Milli-Q Integral 水纯化系统。

### 样品

两个长度为 30–50 个碱基的 DNA ON 样品由客户提供。短 ON 的样品浓度为 3.1 mmol/L，溶于 20 mmol/L PBS 中；长 ON 的样品浓度为 1.6 mmol/L，溶于水。两个样品均在未经稀释或样品前处理的情况下进样。

进行纯化前，使用 HPLC/MS 分离方法 (HA/HFIP 方法，见表 1) 分析两个样品。该方法是一个典型的质量控制流程，可获得合成产物的纯度和用于纯化的目标质量。为通过自动纯化软件实现优化放大，分析和制备方法需要使用相同的流动相和色谱柱填料。为此，应用了另一种方法 (DBA-TRIS 法，见表 2)，在用于纯化的高流速下不需要昂贵的 HFIP 试剂。第二种方法与质谱法不兼容，因为 TRIS 缓冲液无挥发性。然而，可以使用基于质量的馏分收集，因为使用主动分流器和挥发性补偿溶剂仅将一小部分液流运输至 MSD。

分析高达 100 个核苷酸的 ONs 的主要选择是 Agilent AdvanceBio 寡核苷酸系列的色谱柱。这款色谱柱基于 Agilent InfinityLab Poroshell 技术，采用高 pH (HPH) 涂层的表面多孔颗粒 (SPP)。除兼

容高 pH 和温度外，每批 AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱均进行寡核苷酸分离的质量控制，以实现  $n/(n-1)$  分离。随着分析型 Scalar 和 21.2 mm 内径的制备型色谱柱加入 AdvanceBio 寡核苷酸柱系列，高

分离度分析方法现在可以更轻松地转移到制备条件下。在分析和制备规模上采用相同的固定相可减少方法调整的需要，同时增加方法转移的可靠性。

## 方法设置

表 1. 分析运行的色谱条件，HA/HFIP 法

参数	分析运行												
流动相	A) 15 mmol/L 己胺 + 200 mmol/L HFIP 水溶液 (pH 约 8.3) B) 甲醇												
流速	0.8 mL/min												
梯度	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间 (min)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>71</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>9.5</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table>	时间 (min)	%B	0	50	7	71	8	100	9	100	9.5	50
时间 (min)	%B												
0	50												
7	71												
8	100												
9	100												
9.5	50												
停止时间	11 min												
进样量	2 $\mu$ L												
进样器方法预设	预设 1: 极性样品基质 180 $\mu$ L 定量环溶剂												
温度	室温												
紫外检测	260 nm 10 Hz 数据速率												
质谱检测	负离子扫描 $m/z$ 500-3000												

表 2. 分析和制备运行的色谱条件，DBA-TRIS 法

参数	分析运行	制备运行
流动相	A) TRIS-HCl, pH 8.3, 75 mmol/L DBA 溶于 7.5% ACN B) TRIS-HCl, pH 8.3, 75 mmol/L DBA 溶于 80% ACN	
流速	0.8 mL/min	25 mL/min
梯度	通过软件计算的筛选梯度和聚焦梯度	
进样量	2 $\mu$ L	1000 $\mu$ L
进样器方法预设	预设 1: 极性样品基质 180 $\mu$ L 定量环溶剂	预设 1: 极性样品基质 800 $\mu$ L 定量环溶剂
温度	室温	室温
紫外检测	260 nm 10 Hz 数据速率	
质谱检测	负离子扫描 $m/z$ 500-3000	负离子扫描 $m/z$ 500-3000 软件根据目标质量选择 EIC
与 MSD 的分流比	全流	500:1 (模式 M1) 12-24 min 有效
馏分收集	不适用	基于峰的馏分模式，UV 与 MSD 信号 通过逻辑 AND 结合 UV 阈值: 10 mAU UV 正斜率: 2 mAU/s UV 负斜率: 1 mAU/s MSD 阈值: 2000 cps

表 3. MSD 雾化室和馏分收集设置

参数	值
补充溶剂	含 0.1% 甲酸的甲醇/水溶液 (70/30)
补偿气流速	1.5 mL/min
离子源	安捷伦电喷雾 (ESI) 离子源
雾化器压力	40 psig
干燥气温度	350 $^{\circ}$ C
干燥气流速	13.0 L/min
毛细管电压	-3000 V
扫描范围	500-3000 $m/z$
目标质量 ( $m/z$ )	短 ON: 2674.7; 2139.8 长 ON: 2718.0; 2264.1
离子形态	[M-H] <sup>-</sup> 、[M-2H] <sup>2-</sup> 、[M-3H] <sup>3-</sup>

## 结果与讨论

使用 HPLC/MS 方法和 1290 Infinity II 自动制备型液相色谱仪的分析路径，在分析规模下成功分离了两个 ON 样品。优化后梯度为 50%–71% B，从不完整的 ON 片段中分离出全长产物 (FLP)。图 1 显示了 UV 色谱图和短 ON 分离的 TIC。长 ON 分离见图 2。长 ON 的纯度低于短 ON。然而，两个样品的分离程度足以鉴定相应的 FLP。基于这些分析分离，提取了 FLP 洗脱时的质谱。OpenLab ChemStation 中的积分卷积工具计算了 FLPs 的分子量，并将谱图中的信号与电荷数（图 3 和图 4）联系起来。然后，可使用鉴定的多电荷离子触发制备运行中的馏分收集。

为纯化两种 ONs，将方法改为使用含 DBA 的流动相作为离子对试剂，TRIS 作为缓冲液。尽管 TRIS 与 MS 不兼容，但在制备运行中通过 MSD 信号检测并收集了目标 ONs。通过对全流主动分流，并使用相容的补偿溶剂将分流输送至 MS 实现这一目的。将流速调节至 25 mL/min，对应制备色谱柱内径和粒径的增加。还改变了梯度：通过自动纯化软件创建了用于分析型筛选的线性梯度。同样，根据分析结果中目标峰的选择，通过软件计算用于优化分离的聚焦制备型梯度。

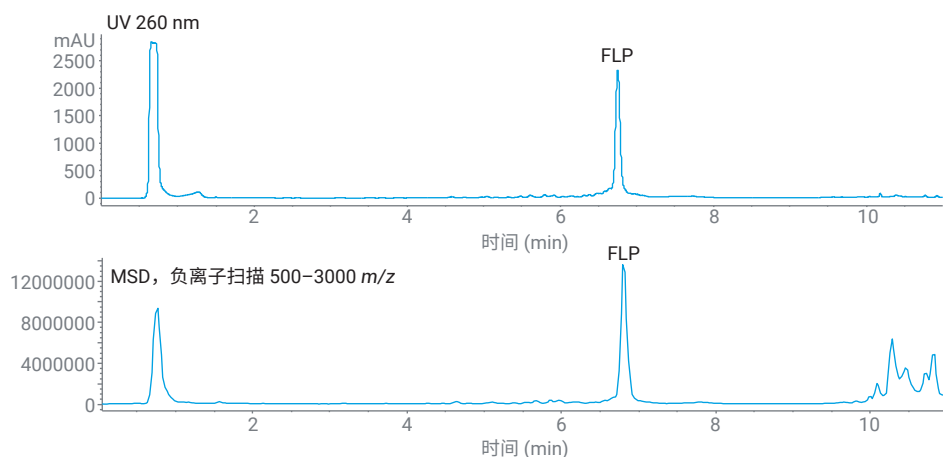


图 1. 使用 HA/HFIP 和优化梯度分离短 ON

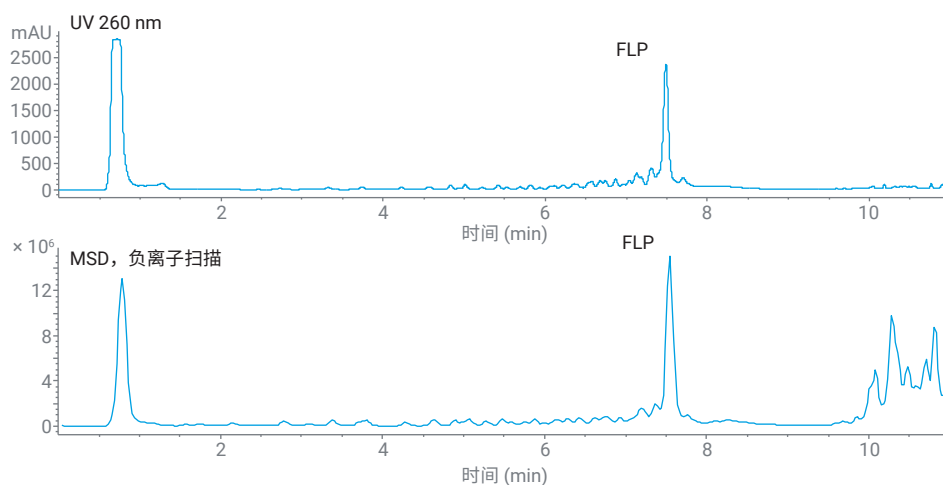


图 2. 使用 HA/HFIP 和优化梯度分离长 ON

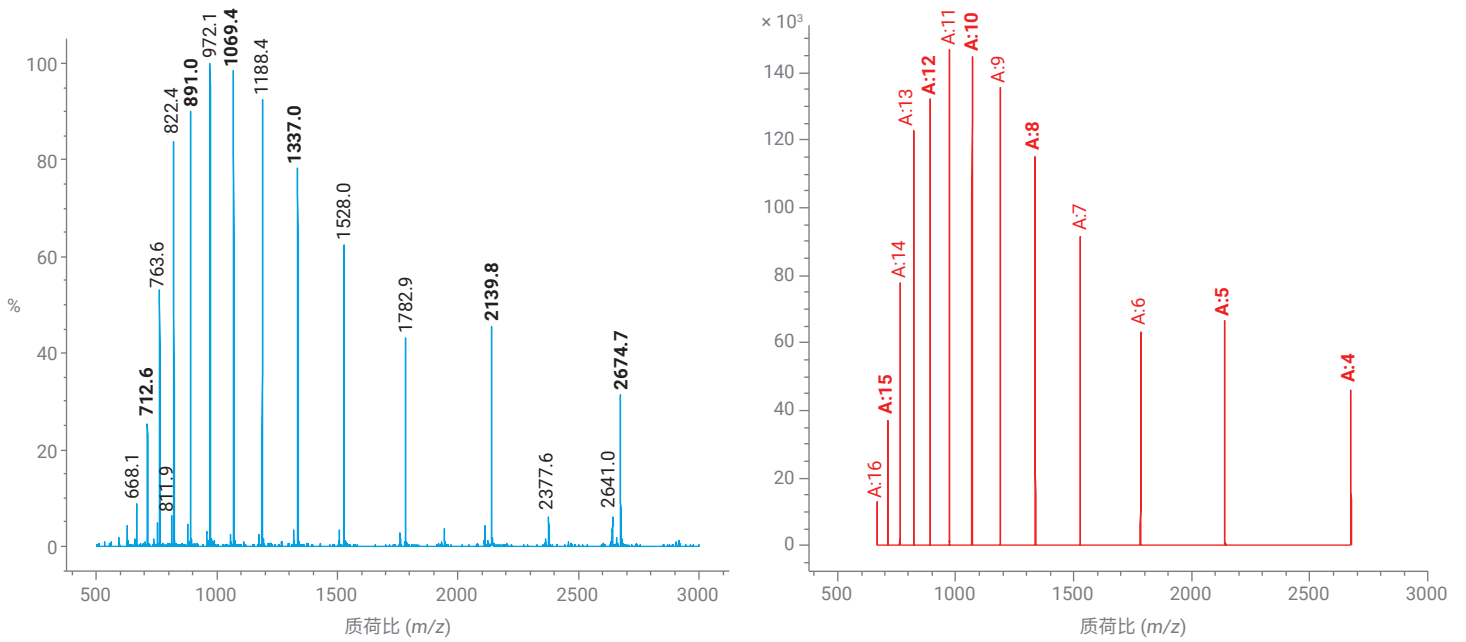


图 3. 通过解卷积计算的短 ON 的谱图和多电荷离子 (A: 电荷数)。FLP 的分子量计算值为 10704 Da。用作馏分触发器的离子以粗体突出显示

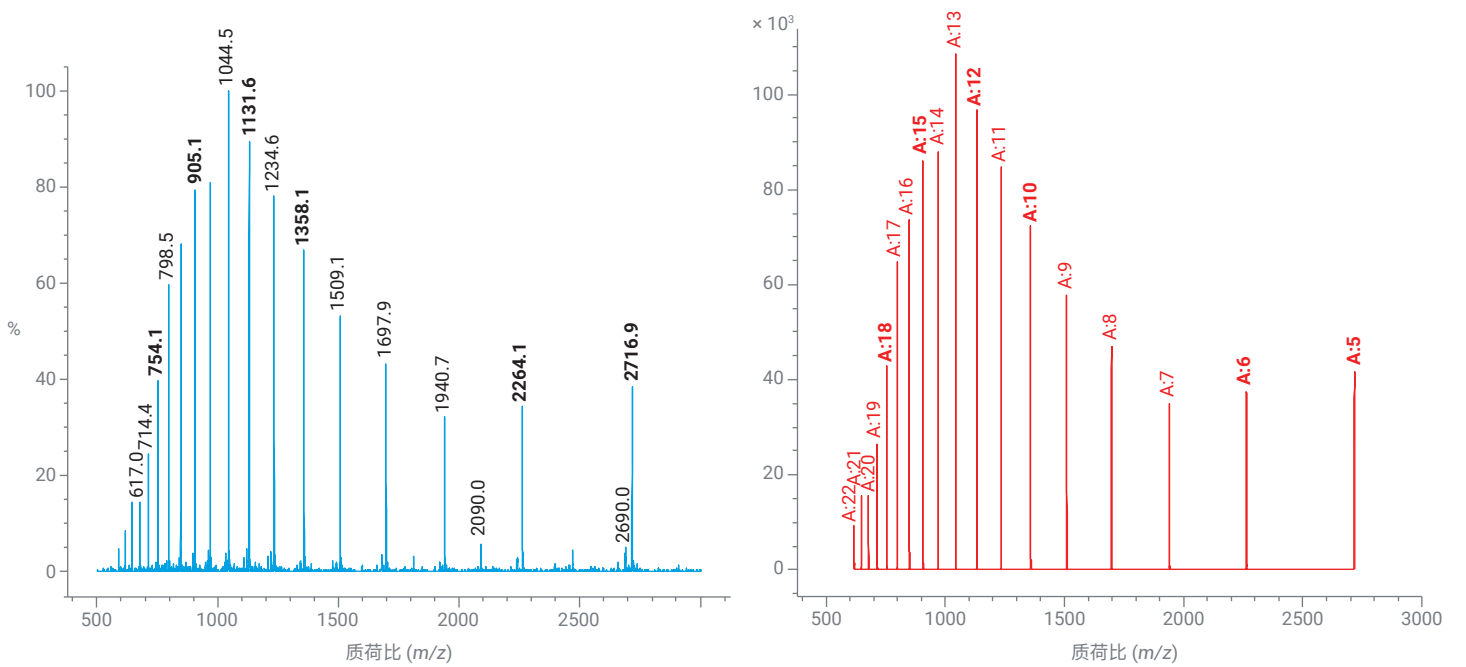


图 4. 通过解卷积计算的长 ON 的谱图和多电荷离子 (A: 电荷数)。FLP 的分子量计算值为 13592 Da。用作馏分触发器的离子以粗体突出显示

DBA/TRIS 分离的分析色谱图见图 5 和图 6。请注意，分析梯度的目的不是提供最高分离度，而是确定目标峰保留时间处的溶剂条件。为启动该计算，用户选择色谱图中的峰值，单击 **Assign As Target** (指定为目标)。然后，自动纯化软件不仅会计算目标峰的洗脱点，而且还会生成完整梯度，以优化目标峰的分离。可以对该梯度进行微调，例如控制目标是在聚焦梯度的中心洗脱还是在结束时洗脱，以便为早期洗脱的杂质留出更多时间。用于纯化短 ON 的梯度如图 7 所示。

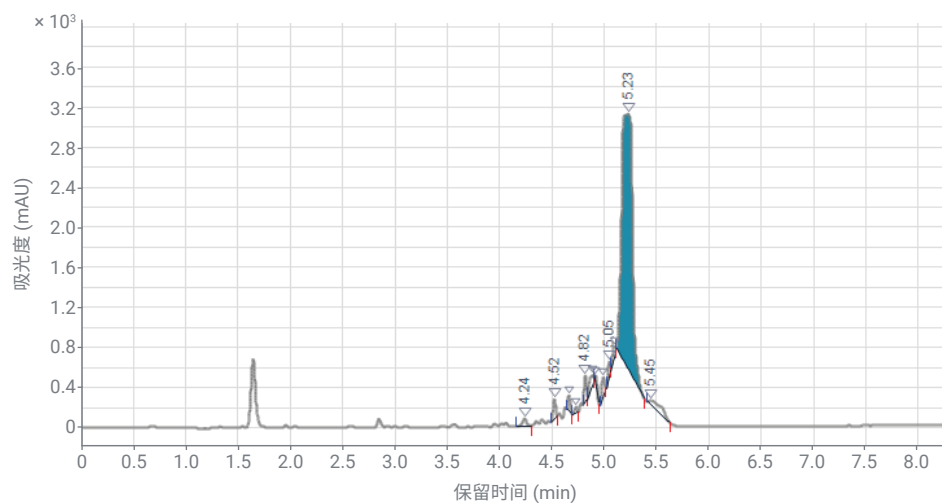


图 5. 使用 DBA/TRIS 和通用梯度分离短 ON。FLP 以蓝色突出显示

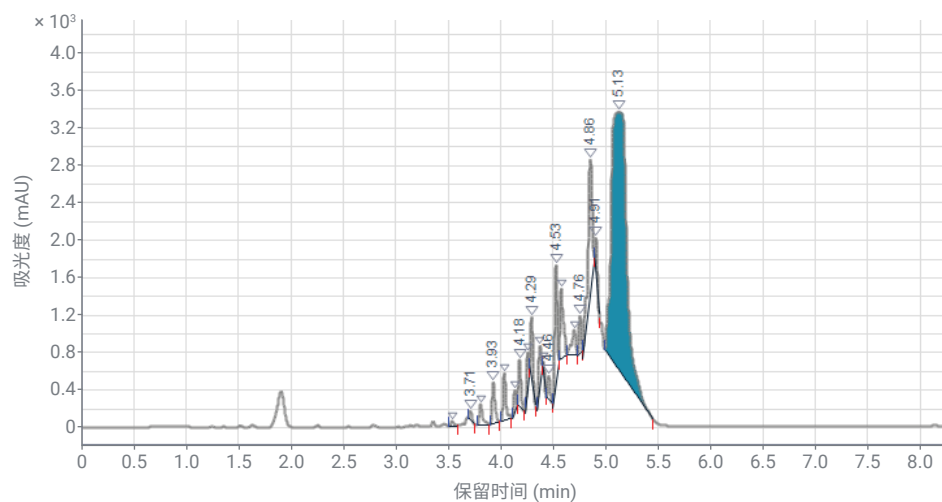


图 6. 使用 DBA/TRIS 和通用梯度分离长 ON。FLP 以蓝色突出显示

在用聚焦梯度开始纯化运行之前，需要定义触发馏分收集的目标质量。每个 ON 选择两个目标质量，短 ON 表示为 [M-4H]<sup>4+</sup> 和 [M-5H]<sup>5+</sup>，长 ON 表示为 [M-5H]<sup>5+</sup> 和 [M-6H]<sup>6+</sup>（见图 3 和图 4）。通过激活双电荷和三电荷目标质量的自动触发器，短 ON 的收集将在 [M-8H]<sup>8+</sup>、[M-10H]<sup>10+</sup>、[M-12H]<sup>12+</sup> 和 [M-15H]<sup>15+</sup> 触发，长 ON 的收集也将 [M-10H]<sup>10+</sup>、[M-12H]<sup>12+</sup>、[M-15H]<sup>15+</sup> 和 [M-18H]<sup>18+</sup> 触发。图 8 显示了短 ON 的制备分离和馏分收集。采集了 8 个时间片段，并通过 MSD 信号成功进行了触发。与 UV 信号的重叠（根据不同延迟时间校正的馏分刻度）证明了 MSD 的选择性增益。如果仅用 UV 信号触发馏分，收集将过早开始，且将收集许多杂质。基于 MSD 信号的触发减少了待筛选、收集和干燥的馏分数量，这将导致馏分更纯且整体纯化过程更快。长 ON 的纯化运行产生了相似的结果，收集了 10 个馏分片段（未显示）。通过将收集物分离成预定持续时间或体积的片段，可以重新分析单个馏分，并收集含有该产品且符合纯度要求的馏分<sup>[3]</sup>。

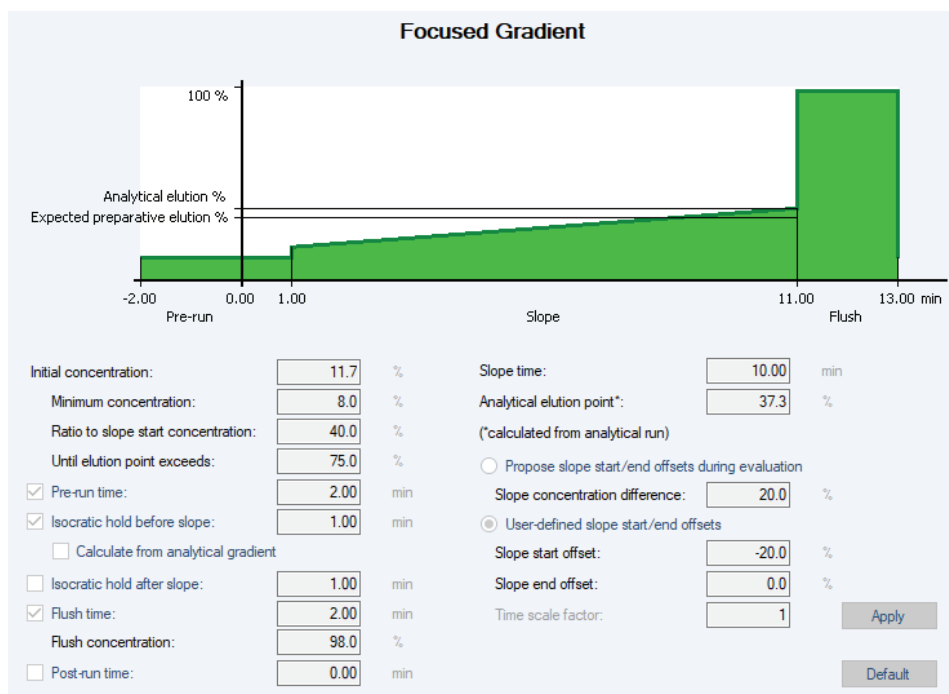


图 7. 为短 ON 计算的聚焦梯度曲线，带微调选项

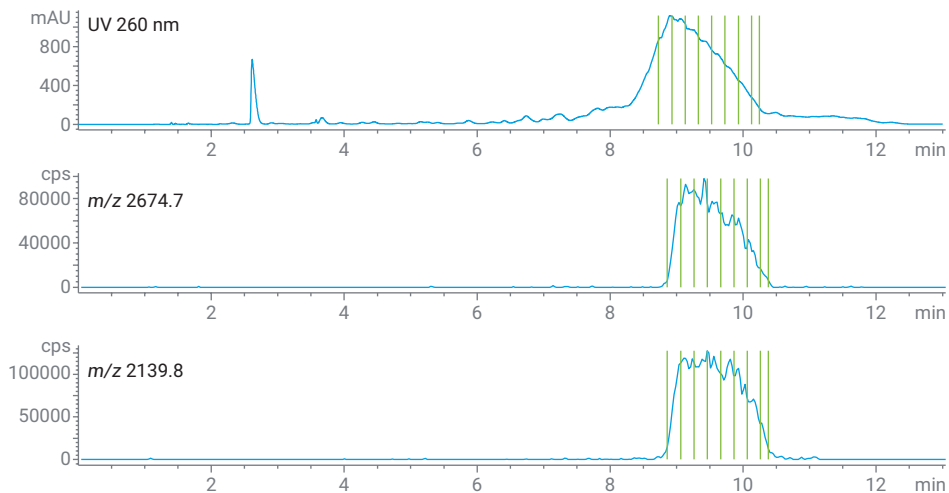


图 8. 使用 DBA/TRIS 和聚焦梯度对短 ON 进行制备型纯化运行。绿色条代表馏分收集的时间片段

短 ON 纯化运行期间收集的 8 个片段的组分再分析结果如图 9 所示。第一个片段(蓝色轨迹)含有杂质,可通过分裂峰观察到。所有其他片段的纯度均 > 99%,可用于最终产品收集。还对长 ON 纯化运行期间收集的 10 张片段进行了重新分析,显示出相似的图片:第一张片段部分被杂质污染,而其他片段的纯度 > 99% (未显示)。为了实现产品的最高回收率,可以收集更多间隔更短的片段。如果应用定量再分析方法,则可以创建列出纯度和产品含量的收集表格,并用于尽可能提高给定纯度要求的产率<sup>[3]</sup>。

## 结论

使用制备型 HPLC 成功纯化了两个含 30–50 个核苷酸的 ON 样品,馏分收集由 MSD 信号触发。采用 MS 兼容方法(HA/HFIP)分析了两个样品,得到选择性触发馏分收集所需的质谱。对于制备纯化,采用了另一种使用 DBA/TRIS 的方法,避免使用昂贵的 HFIP 试剂。尽管 TRIS 与 MS 不兼容,但 MSD 分流中适当的补偿溶剂能够以高选择性和可靠性收集基于质量的馏分。自动纯化软件将通用分析梯度转换为优化后的聚焦梯度,以缩短制备运行并更快地获得纯化化合物。成功收

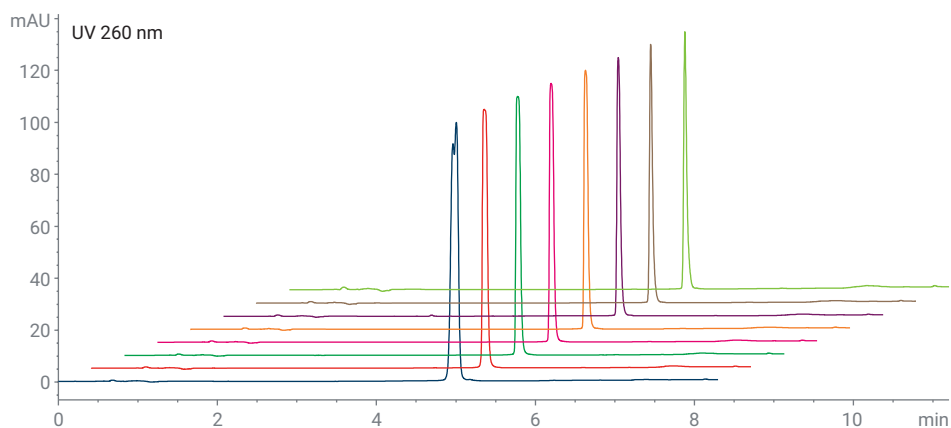


图 9. 短 ON 纯化运行中收集的 8 个馏分分析的色谱图叠加

集了两种 ONs 的馏分片段,可对符合纯度要求的馏分进行再分析和选择性收集。所有运行均使用 Agilent AdvanceBio 寡核苷酸色谱柱进行,该色谱柱可快速且易于从分析应用扩大至制备应用。

## 致谢

本研究得到了瑞典知识基金会通过 KKS SYNERGY 项目“使用数字工具改进过程和质量控制方法”(授权编号 20210021)的支持。作者衷心感谢 Qiagen DNA Synthesis 的 Olle Stålberg 博士提供寡核苷酸样品。

## 参考文献

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 (用于寡核苷酸 LC/UV 和 LC/MS 分析的不同离子对试剂的评估), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-2957EN, **2021**
3. 使用高效液相色谱纯化单链 RNA 寡核苷酸, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-3514ZHCN, **2021**

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

DE68918377

本文中的信息、说明和指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2022  
2022 年 12 月 6 日, 中国出版  
5994-4877ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心:

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价:

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

 **Agilent**  
Trusted Answers