



Reinheitsbestimmung von Oligonukleotiden mit IP-RP

Bei der Festphasensynthese von Oligonukleotiden werden in der Regel Nukleosid-Phosphoramidite als chemische Bausteine eingesetzt. Um unerwünschte Nebenreaktionen zu verhindern, werden Schutzgruppen in die Nukleoside eingeführt. So wird z.B. die 5'-Hydroxygruppe des Zuckerteils mit einer Dimethoxytritylgruppe (DMT) geschützt.

Doch auch bei diesem Ansatz können Verunreinigungen und Abbauprodukte entstehen. Dabei ist die größte He-

erausforderung bei der Aufreinigung von Oligonukleotiden das Vorkommen von strukturell ähnlichen Verunreinigungen. Es sind so genannte „Shortmers“ (n-x) und „Longmers“ (n+x), die sich nur schwer vom Zielprodukt trennen lassen. Der Einsatz von analytischer Chromatographie ist deshalb unerlässlich, um Qualität und Quantität vor und nach der Aufreinigung zu überwachen. Selbstverständlich müssen die Ergebnisse zuverlässig und reproduzierbar sein.



Fioretti et al. (1) beschreiben die Trennung eines Oligonukleotid-Syntheseprodukts. Zur Analyse des Produkts wird eine YMC-TriartC18 UHPLC-Säule im Ionenpaar-Umkehrphasenmodus (IP-RP) verwendet. Die Methode bestimmt die Reinheit des Produkts, hier ein

20-mer Einzelstrang-Nukleotid (s. Tab. 1). Darüber hinaus können auch Verunreinigungen identifiziert werden. Zur weiteren Optimierung der Oligonukleotid-Analyse, für eine noch höhere Ausbeute und Sensitivität, ist die YMC-Accura Triart Bio C18-Säule eine gute Alternative.

Tabelle 1: Oligonukleotid-Sequenz

Einzelstrang-DNA 5'-ATA CCG ATT AAG CGA AGT TT-3'

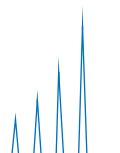




Tabelle 2: Chromatographische Bedingungen

Säule:	YMC-Triart C18 (1,9 µm, 12 nm) 100 x 2,0 mm ID
Artikelnummer:	TA12SP-1002PT
Eluent:	A) 4 mM Triethylamin - 100 mM HFIP* B) Methanol
Gradient:	5%–10%B (1–3 min), 10%–20%B (3–20 min), 20%–90%B (20–22 min)
Flussrate:	0,2 ml/min
Temperatur:	50 °C
Detektion:	UV bei 260 nm
Injektion:	0,5 µl
Probe:	Oligonukleotid-Syntheseprodukt

*Hexafluoroisopropanol

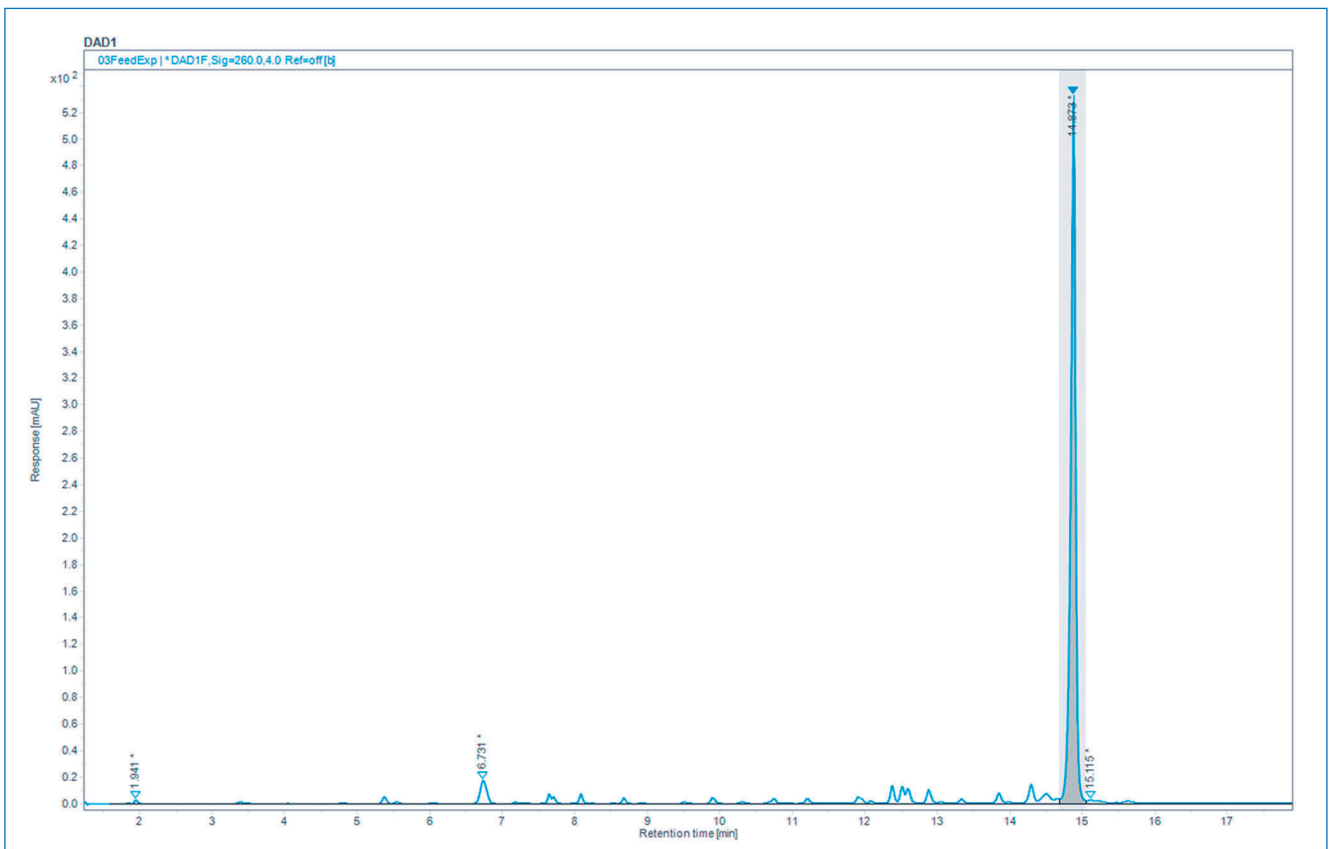


Abbildung 1: Trennung des Oligonukleotid-Syntheseprodukts mittels Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie unter Verwendung einer YMC-Triart C18 UHPLC-Säule.

(1) Fioretti, I., Müller-Späth, T., Weldon, R., Vogg, S., Morbidelli, M., & Sponchioni, M. (2022). Continuous countercurrent chromatographic twin-column purification of oligonucleotides: The role of the displacement effect. *Biotechnology and Bioengineering*, 119, 1861–1872. <https://doi.org/10.1002/bit.28093>

