



УДК 577.113.3:547.963.32.05:543.544

**ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ  
ХРОМАТОГРАФИЯ НУКЛЕОТИДОВ.  
ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ И ИХ РАЗВИТИЕ***Вульфсон А. Н., Якимов С. А.**Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина Академии наук СССР, Москва*

Исследованы возможности разделения моно- и олигонуклеотидов методами высокоэффективной ионообменной, обращенно-фазовой, так называемой «ион-парной» и адсорбционной хроматографии. Изучено влияние состава элюента (растворитель, соли) и его pH на удерживание, селективность и разрешение в обращенно-фазовой и ионообменной хроматографии. Рассмотрена модель гидрофобно-парного ионообменного механизма «ион-парной» хроматографии. Условия разделения оптимизированы по селективности, разрешению и производительности при анализе смесей и препаративном выделении интересующего компонента. Разработаны метод предсказания оптимальной программы градиентного элюирования с заданным временем удерживания, способ выбора сорбента для предколонки, усовершенствована система градиентного элюирования и метод упаковки ВЭЖХ-колонок, продлевающий срок их службы. Описывается метод автоматизированного анализа мономерного состава олигонуклеотидов с помощью ферментативного расщепления иммобилизованным ферментом и последующего ионообменного разделения гидролизата в системе из двух микроколонок.

Разделение смесей моно- и олигонуклеотидов методом ВЭЖХ является ключевой стадией во многих исследованиях в области общей и клинической биохимии, биоорганической химии, молекулярной биологии и генетики. Важной областью применения ВЭЖХ стала геновая инженерия, использующая химически синтезируемые олигонуклеотиды для конструирования функционально активных генов. Хроматография, как способ разделения и как метод исследования, должна обеспечивать высокую эффективность получения и чистоту нуклеотидов и быть достаточно информативной для идентификации интересующих компонентов.

Олигонуклеотиды могут различаться длиной цепи (количеством мономерных звеньев) и набором гетероциклических оснований. На этих различиях и основано разделение смесей нуклеотидов. Разделение по длине осуществляется ионообменной хроматографией (так как длина нуклеотида и количество фосфатных остатков в цепи взаимосвязаны) или эксклюзионной хроматографией, которая здесь не рассматривается из-за недостаточно высокой разрешающей способности для разделения близких по размерам олигонуклеотидов (развитие этого метода, возможно, сдерживается трудностью полного предотвращения адсорбционных взаимодействий нуклеотидов с материалом колонки, см. [1]). Разделение по нуклеотидному составу осуществляется благодаря различию гетероциклов по гидрофобности, которое проявляется в селективном сродстве к неполярным группам сорбентов, либо благодаря различию в зарядах, возникающих при протонировании аминогрупп оснований в кислой среде. С другими подходами к разделению нуклеотидов, не используемыми в ВЭЖХ, можно познакомиться в обзоре [2].

Среди методов разделения олигонуклеотидов, характеризующихся одновременно селективностью к величине их заряда и к составу молекул, выделяется высокой разрешающей способностью распределительная (жидко-жидкостная) обращенно-фазовая ионообменная хроматография — система RPC-5 [3] — разделение на нерастворимом в воде трпоктилметил-аммонии (в виде хлорида, ацтата или другой соли), нанесенном на фто-

Для нуклеотидов и нуклеозидов используется система обозначений, рекомендованная комиссией IUPAC—IUB. Символ d (дезокс) всюду для краткости опущен. ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография.

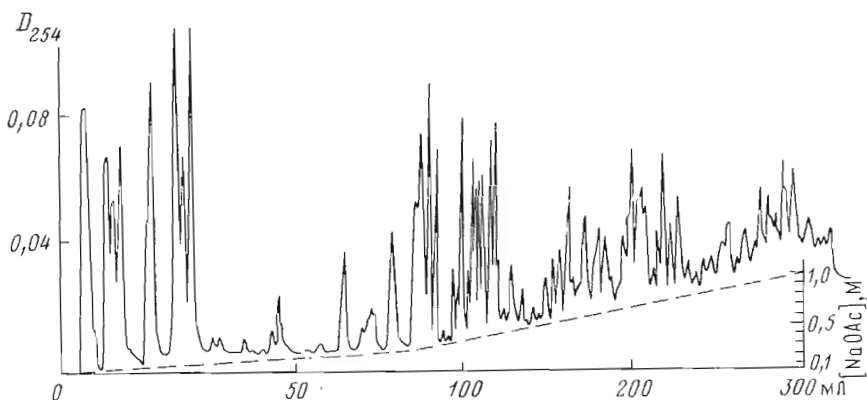


Рис. 1. Ионнообменная жидко-жидкостная хроматография (система RPC-5) моно- и олигонуклеотидов РНКазного гидролизата дрожжевой РНК (1 ОЕ<sub>254</sub> на стеклянной колонке (0,6×50 см)). Условия см. в «Экспериментальной части»

ропластовый порошок. Катионы четвертичного аммония обуславливают анионообменные свойства, а алкильные радикалы придают гидрофобность стационарной фазе. Поэтому нуклеотиды на этом сорбенте разделяются одновременно по длине и составу. Это видно на примере разделения РНКазного гидролизата суммарной РНК дрожжей (рис. 1). В этом гидролизате, по данным чисто ионнообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе по методу Томлинсона и Тенера [4], содержались нуклеотиды длиной от одного до шести звеньев; на RPC-5-хроматограмме этого гидролизата было обнаружено около 90 компонентов [5]. Однако обратной стороной хроматографии, основанной на разделении по двум механизмам, является ее неинформативность, т. е. невозможность идентифицировать нуклеотиды по временам выхода.

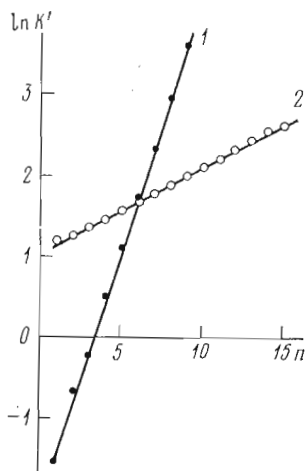
Для повышения информативности при работе с биополимерами целесообразно использовать методы, основанные на различии лишь в одном из свойств молекул.

Для разделения нуклеотидов, различающихся по составу, широко применяется обращенно-фазовая хроматография на неполярных пришито-фазных сорбентах (впервые применена для разделения нуклеотидов в лаборатории Кораны [6]), так как нуклеотиды равной длины (изоплиты), но разного состава различаются гидрофобностью.

Особое значение в олигонуклеотидном синтезе приобрела в последнее время адсорбционная прямо-фазовая (normal-phase, *англ.*) хроматография. Это стало возможным потому, что основные полярные группы продукта конденсации — фосфатные, amino и окси — на протяжении синтеза олигонуклеотида «фосфотриэфирным» методом [7] защищены и эти производные хорошо растворимы в таком малополярном растворителе, как хлороформ. Благодаря этому более простая и быстрая хроматография на силикагеле при выделении продуктов межнуклеотидных конденсаций пришла на смену менее производительной ионнообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе, как это осуществлялось в нуклеотидном синтезе «фосфодифирным» методом [8]. Но в существующей практике часто используют низкоэффективные колонки с силикагелем широкого фракционного состава, сильно нагружаемые пробой.

Основное внимание в данной работе уделено анализу возможностей методов ВЭЖХ и их оптимизации с учетом не только повышения эффективности, селективности и разрешения, но и достижения наибольшей производительности используемых методов, поскольку ВЭЖХ применяется не только для анализа смесей нуклеотидов или определения гомогенности целевого продукта, но и для препаративного выделения высокоочищенных нуклеотидов.

Рис. 2. Зависимости удерживания ( $K'$ ) олигонуклеотидов от количества мононуклеотидных звеньев ( $n$ ) на ионообменной (1 — Zorbax-NH<sub>2</sub>) и неполярной (2 — Zorbax-C8) пришито-фазных колонках. Образец: смесь олигорибоаденилатов гА (рА)<sub>n</sub>. Условия элюирования: 1 — 0,4 М NH<sub>4</sub>OAc (рН 7,0) в 20% MeOH, 1 мл/мин, 35° С; 2 — 0,2 М NH<sub>4</sub>OAc (рН 7,2) в 11% MeOH, 1 мл/мин, 35° С. Обе колонки размером 0,46 × 25 см



### RPC-5-хроматография рибо- и дезоксирибоолигонуклеотидов

Стеклянные колонки, упакованные микрочастицами (6–8 мкм) пористого политрифторхлорэтилена со слоем нанесенного хлористого триоктилметиламмония (см. «Экспериментальную часть»), обладают высокой разрешающей способностью (см. рис. 1), но низкая проницаемость этих колонок сильно снижает скорость хроматографии, которая длится до 20 ч на 50-см колонке при давлении 2–3 атм. Столько же времени занимает регенерирование колонки. Мы установили, что колонки длиной 10–15 см обладают достаточным разрешением для выделения однократной хроматографией целевого продукта блочного жидкофазного олигонуклеотидного синтеза, чистого по мономерному составу и по данным метода нуклеотидных карт [5]. Но и в данном случае разделение длится 3–4 ч. При увеличении скорости потока наблюдается сжатие сорбента начиная с 5–10 атм, сопровождающееся дальнейшим снижением проницаемости. При использовании стальных колонок было показано, что сжатие сорбента прекращается при давлении около 300–400 атм; поэтому колонки, упакованные при 500 атм, оказались стабильными при давлении 120–180 атм, обеспечивавшем разделение за 1–2 ч. Проницаемость таких колонок оказалась в 40–60 раз ниже, чем у колонок, упакованных при низком давлении. Важно то, что низкопроницаемые колонки высокого давления оказались менее эффективными по разрешающей способности и колонки длиной 50 см не всегда обеспечивали необходимую чистоту продукта. Снижение эффективности колонок, упакованных под высоким давлением, вероятно, обусловлено сжатием пористого фторопласта и снижением его удельной поверхности. Срок службы колонок при их непрерывном использовании составлял около 2 месяцев для стеклянных и около 3 месяцев для стальных колонок, при этом не наблюдалось потери стационарной фазы (удерживание нуклеотидов оставалось постоянным при условии, что концентрация соли в элюенте была не менее 0,1 М). Старение колонок проявлялось в снижении проницаемости стеклянных и разрешающей способности стальных колонок. Таким образом, система RPC-5 возможна в двух вариантах: высокоразрешающем, когда хроматография проводится при низкой скорости и давлении, и высокоскоростном, но менее эффективном, и при высоком давлении. Но самый главный недостаток этого метода заключается в неинформативности, что уже указывалось нами ранее.

### Хроматография на пришито-фазных анионообменниках

Мы ставили своей целью поиск сорбента и условий хроматографии на нем, исключающих все взаимодействия нуклеотидов, кроме ионных. Предполагалось разработать аналог метода Томлинсона и Тенера [4], но в

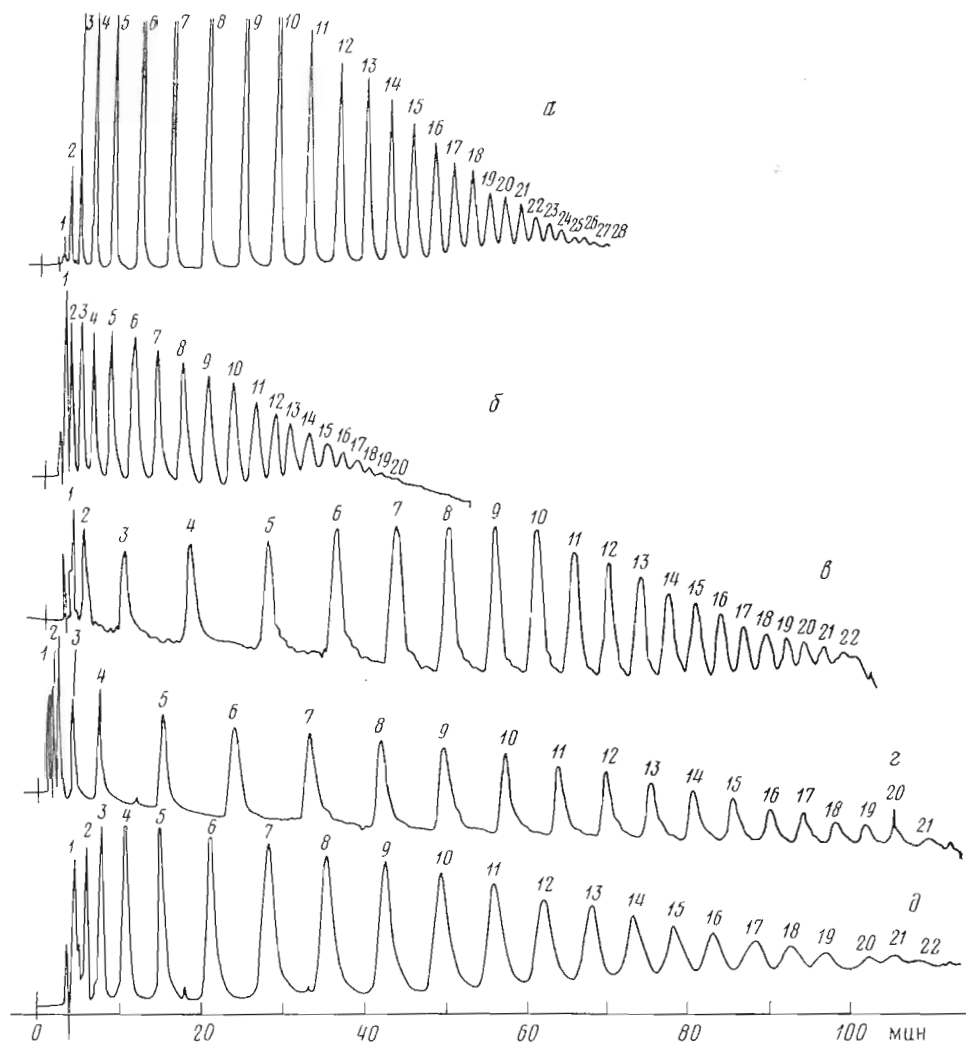


Рис. 3. Ионобменная ВЭЖХ гА(рА)<sub>n</sub> на анионообменных колонках: а — с новым сорбентом типа Sil-O-Si-Alk-N<sup>+</sup>(Alk')<sub>2</sub>Me, где Sil — силикагель, б — Zorbax-SAX, в — Nucleosil-NH<sub>2</sub>, г — Ultrasil-NH<sub>2</sub>, д — Zorbax-NH<sub>2</sub>. Колонки: а — 0,46×15 см, остальные см. в «Экспериментальной части». Условия элюирования: а — линейный градиент NH<sub>4</sub>OAc 0,1–1,0 М/300 мин в 50% MeOH, 0,84 мл/мин; остальные — линейный градиент NH<sub>4</sub>OAc 0,4–2 М/100 мин в 20% MeOH, 1 мл/мин; pH 7,0, температура 25° С

высокоэффективном варианте. Как известно, при хроматографии на DEAE-целлюлозе могут происходить гидрофобные взаимодействия липидных включений сорбента с гетероциклами [9] и присутствующих в небольшом количестве COOH-групп с аминогруппами оснований [10]. Это приводит к частичному разделению олигонуклеотидов по составу и снижает разрешение по величине суммарного заряда фосфатных групп. Для снижения неспецифических взаимодействий при хроматографии нуклеотидов в элюент вводят мочевину (до 7–8 М), значительно увеличивающую вязкость раствора и вследствие этого снижающую скорость потока. Снижение эффективности массопереноса в вязком элюенте компенсируется снижением скорости потока. При этом далеко не оптимальная скорость подвижной фазы (с точки зрения снижения диффузионного расширения полосы) компенсируется вязкостью среды. Этим методом удается разделить смеси нуклеотидов, различающихся на один заряд, до 10–15-звенной длины (при длине колонки порядка 0,5 м). В ранее опубликованной работе [11] мы показали, что фракционирование частиц сорбента повышает проницаемость упакованных им колонок, но не улучшает разрешения, так как снижение вклада вихревой диффузии в размывание

Разрешающая способность по разделению гомоолигонуклеотидов некоторых анионитов на основе пористого силикагеля с химически пришитой стационарной аминофазой

Образец: гА(рА)<sub>n</sub>, n ≈ 30. Элюент: NH<sub>4</sub>OAc (рН 7,0), А — 0,4 М, В — 2 М, оба с 20% MeOH, линейный градиент 1% раствора В/мин. Скорость потока 1 мл/мин. Температура 25° С

| Анионообменные колонки *<br>(размер колонки, см)   | Ultrasil-NH <sub>2</sub><br>(0,46×25) | Nucleosil-NH <sub>2</sub><br>(0,4×25) | Zorbax-NH <sub>2</sub><br>(0,46×25) | Zorbax-SAX<br>(0,46×25) |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| Число разделенных олигомеров<br>(время разделения, мин)  | 22(110)                               | 21(110)                               | 22(115)                             | 20(42)                  |
| Длина цепи последнего разрешенного (R <sub>s</sub> ≥ 1,5) олигомера<br>(время разделения, мин) | 20(94)                                | 21(105)                               | 20(105)**                           | 16(35)***               |
| Размер частиц сорбента, мкм  | 10                                    | 5                                     | 6                                   | 6                       |
| Давление, атм  | 25–30                                 | 125–150                               | 50–75                               | 50–75                   |

\* Коммерческие, упакованные и паспортизованные фирмами-изготовителями.

\*\* Или 19(47) при 35° С.

\*\*\* Или 19(65) при градиенте раствора В 0,5%/мин.

Таблица 2

Оценка возможности получения линейной калибровки «размер олигонуклеотида — время выхода \*» по результатам разделения изоплитов на силикагелевых анионитах

Образец: смесь октануклеотидов Т-А-Т-Г-А-Т-А-Т и А-Г-С-Т-Т-С-С-Т и додекануклеотидов Г-А-Г-А-Г-А-Т-Т-Т-А-С и Т-А-А-С-С-А-Т-Г-Т-С-С-А.  
Условия см. в подписи к табл. 1

| Колонки                   | Начальная концентрация элюента, % раствора В | Октануклеотиды   |                | Додекануклеотиды  |                 | Расстояние между центрами соседних «оконов» (S) ( $\bar{t}_{R12} - \bar{t}_{R8}$ )/4 | Вместимость «оконов» в расстоянии между их центрами ** S/Δt <sub>R</sub> |
|---------------------------|--|------------------|----------------|-------------------|-----------------|--|--|
|                           |  | Δt <sub>R8</sub> | $\bar{t}_{R8}$ | Δt <sub>R12</sub> | $\bar{t}_{R12}$ |  |  |
| Ultrasil-NH <sub>2</sub>  | 20   | 2,0              | 14,25          | 2,5               | 33,75           | 4,88   | 1,95   |
| Zorbax-NH <sub>2</sub>    | 20   | 2,0              | 8,75           | 2,75              | 26,1            | 4,35   | 1,58   |
| Zorbax-SAX                | 0  | 1,5              | 10,5           | 2,0               | 22,0            | 2,88   | 1,44   |
| Nucleosil-NH <sub>2</sub> | 10   | 2,25             | 12,25          | 4,0               | 32,0            | 4,94   | 1,24   |

\*  $\bar{t}_R$  — среднее значение времени выхода (t<sub>R</sub>) в минутах.

\*\* При максимальных значениях Δt<sub>R</sub>.

полосы вещества лимитируется высокой вязкостью. В результате удается увеличить только скорость хроматографии.

В последние годы появилось большое число коммерческих анионообменников на основе пористого силикагеля с размером частиц 5–10 мкм, модифицированного первичным аминоалкилсилиланом (обычно γ-аминопропил) или соответствующим производным четвертичного аммония, и упакованных или высокоэффективных колонок. Эти сорбенты применяются для разделения моно- и олигонуклеотидов, но должным образом не изучены (см., например, [12–15]). В олигонуклеотидном синтезе широко использовали Renvaphase-AAX [16], пелликулярный сорбент на основе частиц размером 30–40 мкм с монолитным ядром и тонким слоем развитой и химически модифицированной поверхности с низкой удельной емкостью. Однако в настоящее время этот сорбент не производится.

В данной работе прежде всего был проведен анализ принципиальных возможностей ионообменной и молекулярной (обращенно-фазовой) ВЭЖХ с использованием в качестве модельной смеси гомологичных олигомеров — олигоаденилатов (гА(рА)<sub>n</sub>, n ≈ 30). Разделение производили на аминопропильном и неполярном октильном сорбентах с одинаковой силикагелевой основой — Zorbax-NH<sub>2</sub> и Zorbax-C8. В результате получили линейные зависимости ln K' (K' — удерживание, измеряемое выражением K' =

Зависимость разрешения ( $R_S$ ) и приведенного разрешения ( $R_S/t_{R_2}$ ) изоплитов на новом анионите от концентрации MeOH в элюенте

| № | MeOH, %          | [NH <sub>4</sub> OAc], M | $R_S$ | $t_{R_2}$ , мин | $R_S/t_{R_2}$ |
|---|------------------|--------------------------|-------|-----------------|---------------|
| 1 | 50               | 0,1 → 1/200 мин          | 0,28  | 26,5            | 0,01          |
| 2 | 30               | 0,1 → 1/80 мин           | 1,82  | 33,0            | 0,05          |
| 3 | 20               | 0,1 → 1/40 мин           | 3,52  | 62,5            | 0,06          |
| 4 | 20 → 100/200 мин | †                        | 3,16  | 23,0            | 0,14          |

Примечания. Колонка: 0,46×15 см, частицы 5 мкм. Образец: смесь гексануклеотидов G-G-T-A-C-C и G-A-A-T-T-C. Скорость потока: 0,7 мл/мин. Температура 20°С. См. также рис. 4 и ср. с рис. 5.

$= (t_R - t_0)/t_0$ , где  $t_R$  и  $t_0$  — времена удерживания интересующего вещества и несорбируемого компонента) от  $n$ , причем крутизна прямой для анионита значительно больше, чем для неполярного сорбента (рис. 2). При этом коэффициенты селективности  $\alpha (\alpha = K'_2/K'_1)$  разделения соседних гомологов составляют на анионите 1,8, а на неполярном сорбенте 1,1, что является наглядным подтверждением предпочтительности ионообменной ВЭЖХ для разделения олигонуклеотидов по длине цепи. Для того чтобы иметь возможность программировать градиентное элюирование (см. ниже), мы определили зависимость удерживания от концентрации элюента; она имеет вид:  $\ln K' = a - b \ln [NH_4OAc]$ . Хроматография мононуклеотидов при нейтральном pH показала, что ионные взаимодействия играют заметную роль и на анионите ( $K'$  составляет: для pT — 0,7, для pG и pC — 1,05, для pA — 1,2;  $\alpha_{pA/pT} = 1,7$ , ср. с данными табл. 4). Одновременно проведено сравнение нескольких коммерческих аминпропильных (с первичной аминогруппой и четвертичной аммонийной группой) пришито-фазных сорбентов по их разрешающей способности (модельная смесь — те же гА (pA)<sub>n</sub>) и селективности к гетероциклическому составу при хроматографии гетерогенных изоплитов. В качестве элюента использовали раствор NH<sub>4</sub>OAc (pH 7,0) с добавлением 20% метанола, несколько увеличивающего эффективность разделения; этот элюент удобен тем, что удаляется из элюата упариванием в вакууме, поэтому не требуется стадии обессоливания при препаративных выделениях олигонуклеотидов. По разрешающей способности испытанные сорбенты оказались очень близкими — они примерно одинаково разделяют до 20–22 гомоолигонуклеотидов (табл. 1 и рис. 3). Сравнение же их по селективности к гетероциклическому составу выявило большие различия между ними, по, по-видимому, получить линейную калибровку «длина олигонуклеотида — удерживание» с перекрывающимися временными «окнами» возможно (см. табл. 2). Поэтому во многих случаях, как, например, в блочном олигонуклеотидном синтезе, эти сорбенты могут быть использованы благодаря разрешающей способности, достаточной для выделения 15–20-звенных олигомеров. Нагрузочная способность таких колонок (0,46×25 см) равна 5–10 ОЕ<sub>234</sub> олигонуклеотида в пике.

Наряду с коммерческими анионообменными колонками мы испытали новый анионит, полученный также на основе пористого силикагеля с пришитой стационарной фазой типа четвертичного аммониевого производного\*. Благодаря особенности строения этого сорбента массообмен на стационарной фазе протекает быстро, поэтому упакованные им колонки (способ упаковки см. ниже) обладают высокой эффективностью (6–7 тысяч теоретических тарелок при длине колонки 15 см), измеренной при хроматографии пентануклеотида (в аналогичных условиях коммерческие колонки длиной 25 см показали в 2–3 раза более низкую эффективность). Высокая разрешающая способность этого анионита позволяет разделять

\* Работа проведена совместно с Г. В. Лисичкиным и С. М. Староверовым (химический факультет МГУ). Детали синтеза будут опубликованы отдельно.

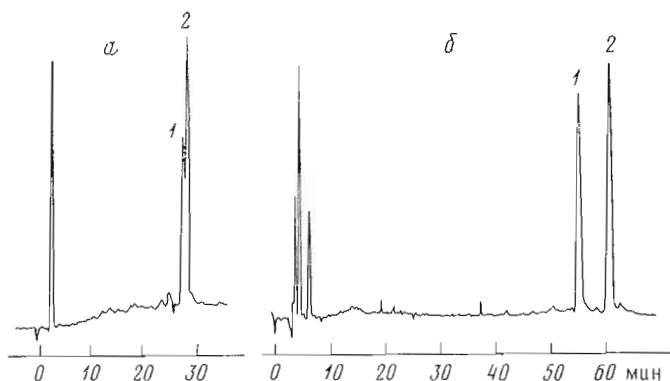


Рис. 4. Хроматографии гексануклеотидов G-G-T-A-C-C (1) и G-A-A-T-T-C (2) на новом анионите. Влияние концентрации MeOH на селективность к гетероциклическому составу олигонуклеотидов. Элюент:  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (pH 7,0), градиент 0,1–1 M / 300 мин, а – в 50% MeOH, б – в 20% MeOH. Температура 25° С

до 30 гомеолигонуклеотидов (см. рис. 3а). Гидрофобность стационарной фазы нового сорбента достаточно сильно выражена, но его селективностью к гетероциклическим основаниям, т. е. вкладом молекулярных взаимодействий с адсорбатом, легко управлять, изменяя концентрацию органического растворителя (метанол, ацетонитрил) в элюенте. Поэтому им можно пользоваться как для чисто ионообменной ВЭЖХ (в 50% метаноле), так и для молекулярной хроматографии (типа обращенно-фазовой на неполярном сорбенте) без участия ионных взаимодействий с адсорбатом — в среде с высокой ионной силой (см. табл. 3 и рис. 4).

#### Обращенно-фазовая хроматография

В настоящее время этот метод представляется важнейшим и наиболее широко используемым в исследованиях нуклеиновых кислот. Как уже отмечалось, он впервые был использован для хроматографии нуклеотидов в лаборатории Х. Г. Кораны [6]. Широкое применение этого метода для разделения нуклеотидов основано на высокой селективности неполярных сорбентов к гетероциклическим основаниям, что позволяет легко разделять не только природные нуклеотиды с ограниченным набором гетероциклов, но и модифицированные нуклеотиды. Разрешающая способность обращенно-фазовых колонок настолько повысила производительность разделений и чистоту олигонуклеотидов, что Х. Г. Корана придавал равное значение совершенствованию химической методологии получения олигонуклеотидов и применению ВЭЖХ в развитии геной инженерии [17].

Вслед за первой работой большинство последователей (например, [18]) пользуются той же системой: сорбент  $\mu\text{Bondapak-C}_{18}$  и водный ацетонитрил, содержащий 0,1 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  в качестве элюента, несмотря на замеченную необратимую сорбцию [18] значительной части нуклеотидов на этом сорбенте и то, что в последние годы появились более эффективные колонки с другими сорбентами этого же типа.

Известно, что тип стационарной фазы и способ ее пришивания к силикагелю, не говоря о различии свойств силикагелей разного происхождения, существенным образом влияют на основные свойства сорбентов для обращенно-фазовой ВЭЖХ (см., например, [19]). Наиболее эффективные сорбенты получают агглютинированием коллоидных частиц силиказоля в микросферы заданного размера и пористости с узким распределением пор по диаметру; силикольные группы поверхности химически модифицируют монофункциональными реагентами типа  $\text{RMe}_2\text{SiCl}$  (R — радикал, выполняющий роль стационарной фазы) с максимальной, стерически возможной степенью модификации. Полифункциональные реагенты (ди- или трихлор- либо ди- или триалкоксисиланы) в условиях мо-

Удерживание ( $K'$ ) и селективность ( $\alpha$ ) разделения моноуклеотидов на обращенно-фазовых колонках

| Моноуклеотиды                                       | Nucleoside-ODS** |          | Ultrasphere-ODS** |          | Zorbax-ODS** |          | Microsorb-CN** |          | Zorbax-C8** |          | μBondapak-C <sub>18</sub> <sup>c*</sup> |          | Ultrasphere-C8** |          |
|---|------------------|----------|-------------------|----------|--------------|----------|----------------|----------|-------------|----------|---|----------|------------------|----------|
|   | $K'$             | $\alpha$ | $K'$              | $\alpha$ | $K'$         | $\alpha$ | $K'$           | $\alpha$ | $K'$        | $\alpha$ | $K'$                                    | $\alpha$ | $K'$             | $\alpha$ |
| 1% ацетонитрил с 0,1 М NH <sub>4</sub> OAc (pH 7,2) |                  |          |                   |          |              |          |                |          |             |          |   |          |                  |          |
| pC  | 0,08             | 8,76     | 0,07              | 9,0      | 0,09         | 5,78     | 0,15           | 5,2      | 0,13        | 3,23     | 0,19                                    | 4,3      | 0,04             | 2,98     |
| pT  | 0,71             | 2,13     | 0,63              | 1,7      | 0,52         | 4,42     | 0,78           | 1,5      | 0,42        | 4,36     | 0,82                                    | 1,8      | 0,12             | 1,0      |
| pG  | 1,51             | 2,23     | 1,07              | 2,3      | 0,74         | 2,51     | 1,18           | 2,3      | 0,57        | 3,45     | 1,46                                    | 1,75     | 0,12             | 1,68     |
| pA  | 3,44             |          | 2,47              |          | 1,86         |          | 2,74           |          | 1,97        |          | 2,56                                    |          | 0,21             |          |
| $\alpha_{pA/pC}$                                    | 42,1             |          | 35,3              |          | 20,67        |          | 18,3           |          | 15,15       |          | 13,5                                    |          | 5,0              |          |
| 1% метанол с 0,1 М NH <sub>4</sub> OAc (pH 7,2)     |                  |          |                   |          |              |          |                |          |             |          |   |          |                  |          |
| pC  | 0,24             | 5,08     | 0,21              | 5,44     | 0,13         | 7,15     |                |          | 0,09        | 5,7      |   |          | 0,04             | 2,98     |
| pT  | 1,22             | 1,82     | 1,14              | 1,41     | 0,93         | 1,9      |                |          | 0,5         | 1,6      |   |          | 0,12             | 1,0      |
| pG  | 2,22             | 2,34     | 1,61              | 2,44     | 1,77         | 2,36     |                |          | 0,78        | 2,5      |   |          | 0,12             | 2,34     |
| pA  | 5,2              |          | 3,93              |          | 4,53         |          |                |          | 1,96        |          |   |          | 0,29             |          |
| $\alpha_{pA/pC}$                                    | 21,7             |          | 18,7              |          | 34,85        |          | 22,5           |          | 6,95        |          |   |          |                  |          |

\* 0,4×25 см, поток 0,6 мл/мин, 85 атм.

\*\* 0,46×25 см, поток 0,7 мл/мин, 90 атм.

\*\*\* 0,39×30 см, поток 2 мл/мин, 130 атм.

\*\*\*\* 0,2×25 см, поток 0,33 мл/мин, 35 атм.

\*\*\*\*\* 0,46×25 см, поток 0,7 мл/мин, 90 атм.



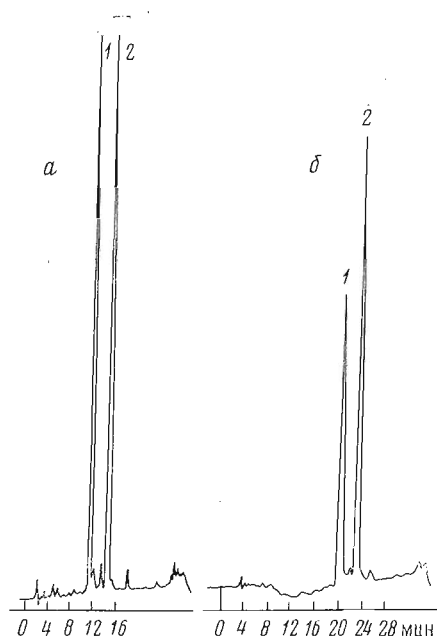


Рис. 5

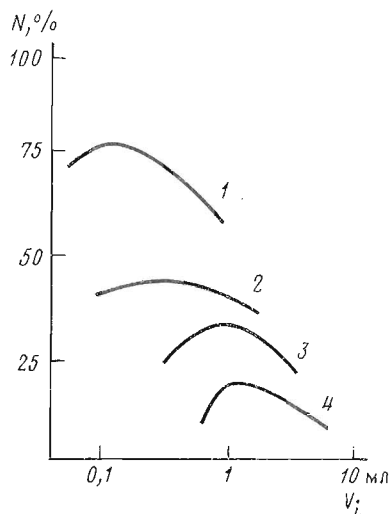


Рис. 6

Рис. 5. Обращенно-фазовая хроматография гексануклеотидов (1 — G-G-T-A-C-C, 2 — G-A-A-T-T-C) на колонках Zorbax-C8 (а) и Zorbax-ODS (б) (обе колонки имели паспортную эффективность  $\sim 15\,000$  теоретических тарелок). Элюент: А — 40% MeOH в 0,2 М  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (рН 7,2), В — 37% MeOH в 0,14 М  $\text{NH}_4\text{OAc}$  (рН 7,2); а — градиент 1,7% раствора В/мин, поток 1 мл/мин; б — градиент начиная с 10% раствора В 2,5% раствора В/мин, поток 0,84 мл/мин. Давление 80 атм, температура 35°С

Рис. 6. Нагрузочная способность препаративной (2,3×25 см) обращенно-фазной колонки Zorbax-C8. Зависимость эффективности ( $N$ ) от нагрузки (в мг) и объема ( $V_i$ ) вводимой пробы. Кривые 1–4 соответствуют нагрузке 5, 10, 20 и 50 мг соответственно. Элюент: MeOH–H<sub>2</sub>O (45 : 55), скорость потока 10 мл/мин. Образец: бензиловый спирт,  $K'$  1,5

дифицирования Si–ОН-групп в некоторой степени поликонденсируются и образуют стационарную фазу в виде длинных разветвленных цепей, поэтому данные о содержании углерода в стационарной фазе таких сорбентов не отражают степени модифицирования их поверхности. Различия в структуре сорбента и стационарной фазы сказываются на важнейших характеристиках: селективности, эффективности массопереноса, способности к адсорбции немодифицированной (и незкранированной) поверхности силикагеля (эти вопросы подробно освещены в монографиях [20, 21] и диссертации [22]).

С целью устранения имеющихся недостатков в сегодняшней практике обращенно-фазовой ВЭЖХ нуклеотидов и дальнейшего развития последней как для аналитического, так и препаративного применения мы провели настоящее исследование. Прежде всего был испытан ряд сорбентов с октильной и октадецильной стационарной фазой (см. табл. 4) на величину удерживания и селективность к гетероциклическому составу нуклеотидов. При использовании элюента с ацетонитрилом наиболее селективными оказались сорбенты Nucleosil-ODS и Ultrasphere-ODS, в то время как  $\mu\text{Bondapak-C}_{18}$  оказался в 3 раза менее селективным. Учитывая экономические соображения, мы проверили возможность замены ацетонитрила на метанол (этанол не использовался из-за высокой вязкости его водных растворов, снижающей эффективность массопереноса), причем оказалось, что расположение сорбентов в ряду по величине удерживания и селективности при использовании водного метанола отличается от расположения, полученного при использовании водного ацетонитрила, и лучшими по селективности оказались Zorbax-ODS и Zorbax-C8. Из этих двух сорбентов Zorbax-C8 оказался предпочтительнее, так как из-за меньшей удерживающей способности для элюирования олигонуклеотидов требуется

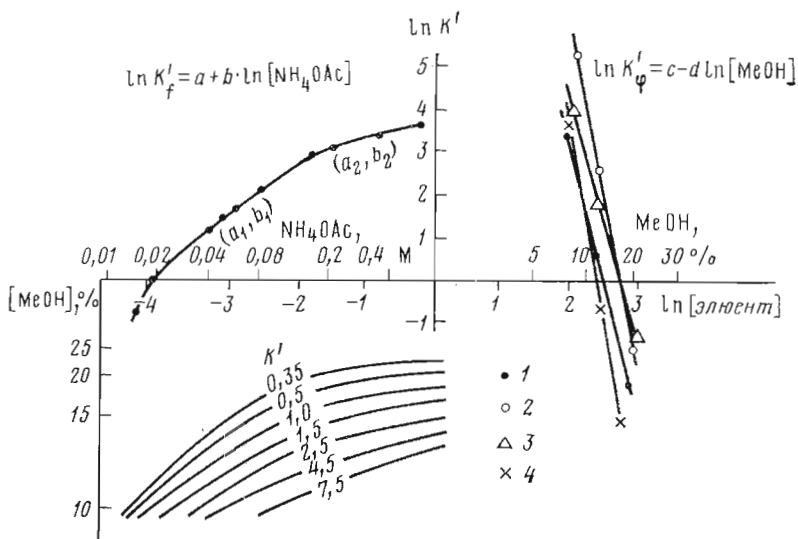


Рис. 7. Зависимость удерживания нуклеотидов в обращенно-фазовой хроматографии от концентрации соли и MeOH в элюенте. Колонка Zorbax-C8. Скорость потока 1 мл/мин. Температура 35° С. 1 — T-A-A-G-C-A-G-A-T-G-C-C-A, 2 — A-T-C-T-T-A-C-T-G-C-A-T, 3 — A-A-T-T-C-G-G-T-T, 4 — C-G-A-A-T-T-C-G.  $K'_f$  — при постоянной концентрации MeOH (10%),  $K'_\phi$  — при постоянной концентрации  $NH_4OAc$  (0,2 М)

более низкая концентрация метанола (10–20% против 20–40% на Zorbax-ODS), что существенно по двум причинам: 1) 30–40% растворы метанола в воде попадают в область аномальной вязкости (1,3–1,6 сП), что сопровождается снижением эффективности (ср. хроматограммы на рис. 5) и повышенном давлении; 2) в 2 раза сокращается расход растворителя, составляющий на Zorbax-C8 5–10 л в месяц.

Поскольку нуклеотиды весьма чувствительны к pH среды, мы провели влияние pH на селективность и убедились в том, что ионные свойства молекул нуклеотидов не играют роли при взаимодействии их с неполярной стационарной фазой. (В кислой среде гетероциклические основания протонируются и приобретают положительный заряд, возрастающий в ряду: pT, pG, pA, pC [23].) Порядок выхода с обращенно-фазовой колонки в интервале pH 4–7,2 соответствует возрастанию гидрофобности в ряду: pC, pT, pG, pA. Селективность их разделения при увеличении pH возрастает ( $\alpha_{pA/pC}$  составляет: при pH 4,5 — 4, при pH 5,5 — 5, при pH 6,5 — 8, при pH 7,0 — 13, при pH 7,2 — 22,5); мы остановились на pH 7,2, поскольку при этом еще не происходит гидролиз силилового эфира стационарной фазы.

Сорбционно-десорбционное равновесие на этом сорбенте постоянно и не зависит от количества образца при нагрузке до 10 ОЕ<sub>254</sub> олигонуклеотида (около 0,4 мг) в пике при диаметре колонки 0,46 см; до 40 ОЕ<sub>254</sub> при диаметре колонки 0,94 см и до 200 ОЕ<sub>254</sub> при диаметре колонки 2,12 см. Нагрузка, равная половине от указанной, снижает эффективность разделения на 40–50%, а полная нагрузка снижает в 2 раза разрешение. В ходе длительного препаративного использования колонок был неоднократно подтвержден их количественный баланс. Как известно, нагрузочная способность колонки зависит от концентрации вводимой пробы [24–26], и это подтвердили наши определения (см. рис. 6)\*; но при градиентном элюировании объем вводимой пробы не столь существен, если вещество растворено в относительно слабом (по отношению к элюенту) растворителе. Учитывая, что количественный уровень генно-инженерных работ с использованием моно- или олигонуклеотидов составляет доли миллиграмма — несколько миллиграммов, найденные нагрузочные способности колонок оказываются достаточными.

\* Проведены совместно с А. Т. Кожичем и Г. Г. Васняровым (ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР).

Нами было исследовано также влияние концентрации соли в элюенте на разделение (рис. 7). При концентрации соли менее 0,02 М  $K' < 0$ , что может быть объяснено электроэкслюзией отрицательно заряженных нуклеотидов из пор сорбента, несущего отрицательный поверхностный заряд. После нейтрализации поверхностного заряда и увеличения концентрации соли до 0,14 М, вероятно, происходит нейтрализация заряда нуклеотидов, и это сильно увеличивает удерживание (средство сольватированных нуклеотидов к неполярной фазе возрастает), которое находится в логарифмической зависимости от концентрации соли. При дальнейшем увеличении концентрации соли следует область слабо выраженного увеличения средства нейтрализованных нуклеотидов к неполярной стационарной фазе. Для моно- и олигонуклеотидов эти зависимости аналогичны и различаются только значениями коэффициентов уравнения  $\ln K' = a + b \ln [NH_4OAc]$  из-за разных вкладов полярных и гидрофобных частей молекул (при различном размере и составе молекул) в общее удерживание. Далее, мы нашли зависимость удерживания от концентрации метанола. На рис. 7 эта зависимость приведена также в спрямленном виде:  $\ln K' = c - d \ln [MeOH]$ . Причина логарифмической, а не линейной (как для менее полярных соединений: многоядерных ароматических углеводов [27, 28], спиртов и фенолов [29], ароматических кислот [30]) зависимости  $\ln K'$  от концентрации метанола нами не установлена, но, видимо, не случайно удерживание высокополярных нуклеотидов на обращенно-фазовом сорбенте подчиняется закономерности, которая характерна для адсорбционной прямо-фазовой хроматографии (см. [31, 32]). Далее, любым из трех способов — экспериментально, математически или графически — можно найти выражение одновременного влияния концентраций соли и метанола на удерживание (рис. 7, внизу) в виде частных решений по  $K'$ . Видно, что одно и то же значение  $K'$  можно получить при разных комбинациях концентраций метанола и соли, но важно найти оптимальные с точки зрения разрешающей способности и производительности условия элюирования.

*Оптимизация состава элюента. Метод предсказания оптимальной программы градиента с заданным временем выхода интересующего компонента*

На рис. 7 видно, что, например, для  $K' = 1$  можно варьировать концентрацию метанола в пределах 10—18% и соли — в пределах 0,02—1 М, но практический интерес представляет область слабо выраженной зависимости удерживания от концентрации соли, т. е. выше 0,14 М. Учитывая относительные вклады влияния на  $K'$  концентраций обоих компонентов элюента, можно программировать двойные градиенты как одинакового, так и противоположного направления. Градиентное элюирование (с программируемым составом элюента) — наиболее простой метод изменения условий разделения в ходе самого процесса разделения — в большинстве случаев необходимо при хроматографии реальных смесей нуклеотидов (синтетических или природного происхождения) из-за больших различий в удерживании компонентов, обусловленных большим различием в средстве к стационарной фазе. Не вдаваясь в рассмотрение теории этого метода (см., например, монографии [21, 33, 34]), отметим лишь наиболее существенное для нас: градиентное элюирование позволяет за значительно меньшее время элюировать с колонки все компоненты сложной смеси и примерно с одинаковой эффективностью, но при этом разрешение соседних компонентов всегда хуже, чем при их разделении в изократических (постоянных) условиях. Для аналитических разделений этот компромисс не столь существен, как в препаративной ВЭЖХ, и в этом случае предпочтительно использовать преимущества градиентного элюирования — быстроту и обзорность, но в оптимизированных условиях, обеспечивающих удовлетворительное разрешение. Результаты наших поисков приведены в табл. 5: при разделении гексануклеотидов GGТАСС и GAАТТС, содержащих одинаковое количество слабо и более сильно удерживаемых мономерных

Зависимость разрешения ( $R_S$ ) и приведенного разрешения ( $R_S/t_{R_2}$ )  
от условий градиентного элюирования

Обращенно-фазовая хроматография гексапуклеотидов G-G-T-A-C-C и G-A-A-T-T-C на колонке Zorbax-CS (0,46×25 см). Скорость потока 1 мл/мин. Температура 35°С. Задержка ввода пробы 2,5 мин после старта градиентной программы

| Номер серии | Программа градиента  |                          |                             | $R_S$ | $t_{R_2}$ , мин | $R_S/t_{R_2}$ |
|-------------|--|--------------------------|-----------------------------|-------|-----------------|---------------|
|             | Элюент: $\frac{\text{MeOH, \%}}{[\text{NH}_4\text{OAc}], \text{ M}}$ |                          | Длительность программы, мин |       |                 |               |
|             | А  | В                        |                             |       |                 |               |
| 1           | $\frac{10}{0,2}$   | $\frac{37^{1*}}{0,29}$   | 40                          | 4,5   | 13,3            | 0,34          |
|             |  |                          | 70                          | 5,6   | 13,6            | 0,41          |
|             |  |                          | 100                         | 6,0   | 14,2            | 0,42          |
| 2           | $\frac{10}{0,2}$   | $\frac{37^{2*}}{0,2}$    | 40                          | 6,4   | 13,0            | 0,49          |
|             |  |                          | 70                          | 6,6   | 13,8            | 0,48          |
|             |  |                          | 100                         | 6,4   | 14,5            | 0,44          |
| 3           | $\frac{10}{0,2}$   | $\frac{37^{3*}}{0,145}$  | 40                          | 5,4   | 13,9            | 0,39          |
|             |  |                          | 70                          | 6,3   | 14,1            | 0,45          |
|             |  |                          | 100                         | 6,7   | 14,8            | 0,45          |
| 4           | $\frac{5}{0,1}$  | $\frac{33,5^{4*}}{0,19}$ | 40                          | 6,2   | 18,4            | 0,34          |
|             |  |                          | 70                          | 8,4   | 22,2            | 0,38          |
|             |  |                          | 100                         | 9,7   | 25,7            | 0,38          |
| 5           | $\frac{5}{0,1}$  | $\frac{33,5^{5*}}{0,07}$ | 40                          | 5,7   | 18,3            | 0,31          |
|             |  |                          | 70                          | 6,8   | 21,7            | 0,31          |
|             |  |                          | 100                         | 7,5   | 24,7            | 0,30          |

Примечания. Использовалась линейная градиентная программа элюента В (0→30%) в элюенте А (диапазон 0—80 делений шкалы формирователя градиента модель 838). Истинный состав элюента В: <sup>1\*</sup> 100% MeOH с 0,5 M солью, <sup>2\*</sup> 100% MeOH с 0,2 M солью, <sup>3\*</sup> 100% MeOH, <sup>4\*</sup> 100% MeOH с 0,4 M солью, <sup>5\*</sup> 100% MeOH.

звеньев, мы программировали одинаково и противоположно направленные линейные градиенты концентраций метанола и соли и варьировали их крутизну. Оптимизация условий была направлена на достижение лучшего разрешения ( $R_S$ ) и высокой производительности, которую отражает приведенное ко времени разрешение ( $R_S/t_{R_2}$ ). При одновременном возрастании концентраций метанола и соли (серия 1)  $R_S$  и  $R_S/t_{R_2}$  оказались ниже, чем при неизменной или убывающей концентрации соли (серии 2 и 3). Расширение диапазона концентраций (серии 4 и 5) оказалось невыгодным, так как длительность разделения возросла в большей степени, чем разрешение. Лучшими оказались результаты серии 3: здесь достигается высокое разрешение при высокой производительности. Кроме того, для такой градиентной программы в качестве второго компонента («В») был использован чистый метанол. Это повышает воспроизводимость и позволяет удалять с колонки сильно удерживаемые примеси (например, в олигонуклеотидном синтезе это могут быть олигонуклеотиды с не полностью удаленными защитными группами или побочные продукты сульфонирования по гетероциклам) без смены элюента.

Для анализа многокомпонентных смесей олигонуклеотидов найденные условия оказались удобными. Однако времена выхода 10—12-звенных олигонуклеотидов различались в 3 раза (от 10 до 30 мин), поэтому для препаративных выделений интересующих компонентов эти условия целесообразно оптимизировать по времени и разрешению от близких примесей. Для этого надо было найти способ определения узких пределов концентрации составных частей элюента в градиентной программе, в которых элюируется целевой компонент с хорошим разрешением, и в то же время сократить длительность элюирования предшествующих компонентов смеси.

Такой способ предсказания удовлетворительной по разрешению градиентной программы с произвольно задаваемым временем выхода интересующего компонента смеси мы разработали на основе ранее найденной

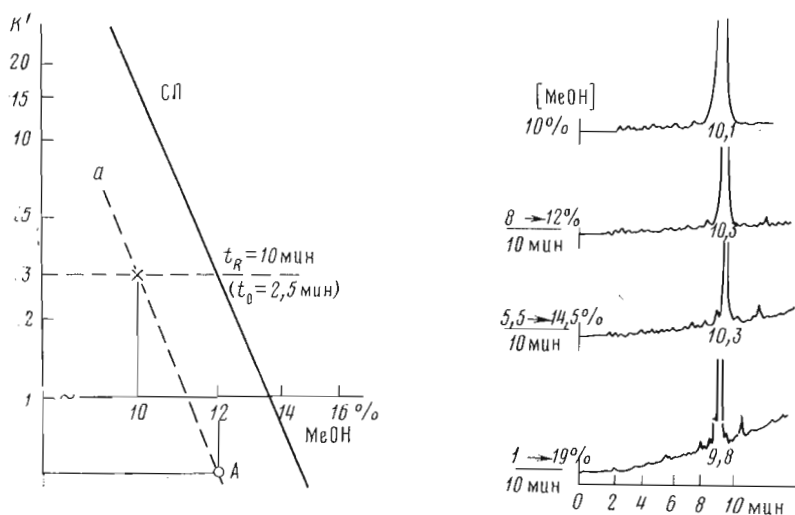


Рис. 8. Иллюстрация способа предсказания градиентной программы элюирования с заданным временем выхода интересующего компонента. Слева — нахождение концентрации MeOH (обозначено звездочкой), соответствующей заданному (10 мин) времени удерживания; СЛ — средняя линия удерживания олигонуклеотидов (по данным, приведенным на рис. 7). Справа — хроматограммы того же образца при разных по крутизне градиентных программах, симметричных относительно найденной (10%) концентрации MeOH. Ввод пробы в градиентных циклах с 2,5-мин задержкой после старта градиента. Пояснения см. в тексте

зависимости  $K'$  от концентрации метанола. Проиллюстрируем его на конкретном примере. При некоторой концентрации метанола (например, 12%) проводится изократическая хроматография нового образца и определяется его  $K'$  (на рис. 8 точка А). Через эту точку проводим прямую  $a$  параллельно средней линии (СЛ), полученной осреднением экспериментальных зависимостей для ряда исследованных олигонуклеотидов (см. рис. 7; легко убедиться, что разница в наклоне этих прямых и средней линии не приводит к большим ошибкам, так как диапазон концентрации метанола для  $K'=1-5$  невелик. Если необходимо исключить эту ошибку или если отсутствуют данные для построения средней линии, то можно провести вторую изократическую хроматографию образца при другой концентрации метанола и построить искомую прямую  $a$  по двум экспериментальным точкам). На прямой  $a$  можно задать любое желаемое время выхода интересующего компонента смеси и узнать необходимую для этого концентрацию метанола; в данном примере мы задали  $t_R=10$  мин, чему соответствует концентрация метанола, равная 10% (проверка — верхняя хроматограмма на рис. 8 — подтвердила правильность найденной концентрации). Программирование градиента по нашему способу включает эту найденную концентрацию метанола как среднюю величину между концентрациями, соответствующими началу и концу программы, длительность которой равна задаваемому времени выхода интересующего компонента; крутизну градиента (например, 8–12%/10 мин или 1–19%/10 мин, см. рис. 8) легко выбрать по первой изократической хроматограмме, на которой видно, близко или далеко от интересующего компонента находятся пики других компонентов смеси. При этом следует учитывать, что наиболее пологий градиент обеспечит лучшее разрешение. Из того же рисунка видно, насколько хорошо ( $\pm 2-3\%$ ) воспроизводится заданное нами время выхода. Применение найденных условий разделения и метода программирования градиента показано (рис. 9) на примере препаративного выделения синтетического додекануклеотида G-T-T-G-T-T-G-A-C-A-T-T (один из фрагментов промотора РНК-полимеразы *E. coli*; все синтетические олигонуклеотиды-фрагменты ДНК выделялись аналогично).

Однако выделение обращенно-фазовой ВЭЖХ индивидуального по хроматограмме, как на рис. 9, олигонуклеотида не всегда означает его гомо-

| PK *  | TIME  | AREA   | AREA % |
|-------|-------|--------|--------|
| 1     | 2.42  | 714    | .11    |
| 2     | 11.32 | 1291   | .20    |
| 3P    | 12.35 | 3026   | .46    |
| 4P    | 12.87 | 5840   | .90    |
| 5P    | 13.18 | 6698   | 1.03   |
| 6P    | 13.47 | 3246   | .50    |
| 7P    | 14.35 | 35966  | 5.52   |
| *8P   | 15.26 | 177672 | 27.27  |
| 9P    | 15.77 | 25324  | 3.89   |
| 10P   | 16.76 | 11424  | 1.75   |
| 11P   | 17.21 | 3244   | .50    |
| 12P   | 17.56 | 928    | .13    |
| 13P   | 17.85 | 2480   | .38    |
| 14P   | 18.14 | 5572   | .86    |
| 15P   | 18.94 | 3568   | .55    |
| 16P   | 19.69 | 6764   | 1.04   |
| 17P   | 20.25 | 25216  | 3.87   |
| 18P   | 20.57 | 30320  | 4.65   |
| 19P   | 20.94 | 10136  | 1.56   |
| 20P   | 21.32 | 11456  | 1.76   |
| 21P   | 21.69 | 12456  | 1.91   |
| 22P   | 22.44 | 86996  | 13.35  |
| 23P   | 23.08 | 54912  | 8.27   |
| 24P   | 23.56 | 10542  | 1.62   |
| 25P   | 24.35 | 102364 | 15.71  |
| 26P   | 25.37 | 14488  | 2.22   |
| TOTAL |       | 651543 | 100.01 |

| PK *  | TIME  | AREA  | AREA % |
|-------|-------|-------|--------|
| 1P    | 2.68  | 179   | .26    |
| *2    | 15.27 | 68057 | 89.74  |
| TOTAL |       | 68236 | 100.00 |

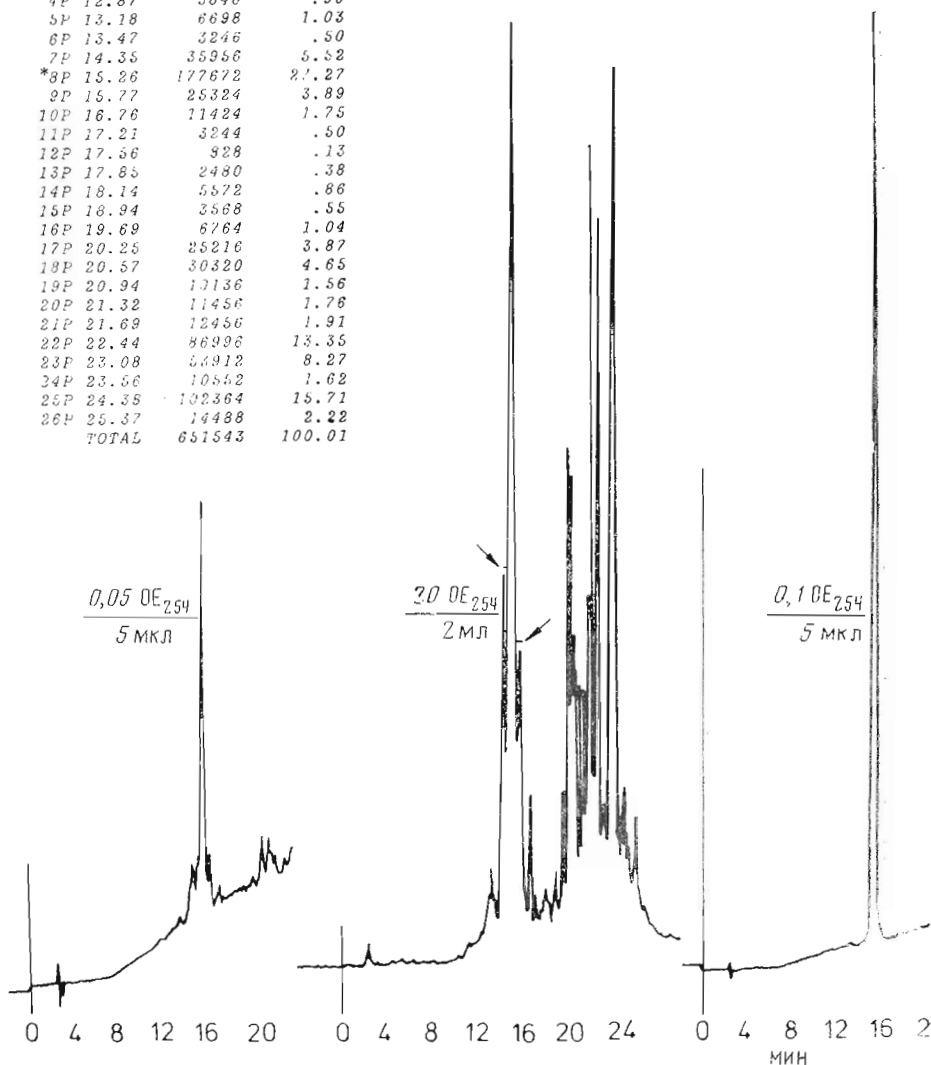


Рис. 9. Выделение синтетического додекануклеотида G-T-T-G-T-T-G-A-C-A-T-T обращенно-фазовой ВЭЖХ с программированием состава элюента и заданным временем выхода 15 мин. Колонка Zorbax-C8 (0,46×25 см). Условия см. в табл. 5, № 3. Предколонка Permaphase-ODS (0,46×5 см). Детектирование: УФ<sub>254</sub>, 0,06; 3,88; 0,06 ОЕ на шкалу (слева направо) (выходной сигнал детектора с максимальной шкалой. 2,56 ОЕ на шкалу заглублен в 1,5 раза электрически). Задержка ввода пробы 3,5 мин после старта градиентной программы. Градиентные программы: анализ смеси (слева) — 10–18% MeOH/15 мин, в препаративном цикле (в центре) и при анализе однородности выделенного продукта (справа) — 12–16% MeOH/15 мин (симметрично относительно 14% MeOH), после 15 мин крутой подъем градиента для смыва поздних пиков. На отчетах калькулятора звездочкой отмечены данные пика додекануклеотида при очистке и анализе однородности

генность, так как в некоторых случаях различающиеся по размеру и составу нуклеотиды имеют одинаковое удерживание (см. рис. 10). Поэтому целесообразно предварительно разделять олигонуклеотиды ионообменной ВЭЖХ, обладающей большей селективностью к размерам олигонуклеотидов, а затем обращенно-фазовой, значительно более селективной к их гетероциклическому составу.

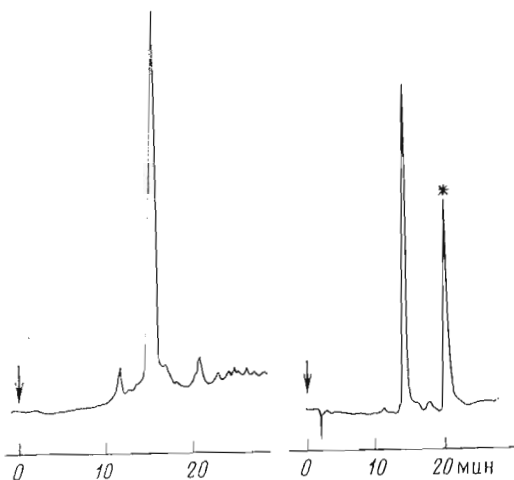


Рис. 10. Двухмерный анализ синтетического образца (G-A-A-C-T-G-G-T-T-A-C-C-G, обозначен звездочкой) ионообменной (справа) и обращенно-фазовой (слева) ВЭЖХ. Условия см. в подписи к рис. 3а (градиент с 15% раствора В) и табл. 5, № 3 (50-мин градиент)

### *Градиентная система с улучшенной защитой колонки для ВЭЖХ*

Известно, что срок службы колонки сокращается при насыщении стационарной фазы сильно удерживаемыми или хемосорбирующимися примесями из образцов и элюента. Для предохранения от них высокоэффективных колонок широко используются предколонки. В вопросе их изготовления существуют два подхода: 1) с использованием того же сорбента и тех же размеров частиц, что и в колонке; 2) с использованием крупных частиц пелликулярных сорбентов [35]. Так как проба, проходя через колонку, размывается, то в первом случае предколонку рассматривают как удлинение колонки сверху, т. е. процесс разделения смеси начинается в ней, и при минимальном объеме соединения предколонки с колонкой наблюдается небольшое снижение эффективности системы в сравнении с эффективностью колонки. В случае заполнения предколонки пелликулярным сорбентом размывание пробы в большей степени снижает эффективность системы. Таким образом, для обоих типов предколонок их объем и объем соединений отрицательно сказываются на эффективности и разрешении, особенно для ранних пиков, выходящих в малом объеме. Но уменьшение объема предколонки находится в противоречии с ее назначением, поскольку снижает ее емкость, в то время как уменьшение объема соединения выполнимо, но конструктивно сложно (например, соединением «встык»). Все сказанное относится к изократической ВЭЖХ.

Мы нашли, что ограничения объема предколонки и ее соединения с колонкой практически теряют значение в градиентной хроматографии при условии, если правильно выбран сорбент предколонки. Для его подбора мы применили простой прием: на предколонке (0,46×5 см), упакованной сухим способом крупными частицами сорбента (30–50 мкм), проводили хроматографию типичной смеси, т. е. содержащей олигонуклеотиды и вещества, удерживаемые столь же сильно, что и нежелательные примеси в обычных смесях (или растворителе). Хроматографию на предколонке проводили в тех же условиях, что и на колонке. Испытав таким образом несколько сорбентов (см. табл. 6), выбрали те, которые обладают небольшим удерживанием интересующих компонентов, но удерживают нежелательные примеси в пределах рабочего диапазона концентрации элюента; этими свойствами обладают сорбенты Permaphase-ODS и Lichroprep-RP2 (табл. 6). Аналогичным образом были испытаны сорбенты для предколонки в ионообменной ВЭЖХ (табл. 7). Ввиду того что имевшиеся у нас материалы оказались сильно удерживающими, предпочтение было отдано

Исследование сорбентов для предколонки при обращенно-фазовой хроматографии:  
Приведена концентрация метанола, при которой вышел пик нуклеотида

| Образец                        | Zorbax-C8 | Vydac-RP | Co-pe'il-ODS | Lichroprep-RP2 | Permaphase-ODS | Vydac-RP + Zorbax-C8 | Co-pe'il-ODS + Zorbax-C8 | Lichroprep-RP2 + Zorbax-C8 | Permaphase-ODS + Zorbax-C8 |
|--------------------------------|-----------|----------|--------------|----------------|----------------|----------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Гексануклеотид                 | 19,7      | 14,7     | 11,9         | 0              | 3,5            | 22,4                 | 20,5                     | 21,1                       | 20,0                       |
| Додекануклеотид                | 30,3      | 22,8     | 14,0         | 12,9           | 11,5           | 32,0                 | 31,1                     | 32,2                       | 31,0                       |
| Примесь                        |           | 45 *     | 25           | 50 *           | 43 *           |                      | >50 *                    |                            |                            |
| Уширение пика на 1/2 высоты, % | 0         |          |              |                |                | 49,0                 | 4,5                      | 4,5                        | 3,0                        |

Примечание. Колонка Zorbax-C8 (0,46×25 см), предколонка 0,46×5 см. Образец: гексануклеотид G-A-A-T-T-C, додекануклеотид T(pT)<sub>10</sub>C и неидентифицированная примесь. Элюент: см. табл. 5, № 3, линейный градиент элюента В 2%/мин. Скорость потока 1 мл/мин. Температура 25°С.

\* При промывке в градиенте от раствора В до MeOH.

Таблица 7

Исследование сорбентов для предколонки при ионообменной хроматографии:  
Приведена концентрация соли, при которой вышел пик нуклеотида, М

| Образец                        | Zorbax-NH <sub>2</sub> | AL-pe'lioxex-WAX | Vydac-AX | Lichroprep-RP2* | Lichroprep-RP2 + Zorbax-NH <sub>2</sub> |
|--------------------------------|------------------------|------------------|----------|-----------------|---|
| Октануклеотид                  | 0,85                   | 0,74             | 2        | 10,8            |   |
| Декануклеотид                  | 0,98                   | 0,96             | 2        | 4,2             |   |
| Додекануклеотид                | 1,12                   | 1,12             | 2        | 13,8            | 1,12                                    |
| Уширение пика на 1/2 высоты, % | 0                      |                  |          |                 | 5,0                                     |

Примечание. Колонка Zorbax-NH<sub>2</sub> (0,46×25 см), предколонка 0,46×5 см. Образец октануклеотид T-A-T-G-A-T-A-T, декануклеотид C-C-G-G-T-A-C-C-G-G и додекануклеотид T-A-A-C-C-A-T-G-T-G-C-A. Элюент: А — 20% MeOH с добавкой NH<sub>4</sub>OAc до pH 7,0; В — 20% MeOH в 2 М NH<sub>4</sub>OAc (pH 7,0); градиент раствора В 1%/мин; скорость потока 1 мл/мин; температура 25°С.

\* Элюент: А — 10% MeOH в 0,4 М NH<sub>4</sub>OAc, В — 37% MeOH в 0,4 М NH<sub>4</sub>OAc.

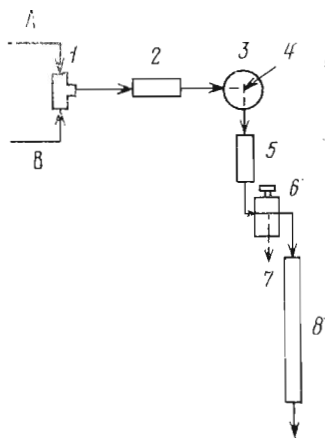
сорбенту Lichroprep-RP2, на котором незащищенные олигонуклеотиды не задерживаются при 15—18% метанола в элюенте.

Поскольку интересующие компоненты элюируются с правильно подобранной предколонки раньше, чем они начинают свое движение по колонке, объем, в котором они вносятся в предколонку и в котором они попадают в колонку, не имеет значения. Это приводит к тому, что эффективность системы не снижается и снимаются ограничения с объема соединительного узла предколонки с колонкой. Вместо соединения с минимальным объемом оказалось возможным соединить предколонку с колонкой через трехходовой кран, что дает большое преимущество для регенерации сорбента предколонки, так как позволяет часто промывать только предколонку сильным элюентом.

В жидко-жидкостной (распределительной) хроматографии широко использовались форколонки (на линии насос — инжектор), предназначенные для насыщения элюента стационарной фазой [24]. Мы также предлагаем использовать форколонку, но с другой целью — для предохранения колонки от примесей в элюенте. Кроме того, форколонка может выполнять еще и функцию статического смесителя растворителей в градиентной системе, а также фильтра подвижной фазы от взвешенных частиц. Замена динамического (электромагнитного) смесителя и пористо-металлического фильтра на форколонку со свободным объемом около 0,5 мл сокращает объем системы перед колонкой, тем самым сокращая запаздывание градиента и улучшая воспроизводимость формы заданного программой градиента. Сорбент, используемый в форколонке, не должен задерживать компоненты элюента (например, метанол из воды в обращенно-фазовой хромато-



Рис. 11. Схема градиентной системы с двумя предколонками. А, В — программируемые по времени потоки элюентов, 1 — Т-образный соединитель, 2 — форколонка (0,46×5 см) для элюента и статический смеситель, 3 — инжектор для ввода пробы (4), 5 — предколонка для пробы (0,46×5 см), 6 — трехходовой кран, 7 — слив при промывании предколонки, 8 — колонка. Пояснения см. в тексте



графии, метанол из хлороформа в прямо-фазовой адсорбционной и метанол и соль из воды в ионообменной хроматографии), приводя к искажению профиля градиента, и должен иметь размер частиц не менее 30 мкм для эффективного перемешивания двух элюентов. Названным требованиям удовлетворяют сорбенты Lichroprep-RP2 и Permaphase-ODS (первый обладает большей емкостью) для обращенно-фазовой и ионообменной ВЭЖХ, для адсорбционной прямо-фазовой хроматографии пригодны силикагели с удельной поверхностью до 300 м<sup>2</sup>/г. Общая схема градиентной системы с форколонкой и предколонкой представлена на рис. 11.

#### Так называемая «ион-парная» хроматография

Название «ион-парная хроматография» в настоящее время применяют к большому числу методов, основанных на разных механизмах разделения. Здесь используют как модифицированные (типа ODS), так и немодифицированные носители, разные модификаторы, разные среды (в том числе и такие, в которых нерастворимы исследуемые вещества в отсутствие модификатора). По понятным причинам нас интересовал тот вариант, при котором хроматография протекает в водной среде, а сам интерес к методу обусловлен широкими возможностями изменения основных свойств разделительной системы. (Полный обзор по методу см. [36], [34], с. 240–260.)

Если в качестве модификатора подвижной фазы использовать алкилсульфонаты, например додецилсульфат натрия (SDS), то, как и обращенно-фазовая хроматография, этот метод может быть использован для разделения моно- и олигонуклеотидов по их гетероциклическому составу. Для того чтобы понять основу и закономерности наблюдаемого разделе-

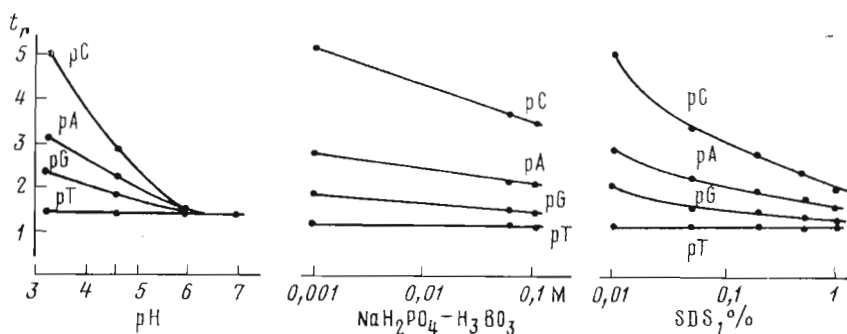


Рис. 12. Зависимость удерживания мононуклеотидов от pH (при 0,01% SDS в 0,01 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_3\text{BO}_3$ ), концентрации солевого буфера (при 0,01% SDS, pH 3,2) и модификатора (при 0,01 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_3\text{BO}_3$ , pH 3,2) в «ион-парной» хроматографии на неполярном сорбенте. Колонка Micropack-CN, скорость потока 0,3 мл/мин, температура 25° С

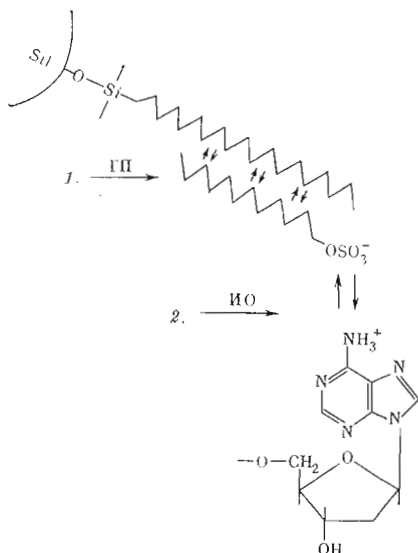


Рис. 13. Модель гидрофобно-парного ионообменного механизма разделения водорастворимых электролитов (нуклеотиды, нуклеозиды). 1 — образование гидрофобной пары (ГП) при взаимодействии модификатора с неполярной стационарной фазой, 2 — ионообменное (ИО) взаимодействие модифицированной стационарной фазы с протонированной молекулой электролита

ния, мы исследовали зависимость удерживания от pH (рис. 12); оказалось, что мононуклеотиды разделяются только в кислой среде (pH 3–4), а главное — порядок их выхода (pT, pG, pA, pC) — говорит в пользу ионообменного механизма разделения, так как соответствует порядку возрастания величин зарядов оснований в кислой среде [23]. Изучение влияния температуры и ионной силы элюента подтвердило это предположение. Так, повышение температуры до 60°С не влияло на удерживание, а увеличение концентрации солевого буфера снижало удерживание нуклеотидов (в обращенно-фазовой хроматографии, основанной на молекулярных взаимодействиях, наблюдается обратное влияние указанных факторов); эти закономерности присущи ионообменному механизму разделения. При оптимальных условиях (0,01% додецилсульфат натрия в 0,01 М фосфатном буфере при pH 3,2) даже на малоселективной колонке (в режиме обращенно-фазовой хроматографии) достигается высокая селективность ( $\alpha_{pC/pT}=30$ ) (ср. с табл. 4).

По-видимому, механизм разделения нуклеотидов — водорастворимых электролитов — включает два основных процесса (впервые предположение о таком механизме было высказано Киссинджером [37]): 1) благодаря гидрофобному средству модификатор интеркалирует в слой неполярной стационарной фазы, ориентируясь ионогенной группой в сторону подвижной фазы; 2) модифицированная таким образом стационарная фаза сульфогруппами додецилсульфата натрия вступает в ионообменное взаимодействие с протошированными аминогруппами нуклеотидов (или нуклеозидов). Такая модель (рис. 13) объясняет, почему в случае «поп-парной» хроматографии наблюдается чисто ионообменное разделение, как на классическом катионообменнике [38, 39]. Если бы не происходило процесса стадии (1) — образования гидрофобной пары [стационарная фаза — модификатор], — т. е. если бы додецилсульфат-ион в растворе (в подвижной фазе) образовал бы полную пару с нуклеотидами и разделение в этом случае осуществлялось бы на немодифицированной стационарной фазе, то с увеличением концентрации додецилсульфата натрия в элюенте удерживание нуклеотидов возрастало; в действительности же наблюдается обратная зависимость (рис. 12). Таким образом, стадия (1) является определяющей, и в соответствии с этим разделение водорастворимых электролитов на неполярном носителе в присутствии ионогенного гидрофобного модификатора следовало бы правильно называть гидрофобно-парной ионообменной хроматографией.

Как уже упоминалось, этот метод применим только для разделения производных нуклеотидов с блокированными amino-, окси- и, главное, фосфатными группами. Областью применения этого метода является практически исключительно «фосфотриэфирный» олигонуклеотидный синтез, само название которого объясняет возможность проведения элютивной прямо-фазовой хроматографии производных нуклеотидов, так как на всех стадиях химического синтеза олигонуклеотида фосфатные группы в продукте межнуклеотидной конденсации блокированы. В последнее время появились работы с применением для этих целей припшито-фазных сорбентов для прямо-фазовой [40] и обращенно-фазовой [41] ВЭЖХ защищенных олигонуклеотидов, но преимущества применения более дорогих сорбентов не очевидны.

Благодаря целому ряду усовершенствований в химической методологии (см. обзоры [7, 42]) за последние 5 лет резко возросла эффективность этих работ, сократились длительность и трудоемкость синтеза, выходы целевых продуктов приблизились к количественным. Тем не менее необходимость в хроматографии при выделении продуктов промежуточных стадий не сокращается. Используемая традиционная хроматография на низкоэффективных, сильно перегружаемых колонках не может обеспечить высокой чистоты получаемых соединений и сопряжена со значительными потерями вещества при отборе лишь центральной части пика. Кажущиеся небольшими, эти потери в многостадийных синтезах весьма значительны. Простой расчет это подтверждает: если принять потерю при выделении равной 10% от 90% выхода на каждой стадии, то оказывается, что для получения единицы продукта 10-стадийного синтеза потребуется около 27 единиц исходного вещества. При исключении потерь расход исходного вещества составит лишь 9 единиц. К этому надо прибавить экономию всех реагентов и материалов и снижение трудоемкости работ. Не всегда также учитывается, что оставшаяся в образце примесь может быть реакционноспособной на следующих стадиях, и, следовательно, от стадии к стадии может происходить увеличение числа и количества примесей, что значительно осложняет выделение высокоочищенного целевого продукта в конце синтеза. Надежды на то, что фермент на последующих стадиях сборки нуклеотидных блоков в биологически активную структуру «узнает» и использует только пригодный блок, не имеют под собой почвы и могут явиться причиной получения функционально неактивных полинуклеотидов.

Цель настоящего раздела работы — оценить эффективность применения ВЭЖХ на начальных и промежуточных стадиях синтеза олигонуклеотидов. Мы использовали препаративные (2,3×25 см) колонки с силикагелем Lichrosorb-Si60 с частицами размером 10 мкм, упакованные по заказу фирмы Du Pont фирмой Chrompack (в настоящее время заменены фирмой Du Pont на собственные колонки Zorbax-Sil 2,12×25 см) эффективностью 12—15 тысяч теоретических тарелок. Элюирование проводили хлороформом с добавлением метанола (до 10%), содержащего 5,2% воды, т. е. так называемым изогидрическим растворителем [43], в присутствии которого силикагель сохраняет постоянную активность. Эти же растворители использовали и в градиентной хроматографии (см. «Экспериментальную часть»), что удобно для быстрого анализа смеси. Регенерация (10% метанола с тем же количеством воды) и уравнивание колонки стартовым элюентом занимали 10—15 мин. Ряд блоков — ди-, три- и тетра-нуклеотиды (синтезированы В. Н. Добрыниным [44]) — были проанализированы на однородность в количестве 0,05—0,1 мг и препаративно хроматографированы на указанных колонках после предварительного выделения их из реакционной смеси на небольшой (1,5×3 см) колонке с силикагелем для удаления из смеси непрореагировавшего фосфатного компонента, продуктов превращения конденсирующего реагента и других нежелательных для колонки для ВЭЖХ примесей. Нагрузка достигала 300 мг. В ряде случаев

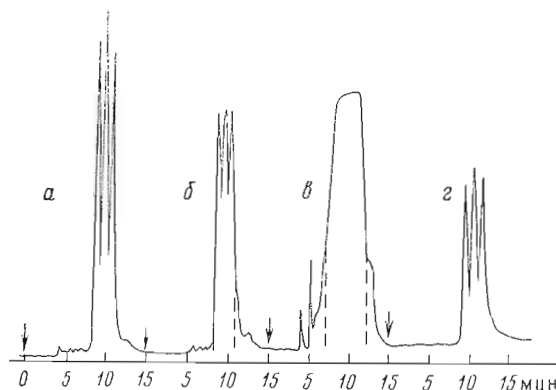


Рис. 14. Адсорбционная прямо-фазовая ВЭЖХ защищенного динуклеотида  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}] \text{bzA} \mp \text{Tr}(\text{ClPh}, \text{CNEt})$ , где  $\text{ClPh}$  — *n*-хлорфенил, а  $\mp$  — межнуклеотидная связь, защищенная *n*-хлорфенильным остатком. Колонка Lichrosorb-Si60, 10 мкм (2,3×25 см). Элюент  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (96:4) (MeOH содержит 5,2% воды), 8 мл/мин. Детектирование: УФ<sub>254</sub> с препаративной кюветой (толщина слоя 1 мм), наибольшая шкала 25,6 ОЕ<sub>254</sub>. Хромотограммы а-г получены при нагрузках 8, 30, 300 и 0,05 мг соответственно

высокоэффективная колонка разделяла диастереомеры, образование которых связано с хиральностью триэфирных фосфатных групп (рис. 14), что в принципе не является необходимым, так как после удаления защитных групп указанная изомерия пропадает. Существенно то, что при больших нагрузках отделялись примеси, едва заметные при ТСХ. При использовании этих колонок было найдено, что возможно разделение при коэффициенте селективности до 1,05–1,1 с нагрузкой до 30–50 мг, при селективности 1,2 — до 0,5 г, а в простых смесях при коэффициенте селективности около 3 нагрузка может достигать 2 г за один изократический цикл (15–30 мин). Аналогичным образом были очищены промежуточные блоки при синтезе гексануклеотида G-G-C-A-T-G, и продукт, выделенный на маленькой (1,5×3 см) колонке, не требовал дополнительной очистки (рис. 15). На том же рисунке демонстрируется высокая селективность силикагеля, позволяющая быстро отделить полностью защищенный олигонуклеотид от олигонуклеотида, утратившего защитную метокситритильную группу.

Таким образом, целесообразность очистки продуктов промежуточных стадий химического синтеза олигонуклеотидов адсорбционной ВЭЖХ и эффективность такой очистки и анализа гомогенности стала не менее очевидной, чем ВЭЖХ конечных (деблокированных) олигонуклеотидов.

#### *Анализ мономерного состава олигонуклеотидов микроколоночной хроматографией*

В последние годы анализ мономерного состава олигонуклеотидов (подробно — см. работу [45]) был в значительной мере вытеснен принципиально другим подходом — фингерпринтированием, или методом нуклеотидных карт [46], предназначенным для установления первичной структуры олигонуклеотидов: в 5'-концевое положение олигомера вводится радиоактивная метка в виде <sup>32</sup>P-фосфатной группы и меченый нуклеотид подвергают частичному ферментативному расщеплению с 3'-конца с образованием смеси укороченных, вплоть до 5'-концевого мононуклеотида, меченых фрагментов. Эту смесь разделяют электрофорезом и ионообменной ТСХ во взаимно перпендикулярных направлениях, радиоавтографированием выявляют пятна меченых фрагментов и по их относительному положению реконструируют структуру олигомера. Применительно к синтетическим олигонуклеотидам таким образом подтвержденная последовательность мономерных звеньев рассматривается и как соответствие мономерного состава требуемому, т. е. заданному последовательностью синтеза. Однако

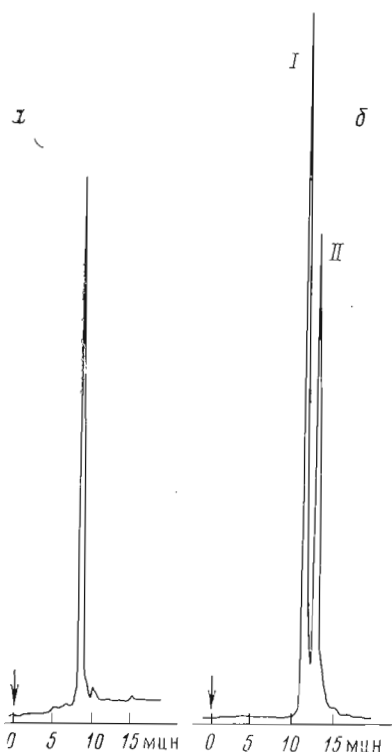


Рис. 15

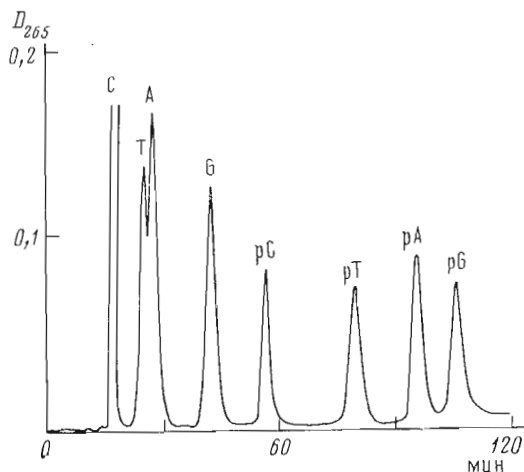


Рис. 16

Рис. 15. Прямо-фазовая ВЭЖХ защищенных гексануклеотидов. Колонка та же, что на рис. 14. Элюент  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (с 5,2% воды) 9:1, поток 14 и 9 мл/мин соответственно. *a* -  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]bzC\equiv ibG\equiv bzC\equiv bzA\equiv T\equiv ibG(\text{Ac})$ , *б* -  $[(\text{MeO})_2\text{Tr}]ibG\equiv T\equiv T\equiv bzA\equiv T\equiv bzA\equiv bzC(\text{Ac})$  (пик I) и  $ibG\equiv T\equiv T\equiv bzA\equiv T\equiv bzA\equiv bzC(\text{Ac})$  (пик II). Сокращения см. в подписи к рис. 14, *ib* - изобутирил

Рис. 16. Микроколоночная ионообменная хроматография эквимольярной смеси нуклеозидов и 5'-моонуклеотидов (всего 0,02 ОЕ<sub>2,3</sub>). Микроколонока (0,5×100 мм) с Aminex-A27. Элюент: градиент концентрации NaOAc (pH 4,3) с 50 мин 0-1 М, 2 мл, скорость потока 1 мл/ч, давление 10 атм. Температура 20° С. Объем пробы 4 мкл в 0,05 М фосфатном буфере (pH 8,2). Стандартное отклонение площадей пиков моонуклеотидов ±0,5% (pC), ±2,5% (pG)

при этом не учитывается возможность неполного прохождения 5'-фосфорилирования, или селективного прохождения по какой-либо причине фосфорилирования (в случае негомогенности олигонуклеотида) одного из компонентов смеси. В этом случае фингерпринт отразит истинный состав не образца, а только его меченого компонента. В нашей практике такие случаи бывали, и выявлялись они при анализе продуктов полного расщепления олигонуклеотида на мономеры.

Метод, который мы использовали для анализа, основан на разделении мономерных звеньев, образующихся при полном расщеплении олигонуклеотидной цепи с 3'-конца под действием фосфодиэстеразы змеиного яда. Получающийся гидролизат содержит 5'-моонуклеотиды и нуклеозид, если олигонуклеотид не содержал на 5'-конце фосфатную группу. Для разделения смеси моонуклеотидов можно использовать разные — обращенно-фазовые и ионообменные — системы, например простой способ изократического разделения, описанный в работе [15]. Используя этот метод, но заменив фосфатный буфер на фосфат-боратный, мы получили полное разделение моонуклеотидов за 5 мин с чувствительностью определения до  $10^{-12}$  моль. Однако этим способом было невозможно добиться разделения нуклеозидов, необходимого для идентификации 5'-концевого звена. Такую возможность предоставляет хроматография на полимерном алифатическом аннионе Aminex-A27 или A28, разработанная в работе [45] в варианте с применением высокого давления. Мы нашли, что для удовлетворительно-

го разделения смеси нуклеозидов и мононуклеотидов на этих анионитах достаточно приготовить микроколонку эффективностью до 500 теоретических тарелок и вести градиентное элюирование ацетатом натрия при рН 4,3. (О микроколоночной хроматографии нуклеиновых кислот см. работу [47].) Этот вариант анализа поддается автоматизации. Ферментативное расщепление проводится в микроколонке иммобилизованным на целлюлозе ферментом, гидролизат поступает непосредственно в разделительную микроколонку. Анализ смеси, содержащей кроме мононуклеотидов нуклеозид, длится 2 ч (рис. 16). При анализе 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов разделение мононуклеотидов занимает 0,5 ч при ускорении элюции (для поддержания давления не выше 10 атм повышается температура до 60°С). Чувствительность анализа составляет  $10^{-9}$ — $2,5 \cdot 10^{-10}$  моль, причем для анализа расходуется 0,02—0,005 ОЕ<sub>254</sub> (1—0,2 мкг) олигонуклеотида. Этого количества достаточно для надежного определения мономерного звена, один раз встречающегося в 10—15-звенной цепи [5].

В настоящее время становятся доступными микроколонки высокой эффективности с сорбентами, средний размер частиц которых составляет 10 и даже 5 мкм [48—50]. В связи с этим становится целесообразным для подобных анализов использовать обращенно-фазовую или «ион-парную» хроматографию, способные разделять смеси нуклеотидов с нуклеозидами, но более быстрые и чувствительные благодаря эффективности колонок и высокой селективности к гетероциклическому составу мономеров (см. выше). Но для развития микроколоночной хроматографии в метод ВЭЖХ необходимо решение таких вопросов, как снижение объемов и улучшение динамических характеристик соединений колонки, кюветы детектора и электрического сигнала детектора.

#### *Упаковка ВЭЖХ колонок с допакочной процедурой*

Современные колонки для ВЭЖХ, производимые целым рядом фирм, обладают высокими характеристиками по селективности, эффективности, симметрии пиков, во многих случаях и по проницаемости. Даже такая характеристика, которая не входит в число гарантируемых параметров, — время жизни колонки — стала настолько высокой, что в обычных условиях (т. е. близких к тем, в которых колонки тестируются) высокоэффективная и хорошо проницаемая колонка служит до 1 года и более и за это время позволяет осуществить несколько тысяч разделений. Все это говорит о высоком качестве сорбентов, конструкции колонок и технологии упаковки. Тем не менее мы обнаружили, что колонки стабильны только при невысокой вязкости элюента (до 1—1,5 сП). При использовании более вязкой подвижной фазы, например 0,2—2 М растворов соли в водном метаноле (30—70%), т. е. при обращенно-фазовой и понообменной ВЭЖХ, колонки быстро теряют свое первоначально высокое качество: проницаемость падает, ухудшается симметричность пиков, падает эффективность (иногда появляется раздвоение пиков). При этом оказалось, что столб сорбента проседает, образуется полость глубиной до 1 см в 25-см колонках. Особенно быстро это происходит при частом чередовании вязкости, что непременно сопровождается градиентное элюирование.

Возможным объяснением такого воздействия подвижной фазы на столб сорбента является вязкостное трение, увлекающее микрочастицы сорбента, т. е. его переупаковка. Поэтому мы применили при упаковке ВЭЖХ колонок тот же прием, что применяли ранее при упаковке стеклянных колонок фракционированной целлюлозой [11] — процедуру вязкостной допакочки. Она состоит в том, что после упаковки взвеси сорбента из невязкого растворителя (в котором упаковка происходит быстро, но недостаточно равномерно и плотно) колонка промывается более вязкой подвижной фазой при том же давлении, при котором происходила упаковка, причем смена растворителей производится без остановки потока. Допакочка может осуществляться раствором, плохо смачивающим сорбент. В такой среде сорбент не может быть сразу равномерно упакован из-за образования рыхлых агломератов. Однако в предварительно упакованной

колонок под действием такой среды, вероятно, происходит разрыхление более плотно упакованных зон (в основном в осевой части столба сорбента) и перепаковка в направлении от оси к стенкам под действием вязкостного трения. После допаковки, перед снятием колонки, ее необходимо промыть при том же давлении хорошо смачивающим растворителем для снижения электростатического отталкивания частиц. Для припетофазных сорбентов мы пользуемся метанолом или ацетоном, а вязкостную допакровку проводим смесью  $\text{MeOH}-\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_4\text{OAc}$ . При упаковке немодифицированного силикагеля используем гексан или ацетон, обеспечивающие быстроту упаковки, и более вязкий изопропанол для допаковки.

Для оценки качества упакованных этим способом колонок рассмотрим характеристики колонки с новым анионитом, рассматривавшиеся выше. Седиментацией в метаноле была выделена фракция частиц со средним размером 5 мкм, имевших скорость оседания 25–30 мм/ч, и упакована в колонку (0,46×15 см) обычной конструкции (система Swagelok) (см. «Экспериментальную часть»). Определение эффективности проводили по пентануклеотиду  $\gamma\text{A}(\text{pA})$ , в 50% метаноле, содержащем 0,1 М ацетат аммония при скорости потока 1 мл/мин,  $K'$  образца 3,5. Эффективность колонки оказалась равной 6650 теоретических тарелок. Давление на входе в колонку при промывании метанолом (1 мл/мин) равно 30 атм. В пределах срока жизни стационарной фазы физические свойства колонки не изменялись, несмотря на использование ее в вязкой среде при потоке 1 мл/мин и давлении до 150 атм.

С использованием рассмотренных методов в найденных оптимальных условиях проведены анализы состава или гомогенности и препаративные выделения высокоочищенных олигонуклеотидов из почти 300 природных или синтетических смесей. Выделенные синтетические олигонуклеотиды были успешно использованы при сборке ряда функционально активных фрагментов ДНК и в других биохимических исследованиях,

### Экспериментальная часть

$\text{MeOH}$  и  $\text{CH}_3\text{CN}$  квалификации х.ч. дополнительно очищали по описанным методикам [51],  $\text{SnCl}_4$  сушили над  $\text{P}_2\text{O}_5$  и перегоняли над  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , хранили с добавлением 0,5%  $\text{EtOH}$  в темноте без доступа воздуха. Растворы  $\text{NaOAc}$  с pH 4,3 готовили из  $\text{AcOH}$ , перегнанной над  $\text{KMnO}_4$ , и  $\text{NaOH}$  квалификации х.ч. Растворы  $\text{NH}_4\text{OAc}$ , pH 7,0 и 7,2, готовили из соли ос.ч. с добавлением водного  $\text{NH}_3$ . 1 М раствор  $\text{NaH}_2\text{PO}_4-\text{H}_3\text{BO}_3$  готовили из 1 М растворов  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  и  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ос.ч., для требуемого pH добавляли  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  или  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Додецилсульфат натрия (Serva) перекристаллизовывали из воды при охлаждении до получения препарата, не поглощающего при 254 нм. Все растворы фильтровали через два стекловолокнистых фильтра GF/D (2,7 мкм) и GF/F (0,7 мкм) (Whatman) и дегазировали 10 мин в вакууме при 10 мм. Дезоксирибонуклеотиды (Sigma) использовали в концентрации 10  $\text{OE}_{254}$  в 1 мл воды. Олигодезоксирибонуклеотиды получены химическим синтезом «фосфотриэфирным» методом в нашей лаборатории (заведующий — академик М. Н. Колосов). РНКазный гидролизат суммарной РНК дрожжей предоставлен нам профессором Б. Б. Фуксом (Институт морфологии человека АМН СССР), олигорибонуклеотиды получены щелочным гидролизом полиадениловой кислоты с последующим терминальным дефосфорилированием щелочной фосфатазой *E. coli*, смесь предоставлена нам А. В. Честухиным (ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР).

Для хроматографии при низком давлении использовали перистальтический насос Minipuls-II (Gilson) и стеклянные колонки с подвижным верхним адаптером M-8005-02 (СКБ аналитического приборостроения НТО АН СССР). Для ВЭЖХ использовали градиентные хроматографы: модель 830 (Du Pont) с пневмоусилительным насосом, формирователем градиента (модель 838), инжектором Rheodyne-7120 (петли объемом от 10 мкл до 10 мл), встроенным  $\text{UF}_{254}$ -фотометром (кюветы объемом 8 мкл, длина оптического пути 10 мм, и 20 мкл, длина оптического пути 1 мм):

модель 8520 (Varian) с инжектором Rheodyne-7125 и УФ-спектрофотометром (Du Pont); модель 8820 (Du Pont) с микропроцессорным управлением, с трехпоршневым насосом, термостатом, инжектором Rheodyne-7125, УФ<sub>254</sub>-фотометром и УФ-спектрофотометром, поплавковым дегазатором элюента; микроколоночный хроматограф ХЖ-1305 (СКБ аналитического приборостроения НТО АИ СССР) с преформированным созданием градиента, со шприцевым насосом, спектрофотометрическим детектором с кюветой 0,8 мл и длиной оптического пути 1,5 мм (выходной сигнал 10 мВ на шкалу регистрировали с чувствительностью 1 мВ на шкалу через добавочную емкость самописцем А-25 (Varian), что увеличивало чувствительность 0,25 ОЕ на шкалу в 10 раз, постоянная времени регистрации ~10 с). Обсчет хроматограмм проводили калькулятором CDS-111 (Varian).

Для RPC-5-системы политрифторхлорэтилен с размером частиц 100–150 мкм (50 г) (Serva) дробили энергичным встряхиванием со стеклянными шариками диаметром 3–5 мм (~100 г) в 300 мл  $\text{CHCl}_3$  (15–20 ч), растворитель упаривали и частицы фракционировали в восходящем потоке 30% спирта в колонке размером 10×150 см. Основную фракцию, содержащую 80–90% частиц диаметром 6–8 мкм, собирали на фильтре с размерами пор 0,7 мкм при скорости потока около 0,5 л/ч. Триоктилметил-аммонийхлорид (Adogen 464, Serva) наносили на высушенный политрифторхлорэтилен из раствора в  $\text{CHCl}_3$  по описанному методу [52], сорбент суспендировали в 3 М NaOAc при перемешивании в вакууме. Стеклянные колонки (0,6×8–50 см) заполняли 10–20% (здесь и далее процентная концентрация приводится по объему) взвесью сорбента с помощью перистальтического насоса. Стальные колонки (0,2×50 см) заполняли снизу вверх 5–10% взвесью сорбента из стального резервуара под давлением 500 атм от двух спаренных насосов Varian-8520. Хроматографию проводили с начальной концентрации NaOAc не ниже 0,1 М на стеклянных колонках при давлении до 3 атм (до 20 мл/ч), на стальных — при давлении 120–180 атм (20 мл/ч).

Коммерческие упакованные колонки для ВЭЖХ Micropack-CN (Varian), Zorbax-Sil, Zorbax-C8, Zorbax-ODS, Zorbax-NH<sub>2</sub>, Zorbax-SAX (Du Pont), Ultrasphere-C8, Ultrasphere-ODS, Ultrasil-NH<sub>2</sub> (Altex), Nucleosil-ODS и Nucleosil-NH<sub>2</sub> (Machery-Nagel) следующих размеров: Micropack — 0,2×25 см, Zorbax — 0,46×25, 0,94×25 и 2,12×25 см, Ultrasphere и Ultrasil — 0,4×25 см, Nucleosil — 0,4×25 см и с новым анионитом — 0,46×15 см. Колонки предварительно промывали MeOH (кроме колонок с силикагелем), затем смесями MeOH — вода (9 : 1, 7 : 3, 1 : 1 и 1 : 9) при давлении не выше 30 атм. При работе задавали скорость потока до 1 мл/мин через колонки диаметром 0,46 см, до 4 мл/мин через колонки 0,94 см, 12–15 мл/мин через колонки диаметром 2,12 см с модифицированным силикагелем и 20–50 мл/мин — с силикагелем.

Пришито-фазные сорбенты с размером частиц ~5 мкм упаковывали в стальные колонки (0,46×15 или 0,46×25 см) с электрополированной внутренней поверхностью снизу вверх под давлением 600 атм. Для этого использовали два резервуара по 60 мл и пневмоусилительный насос DST-150A (Haskel), соединенные последовательно. Насос заправляли 150 мл 50% водного MeOH с 0,1 М NH<sub>4</sub>OAc, промежуточный резервуар (стальная трубка) заправляли MeOH, следующий — взвесью сорбента в MeOH, достаточной для заполнения колонки и переходника (между резервуаром и колонкой) (0,46×4 см) на 2–3 см. После прохождения первого раствора пропускали 200 мл 50% MeOH с 2,5 М NH<sub>4</sub>OAc и 200 мл MeOH.

ВЭЖХ на силикагеле проводили в  $\text{CHCl}_3$  с добавлением MeOH, содержащего 5,2% воды по [43], на аналитических колонках в линейном градиенте концентрации MeOH (0–10%/30 мин), на препаративных колонках изократически.

Для выбора сорбентов для предколонок (0,46×5 см) использовали Lichroprep-RP2 (Merk) (фракционировали седиментацией и использовали частицы размером 25–35 мкм), Vydac-RP и Vydac-AX (Separations Group), Co-pell-ODS и AL-Pellionex-SAX (Whatman), Permaphase-ODS



(Du Pont). Упаковывали сухим способом, промывали MeOH со скоростью 10–15 мл/мин, проверяли полноту заполнения и при необходимости досыпали сорбент.

Для анализа мономерного состава раствор олигонуклеотида (0,005–0,2 ОЕ<sub>254</sub> в 0,5–3 мкл 0,05 М фосфатного буфера (рН 8,2)) пропускали через стеклянную микроколонку (0,5×40 мм) с иммобилизованной на целлюлозе фосфодиэстеразой змеиного яда (предоставлена нам авторами [53]) (температура колонки 37°С) со скоростью 1 мкл/мин в течение 20 мин, соединенную с микроколонкой (1×100 мм) с Aminex-A27 или A28 (Bio Rad), затем вторую микроколонку переключали к насосу и элюировали NaOAc, рН 4,3 (линейный градиент 0–1 М, объем 2 мл) со скоростью 1 мл/ч при 20°С или 2 мл/ч при 60°С при давлении около 10 атм.

Авторы признательны академику М. Н. Колосову за шипширование проведенных исследований и сотрудникам лаборатории, обеспечившим нас обширным нуклеотидным материалом. Мы также благодарны доктору Дж. Дж. Киркланду за крайне полезные советы по выбору направлений и методов исследований, профессору А. В. Киселеву и профессору К. К. Унгеру за обсуждение результатов работы, а также Э. П. Фридланд (DIME'S Group, Inc.) и доктору В. Манцу (Du Pont (U.K.) Lim.) за оперативную помощь в обеспечении работы необходимыми материалами.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Molko D., Derbyshire R., Cuy A., Roget A., Teoule T., Boucherie A. J. *Chromatogr.* 1981, v. 206, № 3, p. 493–500.
2. Гуськова Л. И., Демушкин В. П. *Успехи химии*, 1974, т. XLIII, вып. 7, с. 1241–1281.
3. Kelmers A. D., Weeren H. O., Weiss J. F., Pearson R. P., Stulberg M. P., Novelli G. D. *Methods Enzymol.*, 1971, Part C, p. 9–34.
4. Tomlinson R. V., Tener G. M. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1962, v. 84, № 13, p. 2644–2645.
5. Вульфсон А. Н. Синтез фрагментов структурного гена тРНК<sub>1</sub><sup>Val</sup> дрожжей. Оптимизация фосфодиэфирного метода синтеза и способов фракционирования олигонуклеотидов. Автореф. дис. ... канд. хим. наук. М.: ИВХ АН СССР, 1979.
6. Fritz H.-J., Belagaje R., Brown E. L., Fritz R. H., Jones R. A., Lees R. G., Khorana H. G. *Biochemistry*, 1978, v. 17, № 7, p. 1257–1267.
7. Reese C. B. *Tetrahedron*, 1978, v. 34, № 21, p. 3143–3179.
8. Khorana H. G. et al. *J. Mol. Biol.*, 1972, v. 72, № 2, p. 209–426.
9. Tomlinson R. V., Tener G. M. *Biochemistry*, 1963, v. 2, № 4, p. 697–702.
10. Staehelin M. *Biochim. et biophys. acta*, 1961, v. 49, № 1, p. 11–19.
11. Берлин Ю. А., Вульфсон А. Н., Колосов М. Н., Коробко В. Г., Якимов С. А. *Биоорганическая химия*, 1977, т. 3, № 1, с. 22–30.
12. Gait M. J., Sheppard R. C. *Nucl. Acids Res.*, 1977, v. 4, № 4, p. 1135–1158.
13. Schott H., Schwarz M. J. *Chromatogr.*, 1978, v. 157, № 1, p. 197–215.
14. Schott H. *J. Chromatogr.*, 1979, v. 172, № 1, p. 179–205.
15. Aukaty M. F., Bubenschikova S. N., Kagramanova V. K., Baratova L. A. *J. Chromatogr.*, 1977, v. 137, № 2, p. 351–356.
16. Leutzinger E. E., Miller P. S., Ts'o P. O. P. In: *Nucleic Acid Chemistry*/Eds Townsend L. B., Tipson R. S. N. Y.: Wiley, 1978, part 2, p. 1037–1043.
17. Корана Х. Г. В кн.: *Итоги и перспективы развития биоорганической химии и молекулярной биологии*. М.: Наука, 1978, с. 201–239.
18. Gait M. J., Singh M., Sheppard R. C., Edge M. D., Green A. R., Heathcliff G. R., Athkinson T. V., Newton C. R., Markham A. F. *Nucl. Acids Res.*, 1980, v. 8, № 5, p. 1081–1096.
19. Goldberg A. Comparison of reversed phase packings, LC technical report E-36342, Wilmington: DuPont Analytical Instrument Div., 1979.
20. Unger K. K. *Porous silica: Its properties and use as a support in column liquid chromatography*. Amsterdam: Elsevier, 1979.
21. Snyder L. R., Kirkland J. J. *Introduction to modern liquid chromatography*, 2nd edition. N. Y.: Wiley, 1979.
22. Berendsen G. E. Preparation and characterization of well-defined chemically bonded stationary phases for high pressure liquid chromatography, philosophy doctor dissertation, Delft University (Netherlands), 1980.
23. Smith J. D. In: *The Nucleic Acids*/Eds Chargaff E., Davidson N. N. Y.: Acad. Press, 1955, v. 1, p. 267.
24. Klinkenberg A. In: *Gas chromatography*/Ed. Scott R. P. W. Butterworths, 1960, p. 182.
25. Scott R. P. W., Kucera P. J. *Chromatogr.*, 1976, v. 119, p. 467–482.
26. Barford R. A., McGraw R., Rothbart H. L. *J. Chromatogr.*, 1978, v. 166, № 2, p. 365–372.

27. Karger B. L., Gant J. P., Hartkopf A., Weiner P. H. J. Chromatogr., 1976, v. 128, № 1, p. 65-78.
28. Abbott S. R., Berg J. B., Achener P., Stevenson R. L. J. Chromatogr., 1976, v. 126, p. 421-438.
29. Karch K., Sebastian I., Engelhardt H. J. Chromatogr., 1976, v. 122, p. 171-184.
30. Horvath Cs., Melander W., Molnar I. J. Chromatogr., 1976, v. 125, № 1, p. 129-156.
31. Engelhardt H., Elgass H. In: HPLC: Advances and Perspectives/Ed. Horvath Cs. N. Y.: Acad. Press, 1980, v. 2, p. 101-104.
32. Энгельгардт Х. Жидкостная хроматография при высоких давлениях/Ред. Чмутов К. В. М.: Мир, 1980, с. 118-124.
33. Snyder L. R. In: HPLC: Advances and Perspectives/Ed. Horvath Cs. N. Y.: Acad. Press, 1980, v. 1, p. 208-312.
34. Melander W. R. Ibid., v. 2, p. 114-319.
35. Kirkland J. J., Yau W. W., Stoklosa H. J., Dilks C. H. J. Chromatogr. Sci., 1977, v. 15, № 6, p. 303.
36. Tomlinson E., Jeffries T. M., Riley C. M. J. Chromatogr., 1978, v. 159, № 3, p. 315-358.
37. Kissinger P. T. Anal. Chem., 1977, v. 49, № 6, p. 883-885.
38. Kirkland J. J. J. Chromatogr. Sci., 1970, v. 8, № 1, p. 72-75.
39. Гере Р. В кн.: Современное состояние жидкостной хроматографии/Ред. Киркланд Дж. М.: Мир, 1974, с. 304-306.
40. Hartwick R. A. J. Chromatogr., 1981, v. 217, p. 479-490.
41. Hsiung H. M., Brousseau R., Michnicwicz J., Narang S. A. Nucl. Acids Res., 1979, v. 6, № 4, p. 1371-1385.
42. Alvarado-Urbina G., Sathe G. M., Liu W.-C., Gillen M. F., Duck P. D., Bender R., Ogilvie K. K. Science, 1981, v. 214, № 4518, p. 270-274.
43. Thomas J.-P., Brun A., Bouvine J.-P. J. Chromatogr., 1977, v. 139, № 1, p. 21-44.
44. Коробко В. Г., Добрынин В. Н. и др. Биоорганич. химия, 1979, т. 5, № 12, с. 1802-1815.
45. Демушкин В. П., Пляшкевич Ю. Г. Биоорганич. химия, 1976, т. 2, № 12, с. 1652-1659.
46. Sanger F. In: Virus research/Eds Fox C. F., Robinson W. S. N. Y.: Acad. Press, 1973, p. 573.
47. Кнорре Д. Г., Саидягчиев Л. С. В кн.: Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот/Ред. Кнорре Д. Г., Венкстерн Т. В. М.: Наука, 1973, с. 7-23; Грачев М. А. Там же, с. 104-122.
48. Scott R. P. W. J. Chromatogr. Sci., 1980, v. 18, № 2, p. 49-54.
49. Knox J. H. J. Chromatogr. Sci., 1980, v. 18, № 8, p. 453-459.
50. Kucera P. J. Chromatogr., 1980, v. 198, № 2, p. 93-110.
51. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976, с. 439-440.
52. Pearson R. L., Weiss J. F., Kelmets A. D. Biochim. et biophys. acta, 1971, v. 228, № 3, p. 770-774.
53. Берлин Ю. А., Дьяков В. Л., Колосов М. Н. Биохимия, 1974, т. 39, № 4, с. 747-750.

Поступила в редакцию  
16.VII.1982

## HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF NUCLEOTIDES: GENERAL METHODS AND THEIR DEVELOPMENT

WULFSON A. N., YAKIMOV S. A.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences  
of the USSR, Moscow*

The separation of mono- and oligonucleotides possibilities by means of high performance ion-exchange, reversed-phase, so-called «ion-pair» and adsorption chromatography are studied. The influence of the eluent composition (solvent, salt) and pH on the retention, selectivity and resolution in reversed-phase and ion-exchange chromatography is investigated. The model of the hydrophobic-pair ion-exchange mechanism of ion-pair chromatography is considered. The conditions for analysis and preparative isolation of a desired component are optimized for selectivity, resolution and throughput. The methods for prediction of the optimal gradient elution program reasonable resolution at the desired retention time and for choosing the guard-column packing material are proposed. A design of the gradient for system and the version of slurry packing method for HPLC prolonged life-time columns are improved. The automatized analytical technique for determination of the oligonucleotide monomeric composition with two coupled microcolumns is described, that involves enzymatic digestion of an oligonucleotide followed by ion-exchange separation of the hydrolysate.