

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ  
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
Факультет естественных наук**

Кафедра аналитической химии

Дипломная работа

**ОПТИМИЗАЦИЯ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ  
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ  
ХРОМАТОГРАФИИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ**

Крышталева Наталья Андреевна

Научный руководитель

к.х.н. Кожанова Людмила Алексеевна

---

Новосибирск – 2010

## СОДЕРЖАНИЕ

Условные обозначения и сокращения.....	3
1. ВВЕДЕНИЕ.....	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ.....	5
2.1. Строение и номенклатура олигонуклеотидов.....	5
2.2. Факторы, влияющие на разделение олигонуклеотидов.....	6
2.2.1. Обращенные неподвижные фазы для ОФ ВЭЖХ олигонуклеотидов.....	6
2.2.2. Состав подвижной фазы.....	8
2.2.3. Нагрузка на колонку.....	9
2.2.4. Скорость потока подвижной фазы.....	10
2.2.5. Размер частиц сорбента.....	11
2.2.6. Температура.....	11
2.2.7. Изократический и градиентный режимы хроматографии.....	11
2.2.8. Температурное программирование при изократическом режиме хроматографии.....	13
2.2.9. Параметры колонки.....	13
2.3. Влияние состава олигонуклеотида на удерживание.....	14
2.4. Пиковая емкость.....	15
2.5. Параметры и критерии оптимизации разделения олигонуклеотидов.....	16
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	17
3.1. Материалы.....	17
3.2. Оборудование.....	18
3.3. Приготовление растворов.....	18
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	19
4.1. Влияние содержания ацетонитрила в подвижной фазе на факторы емкости. Изократический режим хроматографии.....	20
4.2. Влияние концентрации ион-парного агента на удерживание олигонуклеотидов.....	21
4.3. Нагрузка на колонку.....	23
4.4. Влияние температуры на удерживание олигонуклеотидов.....	24
4.5. Скорость изменения концентрации ацетонитрила в подвижной фазе.....	24
4.6. Скорость потока подвижной фазы.....	26
4.7. Определение оптимального наклона градиента и скорости потока	

подвижной фазы.....	28
4.8. Хроматография смесей олигонуклеотидов в оптимальных условиях .....	30
4.9. Изменение начальной концентрации ацетонитрила.....	35
4.10. Предсказание удерживания олигонуклеотидов.....	36
4.11. Общая схема оптимизации условий ион-парной хроматографии олигонуклеотидов на обращенно-фазовых сорбентах.....	38
5. ВЫВОДЫ.....	39
6.ЛИТЕРАТУРА.....	40

## УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

*ОФ* – обращенная фаза; обращенно-фазовая  
*ВЭЖХ* – высокоэффективная жидкостная хроматография  
*С18* – неподвижная фаза (сорбент) *n*-октадецилсиликагель  
*С8* – неподвижная фаза *n*-октилсиликагель  
*ДНК* – дезоксирибонуклеиновая кислота  
*ПАУ* – полиароматические углеводороды  
*ТЕАА* – триэтиламмоний ацетат  
*ТЕА* – триэтиламин  
*HFIP* – гексафтороизопропанол  
*ВЭТТ* – высота, эквивалентная теоретической тарелке  
*H* – высота теоретической тарелки  
*u* – скорость потока подвижной фазы  
*k'* – фактор удерживания  
*P* – пиковая емкость колонки  
*P\*\** – пиковая емкость образца  
*t<sub>g</sub>* – время градиента  
*w* – ширина пика у основания  
*t<sub>r</sub>* – время удерживания вещества  
*R* – разрешение пиков  
*N* – эффективность колонки  
*G* – градиент органического модификатора  
*L* – длина колонки

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Олигонуклеотиды широко используются в молекулярной биологии, биохимии, генной инженерии. В настоящее время их получают путем автоматизированного твердофазного химического синтеза.

Требуемая чистота олигонуклеотида определяется целями, для которых он предназначается. Решающее значение может иметь содержание основного вещества, отсутствие примесей более коротких олигонуклеотидов, полнота удаления защитных групп и отсутствие модификаций в гетероциклических основаниях.

Одним из основных методов определения олигонуклеотидов является обращенно-фазовая (ОФ) высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Этот метод дает широкие возможности для разделения веществ близких по свойствам. Он позволяет сочетать необходимые чувствительность и селективность с решением препаративных задач. Разделение олигонуклеотидов происходит за счет гидрофобных свойств молекул.

По оптимизации условий анализа олигонуклеотидов методом ОФ ВЭЖХ известно много работ, но эти исследования применимы, как правило, только к конкретным сорбентам. На практике замена сорбента на однотипный часто приводит к непредсказуемым результатам.

Целью нашей работы было исследование факторов, влияющих на разделение олигонуклеотидов на обращенно-фазовых сорбентах, и разработка общей стратегии оптимизации условий разделения олигонуклеотидов на ОФ сорбентах.

Эту задачу мы решали на примере трех ОФ сорбентов с различными свойствами: NucleoSep 200-5, Диасфер 300-C10CN, ProntoSil C18AQ 120-5. NucleoSep 200-5 является обращенной фазой относительно нового типа, она содержит перфторированные углеродные заместители, отличается от обращенной фазы C18 по характеристикам удерживания и может быть полезной для разделения полярных веществ. Диасфер 300-C10CN содержит циано-группы и часто используется для разделения полярных соединений в биологических образцах. ProntoSil C18AQ 120-5 - это обращенная фаза C18, широко применяемая в том числе и для разделения олигонуклеотидов. Использование сорбентов с различными свойствами позволит увеличить селективность и эффективность разделения олигонуклеотидов.

Все результаты, представленные в настоящей работе, получены непосредственно автором. Автор самостоятельно проводил все эксперименты и обрабатывал данные, а также принимал активное участие в планировании экспериментов и обсуждении результатов.

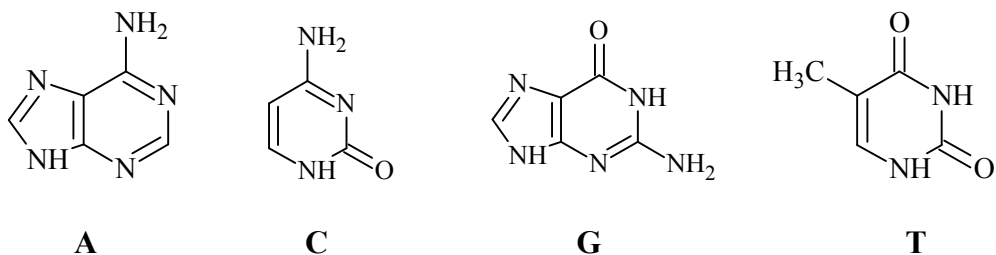
## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ

#### 2.1. Строение и номенклатура олигонуклеотидов

Олигонуклеотиды – природные или синтетические линейные олигомеры, мономерами которых являются нуклеотиды. В состав олигонуклеотидов входит от двух единиц до нескольких сотен нуклеотидов. Каждый нуклеотид состоит из нуклеозида (пуринового или пиримидинового основания и 2'-рибозы или 2'-деоксирибозы) и фосфата. Основные нуклеозиды ДНК: 2'-деоксирибоаденозин (dA), 2'-деоксирибогуанозин (dG), 2'-деоксирибоцитидин (dC) и 2'-деоксириботимидин (dT). На рис. 1 показаны четыре основания, входящие в состав ДНК, и структурная формула олигонуклеотида, состоящего из четырех звеньев.

#### Гетероциклические основания



#### Олигонуклеотид dp(ACGT)

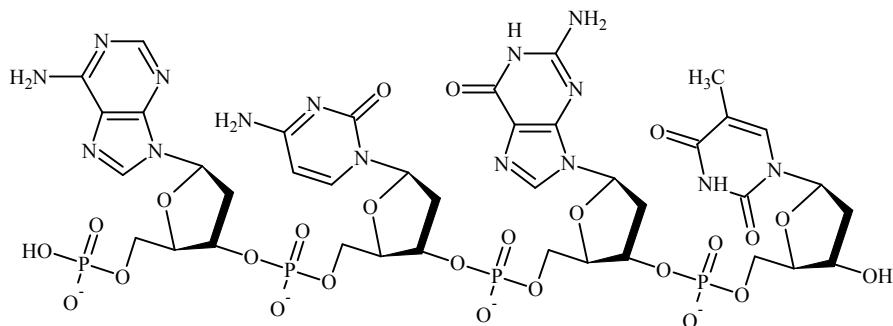


Рис. 1. Гетероциклические основания (А - аденин, С - цитозин, G - гуанин, Т - тимидин) и олигонуклеотид dp(ACGT).

Нуклеиновые кислоты имеют несколько уровней организации: первичную, вторичную, третичную и четвертичную структуры. Для хроматографии олигонуклеотидов значимыми являются первые две структуры. Первичная структура представляет собой линейную последовательность нуклеотидов. Вторичная структура образуется за счет

нековалентных взаимодействий нуклеотидов (прежде всего, азотистых оснований) между собой: водородных связей и стэкинг-взаимодействий. Стэкинг – нековалентное взаимодействие между молекулами, содержащими ароматические кольца, образуется за счет перекрываний p-орбиталей в  $\pi$ -сопряженных системах. В случае стэкинг-взаимодействия азотистые основания уложены друг над другом "в стопки". Классическим примером вторичной структуры является двойная спираль ДНК [1].

Вторичная структура олигонуклеотидов влияет на их хроматографическое удерживание. Для дестабилизации вторичной структуры олигонуклеотидов применяют полярные растворители и повышенную температуру.

## **2.2. Факторы, влияющие на разделение олигонуклеотидов**

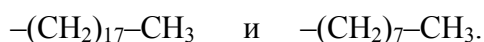
### **2.2.1. Обращенные неподвижные фазы для ОФ ВЭЖХ олигонуклеотидов**

Неподвижные фазы, применяемые для ОФ ВЭЖХ олигонуклеотидов, обычно синтезируются на основе силикагеля. Они различаются по размеру частиц, диаметру пор, содержанию силанольных групп, примесей тяжелых металлов, длине, типу и числу привитых заместителей на единицу поверхности. Все эти параметры влияют на хроматографическую подвижность олигонуклеотидов и форму их пиков на хроматограмме.

Основная причина уширения хроматографических пиков олигонуклеотидов — низкая скорость массопереноса. Поэтому для разделения этих веществ предпочтительнее использовать сорбенты с размером частиц от 2 до 5 мкм, для которых диффузионный путь молекул мал [2].

В зависимости от молекулярной массы олигонуклеотидов выбирают неподвижные фазы с порами, размер которых превышает размер олигонуклеотида. Если короткие олигонуклеотиды можно хроматографировать на сорбентах с порами 10-20 нм, то длинные олигонуклеотиды требуют применения фаз с порами до 100-200 нм [3].

Наиболее распространенными неподвижными фазами для ОФ ВЭЖХ олигонуклеотидов являются адсорбенты типа C18 или C8 [4]. Эти адсорбенты синтезируют на основе пористого силикагеля путем ковалентной прививки к его поверхностным силанольным группам заместителей



Фазы с заместителями C18 предпочтительнее фаз типа C8, так как они имеют большую емкость, связанную с тем, что толщина "слоя неподвижного растворителя" C18 больше "слоя" C8, и фазы C8 отличаются меньшей гидрофобностью.

Обращенные перфторированные фазы являются ОФ фазами нового типа и поэтому используются относительно редко. Существуют два типа сорбентов с перфторированными фазами, синтезированными на основе силикагеля: сорбенты с привитыми алкильными заместителями, линейными (Fluophase RP) или разветвленными (Fluofix), и с ароматическими заместителями  $-C_6F_5$  (Fluophase PFP). Перфторированные фазы ведут себя как сильные кислоты Льюиса — акцепторы электронов, селективно взаимодействуя с электронодонорными основаниями Льюиса (например, аминами или азотистыми основаниями). Перфторированные фазы с ароматическими заместителями трудно точно классифицировать по шкале полярности, они занимают промежуточное положение между обращенной фазой и силикагелем и проявляют как гидрофобные, так и полярные свойства [5].

В работе [6] сравнивали селективность перфторированной фазы Fluophase RP с фазой C18. В качестве элюента использовали метанол и 2,2,2-трифторэтанол. Перфторированная фаза показала наибольшую селективность по отношению к веществам-акцепторам водородных связей (например, к кофеину и анизолу) при использовании в качестве элюента 2,2,2-трифторэтанола. Эту уникальную селективность авторы объясняют более сильной адсорбцией трифторэтанола на поверхности перфторированной фазы, чем на поверхности углеводов. Трифторэтанол, являясь сильным донором водородных связей, адсорбируется на поверхности неподвижной фазы и удерживает соединения-акцепторы водородных связей, при этом "отталкивая" соединения-доноры.

Перфторированная фаза Fluofix проявляет уникальную селективность по отношению к полиароматическим углеводородам (ПАУ) при использовании метанола в качестве растворителя [7]. Селективность перфторированной фазы по отношению к гомологичным ПАУ меняется в зависимости от концентрации метанола в подвижной фазе. При высоких концентрациях метанола (больше 80 об.%) ПАУ с большей молекулярной массой элюируются быстрее по сравнению с углеводородами с меньшей молекулярной массой. При меньших концентрациях метанола ПАУ элюируются в порядке увеличения молекулярной массы, также, как при хроматографии на фазах C18.

Сорбенты с циано-группами (нитрильные фазы) являются очень полярными, поэтому их применяют в основном для разделения полярных веществ [8]. Нитрильные фазы можно использовать как в нормальной, так и в обращенно-фазовой ВЭЖХ, что является их неоспоримым преимуществом.

В работе [9] сравнивали свойства октадецильной фазы и восьми нитрильных фаз, синтезированных в разных условиях, по отношению к ароматическим соединениям.



Хроматографические свойства и долговечность колонок проверяли в условиях нормальной и обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Нитрильные сорбенты, синтезированные с использованием 3-цианопропилтрихлорсилана, показали более сильное удерживание полиароматических углеводов, чем алкилбензолов, так как основной вклад в удерживание полиароматических соединений вносит дипольное взаимодействие. Циано-фазы, приготовленные с использованием 3-цианопропилдиметилсилана, а также фаза C18 проявили лучшую селективность по отношению к этилбензолу и н-бутилбензолу. В этом случае разделение основано на гидрофильных взаимодействиях.

Кроме того, было показано, что циано-фазы, приготовленные с использованием 3-цианопропилтрихлорсилана, имеют более продолжительное время жизни, чем циано-фазы на основе 3-цианопропилдиметилсилана.

Помимо описанных выше сорбентов, для ОФ ВЭЖХ олигонуклеотидов также используют сорбенты, синтезированные на основе полимеров, например сополимеров стирола и дивинилбензола [3, 10]. Они проявляют высокую селективность, термически и гидролитически устойчивы [11], но их главные недостатки - относительно низкая эффективность колонки по сравнению с силикагельными фазами и заметная сжимаемость при давлениях более 10 МПа.

За последние 10 лет заметное распространение получили "монолитные" колонки, в которых сорбент находится не в виде отдельных гранул, а в виде монолитной массы [12-15]. Обладая целым рядом преимуществ перед обычными колонками, монолитные колонки не нашли широкого распространения из-за плохой воспроизводимости свойств колонок между собой.

### **2.2.2. Состав подвижной фазы**

В качестве подвижной фазы для ОФ ВЭЖХ используют водные растворы с добавками органических растворителей (метанол, ацетонитрил). При хроматографии на весьма гидрофильных фазах (сополимер N-изопропилакриламида, метилакрилата бутила и N,N-диэтиламинпропилакриламида) подвижной фазой может являться и водно-солевой раствор [16]. При работе с фторированными неподвижными фазами используют метанол и 2,2,2-трифторэтанол [6, 7].

Гидрофобность олигонуклеотидов зависит от степени их ионизации, определяющейся рН раствора. Для получения воспроизводимых результатов значения рН подвижной фазы поддерживают в заданных пределах, используя добавки соответствующих солей или кислот [17].

В состав олигонуклеотидов входит рибозофосфатная цепь, которая является гидрофильной и не уходит из воды в неполярную неподвижную фазу, уменьшая тем самым удерживание олигонуклеотидов. Для увеличения удерживания в большинстве случаев ОФ ВЭЖХ используют в варианте ион-парной хроматографии, добавляя в подвижную фазу в качестве динамических модификаторов гидрофобные аммониевые катионы, образующие ионные пары с фосфатными группами. Введение ион-парных реагентов преследует две цели: улучшение селективности при разделении длинных олигонуклеотидов и введение ионных взаимодействий в механизм разделения для достижения пропорционального вклада каждого нуклеотида в удерживание олигонуклеотида.

Триэтиламмоний ацетат (ТЕАА) является самым распространенным ион-парным буфером, но используются также и другие [18-21]. Триэтиламмоний ацетат позволяет достигать хорошего разделения олигонуклеотидов, а его летучесть позволяет избежать процедуры обессоливания при использовании в препаративной хроматографии. С другой стороны, ТЕАА – слабая ион-парная система, и влияние олигонуклеотидной последовательности в олигонуклеотидной цепи на удерживание устраняется не полностью [2]. Для увеличения удерживания олигонуклеотидов в системе с триэтиламином (ТЕА) дополнительно вводят гидрофобные анионы – доноры водородных связей. В работах [2, 22-24] используют буфер ТЕА-НФИР (гексафторизопропанол).

Концентрация ион-парных агентов обычно составляет 0,002-0,1 М [12, 25-27], то есть она должна быть избыточной по отношению к группам противоионов олигонуклеотидов.

### **2.2.3. Нагрузка на колонку**

Влияние нагрузки на эффективность разделения определяет препаративные возможности метода.

При достижении определенного количества вводимого в колонку образца форма пика искажается и уменьшается время удерживания. В этом случае говорят о перегрузке колонки. Для того, чтобы определить, сколько вещества можно ввести в колонку без потери эффективности, находят линейный диапазон концентраций. Известно, что для небольших количеств вводимого в колонку вещества времена удерживания и эффективность колонки не зависят от массы образца. Но при достижении критического значения массы, наблюдается заметное уменьшение времени удерживания и эффективности колонки.

Снайдер определил линейный диапазон нагрузки на колонку как отношение массы образца к массе адсорбента, дающее значение  $k'$  на 10% меньше, чем соответствующее значение  $k'$ , определенное для меньших образцов [28]. Когда превышаете линейный диапазон нагрузки на колонку, качественный и количественный анализ становится более сложным. В этом случае фактор удерживания меняется в зависимости от массы введенного образца, а эффективность колонки может сильно падать, что приводит к ухудшению разделения. Вследствие сказанного выше, предпочтительнее выбирать условия, соответствующие линейному диапазону нагрузки на колонку, которые составляют обычно  $10^{-3}$ - $10^{-2}$  граммов вещества на один грамм адсорбента [29].

#### 2.2.4. Скорость потока подвижной фазы

Эффективность хроматографической колонки,  $\alpha$ , следовательно, и эффективность разделения компонентов определяется ВЭТТ, высотой, эквивалентной теоретической тарелке (H). ВЭТТ и линейная скорость потока ( $u$ ) связаны уравнением Ван-Деемтера [4]:

$$H \approx A + B/u + C \cdot u, \quad (1)$$

где  $A$  - параметр, учитывающий неравномерность движения потока подвижной фазы,  $B$  - параметр, учитывающий продольную диффузию вещества,  $C$  - параметр, учитывающий сопротивление массопереносу в колонке. Вид суммарной зависимости и отдельных вкладов в нее показаны на рис. 2.

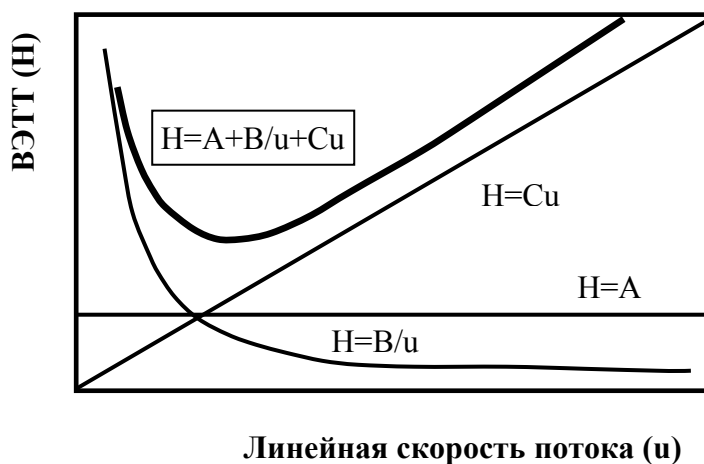


Рис. 2. Кривая Ван-Деемтера и вклады каждого параметра.

Олигонуклеотиды - молекулы с большой молекулярной массой и, соответственно, малым коэффициентом диффузии, поэтому наибольший вклад в уравнение Ван-Деемтера вносит коэффициент  $C$  [2]. В результате для олигонуклеотидов кривая Ван-Деемтера

имеет вид почти линейной зависимости без локального минимума в аналитически значимом диапазоне значений скорости потока подвижной фазы.

### **2.2.5. Размер частиц сорбента**

Медленный массоперенос олигонуклеотидов в неподвижной фазе приводит к значительному уширению пиков. Для уменьшения диффузионного пути и улучшения разделения олигонуклеотидов нужно использовать сорбент с небольшим размером частиц (1,7-2,5 мкм). Этот эффект в наибольшей степени проявляется для длинных олигонуклеотидов из-за меньших значений их коэффициентов диффузии [1].

Однако уменьшение частиц сорбента приводит к резкому увеличению давления на колонке, что ужесточает требования к оборудованию и к устойчивости сорбента.

### **2.2.6. Температура**

Известно, что температура в жидкостной хроматографии влияет на величину коэффициента удерживания ( $k'$ ) веществ согласно следующему уравнению [22]:

$$\ln k' = A/T + B, \quad (2)$$

где  $A$  и  $B$  - параметры, не зависящие от температуры,  $A > 0$ .

В обращенно-фазовой хроматографии повышение температуры приводит к разрушению структуры воды и, тем самым, к ослаблению гидрофобных взаимодействий, что, в конечном итоге, ослабляет удерживание вещества.

Изменение температуры в процессе разделения (градиент температуры) может быть использовано для изменения селективности сорбента. Это позволяет разделять нуклеотиды даже без использования органического растворителя, но только за счет изменения факторов емкости веществ [30] с повышением температуры.

По отношению к длинным олигонуклеотидам температура ВЭЖХ анализа может иметь решающее значение. Это связано с внутримолекулярной структурой олигонуклеотидов, которая при повышении температуры разрушается. Структурированные и деструктурированные олигонуклеотиды обладают разными хроматографическими свойствами.

### **2.2.7. Изократический и градиентный режимы хроматографии**

Олигонуклеотиды разделяют как при постоянном составе элюента (изократический метод), так и при изменении его состава (увеличении "силы" подвижной фазы) в течение анализа (градиентный метод).

Олигонуклеотиды, являясь линейными полимерами, относятся к веществам с аномально высокой чувствительностью к составу элюента, поэтому их, как правило, хроматографируют в градиентном режиме. Высокая чувствительность олигонуклеотидов по отношению к концентрации органического модификатора в подвижной фазе хорошо согласуется с моделью многоточечного связывания, предложенной в работе Ренье [31] для ОФ ВЭЖХ пептидов. По отношению к олигонуклеотидам аналогичные данные были получены Гиларом с соавторами [2], которые исследовали зависимости коэффициентов удерживания ( $k'$ ) олигонуклеотидов  $dp(T)_{2-30}$  от состава подвижной фазы. Результаты из работы [2] приведены на рис. 3.

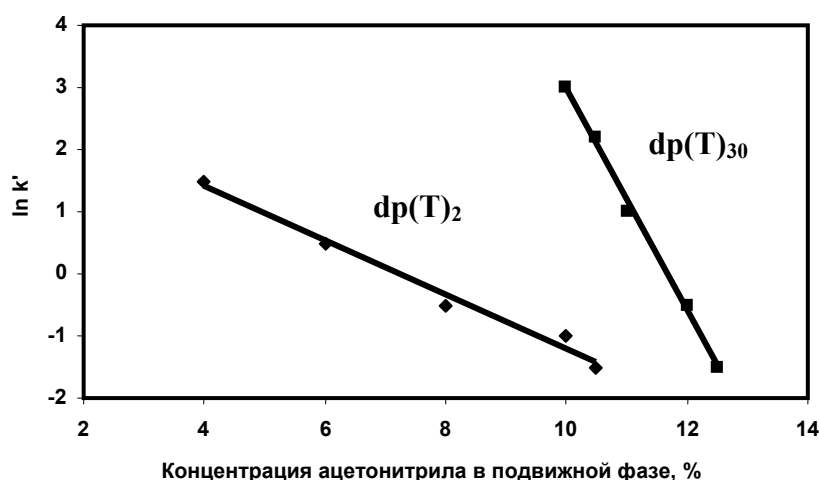


Рис. 3. Графики зависимости логарифмов коэффициентов удерживания от скорости изменения концентрации ацетонитрила в подвижной фазе для  $dp(T)_2$  и  $dp(T)_{30}$ .

Условия анализов: колонка XTerra MS C<sub>18</sub> 30x4,6 мм, 2,5 мкм; элюент А - 0,01 М триэтиламмоний ацетат, рН 7,0; элюент Б - ацетонитрил; скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин; температура колонки 60°C.

Градиентный режим характеризуется следующими параметрами: скоростью изменения состава подвижной фазы (в объемных процентах органического растворителя за миллилитр), "размахом" градиента (разность между конечной и начальной концентрацией органического модификатора), а также начальным содержанием органического модификатора в подвижной фазе. Первый параметр влияет на селективность разделения олигонуклеотидов. Второй параметр выбирается исходя из состава исследуемой смеси олигонуклеотидов и природы сорбента. Увеличение третьего параметра - начальной концентрации подвижной фазы - позволяет значительно сократить время анализа при хроматографии длинных олигонуклеотидов, не потеряв при этом селективности разделения.

Так как для длинных олигонуклеотидов зависимость  $k'$  от концентрации органического растворителя очень резкая, хроматографировать их при постоянной концентрации органического растворителя практически невозможно - олигонуклеотид либо не удерживается на колонке, либо имеет очень большой объем удерживания. Тем не менее анализ длинных олигонуклеотидов иногда осуществляется в изократическом режиме, но удерживание веществ уменьшают увеличением температуры (температурное программирование) [26].

### **2.2.8. Температурное программирование при изократическом режиме хроматографии**

Изократический режим хроматографии имеет довольно ограниченную область применения, этим методом можно разделять только смеси коротких олигонуклеотидов. Увеличение температуры в течение анализа (температурное программирование) приводит к изменению факторов емкости веществ, что заметно расширяет сферу использования изократического метода, делая возможным одновременное разделение смесей коротких и длинных олигонуклеотидов. Кроме того, температурное программирование заметно сокращает время анализа по сравнению с изотермическим изократическим режимом хроматографии.

Фактор емкости  $k'$  может меняться в зависимости от программируемого параметра (температуры или силы элюента). Температурное программирование при изократическом режиме хроматографии является, в своем роде, альтернативой градиентной хроматографии. Оно позволяет сохранить главное достоинство изократического режима по сравнению с градиентным - отсутствие необходимости смешения элюентов в течение анализа.

Температурное программирование используется для разделения веществ с большим диапазоном факторов емкости. Например, в работе [26] этот метод применяли для проведения быстрого разделения смеси олигонуклеотидов  $pd(A)_{12-18}$  и  $pd(A)_{25-30}$ , а также смеси  $pd(A)_{40-60}$ , были получены хорошие результаты.

При температурном программировании важно, чтобы температура изменялась равномерно, в противном случае, пики могут иметь неправильную форму и плохо воспроизводиться.

### **2.2.9. Параметры колонки**

Важным следствием аномально высокой чувствительности коэффициента удерживания по отношению к "силе" элюента является то, что сорбция олигонуклеотидов

происходит только в верхней части колонки. При увеличении концентрации органического модификатора во время градиентного элюирования величина  $k'$  быстро стремится к нулю, вещество перестает сорбироваться и свободно движется к детектору в потоке подвижной фазы. Очевидно, что свободное перемещение зоны вещества вдоль колонки приводит к уширению этой зоны, что в конечном итоге уменьшает степень разделения соседних зон. Таким образом, при разделении олигонуклеотидов целесообразно использовать короткие колонки [27].

### 2.3. Влияние состава олигонуклеотида на удерживание

Каждый нуклеотид вносит свой вклад в удерживание олигонуклеотида. Это дает основание для разработки модели, с помощью которой можно предсказать удерживание олигонуклеотида по его брутто-составу.

За основу такой модели, разработанной Гиларом с сотрудниками [2], были приняты следующие допущения:

- вторичная структура олигонуклеотидов не влияет на удерживание и эффективно устраняется при заданных хроматографических условиях (60°C, полярный растворитель - ацетонитрил);

- олигонуклеотид полностью сорбируется на неподвижной фазе пока содержание органического растворителя в подвижной фазе меньше критического. Когда достигается критическое значение силы элюента, олигонуклеотид перестает удерживаться и элюирует;

- критическое значение силы элюента равно составу подвижной фазы в момент элюирования пика олигонуклеотида;

- эффективность ион-парного агента не меняется в течение анализа.

С учетом вышеперечисленных допущений, была найдена зависимость критической силы элюента подвижной фазы от длины гомоолигонуклеотида:

$$y = z \cdot \ln(n_{\Sigma}) + w, \quad (3)$$

где  $y$  - критическое содержание органического модификатора в подвижной фазе (в процентном выражении),  $z$  и  $w$  - константы,  $n_{\Sigma}$  - число нуклеотидов в олигонуклеотидной цепи. Для каждого нуклеотида экспериментально были найдены константы  $z$  и  $w$ :  $a$  и  $e$  - для А,  $t$  и  $f$  - для Т,  $c$  и  $h$  - для С,  $g$  и  $i$  - для G.

Для гетероолигонуклеотидов выражение принимает следующий вид:

$$y = \left( \frac{n_a a + n_t t + n_c c + n_g g}{n_{\Sigma}} \right) \cdot \ln n_{\Sigma} + \left( \frac{n_a e + n_t f + n_c h + n_g i}{n_{\Sigma}} \right), \quad (4)$$

где  $n_a$ ,  $n_t$ ,  $n_c$ ,  $n_g$  - число нуклеотидов А, Т, С и G в гетеронуклеотидной цепи соответственно;  $n_{\Sigma} = n_a + n_t + n_c + n_g$ .

Данная модель хорошо коррелирует с экспериментальными данными для олигонуклеотидов длиной 16-60 нуклеотидов.

В работе [32] Стурм с сотрудниками описали модель, учитывающую вторичную структуру олигонуклеотидов и работающую в диапазоне температур от 30°C до 80°C. Соответствие теоретических и экспериментальных данных было продемонстрировано для олигонуклеотидов длиной от 15 до 48 нуклеотидов. Также была подтверждена правомерность вышеописанной модели Гилара с сотрудниками.

#### 2.4. Пиковая емкость

Удобным параметром для сравнения эффективности разделения на различных колонках для градиентного режима хроматографии является пиковая емкость колонки,  $P$ . Она показывает, какое число хроматографических пиков, равномерно распределенных по времени хроматограммы, можно разделить с разрешением равным единице в данных хроматографических условиях.

Выражение для пиковой емкости колонки можно представить как:

$$P = 1 + \frac{t_g}{(1/n)\sum_i^n w} \quad (5)$$

где  $P$  - пиковая емкость колонки,  $n$  - количество пиков выбранных для расчета  $P$ ,  $t_g$  - время градиента,  $w$  - ширина пика у основания в единицах времени. Таким образом, пиковая емкость колонки - это, фактически, время градиента, деленное на среднюю ширину пиков на хроматограмме. Для некоторых видов хроматографии, например, для обращенно-фазовой хроматографии пептидов, когда на всей хроматограмме ширина пиков почти одинаковая, для расчетов можно выбрать любую группу пиков. В других случаях, например, при очень пологих градиентах, когда пики уширяются с увеличением удерживания, для представительности выборки имеет смысл выбрать для расчета  $P$  первый и последний пики на хроматограмме [33].

Обычно пиковая емкость определяется для полной хроматограммы, начиная от времени выхода неудерживаемого компонента и заканчивая последним компонентом на хроматограмме. Снайдер с сотрудниками [34] ввел понятие пиковая емкость образца,  $P^{**}$ , которая определяется в интервале от времени выхода первого целевого компонента до времени выхода последнего целевого компонента.

Селективность разделения олигонуклеотидов не является постоянной, она уменьшается с длиной цепи, поэтому способ расчета пиковой емкости определяется



составом смеси олигонуклеотидов. Если смесь олигонуклеотидов "однородна" по длинам цепи, то пиковую емкость образца можно представить просто как сумму разрешений соседних пиков. В случае смесей, содержащих как короткие, так и длинные олигонуклеотиды, предпочтительнее поделить весь набор олигонуклеотидов на сегменты с близкими длинами цепей, определить пиковую емкость для каждого сегмента и суммировать полученные результаты [27].

### **2.5. Параметры и критерии оптимизации разделения олигонуклеотидов**

Таким образом, основными параметрами оптимизации ион-парной обращенно-фазовой хроматографии олигонуклеотидов являются:

- природа обращенно-фазового сорбента,
- размер частиц и диаметр пор сорбента,
- длина колонки,
- состав подвижной фазы,
- нагрузка на колонку,
- температура колонки,
- скорость потока подвижной фазы,
- диапазон концентраций органического модификатора в подвижной фазе,
- скорость изменения процентного содержания органического модификатора в подвижной фазе (градиент),
- начальная концентрация органического модификатора.

В качестве критерия оценки оптимальных условий разделения на колонках с различными сорбентами можно использовать пиковую емкость колонки. Пиковая емкость - это количественный критерий, позволяющий напрямую сравнивать колонки между собой.

### 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

#### 3.1. Материалы

Ацетонитрил "Сорт 1" ("Криохром", С.-Петербург); триэтиламин N[Et]<sub>3</sub> ("Panreac", Испания); уксусная кислота НОАс "хч" ледяная ("Лаверна", Москва).

Водные растворы 2'-дезоксирибонуклеотидов:

Обозначение	Последовательность (5'→3')	Количество нуклеотидов в цепи	Количество (мг/мл)
A5	dp(AAAAA)	5	10,7
C5	dp(CCCCC)	5	11,1
T5	dp(TTTTT)	5	7,1
A20	dp(AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA)	20	23,9
C21	dp(CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC)	21	16,1
T20	dp(TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT)	20	20,6
(CCG)7	dp(CCGCCGCCGCCGCCGCCGCCG)	21	11,4
A30	dp(AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA)	30	8,4
C30	dp(CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC)	30	8,8
T30	dp(TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT)	30	8,9
A40	dp(AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAA)	40	11,4
C40	dp(CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC CCCC)	40	14,2
T40	dp(TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTT)	40	12,1
A50	dp(AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA)	50	6,5
C50	dp(CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC CCCCCCCCCCCCCCC)	50	12,8
T50	dp(TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTTT)	50	3,0
10 mer	dp(ACTTACGGTT)	10	0,5
20 mer	dp(ACTTACGGTTGGGTGCATTA)	20	0,6
22 mer	dp(ACCCTGAAGTTCCGTCAAGCTG)	22	0,5
50 mer	dp(AATAACATCTGGATCCTTAATCAAAGCTAACTTA CGGTTGGGTGCATTA)	50	15,0

Все растворы 2'-дезоксирибонуклеотидов были любезно предоставлены ИХБиФМ СО РАН.

### 3.2. Оборудование

Хроматограф жидкостной микроколоночный "Милихром А-02" (ЗАО "ЭкоНова", Новосибирск); весы аналитические электронные "Adventurer", погрешность взвешивания  $\pm 0,2$  мг; рН-метр "Анион-4100" (НПП "Инфраспак-Аналит", Новосибирск) — погрешность измерения рН  $\pm 0,02$ ; пипетки переменного объема на 20-200 мкл (20 мкл  $\pm 4\%$ ; 200 мкл  $\pm 0,25\%$ ) и на 100-1000 мкл (100 мкл  $\pm 2\%$ ; 1000 мкл  $\pm 0,45\%$ ) (ЗАО "ТермоЛабсистемс", С.-Петербург); колбы мерные (25  $\pm 0,03$  мл, 50  $\pm 0,052$  мл, 100  $\pm 0,08$  мл, 200  $\pm 0,1$  мл); колонки 2x75 мм с сорбентами NucleoSep 200-5 (ООО "БиоАванта", Новосибирск), Диасфер 300-С10СN (ООО "БиоХимМак", Москва), ProntoSil С18AQ 120-5 ("Bischoff", Германия).

Обработку хроматограмм проводили с помощью компьютерной программы "Мультихром-СПЕКТР" (ЗАО "Амперсенд", Москва). Графическое представление результатов проводили с помощью компьютерной программы "Microsoft® Excel 2003" ("Microsoft Corp.", США).

### 3.3. Приготовление растворов

**0,1 М ТЕАА, рН 5,5.** К 27,8 мл триэтиламина добавляли в 50 мл подкисленной воды, в раствор добавляли эквимольное количество концентрированной уксусной кислоты и доводили разбавленной кислотой рН до 5,5, объём раствора доводили водой до 200 мл, затем брали аликвоту полученного раствора 10 мл и разбавляли водой до 100 мл. Полученный раствор фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

**0,07 М ТЕАА, рН 5,5.** К 20 мл 0,1 М раствора ТЕАА добавляли 10 мл воды.

**0,05 М ТЕАА, рН 5,5.** К 15 мл 0,1 М раствора ТЕАА добавляли 15 мл воды.

**0,03 М ТЕАА, рН 5,5.** К 7,5 мл 0,1 М раствора ТЕАА добавляли 22,5 мл воды.

**0,01 М ТЕАА, рН 5,5.** К 3 мл 0,1 М раствора ТЕАА добавляли 27 мл воды.

Растворы 2'-дезоксирибонуклеотидов с концентрацией 0,5 мг/мл были получены разбавлением их концентрированных растворов.

#### 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Целью настоящей работы является исследование основных факторов, влияющих на разделение олигонуклеотидов, и оптимизация условий ОФ ВЭЖХ олигонуклеотидов на разных обращенно-фазовых сорбентах: NucleoSep 200-5, Диасфер 300-C10CN, ProntoSil C18AQ 120-5 (далее — NucleoSep, Диасфер, ProntoSil). Эти сорбенты представляют собой сферический объемнопористый силикагель с ковалентно привитыми заместителями. Данные по размерам пор, диаметру частиц, привитым заместителям указаны в таблице 1:

Таблица 1. Размеры пор, диаметр частиц и привитые заместители для трех обращенно- фазовых сорбентов.

Название сорбента	Размер пор, нм	Диаметр частиц, мкм	Заместитель
<b>NucleoSep 200-5</b>	20	5	$-(\text{CH}_2)_2-(\text{CF}_2)_7-\text{CF}_3$
<b>Диасфер 300-C10CN</b>	30	6	$-(\text{CH}_2)_{10}-\text{CN}$
<b>ProntoSil C18AQ 120-5</b>	12	5	$-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$

В дальнейшем разработанный нами оптимизированный метод разделения олигонуклеотидов планируется использовать в препаративном варианте, поэтому в качестве ион-парного агента был выбран достаточно летучий триэтиламмоний ацетат. В качестве органического модификатора выбрали ацетонитрил.

Поскольку такие характеристики имеющегося оборудования и материалов, как размер колонки, диаметр зерна сорбента, максимальное рабочее давление, были фиксированы, то исследование и оптимизацию разделения олигонуклеотидов проводили по следующим параметрам:

- диапазон изменения процентного содержания органического модификатора в подвижной фазе;
- концентрация ион-парного агента;
- нагрузка на колонку;
- температура колонки;
- скорость изменения процентного содержания органического модификатора в подвижной фазе;
- скорость потока подвижной фазы;
- начальная концентрация органического модификатора в подвижной фазе.

#### 4.1. Влияние содержания ацетонитрила в подвижной фазе на факторы емкости.

##### Изократический режим хроматографии

Как отмечалось в литературном обзоре, олигонуклеотиды аномально чувствительны к изменению концентрации органического растворителя в подвижной фазе. Это видно на хроматограммах, приведенных на рис. 4. Смеси олигонуклеотидов были хроматографированы при постоянной силе элюента (изократический режим). Изменение концентрации ацетонитрила всего на 1% приводит к резкому изменению разрешения пиков.

Зависимости факторов емкости различных олигонуклеотидов от процентного содержания ацетонитрила в подвижной фазе для изократического режима на примере колонки NucleoSep 200-5 представлены на рис. 5.

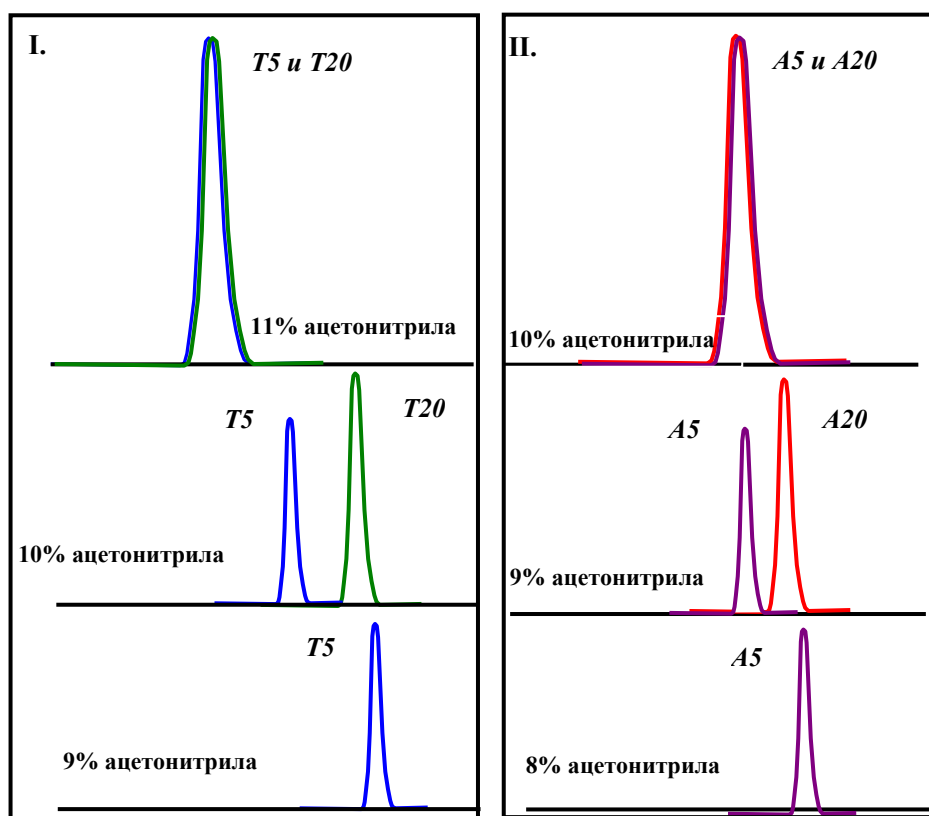


Рис. 4. Хроматограммы олигонуклеотидов T5 и T20 (I), A5 и A20 (II), полученные в изократическом режиме.

Колонка NucleoSep. Условия анализов: элюент А - 0,01 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5; элюент Б - ацетонитрил; скорость потока подвижной фазы 100 мкл/мин; температура колонки 40°C; объем пробы 5 мкл; концентрация ацетонитрила в подвижной фазе указана на рисунке.

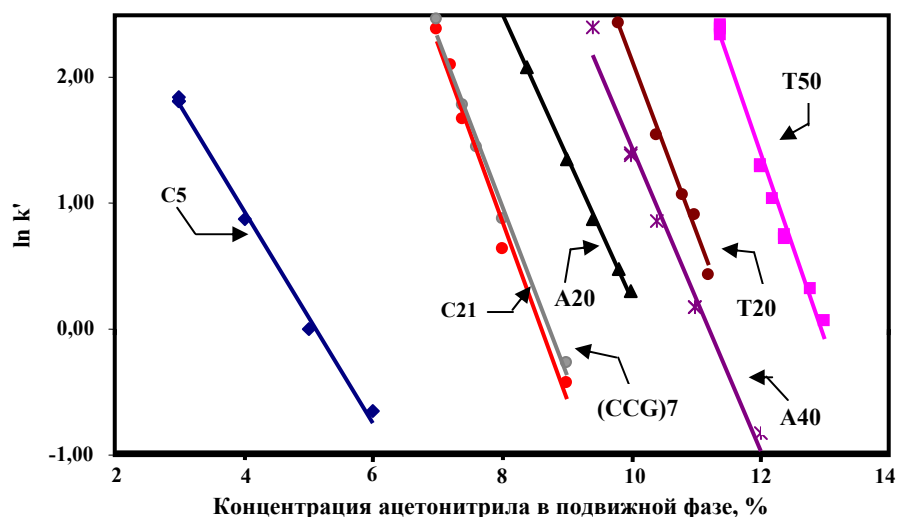


Рис. 5. Зависимость удерживания олигонуклеотидов от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе при изократическом режиме элюирования.

Колонка NucleoSep. Условия анализов: элюент А - 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5; элюент Б - (ацетонитрил : 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5)=1:4; скорость потока подвижной фазы 100 мкл/мин; температура колонки 60°C; объем пробы 5 мкл.

Из полученных данных можно сделать следующие выводы:

1. Зависимость логарифма фактора емкости от процентного содержания ацетонитрила в подвижной фазе линейна, что согласуется с литературными данными (выражение 3).

2. Удерживание олигонуклеотидов аномально сильно зависит от содержания ацетонитрила в подвижной фазе, зависимость фактора емкости для длинных олигонуклеотидов имеет более резкий характер, чем для коротких олигонуклеотидов.

Также, исходя из полученных данных был выбран диапазон концентраций ацетонитрила для градиентной хроматографии смеси олигонуклеотидов длиной от 5 до 50 нуклеотидов на колонке NucleoSep: 7%-14% ацетонитрила.

Для колонок Диасфер и ProntoSil диапазон концентраций ацетонитрила определили исходя из удерживания наименее удерживаемого (C5) и наиболее удерживаемого (T50) компонентов смеси. Диапазоны составили от 4% до 12% ацетонитрила и от 8% до 15% , соответственно.

#### 4.2. Влияние концентрации ион-парного агента на удерживание олигонуклеотидов

Для увеличения удерживания олигонуклеотидов в подвижную фазу добавляли ион-парный агент - триэтиламмоний ацетат (ТЕАА).

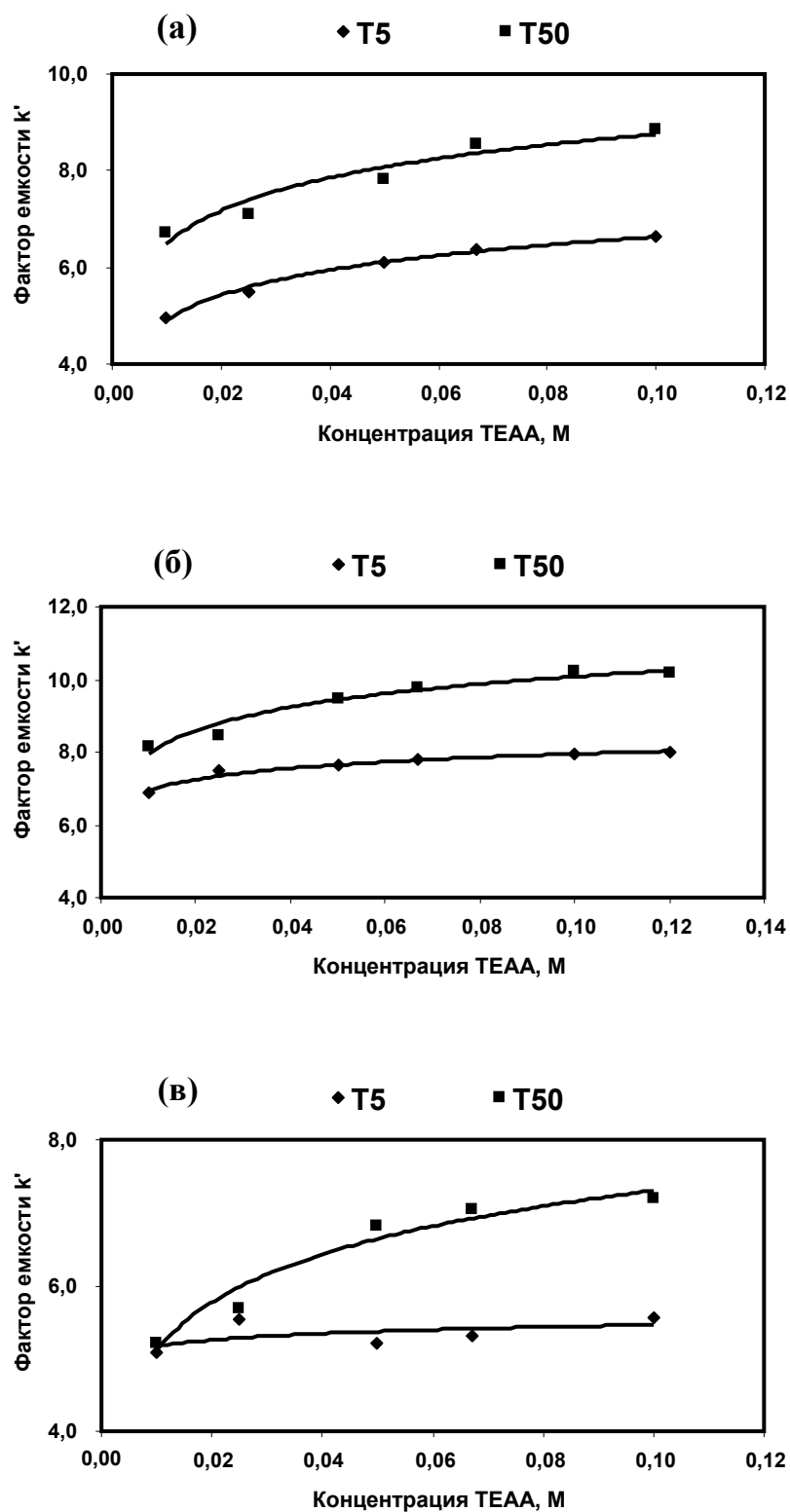


Рис. 6. Зависимость удерживания олигонуклеотидов от концентрации ТЕАА в подвижной фазе.

Условия анализов: элюент А - триэтиламмоний ацетат, рН 5,5; элюент Б - ацетонитрил; скорость потока подвижной фазы 200 мкл/мин; градиент от 3 до 20% за 10 мин; температура колонки 60°C; объем пробы 2 мкл. Колонки: (а) - NucleoSep; (б) - ProntoSil; (в) - Диасфер.

В ходе работы были получены зависимости факторов емкости от концентрации ТЕАА для олигонуклеотидов Т5 и Т50 (рис. 6). Из полученных данных следует, что с увеличением концентрации ТЕАА удержание олигонуклеотидов возрастает до определенного предела, после чего практически не изменяется. Экспериментальные данные согласуются с теорией.

Для дальнейших исследований была выбрана концентрация 0,1М ТЕАА.

### 4.3. Нагрузка на колонку

Предельная допустимая нагрузка на колонку (линейная емкость) в распределительной хроматографии примерно на порядок выше, чем в чисто адсорбционных системах. Без заметного увеличения размывания полос можно ввести в колонку  $10^{-3}$ - $10^{-2}$  г пробы на г адсорбента [35].

На рис. 7 приведены полученные в ходе работы зависимости ВЭТТ от концентрации Т10. Полученные зависимости соответствуют литературным данным. Характер зависимости одинаков для всех трех исследуемых сорбентов. Согласно полученным данным предельная допустимая нагрузка составляет  $5 \cdot 10^{-2}$  г пробы на г адсорбента.

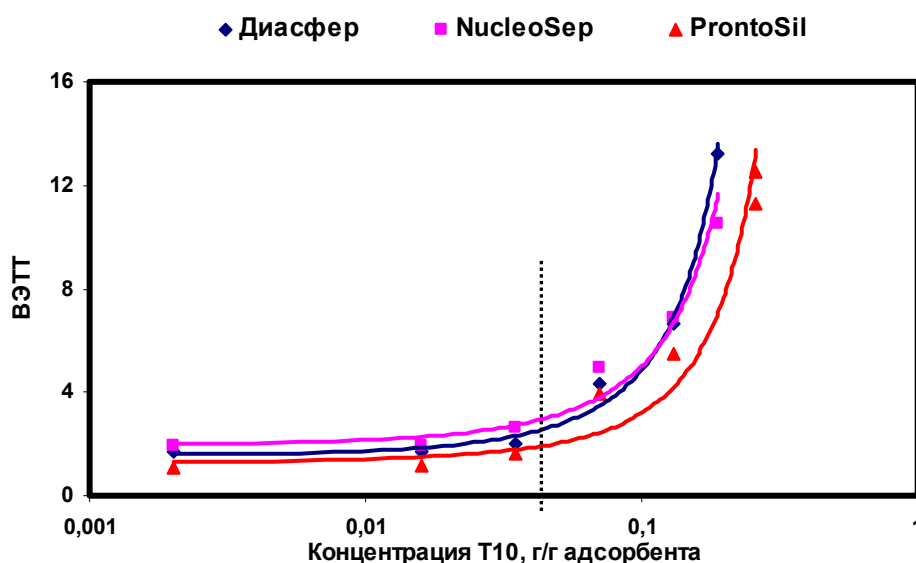


Рис. 7. Зависимость ВЭТТ от нагрузки на колонку.

Условия анализов: элюент А - 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5; элюент Б - (ацетонитрил : 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5)=1:4; температура колонки 60°C; объем пробы 10 мкл. Колонка Диасфер: градиент с 4 до 12% ацетонитрила (с 20 до 60% элюента Б) за 10 мин; скорость потока подвижной фазы 350 мкл/мин. Колонка NucleoSep: градиент с 7 до 14% ацетонитрила (с 35 до 70% элюента Б) за 10 мин; скорость потока подвижной фазы 300 мкл/мин. Колонка ProntoSil: градиент с 8 до 15% ацетонитрила (с 40 до 75% элюента Б) за 10 мин; скорость потока подвижной фазы 400 мкл/мин.



Концентрация всех применяемых в работе растворов олигонуклеотидов составляет 0,016 г/г адсорбента, то есть лежит в области линейного диапазона.

#### 4.4. Влияние температуры на удерживание олигонуклеотидов

Известно, что температура в жидкостной хроматографии влияет на величину коэффициента удерживания ( $k'$ ) веществ согласно следующему уравнению [17]

$$\ln k' = A/T + B, \quad (6)$$

где  $A$  и  $B$  - независимые от температуры параметры,  $A > 0$ .

На рис. 8 показаны результаты исследований влияния температуры колонки на коэффициенты удерживания олигонуклеотидов. Из полученных данных видно, что наибольший вклад в удерживание длинных олигонуклеотидов вносит второе слагаемое выражения 6. Для коротких олигонуклеотидов вклады первого и второго слагаемых меняются с изменением температуры.

Повышение температуры приводит к сокращению времени анализа и уменьшению вязкости подвижной фазы, что, в свою очередь, сопровождается уменьшением давления на входе в колонку. Однако работа при повышенных температурах уменьшает время жизни колонки из-за гидролитического разрушения сорбента.

Для дальнейших исследований была выбрана температура 60°C, так как в этих условиях влияние внутримолекулярных взаимодействий на удерживание олигонуклеотидов уже достаточно мало. Как показали наши эксперименты, все три исследуемые колонки при этой температуре проработали без потери эффективности по меньшей мере по 400 часов.

#### 4.5. Скорость изменения концентрации ацетонитрила в подвижной фазе

Поскольку градиент органического модификатора влияет на разрешение хроматографических пиков, мы изучали зависимость ширины пиков и разрешения от скорости изменения концентрации ацетонитрила в подвижной фазе. Для колонки NucleoSep скорость изменения концентрации ацетонитрила в процентах за миллилитр варьировали в диапазоне от 6% до 24%. Зависимости ширины пиков и разрешения пиков от наклона градиента приведены на рис. 9. Разрешение пиков рассчитывалось по следующей формуле:

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(w_1 + w_2)}, \quad (7)$$

где  $t_R$  - время удерживания пика,  $w$  - ширина пика у основания.

Из графиков видно, что разрешение олигонуклеотидов выше при более пологих градиентах ацетонитрила. Ширина пиков при уменьшении градиента линейно возрастает, но при этом разность времен удерживания растет быстрее. Полученные результаты совпадают с литературными данными [1, 3].

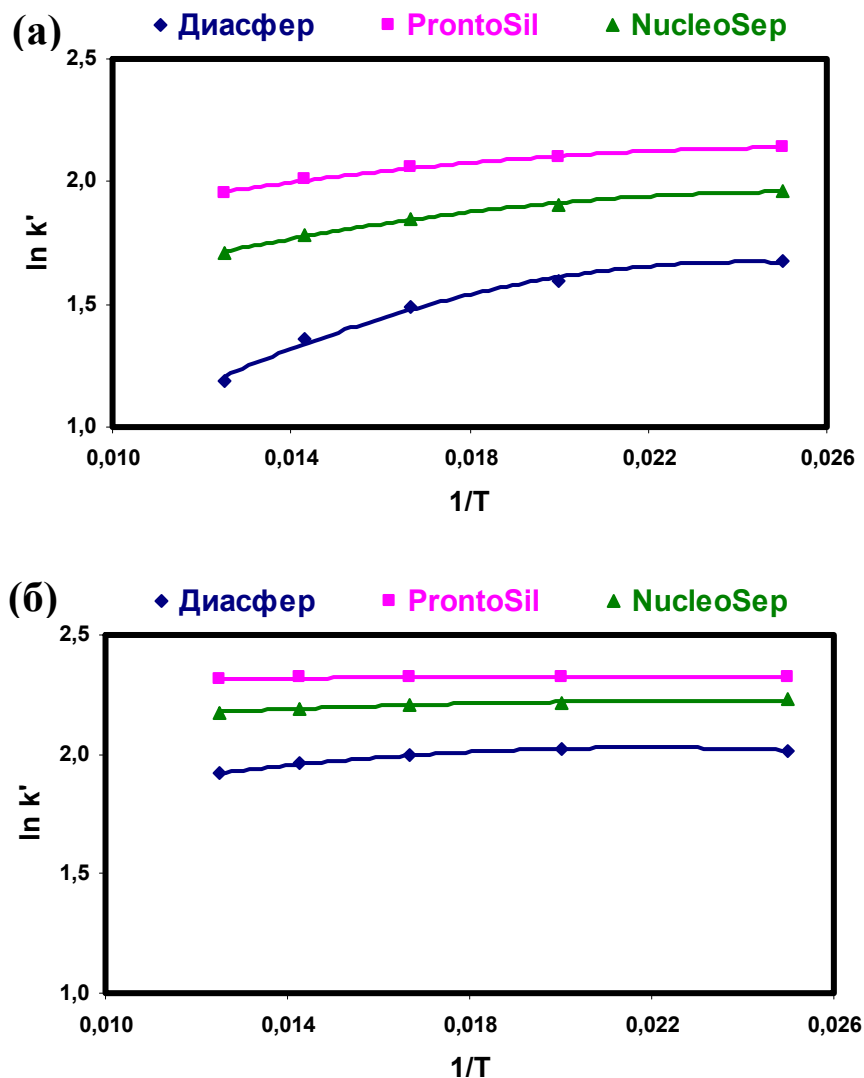


Рис. 8. Зависимости фактора емкости от температуры колонки.  
(а) - олигонуклеотид T5, (б) - олигонуклеотид T50.

Условия анализов: элюент А - 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5; элюент Б – (ацетонитрил : 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5)=1:4; скорость потока подвижной фазы 200 мкл/мин; градиент с 3 до 20% ацетонитрила за 10 мин; объем пробы 2 мкл.

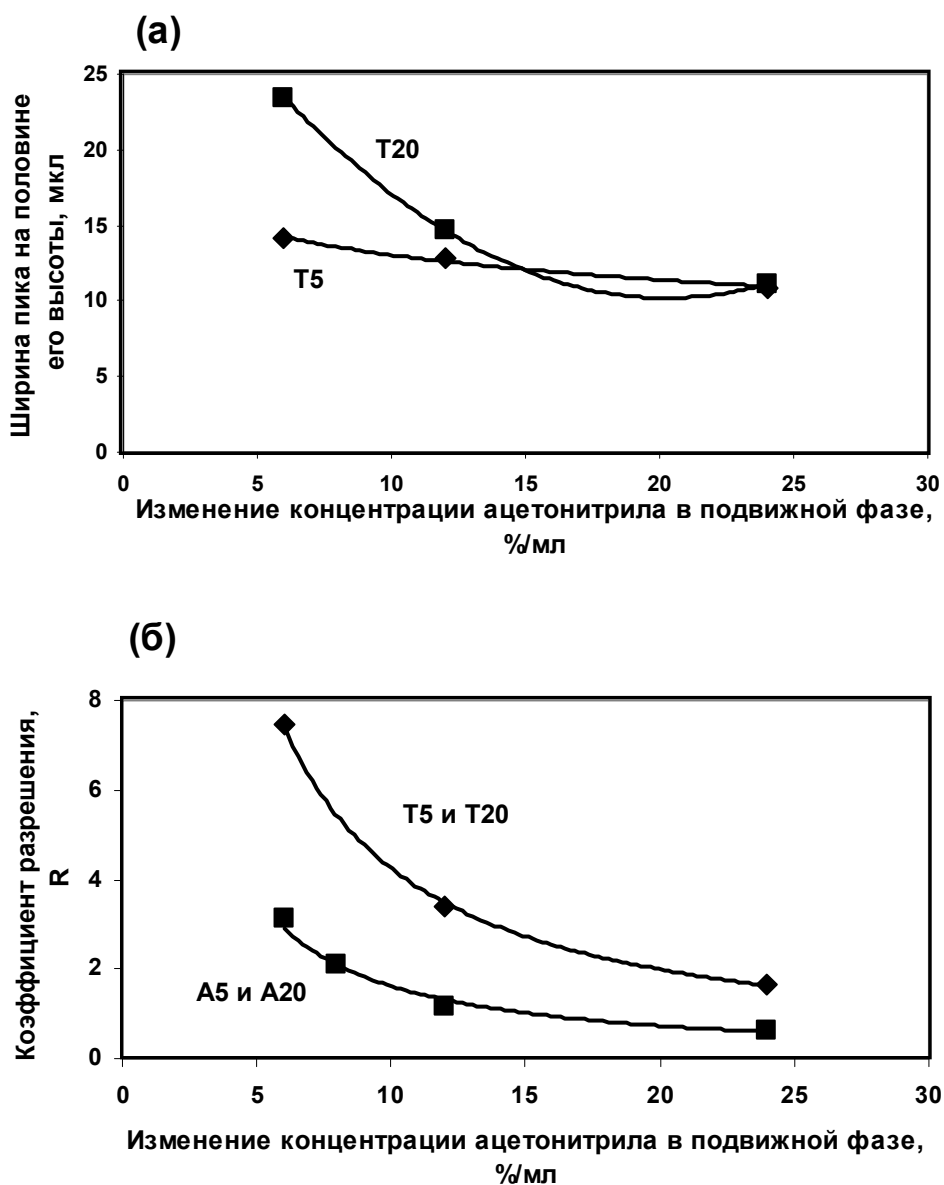


Рис. 9. Зависимость ширины пиков на половине их высоты (а) и коэффициентов разрешения (б) от скорости изменения концентрации ацетонитрила в подвижной фазе (наклон градиента).

Условия анализов: элюент А - 0,01 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5; элюент Б - ацетонитрил; скорость потока подвижной фазы 100 мкл/мин; температура колонки 40°C; объем пробы 5 мкл.

#### 4.6. Скорость потока подвижной фазы

Скорость потока подвижной фазы изменяли в диапазоне от 25 до 400 мкл/мин. Зависимости квадрата ширины пика на половине его высоты от скорости потока приведены для олигонуклеотидов Т5 и Т40 на рис. 10.

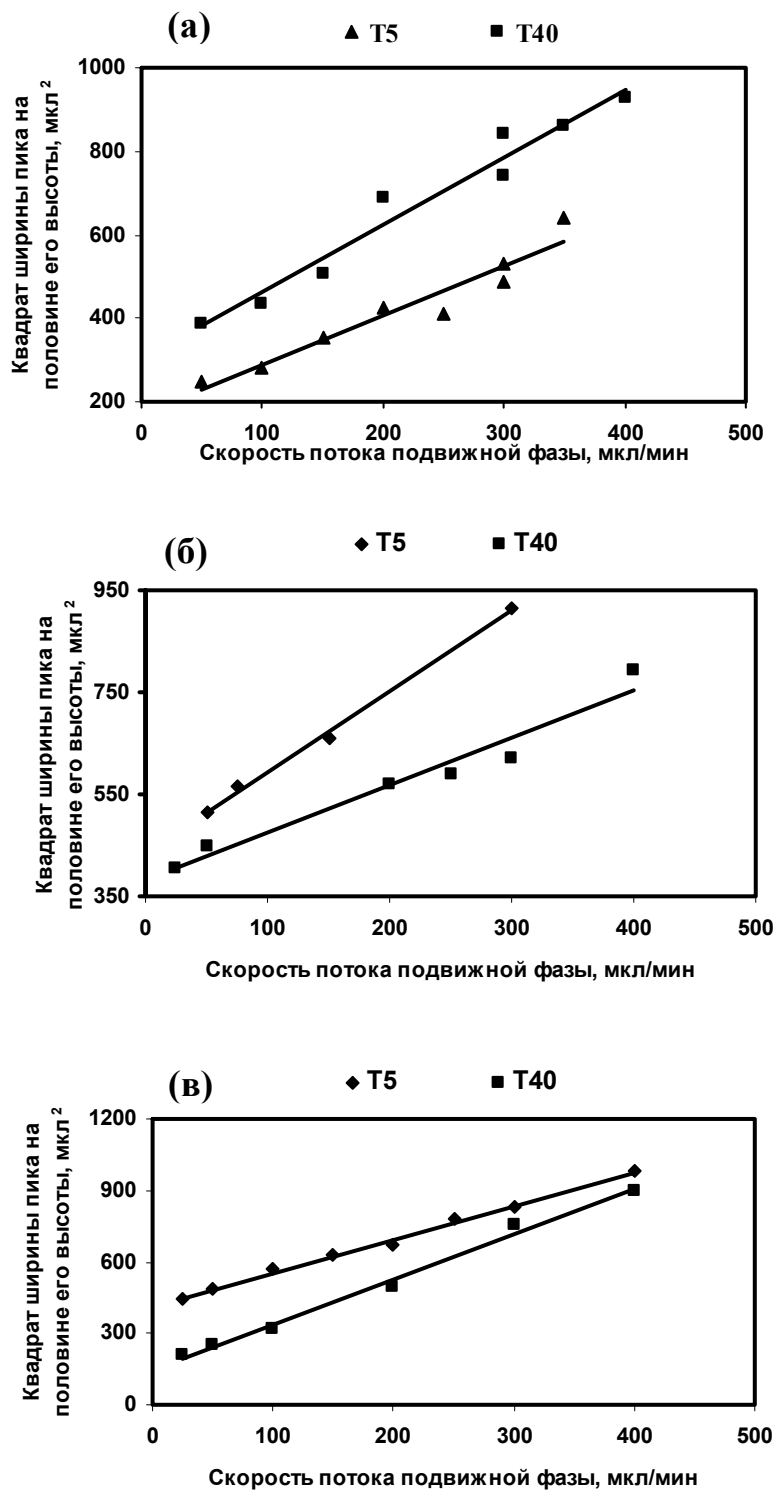


Рис. 10. Зависимость квадрата ширины пика на половине его высоты от скорости потока подвижной фазы.

Условия анализов: элюент А - 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5; элюент Б - (ацетонитрил : 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5)=1:4; температура колонки 60°C; объем пробы 5 мкл. (а) Колонка NucleoSep. Градиент с 4 до 14% ацетонитрила (с 20 до 70% элюента Б) за 2,0 мл; (б) Колонка Диасфер. Градиент с 4 до 14% ацетонитрила (с 20 до 70% элюента Б) за 2,0 мл; (в) Колонка ProntoSil. Градиент с 10 до 20% ацетонитрила (с 50 до 100% элюента Б) за 2,0 мл.

Из рис. 10 видно, что квадрат ширины пиков, пропорциональный высоте, эквивалентной теоретической тарелке (ВЭТТ), линейно возрастает с увеличением скорости потока подвижной фазы и не имеет минимума, который следует из уравнения Ван-Деемтера. Полученные результаты согласуются с теорией: олигонуклеотиды - молекулы с большой молекулярной массой, поэтому основной вклад в уравнение Ван-Деемтера вносит коэффициент  $C$ , учитывающий сопротивление массопереносу (см. выражение 1). Оптимальная скорость потока для олигонуклеотидов не может быть достигнута в аналитически значимом диапазоне скоростей потока подвижной фазы. Повысить эффективность разделения можно уменьшением скорости потока, однако это приводит к значительному увеличению времени анализа. Дальнейшую оптимизацию скорости потока подвижной фазы проводили одновременно с оптимизацией градиента ацетонитрила. В качестве критерия использовали пиковую емкость образца.

#### **4.7. Определение оптимального наклона градиента и скорости потока подвижной фазы**

В градиентной хроматографии наиболее удобной мерой эффективности разделения является пиковая емкость колонки. В общем случае пиковую емкость колонки можно представить следующим образом [27]:

$$P = 1 + \frac{\sqrt{N} \ln(k_{0,1})}{4(G+1)}, \quad (8)$$

где  $N$  - эффективность колонки,  $G$  - скорость изменения (градиент) концентрации органического растворителя в подвижной фазе (наклон градиента),  $k_{0,1}$  - фактор емкости для компонента, который элюируется последним, в начальной точке градиента.

Из выражения 8 следует, что пиковая емкость колонки зависит как от эффективности колонки  $N$ , так и от градиента  $G$ .

Эффективность колонки, в свою очередь, зависит от скорости потока подвижной фазы следующим образом (с учетом выражения 1):

$$N = \frac{L}{H} = \frac{L}{A + B/u + Cu} \quad (9)$$

Таким образом, максимальная пиковая емкость колонки для заданного градиентного времени может достигаться при скорости потока большей, чем скорость, необходимая для максимального значения эффективности колонки. Оптимальная комбинация  $N$  и  $G$  для заданного градиентного времени определяет скорость потока для достижения максимальной пиковой емкости.

Выбирая время градиента для оптимальных условий проведения рутинных анализов, необходимо находить компромисс между экспрессностью и разделением интересующих компонентов. В работе [36] была исследована зависимость пиковой емкости колонки от скорости потока подвижной фазы и времени градиента. Авторы показали, что наибольшая пиковая емкость колонки достигается за достаточно продолжительное время анализа, но 60% от максимальной пиковой емкости достигается всего за 4% от этого времени. Поэтому можно значительно сократить время анализа без существенной потери пиковой емкости. Для наших задач очень важно небольшое время анализа, поэтому мы ограничили время градиента 10 минутами.

Ранее мы установили экспериментально диапазон концентраций ацетонитрила, необходимый для разделения смеси олигонуклеотидов длиной от 5 до 50 нуклеотидов (см. пункт 4.1). Для нахождения оптимального соотношения скорости потока подвижной фазы и наклона градиента мы изменяли скорость потока подвижной фазы в диапазоне от 100 до 400 мкл/мин. Полученные данные показаны на рис. 11. Максимальная пиковая емкость достигается при скорости потока 300 мкл/мин для колонки NucleoSep, 400 мкл/мин для колонки ProntoSil и 350 мкл/мин для колонки Диасфер. Градиент при этом составляет 2,4% ацетонитрила за мл, 1,8% ацетонитрила за мл и 2,3% ацетонитрила за мл, соответственно.

#### 4.8. Хроматография смесей олигонуклеотидов в оптимальных условиях

Используя полученные оптимальные условия было проведено разделение смесей олигонуклеотидов: 1). А5, А20, А30, А40, А50; 2). Т5, Т20, Т30, Т40, Т50 - на трех исследуемых колонках. Полученные хроматограммы показаны на рис. 12-14.

Для расчета суммарной пиковой емкости образца вся хроматограмма была поделена на 4 сегмента и для каждого сегмента была рассчитана пиковая емкость как разрешение соседних пиков. Результаты приведены в таблице 2.

Табл. 2. Значения пиковой емкости образца для смесей олигонуклеотидов А5, А20, А30, А40, А50 и Т5, Т20, Т30, Т40, Т50, полученные из хроматограмм на рис. 12-14.

<b>Олигонуклеотиды</b>	<b>Т5-Т20</b>	<b>Т20-Т30</b>	<b>Т30-Т40</b>	<b>Т40-Т50</b>	<b>ΣТ5-Т50</b>
<b>Диасфер</b>	21,3	4,6	2,0	1,1	29,0
<b>NucleoSep</b>	22,4	4,7	2,6	1,7	31,4
<b>ProntoSil</b>	24,3	5,1	3,1	2,3	34,8
<b>Олигонуклеотиды</b>	<b>А5-А20</b>	<b>А20-А30</b>	<b>А30-А40</b>	<b>А40-А50</b>	<b>ΣА5-А50</b>
<b>Диасфер</b>	15,9	3,3	1,8	1,2	22,2
<b>NucleoSep</b>	12,6	3,0	1,7	1,2	18,5
<b>ProntoSil</b>	20,0	5,7	3,4	2,2	31,3

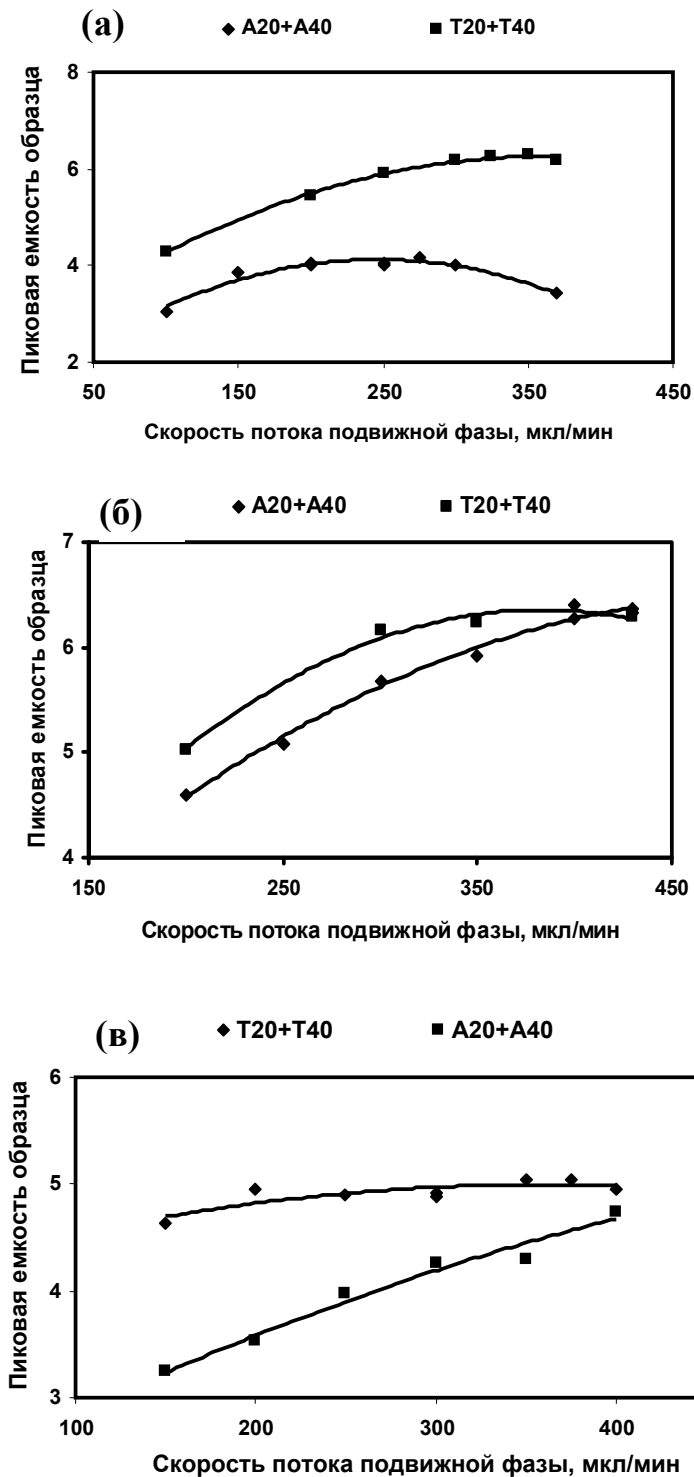


Рис. 11. Зависимость пиковой емкости образца от скорости потока:

Условия анализов: элюент А - 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5; элюент Б - (ацетонитрил : 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5)=1:4; температура колонки 60°C; объем пробы 5 мкл. (а) - Колонка NucleoSep. Градиент с 7 до 14% ацетонитрила (с 35 до 70% элюента Б) за 10 мин. (б) - Колонка ProntoSil. Градиент с 8 до 15% ацетонитрила (с 40 до 75% элюента Б) за 10 мин. (в) - Колонка Диасфер. Градиент с 4 до 12% ацетонитрила (с 20 до 60% элюента Б) за 10 мин.



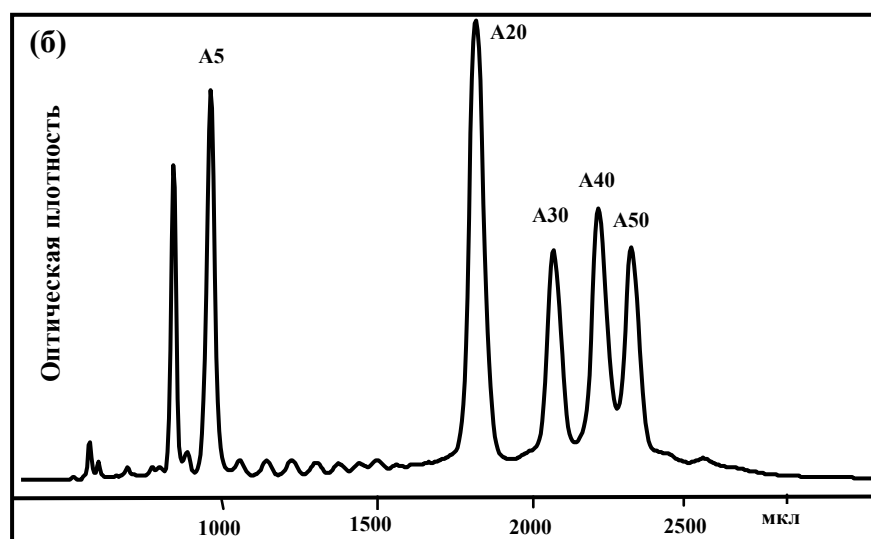
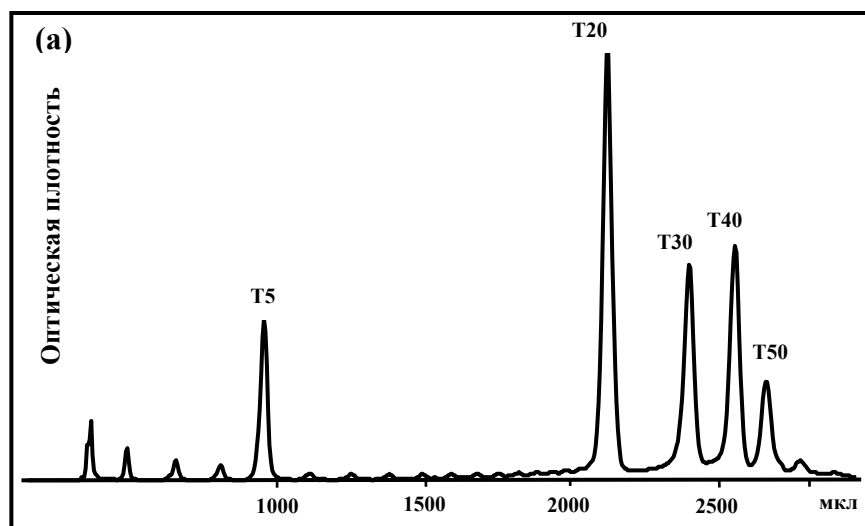


Рис. 12. Хроматограммы, полученные в оптимальных условиях:  
 (а) смесь Т5, Т20, Т30, Т40, Т50; (б) смесь А5, А20, А30, А40, А50.

Колонка NucleoSep. Условия анализов: элюент А - 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5; элюент Б - (ацетонитрил : 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5)=1:4; скорость потока подвижной фазы 300 мкл/мин; градиент с 7 до 14% ацетонитрила (с 35 до 70% элюента Б) за 10 мин; температура колонки 60°C; объем пробы 5 мкл.

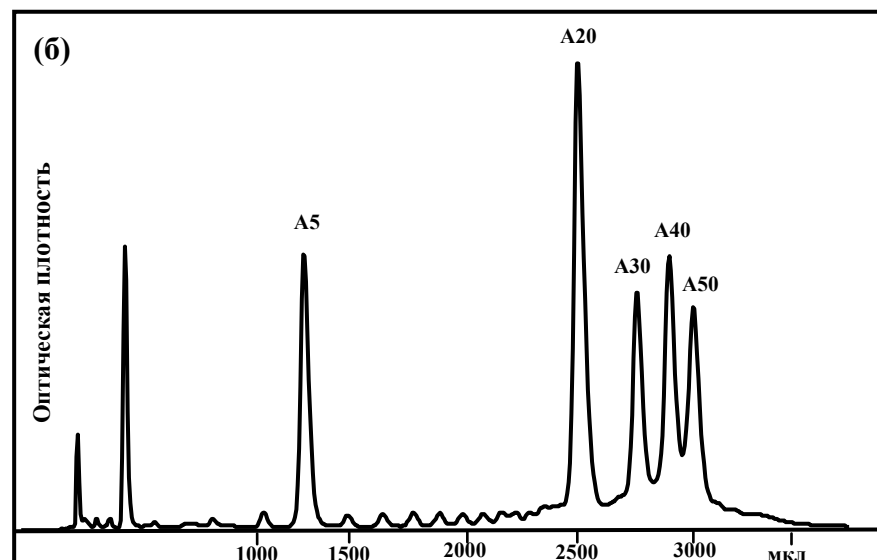
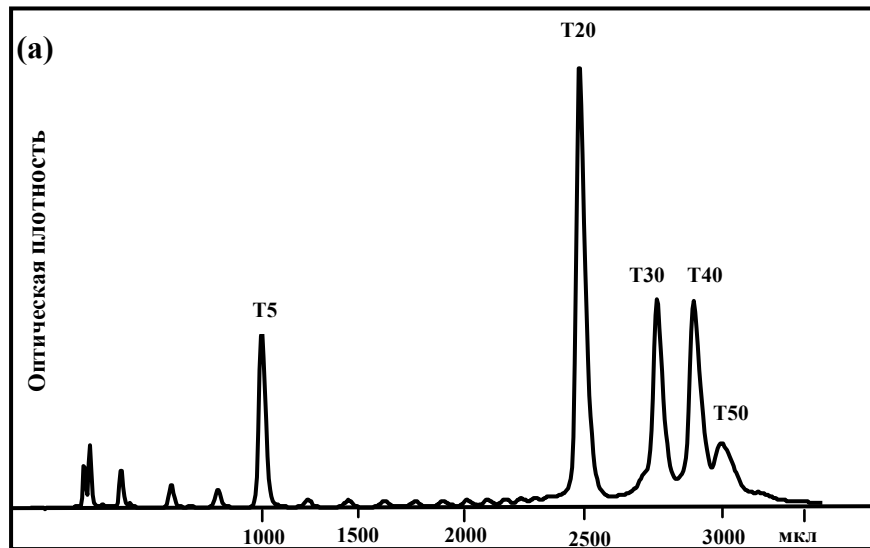


Рис. 13. Хроматограммы, полученные в оптимальных условиях:  
 (а) смесь Т5, Т20, Т30, Т40, Т50; (б) смесь А5, А20, А30, А40, А50.

Колонка Диасфер. Условия анализов: элюент А - 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5; элюент Б - (ацетонитрил : 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5)=1:4; скорость потока подвижной фазы 350 мкл/мин; градиент с 4 до 12% ацетонитрила (с 20 до 60% элюента Б) за 10 мин; температура колонки 60°C; объем пробы 5 мкл.

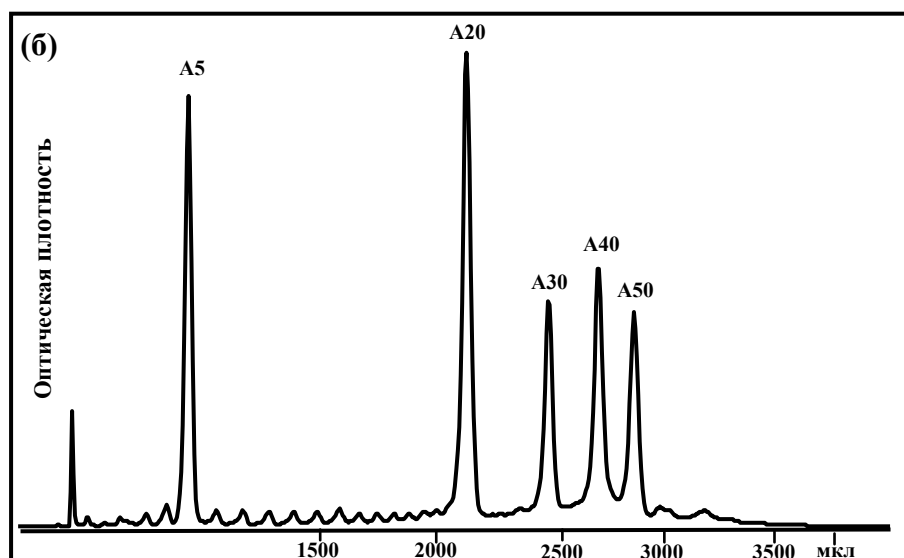
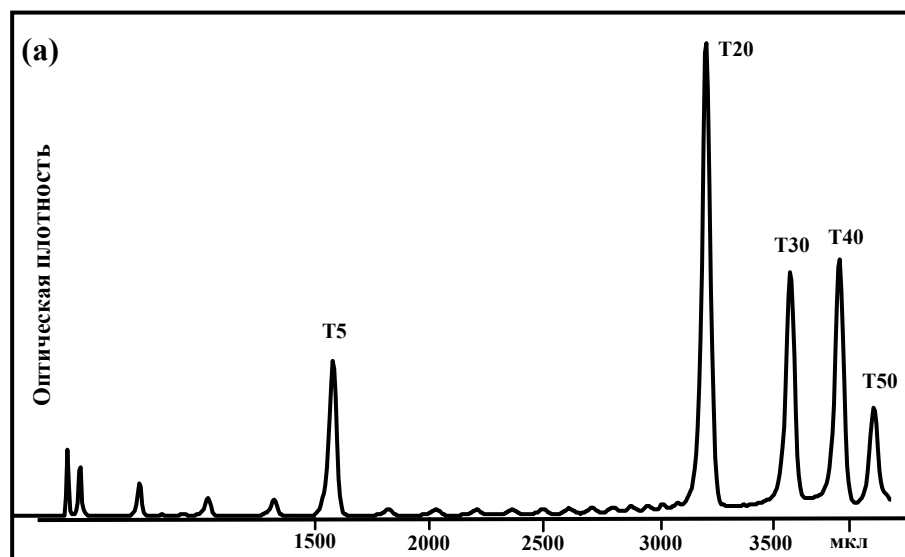


Рис. 14. Хроматограммы, полученные в оптимальных условиях:  
 (а) смесь Т5, Т20, Т30, Т40, Т50; (б) смесь А5, А20, А30, А40, А50.

Колонка ProntoSil. Условия анализов: элюент А - 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5; элюент Б - (ацетонитрил : 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5)=1:4; скорость потока подвижной фазы 350 мкл/мин; градиент с 4 до 12% ацетонитрила (с 20 до 60% элюента Б) за 10 мин; температура колонки 60°C; объем пробы 5 мкл.

#### 4.9. Изменение начальной концентрации ацетонитрила

В выбранных оптимальных условиях (градиент ацетонитрила и скорость потока подвижной фазы) можно увеличивать начальную концентрацию ацетонитрила в подвижной фазе для уменьшения времени анализа длинных олигонуклеотидов без потери разрешения. Это показано на рис. 15 для смеси олигонуклеотидов T5, T20, T30, T40, T50 на колонке NucleoSep.

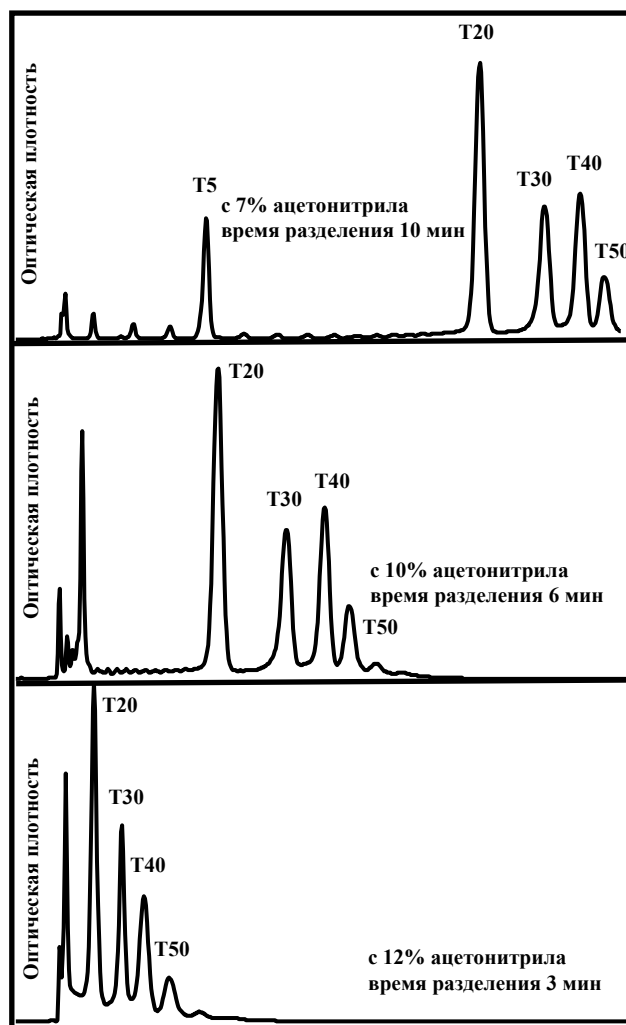


Рис. 15. Хроматограммы смеси олигонуклеотидов T5, T20, T30, T40, T50 при различных начальных концентрациях ацетонитрила в подвижной фазе.

Колонка NucleoSep. Условия анализов: элюент А - 0,1 М триэтиламмоний ацетат, pH 5,5; элюент Б - (ацетонитрил : 0,1 М триэтиламмоний ацетат, pH 5,5)=1:4; скорость потока подвижной фазы 300 мкл/мин; время градиента 10 мин, диапазон градиента 7% ацетонитрила, начальная концентрация ацетонитрила указана на рисунке; температура колонки 60°C; объем пробы 5 мкл.

Значения пиковой емкости для каждого сегмента хроматограммы при начальных концентрациях ацетонитрила, равных 7%, 10% и 12%, представлены в таблице 3.

Табл. 3. Значение пиковой емкости образца для смеси олигонуклеотидов T20, T30, T40 и T50 при различной начальной концентрации ацетонитрила в подвижной фазе.

Нач. конц. ацетонитрила	T20-T30	T30-T40	T40-T50	$\Sigma(T20-T50)$
7%	3,4	1,8	1,2	6,4
10%	3,6	2,0	1,3	6,9
12%	2,5	1,5	1,2	5,2

Из полученных данных следует, что время разделения уменьшилось в 3 раза с увеличением начальной концентрации ацетонитрила на 5%, при этом значения пиковой емкости почти не изменились. Небольшое уменьшение наблюдается только при начальной концентрации ацетонитрила 12% для коротких олигонуклеотидов.

#### 4.10. Предсказание удерживания олигонуклеотидов

В литературном обзоре описывалась модель, позволяющая предсказывать удерживание олигонуклеотидов по их брутто-составу (см. пункт 2.3). Предполагается, что каждый нуклеотид вносит свой вклад в удерживание олигонуклеотида. Определив коэффициенты в уравнении зависимости содержания ацетонитрила в подвижной фазе от длины гомоолигонуклеотида (выражение 3) для каждого из нуклеотидов, можно предсказывать удерживание гетероолигонуклеотидов.

В рамках нашей работы для колонки NucleoSep были найдены коэффициенты для нуклеотидов T, A, C и G. На рис. 16 показаны полученные зависимости концентрации ацетонитрила в подвижной фазе от числа нуклеотидов, входящих в состав олигонуклеотида.

Уравнения для кривых, показанных на рис. 16:

- для A:  $y_A = 1,58 \ln(n_\Sigma) + 5,80, r^2 = 0,9965;$

- для T:  $y_T = 1,99 \ln(n_\Sigma) + 5,72, r^2 = 0,9909;$

- для C:  $y_C = 1,16 \ln(n_\Sigma) + 5,33, r^2 = 0,9964;$

- для G:  $y_G = 1,16 \ln(n_\Sigma) + 5,93, r^2 = 1,000.$

Коэффициенты корреляции для последовательностей A, T, C близкие к единице показывают, что экспериментальная логарифмическая зависимость хорошо согласуется с теоретической (выражение 3).

Поскольку олигонуклеотиды чистой последовательности G плохо растворимы и неудобны в работе, то вклад для нуклеотида G был вычислен из сравнения времен выхода

олигонуклеотидов (CCC)<sub>7</sub> и (CCG)<sub>7</sub>, и далее кривая для нуклеотида G построена теоретически. Мы сравнили удерживание олигонуклеотидов одной длины: (CCC)<sub>7</sub> и (CCG)<sub>7</sub>. Разница в удерживании составила 0,20 % ацетонитрила. Исходя из этих данных выразили удерживание нуклеотида G через соответствующее выражение для C и получили коэффициенты выражения 3. При принятом допущении, что коэффициенты z при логарифме для нуклеотидов G и C равны [2], параметр w для нуклеотида G получился на 0,60 больше, чем для нуклеотида C.

Таким образом, в ходе настоящей работы были получены все коэффициенты, необходимые для предсказания удерживания олигонуклеотидов (выражение 3). В таблице 4 показано соответствие теоретических и экспериментальных данных для гетероолигонуклеотидов длиной от 10 до 50 звеньев (состав гетероолигонуклеотидов приведен в разделе 3.1). Максимальное расхождение между предсказанными и экспериментальными данными составило 0,3% ацетонитрила, что является очень хорошим показателем.

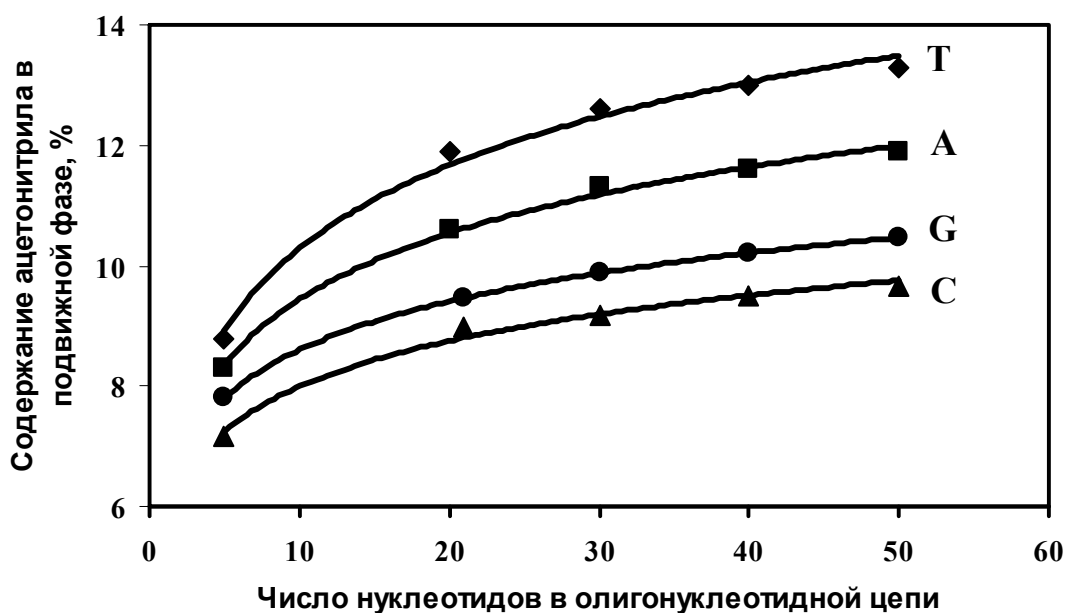


Рис. 16. Зависимость концентрации ацетонитрила в подвижной фазе от числа нуклеотидов, входящих в состав олигонуклеотида.

Колонка NucleoSep. Условия анализов: элюент А - 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5; элюент Б - (ацетонитрил : 0,1 М триэтиламмоний ацетат, рН 5,5)=1:4; скорость потока подвижной фазы 300 мкл/мин; градиент с 7 до 14% ацетонитрила (с 35 до 70% элюента Б) за 10 мин; температура колонки 60°C; объем пробы 5 мкл.

Табл. 4. Сравнение предсказанного и экспериментального % ацетонитрила в подвижной фазе для гетероолигонуклеотидов различной длины.

<b>Олигонуклеотид</b>	<b>% ацетонитрила теоретический</b>	<b>% ацетонитрила экспериментальный</b>	<b>Δ (% ацетонитрила)</b>
<b>10 mer</b>	9,3	9,0	0,3
<b>20 mer</b>	10,3	10,3	0,0
<b>22 mer</b>	10,0	9,9	0,1
<b>50 mer</b>	11,8	11,8	0,0

#### **4.11. Общая схема оптимизации условий ион-парной хроматографии олигонуклеотидов на обращенно-фазовых сорбентах**

Таким образом, на основании проведенных исследований может быть предложена следующая общая схема оптимизации условий разделения олигонуклеотидов на ОФ сорбентах:

1. Выбор состава подвижной фазы (ион-парного агента и органического модификатора).
2. Определение предельно допустимой нагрузки на сорбент (линейной емкости) и выбор диапазона рабочих концентраций растворов олигонуклеотидов.
3. Выбор оптимальной температуры анализа с учетом состава и длины определяемых олигонуклеотидов и устойчивости сорбента.
4. Определение диапазона концентраций органического модификатора в подвижной фазе исходя из состава смеси разделяемых олигонуклеотидов.
5. Выбор времени анализа.
6. Определение оптимальной комбинации градиента и скорости потока подвижной фазы.
7. Выбор начальной концентрации органического модификатора для сокращения времени анализа для длинных олигонуклеотидов..

## 5. ВЫВОДЫ

1. Проведено исследование факторов, влияющих на разделение олигонуклеотидов на обращенно-фазовых сорбентах.

2. Предложен алгоритм оптимизации условий разделения олигонуклеотидов на ОФ сорбентах.

3. Найдены оптимальные условия для хроматографии олигонуклеотидов длиной от 5 до 50 нуклеотидов за 10 мин на сорбентах NucleoSep 200-5, Диасфер 300-C10CN, ProntoSil C18AQ 120-5.

4. Получены коэффициенты для математической модели, позволяющей предсказывать удерживание олигонуклеотидов по их брутто-составу. Показана хорошая сходимость экспериментальных и теоретических данных.



## 6. ЛИТЕРАТУРА

1. Зенгер, В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот: пер. с англ. – М.: Мир, 1987. - 134 с.
2. Gilar, M., Fountain, K. J., Budman, Y. et al. Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of oligonucleotides: Retention prediction // *J. Chromatogr. A.* - 2002. - V. 958. - P. 167–182.
3. Lloyd, L., Millichip, M. I., Mapp, K. J. Rigid polymeric: the future of oligonucleotide analysis and purification // *J. Chromatogr. A.* - 2003. - V.1009. - P. 223–230.
4. Хеншен, А., Хупе, К.-П., Лотшпайх, Ф., Вельтер, В. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии: пер. с англ. – М.: Мир, 1988.
5. Birking, M. K. L., Henry, R. A. A global approach to HPLC column selection using reversed-phase and HILIC modes: what try when C18 doesn't work // *LCGC North America.* - 2010. - V. 28. - N. 3. - P. 234-244.
6. Valko, K., Espinosa, S., Du, C.M. et al. Unique selectivity of perfluorinated stationary phases with 2,2,2-trifluoroethanol as organic mobile phase modifier // *J. Chromatogr. A.* - 2001. - V. 933. - P. 73–81.
7. Yamamoto, F. M., Rokushika, S. Retention properties of the fluorinated bonded phase on liquid chromatography of aromatic hydrocarbons // *J. Chromatogr. A.* - 2000. - V. 898. - P. 141-151.
8. Kirkland, J. J. Development of some stationary phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* - 2004. - V. 1060. - P. 9-21.
9. Okusa, K., Tanaka H., Ohira, M. Development of a new cyano-bonded column for high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* - 2000. - V. 869. - P. 143-149.
10. Oberacher, H., Krajete, A., Parson, W., Huber, C. G. Preparation and evaluation of packed capillary columns for the separation of nucleic acids by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* - 2000. - V. 893. - P. 23–35.
11. Massi, J., Lloyd, L. Temperature as a tool to enhance mass transfer and improve resolution of oligonucleotides in ion-pair reversed phase HPLC // *Varian.* - USA, 2004.
12. Oefner, P. J., Huber, C. G. A decade of high-resolution liquid chromatography of nucleic acids on styrene–divinylbenzene copolymers // *J. Chromatogr. B.* - 2002. - V. 782. - P. 27–55.
13. Huck, C. W., Bakry, R., Bonn, G. K. Polystyrene/divinylbenzene based monolithic and encapsulated capillary columns for the analysis of nucleic acids by high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry // *Engineering in Life Sciences.* - 2005. - V. 5. - P. 431-435.

14. Holdsvendova, P., Suchankova, J., Buncek, M. et al. Hydroxymethyl methacrylate-based monolithic columns designed for separation of oligonucleotides in hydrophilic-interaction capillary liquid chromatography // *J. of Biochemical and Biophysical Methods*. - 2007. - V. 70. - P. 23-29.
15. Sykora, D., Svec, F., Frechet, J. M. J. Separation of oligonucleotides on novel monolithic columns with ion-exchange functional surfaces // *J. Chromatogr. A*. - 1999. - V. 852. - P. 297-304.
16. Ayano, E., Sakamoto, C., Kanazawa, H. et al. Separation of nucleotides with an aqueous mobile phase using pH- and temperature-responsive polymer modified packing materials // *Analytical Sciences*. - 2006. - V. 22. - P. 539-543.
17. Схунмакерс П. Оптимизация селективности в хроматографии: пер. с англ. - М.: Мир, 1989.
18. Ikuta, S., Chattopadhyaya, R., Dickerson, R.E. Reverse-phase polystyrene column for purification and analysis of DNA oligomers // *Anal. Chem.* - 1984. - V. 56. - P. 2253-2256.
19. Haupt, W., Pingoud, A. Comparison of several high-performance liquid chromatography techniques for the separation of oligodeoxynucleotides according to their chain lengths // *J. Chromatogr.* - 1983. - V. 260. - P. 419-427.
20. Huber, C.G., Krajete, A. Analysis of nucleic acids by capillary ion-pair reversed-phase HPLC coupled to negative-ion electrospray ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* - 1999. - V. 71. - P. 3730-3739.
21. Apffel, A., Chakel, J.A., Fischer, S. et al. Analysis of oligonucleotides by HPLC-electrospray ionization mass spectrometry // *Anal. Chem.* - 1997. - V. 69. - P. 1320-1325.
22. Huber, C. G., A. Krajete Sheath liquid effects in capillary high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of oligonucleotides // *J. Chromatogr. A*. - 2000. - V. 870. - P. 413-424.
23. Apffel, A., Chakel, J. A., Fischer, S., Lichtenwalter, K., Hancock, W. S. New procedure for the use of HPLC-ESI MC for analysis of nucleotides and oligonucleotides // *J. Chromatogr. A*. - 1997. - V. 777. - P. 3-21.
24. Apffel, A., Chakel, J. A., Fischer, S., Lichtenwalter, K., Hancock, W. S. Analysis of oligonucleotides by HPLC-ESI MC // *Anal. Chem.* - 1997. - V. 69. - P. 1320-1325.
25. Gilar, M., Bouvier, E. S. P. Purification of crude DNA oligonucleotides by solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. - 2000. - V. 890. - P. 167-177.
26. Djordjevic, N. M., Houdiere, F., Fowler, P., Natt, F. HPLC separation of oligonucleotides in isocratic and temperature-programming mode // *Anal. Chem.* - 1998. - V. 70. - P. 1921-1925.

27. Gilar, M., Neue, U. D. Peak capacity in gradient reversed-phase liquid chromatography of biopolymers. Theoretical and practical implications for the separation of oligonucleotides // *J. Chromatogr. A.* - 2007. - V. 1169. - P. 139–150.
28. Snyder, L. R. Maximum resolution per unit time in liquid-solid adsorption chromatography. Separation on column vs. thin layers // *Anal. Chem.* - 1967. - V. 39. - P. 705-709.
29. Caude, M., Jardy, A. Capacity // *Encyclopedia of Chromatogr.* - Markel Dekker, 2002.
30. Hu, W., Hasebe, K., Haddad, P. R. Temperature effects on retention in reversed-phase liquid chromatography of nucleosides and their bases using water as the mobile phase // *Anal. Communications.* - 1997. - V. 34. - P. 311–314.
31. Regnier, F. E., Geng, X. Retention model for proteins in reversed-phase liquid chromatography // *J. Chromatogr.* - 1984. - V. 296. - P. 15-30.
32. Sturm, M., Kohlbacher, O., Quinten, S., Huber, C. G. A machine learning approach for the prediction of DNA and peptide HPLC retention times (extended abstract). Germany, 2007.
33. Neue, U. D. Theory of peak capacity in gradient elution // *J. Chromatogr. A.* - 2005. - V. 1079. - P. 153-161.
34. Gilar, M., Daly, A.E., Kele, M. et al. Implications of column peak capacity on the separation of complex peptide mixtures in single- and two-dimensional high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* - 2004. - V. 1061. - P. 183-192.
35. Энгельгардт, X. Жидкостная хроматография при высоких давлениях: пер. с англ. - М.: Мир, 1980. - 179 с.
36. Neue, U. D. Peak capacity in unidimensional chromatography // *J. Chromatogr. A.* - 2008. - V. 1184. - P. 107-130.