

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

Кафедра аналитической химии

**ОПТИМИЗАЦИЯ ИОН-ПАРНОЙ ОБРАЩЁННО-ФАЗНОЙ ВЭЖХ
ОЛИГОДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕОТИДОВ
С МНОГОВОЛНОВОЙ ФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ**

Дипломная работа студентки 5 курса
Кононовой Алёны Васильевны

Научный руководитель:
д.х.н. Барам Григорий Иосифович

Лимнологический институт СО РАН
отдел хроматографии

Новосибирск-2004

СОДЕРЖАНИЕ

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	3
1. ВВЕДЕНИЕ.....	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
2.1. Олигонуклеотиды. Строение. Синтез.....	5
2.2. Хроматография олигонуклеотидов	
2.2.1. Ионообменная хроматография олигонуклеотидов.....	7
2.2.2. Обращённо-фазная ВЭЖХ.....	8
2.2.3. Ион-парная ОФ ВЭЖХ олигонуклеотидов.....	8
2.3. УФ-спектроскопия в ВЭЖХ олигонуклеотидов	
2.3.1. Методы детектирования в ВЭЖХ олигонуклеотидов.....	10
2.3.2. Анализ первичной структуры олигонуклеотидов.....	12
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	
3.1. Материалы.....	13
3.2. Оборудование.....	13
3.3. Методы	
3.3.1. Оценка погрешности приготовления растворов.....	14
3.3.2. Приготовление растворов.....	15
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	
4.1. Обычная и ион-парная ВЭЖХ олигонуклеотидов на обращенной фазе.....	16
4.2. Градиентная ион-парная ОФ ВЭЖХ олигонуклеотидов.....	19
4.3. УФ-спектроскопия олигонуклеотидов.....	24
4.3.1. УФ-спектры 2'-дезоксинуклеозидов.....	25
4.3.2. УФ-спектроскопия олигонуклеотидов.....	27
5. ВЫВОДЫ.....	32
6. ЛИТЕРАТУРА.....	33

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

Δ_{σ} – допускаяемая погрешность от содержания примесей в основном веществе, %

$\Delta_m^{эвеш.}$ – погрешность взвешивания

Δ_m – допускаяемая погрешность взвешивания, мг

$\Delta_{расч.}$ – погрешность расчёта спектральных отношений

$\Delta_{СО}$ – погрешность измерения отношения оптических плотностей

δ_C – погрешность приготовления растворов, %

δ_m – относительная погрешность определения массы вещества

δ_{ω} – относительная погрешность определения массовой доли основного вещества в препарате, %

$\delta_{разб.}$ – погрешность разбавления при приготовлении раствора

ε_{260} – коэффициент молярной экстинкции раствора вещества при $\lambda=260$ нм

λ – длина волны, нм

ω – массовая доля основного вещества в препарате, %

A_{260} – поглощение раствора вещества при $\lambda=260$ нм, е.о.п.

C18 – неподвижная фаза (сорбент) *n*-октадецилсиликагель

C_m – массовая концентрация, г/л

C_M – молярная концентрация, моль/л

d_p – диаметр частиц сорбента

F – объёмная скорость потока подвижной фазы

m – масса, г

M – молярная концентрация, моль/л

n – число оснований в олигонуклеотиде

R_S – коэффициент разрешения хроматографических пиков

$R_{Si/So}$ – спектральное отношение как отношение площадей хроматографических пиков вещества на хроматограммах при длинах волн λ_i и λ_0

$R_{Ai/Ao}$ – спектральное отношение как отношение оптических плотностей раствора вещества при длинах волн λ_i и λ_0

sr – относительное стандартное отклонение

S_{λ} – площадь хроматографического пика при длине волны детектирования λ

t – время, мин

T_R – время удерживания вещества в колонке, мин

V – объём, мл

V_R – объём удерживания вещества в колонке, мкл

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием в УФ-диапазоне длин волн

ДЭАЭ – диэтиламиноэтилцеллюлоза

ЖХ – жидкостная хроматография

ИП – ион-парная

конц. – концентрированный (-ая)

МС – масс-спектрометрия

НФ – неподвижная фаза

ОФ – обращенная фаза; обращенно-фазная

ПФ – подвижная фаза

ТЭА – триэтиламин

ТЭАА – триэтиламмоний ацетат

УФ – ультрафиолетовый

1. ВВЕДЕНИЕ

Синтетические олигонуклеотиды являются обширным классом соединений, которые находят широкое применение в генной инженерии и молекулярной биологии. Потребность в них постоянно растет, и это стимулирует химиков к постоянному совершенствованию методов синтеза. В последние 15 лет синтез, осуществляемый с помощью программируемых автоматических синтезаторов, на которых получают фрагменты с заданными длиной и последовательностью оснований, оптимизирован настолько, что олигонуклеотиды стали вполне дешёвыми и доступными. Благодаря применению твердофазного синтеза выход конденсации на каждой стадии достиг в среднем 98.5%. От этого показателя, определяющего эффективность присоединения мономера к полинуклеотидной цепи на каждой стадии синтеза, зависит чистота конечного продукта, которая тем хуже, чем длиннее олигонуклеотид.

Требуемая чистота олигонуклеотида определяется целями, для которых он предназначается. Решающее значение здесь может иметь и содержание основного вещества, и отсутствие примесей олигонуклеотидов-предшественников, и полнота удаления защитных групп, и отсутствие нежелательных модификаций оснований нуклеотидов. Все это вместе взятое требует разработки быстрых и надежных методов анализа олигонуклеотидов. Очевидно, что разработку этих методов необходимо вести с учетом того, что их внедрение не должно существенно увеличить стоимость конечного продукта и приоритет здесь, без сомнения, принадлежит тем методам, которые в состоянии обеспечить максимально полный анализ.

В этом смысле большими потенциальными возможностями обладает метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с многоволновым детектированием, который, обладая большой информативностью, может решить практически все аналитические задачи, касающиеся контроля качества олигонуклеотидов. Он относительно дешев, надежен, быстр и автоматизируем.

В связи с вышесказанным, разработка комплексной методики анализа олигонуклеотидов с помощью ВЭЖХ с многоволновым УФ-детектированием, которая бы позволила использовать весь объём получаемой хроматографической и спектральной информации, представляется нам актуальной задачей.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Олигонуклеотиды. Структура. Синтез

Олигонуклеотиды – это полимерные молекулы с числом мономерных звеньев от 2 до 100. Мономеры (нуклеотиды) представляют собой сложные органические молекулы, состоящие из остатка пентозы (рибозы или 2'-деоксирибозы), этерифицированного по одной из гидроксигрупп остатком фосфорной кислоты и связанного N-гликозидной связью с азотосодержащим гетероциклом. В зависимости от того, какой углевод входит в состав нуклеотида, различают рибонуклеотиды и дезоксирибонуклеотиды. Природные нуклеиновые кислоты (носители наследственной информации) разделяют на рибонуклеиновые кислоты (РНК), построенные из рибонуклеотидов, и дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК), построенные из дезоксирибонуклеотидов.

Мономерами олигодезоксинуклеотидов являются 4 нуклеозида, структурные формулы которых приведены на рис. 1.

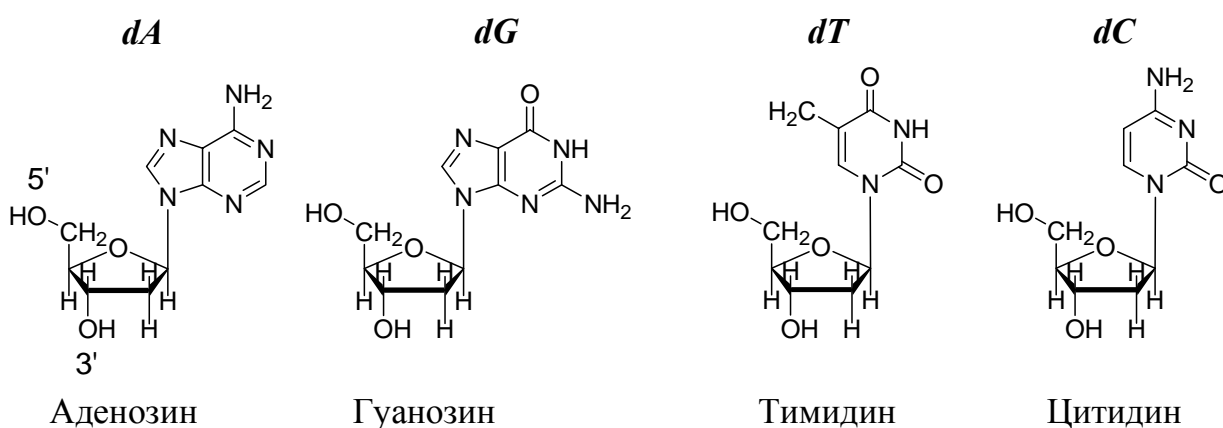


Рис. 1. Структурные формулы 2'-дезоксинуклеозидов.

В их состав входят гетероциклические группы (основания нуклеиновых кислот) аденин, гуанин, тимин, цитозин и 2'-деоксирибоза.

Нуклеотиды представляют собой нуклеозиды, этерифицированные фосфорной кислотой по одной из гидроксигрупп. Остаток фосфорной кислоты в нуклеотидах может находиться в положениях 5' и 3', а у рибонуклеотидов – в положении 2'. В названии нуклеотида всегда указывается место присоединения ортофосфата к остатку рибозы или дезоксирибозы, например: аденозин-5'-монофосфат [*p(dA)*] или аденозин-3'-монофосфат [*(dA)p*].

В молекуле олигонуклеотида нуклеозиды соединены между собой через остаток фосфорной кислоты, как показано на рис. 2.

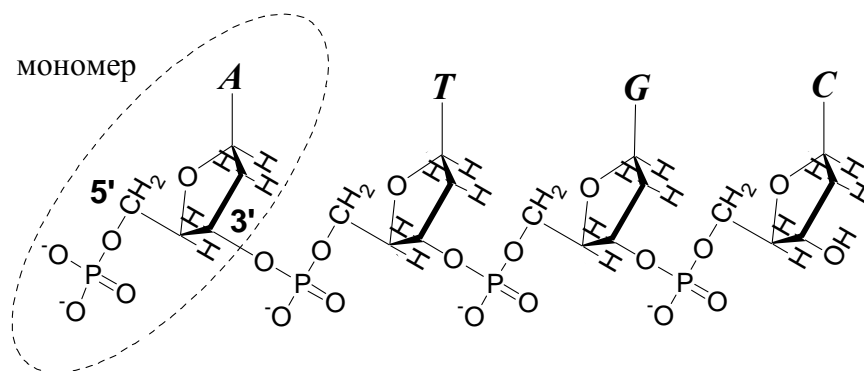


Рис. 2. Структурная формула дезоксиолигонуклеотида $dp(ATGC)$.

Наиболее распространенными методами химического синтеза олигонуклеотидов являются так называемые фосфитамидный (или амидофосфитный) и *H*-фосфонатный методы [1, 2]. Оба метода могут осуществляться в твердофазном варианте, что позволяет их автоматизировать. В качестве носителя используют силикагель или пористое стекло, обработанное таким образом, чтобы можно было иммобилизовать первый (3'-концевой) нуклеозид. В ходе синтеза последовательно наращивается длина олигонуклеотидной цепи соответствующим активированным мономером. В качестве мономеров используют синтоны, производные нуклеозидов, содержащие набор защитных групп и активированные остатки (в ряде случаев), делающие возможным их непосредственное участие в процессе синтеза.

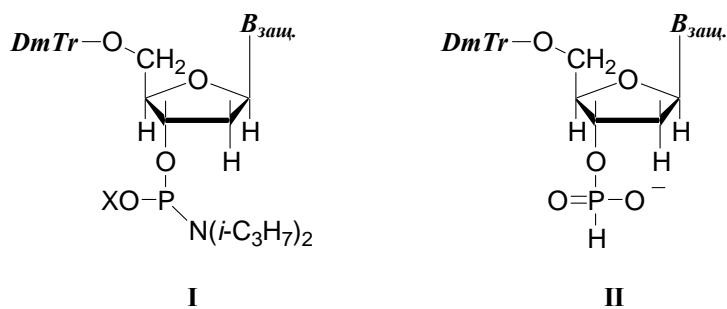


Рис. 3. Структура синтонов, используемых в **I** – фосфитамидном и **II** – *H*-фосфонатном методах синтеза олигонуклеотидов.

$DmTr$ – 5'-бис-(*n*-диметоксифенил)фенилметил (диметокситритил), $B_{защ.}$ – азотистое основание с защищенными аминогруппами, $X=CH_3$ или CH_2CH_2CN .

После каждой стадии конденсации в обоих методах остаток $DmTr$ удаляют с растущей полинуклеотидной цепи слабой кислотной обработкой, освобождая 5'-ОН-группу для следующей стадии роста цепи. В качестве защит для экзоциклических NH_2 -групп гетероциклов вводят бензоильные, изобутирильные, метильные, ацильные и цианэтильные остатки [1], а также тетрагидропиранильные [3] и алкилиденные группировки.

ровки [4], защищающие 2'-гидроксил (при синтезе рибоолигонуклеотидов). После синтеза олигонуклеотида все защиты количественно удаляют. Диметокситритильную группу, как правило, удаляют после очистки целевого продукта хроматографией [1].

В зависимости от цели использования, синтезированные олигонуклеотиды подвергают той или иной очистке, при которой удаляют из препарата защитные группировки, молекулы олигонуклеотидов с оставшимися защитами, более короткие олигонуклеотиды и олигонуклеотиды с модифицированными в результате побочных реакций основаниями.

2.2. Хроматография олигонуклеотидов

2.2.1. Ионообменная хроматография олигонуклеотидов

Методом ионообменной хроматографии разделяют вещества, имеющие заряд, и поэтому она находит применение для выделения синтетических олигонуклеотидов из реакционных смесей и их очистки [3, 5, 6].

Метод ионообменной хроматографии позволяет разделять олигонуклеотиды в зависимости от общего заряда молекулы, который определяется значением pH растворителя. В качестве подвижной фазы используют водные буферные растворы, позволяющие регулировать значение pH . До середины 70-х годов прошлого века для очистки олигонуклеотидов применяли адсорбенты-ионообменники, синтезированные на основе целлюлозы, декстрана, полиакриламида или полистирола [7]. В настоящее время эти "мягкие" ионообменники практически полностью вытеснены "жесткими" неподвижными фазами, позволяющими быстро хроматографировать вещества при давлении 10-20 МПа, т.е. в режиме высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

В тех случаях, когда очистку не удается полностью осуществить на каком-то одном ионообменнике, применяют рехроматографию на другом адсорбенте. Так в работе [8] методом ионообменной ВЭЖХ при анализе "сырого" продукта синтеза олигонуклеотида $d(C)_{30}$ на колонке с сорбентом Superformance 50-10 LiChrospher 4000 DMAE (5 мкм) не удалось разделить фрагменты длиной n и $n-1$. Условия элюции следующие: элюенты: **А**– 20 *mM* NaOAc (pH 6.5)-CH₃CN (4:1), **Б**– 20 *mM* NaOAc (pH 6.5)-CH₃CN (4:1)-1 *M* LiCl; линейный градиент 0-30%**Б**. Фрагменты длиной n и $n-1$ разделили на колонке с анионитом Mono Q HR 5/5 (линейный градиент концентрации NaCl в растворе NaOH с pH 11).

Подробный обзор свойств и областей применения ионообменников представлен в работе [9], где, в частности, проведено сравнение сорбентов на основе силикагеля и

"жестких" полимеров "поли(стиролдивинил-винилбензол), поли(этилвинил-дивинил-бензол)".

2.2.2. Обращённо-фазная ВЭЖХ

Самым распространенным вариантом ВЭЖХ органических соединений в последние 10-20 лет является обращённо-фазная (ОФ) хроматография, в которой разделение основано на различиях в гидрофобных свойствах молекул аналитов. Возможность использовать различные сорбенты с привитыми гидрофобными радикалами в сочетании с растворителями различной элюирующей силы позволяет изменять селективность хроматографической системы в очень широких пределах [10].

Для реализации высокой эффективности колонок и получения воспроизводимых результатов при анализе олигонуклеотидов методом ОФ ВЭЖХ необходимо использовать буферные растворы и контролировать тем самым значение pH в подвижной фазе. Обычно используют буферные растворы ацетата аммония, гидрофосфата калия и др. с pH в диапазоне 6-8. Ниже приведем несколько типичных примеров ОФ ВЭЖХ олигонуклеотидов:

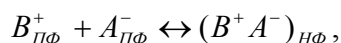
- [11] – разделение олигонуклеотидов на колонке 9.9x150 мм с NovaPack C18 (элюенты: **А**– 0.1 М NH₄OAc, pH 6.8, **Б**– CH₃CN:H₂O (1:1); градиентное элюирование от 0 до 10% **Б** за 10 мин;
- [12] – разделение проводили на колонке с LichroSpher RP-18 (элюенты: **А**– 0.1 М NH₄OAc, pH 7.1, **Б**– CH₃CN; градиентное элюирование от 0 до 20%**Б** за 25 мин;
- [3] – разделение на колонке 4.6x250 мм с Lichrosorb RP-18; градиент от 0 до 20% CH₃CN в 0.05 М LiClO₄);
- [13] – разделение на микроколонке 2x64 мм с Nucleosil C18 с подвижной фазой, содержащей высокие концентрации перхлората лития.

Следует отметить, что применение ОФ ВЭЖХ часто не позволяет решить многие аналитические задачи из-за низкой селективности, которая определяется только пуриновыми и пиримидиновыми основаниями. Фосфатные группы, несущие отрицательный заряд, при ОФ ЖХ "отталкиваясь" от гидрофобной поверхности неподвижной фазы, уменьшают удерживание олигонуклеотида и не вносят заметного вклада в селективность хроматографической системы. Для решения этой проблемы в большинстве случаев ОФ ВЭЖХ используют в варианте ион-парной хроматографии, добавляя в подвижную фазу в качестве динамических модификаторов гидрофобные амины.

2.2.3. Ион-парная ОФ ВЭЖХ олигонуклеотидов

Ион-парная (ИП) хроматография занимает промежуточное положение между ионообменной и обращенно-фазной ЖХ. Суть метода заключается в том, что при разделении соединений, в молекуле которых есть заряженные группы, в подвижную фазу добавляют гидрофобные ионы с противоположным зарядом, образующие ионные пары с молекулами аналита, увеличивая, тем самым, их гидрофобность и, как следствие, их удерживание. "Метод ион-парной хроматографии характеризуется универсальностью и обладает преимуществом по сравнению с классической ионообменной хроматографией, в котором активные центры фиксированы. Вследствие более быстрой массопередачи в ион-парной системе хроматографическое разделение более эффективно, чем на ионообменнике с фиксированными и активными зонами" [10, стр.74].

Упрощёно распределение вещества между подвижной и неподвижной фазами можно представить следующим образом:



где A^- – анион кислоты, который нужно экстрагировать; B^+ – протонированная форма основания, которое применяют для образования ионной пары. В ион-парной хроматографии нельзя предложить единый механизм удерживания молекул. В работе [14], в которой обсуждаются главные закономерности ИП ЖХ, много внимания уделено рассмотрению влияния на удерживание таких факторов, как природа и концентрация ион-парного агента, состав подвижной фазы, ионная сила, pH , температура колонки.

При разделении олигонуклеотидов методом ИП ОФ ВЭЖХ обычно используют в качестве элюентов водные растворы ацетонитрила с добавкой солей алкиламинов и слабых кислот (угольная, уксусная, муравьиная, ортофосфорная), которые одновременно обеспечивают режим ИП ЖХ и необходимую буферную емкость подвижной фазы при заданном значении pH . Выбор правильного типа ион-парного агента позволяет добиваться разделения фрагментов нуклеиновых кислот в соответствии с числом оснований (пар оснований). Так в работе [15] проведено разделение коротких гомоолигонуклеотидов (до 35 оснований) и показано, что введение гексафторизопропанола в буферный раствор триэтиламина (ТЭА) приводит к уменьшению влияния гидрофобности азотистых оснований. При разделении двуцепочных ДНК (50-2000 пар оснований) [16] (колонки 4.6x50 и 7.8x50 мм DNASep C18; элюенты: **А**– 0.1 М ТЭАА (pH 7.0), **Б**– смесь элюента 75%**А** и 25% CH_3CN ; градиент сложной формы) и одноцепочных РНК (200-2000 оснований) [17] (условия те же; элюенты: **А**– 0.1 М ТЭАА - 0.1 М ЭДТА (pH 7.0), **Б**– смесь элюента 75%**А** и 25% CH_3CN) порядок элюирования фрагментов определяется только их длиной, т.е. числом фосфатов. Как показано в работе [18] на разделение

коротких олиготимидилатов (12 и 13 оснований) влияет природа аниона, тогда как на разделение более длинных фрагментов (29 и 30 оснований) тип аниона особого влияния не оказывает.

Значения pH применяемых элюентов находятся в диапазоне от 6 до 11. В работе [18] показано, что при значениях $pH > 8.5$ из-за начинающейся ионизации азотистых оснований удерживание олигонуклеотидов и степень их разрешения уменьшаются.

В градиентной ВЭЖХ, в зависимости от аналитической задачи, необходимо выбрать правильный профиль градиента подвижной фазы. Это вопрос обсуждается в работах [16, 17].

На разрешающую способность колонок в ОФ ВЭЖХ значительное влияние оказывает скорость массопереноса олигонуклеотидов и двухцепочечных молекул ДНК в неподвижную фазу. Наиболее предпочтительны для ВЭЖХ олигонуклеотидов сорбенты с привитой фазой C_{18} . Хорошее разделение ДНК-олигонуклеотидов было достигнуто на непористых сорбентах с малым диаметром зёрен (XTerra MS C_{18} 2.5 μm , 4.6x75) [15, 19] и на пористых сорбентах с большим размером пор. В качестве непористых сорбентов применяют также сорбенты на основе алкилированных сополимеров стирола и дивинилбензола [16, 17, 20].

Для увеличения скорости диффузии молекул олигонуклеотидов элюцию проводят при температурах 45-70°C, однако следует учитывать возможность денатурации двухцепочечных фрагментов нуклеиновых кислот при температурах $> 50^\circ C$.

В работе [21] показано, что увеличение температуры колонки от 70 до 80°C уменьшает время анализа почти в 2 раза при разделении гомоадениловых олигонуклеотидов с длиной 12-18 оснований в изократическом режиме (колонка с сорбентом ODS-AQ (120Å, 3 мкм); элюенты **A**– 10 мМ ТЭАА и **B**– 10 мМ ТЭАА- CH_3CN (1:1); состав подвижной фазы: 86%**A**+14%**B**). Там же предложен метод скоростного термопрограммируемого изократического разделения гомоадениловых олигонуклеотидов с длиной 25-30 и 40-60 оснований.

2.3. УФ-спектроскопия в ВЭЖХ олигонуклеотидов

2.3.1. Методы детектирования в ВЭЖХ олигонуклеотидов

Нуклеиновые кислоты и их компоненты обладают выраженными электронными спектрами в УФ-области с максимумами поглощения вблизи $\lambda = 260$ нм, которые обусловлены поглощением хромофорных групп – азотистых оснований. Известно, что для этих веществ характерно явление гиперхромизма, то есть увеличение оптической плот-

ности при деградации полинуклеотидов до мономеров, а также при разупорядочивании вторичной структуры (денатурации). Наряду с гиперхромизмом используют понятие гипохромизма, то есть уменьшение оптической плотности полимера по сравнению с эквимольярной смесью входящих в его состав нуклеотидов. Влияние на спектры нуклеиновых кислот температуры, природы растворителя, ионной силы раствора, значения *pH* подробно описано в работе [22].

Таблица 1. Основные спектральные свойства дезоксирибонуклеозидов.

<i>dN</i>	Растворит.	ϵ	A_{250}/A_{260}	A_{280}/A_{260}	λ_{\max} , нм	Лит.
<i>dA</i>	<i>pH</i> 2	$\epsilon_{260}=14500$	0.83	0.24	258	[23]
	<i>pH</i> 7	15200	0.79	0.15	260	
	<i>pH</i> 12	14900	-	-	261	
	<i>pH</i> 1	$\epsilon_{\max}=14454$	-	-	256	[24]
H ₂ O	14791	-	-	260		
<i>pH</i> 13	14791	-	-	260	[25]	
MeOH	$\epsilon_{\max}=15100$	$0.88\pm 0.01^*$	$0.23\pm 0.01^*$	257.5		
<i>dT</i>	<i>pH</i> 1	$\epsilon_{260}=8800$	0.65	0.70	267	[23]
	<i>pH</i> 7	8800	0.65	0.70	267	
	<i>pH</i> 12	6650	0.74	0.65	267	
	<i>pH</i> 9.5	$\epsilon_{\max}=9120$	-	-	267	[26]
	<i>pH</i> 1.0-7.2	9550	-	-	207, 267	
	<i>pH</i> 10	8318	-	-	267	
<i>pH</i> 1	7943	-	-	265	[27]	
MeOH	$\epsilon_{\max}=9780$	0.66 ± 0.01	1.03 ± 0.01	265	[28]	
<i>dC</i>	<i>pH</i> 1	$\epsilon_{260}=6200$	0.42	2.15	280	[23]
	<i>pH</i> 7	7400	0.83	0.97	271	
	<i>pH</i> 11	7400	0.83	0.97	271	
	MeOH	$\epsilon_{\max}=12100$	0.61 ± 0.02	2.16 ± 0.01	281	[29]
<i>dG</i>	<i>pH</i> 1	11300	1.00	0.69	255	[23]
	H ₂ O	11800	1.16	0.68	253	
	<i>pH</i> 12	-	0.87	0.61	260	
	<i>pH</i> 7	$\epsilon_{\max}=12589, 10000$	-	-	248, 265	[30]
<i>pH</i> 12	12589	-	-	265		

*) Спектральные значения рассчитывали по спектрам из литературного источника.

Наличие у нуклеиновых кислот характерных спектров позволяет использовать при анализе олигонуклеотидов методом ВЭЖХ фотометрическое детектирование в УФ-диапазоне. Для олигонуклеотидов впервые сочетание жидкостной хроматографии с многоволновым детектированием было реализовано Грачёвым М.А в начале 70-х годов прошлого века [7]. УФ-фотометры и УФ-спектрофотометры являются в этой области анализа наиболее распространенными детекторами. Из других отметим появившиеся 6-8 лет назад масс-спектрометры с ионизацией в аэрозоле (*electro-spray ionization mass-spectrometry*) [18, 20, 31], которые могут обладать рекордной чувствительностью [32]. Конечно, МС-детекторы для рутинных анализов пока слишком дороги.

Основные достоинства фотометрических детекторов известны. Они нечувствительны к флуктуациям температуры, скорости потока элюента и изменению состава растворителя, просты в использовании, не требуют высокой квалификации оператора и достаточно дешёвы, что важно при выполнении рутинных анализов.

Особый интерес для детектирования нуклеотидов имеют спектрофотометрические детекторы, которые позволяют в процессе анализа получать спектральную информацию, которая дает возможность идентифицировать пики на хроматограмме и оценить чистоту вещества в элюате. К таким детекторам относятся диодно-матричные спектрофотометры [33, 34 35] и фотометры с быстрым переключением длин волн монохроматора. Детекторы второго типа известны уже почти 35 лет [36]. входят в состав всех хроматографов серии "Милихром" [37-39].

2.3.2. Анализ первичной структуры олигонуклеотидов

Традиционно в биохимии анализ последовательности нуклеиновых кислот проводят классическими методами Максама-Гилберта и Сенгера с использованием гелеэлектрофореза, но для анализа структуры (подтверждения нуклеотидного состава) синтетических олигонуклеотидов они слишком дороги, длительны и трудоёмки.

Известны другие методы, основанные на одновременном качественном и количественном определении мономеров, полученных в результате полного гидролиза олигонуклеотидов фосфодиэстеразой змеиного яда при разделении гидролизата с помощью ВЭЖХ-УФ на анионообменной колонке [40] и колонке с ОФ С5 [41]. Предложенный в работе [42] дифференциальный спектральный метод установления первичной структуры олигонуклеотидов основан на разделении продуктов неполного гидролиза фосфодиэстеразой в соответствие с длиной фрагментов и определения ($n+1$)-го нуклеотида по спектральным характеристикам n и $n+1$ олигомера. В работе [7] на примере анализа пиримидил-рибонуклеазного гидролизата валиновой т-РНК₁ показана возможность применения метода микроспектрофотометрии в сочетании с микроколоночной ионообменной хроматографией. Идентификацию выделенных из гидролизата фрагментов проводили путём сопоставления удерживания олигонуклеотидов с ожидаемым, а также сравнением спектральных отношений измеренных при хроматографировании с рассчитанными.

Описана методика определения последовательности коротких дезоксиолигонуклеотидов, основанная на анализе методом времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной десорбционной ионизацией (*matrix-assisted laser desorption ionization time-of-*

flight mass spectrometry) продуктов эндонуклеазной обработки образца, выделенных ион-парной ОФ ВЭЖХ [43].

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Материалы

Ацетонитрил "Для ВЭЖХ, сорт 1", $A_{260}=0.02$ е.о.п. ("Криохром", С.-Петербург); метанол "чда", перегнанный; вода бидистиллированная; триметиламина гидрохлорид $N[Me]_3 \cdot HCl$ "ч"; триэтиламин $N[Et]_3$ перегнанный; *трет*-бутиламин $NH_2[t-But]$ (Fluka, Швейцария); тетраметиламмония хлорид $N[Me]_4Cl$ "ч", 3%-й раствор; тетраэтиламмония гидроокись $N[Et]_4OH$ "ч", 30%-й раствор; тетрабутиламмония сульфат декагидрат $[N(But)_4]_2SO_4 \cdot 10 H_2O$ "ч"; цетилтриметиламмоний бромид $N(Me)_3(C_{16}H_{33})Br$ "ч" (Chemapol, ЧССР; уксусная кислота $HOAc$ "хч" ледяная ("Лаверна", Москва); аммония гидроокись "чда"; ацетат натрия "чда".

2'-дезоксинуклеозиды фирмы Yamasa Shoyu Co.Ltd. (Япония): 2'-дезоксиденозин dA (Code N.7037); 2'-дезокситимидин dT (Code N.7082), 2'-дезоксцитидина dC гидрохлорид (Code N.3111); 2'-дезоксигуанозин dG (Code N.7132).

Водные растворы олигонуклеотидов: $d(A)_3$ ($A_{260}=38$ е.о.п.), $d(A)_5$ ($A_{260}=71$ е.о.п.), $d(A)_6$ ($A_{260}=41.8$ е.о.п.), $d(A)_{10}$ ($A_{260}=79.8$ е.о.п.), $d(T)_5$ ($A_{260}=59$ е.о.п.), $d(T)_7$ ($A_{260}=48$ е.о.п.), $d(T)_8$ ($A_{260}=133$ е.о.п.), $d(T)_{10}$ ($A_{260}=69$ е.о.п.), $d(CATGG)$ ($A_{260}=95$ е.о.п.), $d(CTTCA)$ ($A_{260}=114$ е.о.п.), $dp(TCTCT)$ ($A_{260}=40$ е.о.п.), $dp(ACAT)$ ($A_{260}=40$ е.о.п.), $dp(CAGC)$ ($A_{260}=40$ е.о.п.), $d(ATGG)$ ($A_{260}=105$ е.о.п.), $d(AGGC)$ ($A_{260}=114$ е.о.п.) – были любезно предоставлены лабораторией медицинской химии Новосибирского института химической биологии и фундаментальной медицины (НИХБФМ СО РАН). Все они были синтезированы на автоматическом синтезаторе ASM-800 ("БИОССЕТ", Новосибирск) по стандартному амидофосфитному методу и очищены обращено-фазной ВЭЖХ.

3.2. Оборудование

Хроматограф жидкостной микроколоночный "Милихром А-02" (ЗАО "ЭкоНова", Новосибирск); весы аналитические электронные "Adventurer" и весы технические электронные "Scout II" фирмы "Ohaus Europe" (Швейцария); pH -метр "Анион-4100" (НПП "Инфраспек-Аналит", Новосибирск), допускаемая погрешность при измерении $pH \pm 0.03$; магнитная мешалка "ПЭ-6110" (АО "Экрос", С.-Петербург); микроцентрифуга "MiniSpin" (Eppendorf, Германия); пипетки переменного объема со сменными наконечниками "Ленпипет Колор" (100 мкл $\pm 1.5\%$, 1000 мкл $\pm 1.0\%$); пипетки со сменными наконечниками (20 мкл $\pm 2.0\%$, 200 мкл $\pm 1.5\%$) (ЗАО "ТермоЛабсистемс", С.-Петербург); колбы мерные (50 мл $\pm 0.1\%$, 100 мл $\pm 0.1\%$), мерный цилиндр (50 ± 0.5 мл); фильтр "MILLIPORE 0.22 μm Filter Unit" (Millipore Corp., США).

3.3. Методы

3.3.1. Оценка погрешности приготовления растворов

При приготовлении растворов массовую (C_m) и молярную (C_M) концентрации вещества определяли соответственно по формулам:

$$C_m = \varpi \cdot m/V, \quad C_M = \varpi \cdot m/V \cdot Mr,$$

где ϖ - массовая доля основного вещества в препарате; m - масса препарата (г), V - объем раствора (мл), Mr - молярная масса вещества.

Погрешность приготовления контрольного раствора определяется погрешностью, обусловленной наличием примесей в препарате, погрешностью взвешивания, погрешностью используемой мерной посуды. Предел допускаемой погрешности аналитических весов Adventurer составляет 0.75 мг. Относительную погрешность определения массы вещества δ_m определяли по формуле:

$$\delta_m = \pm \cdot \Delta_m / m,$$

где Δ_m - допускаемая погрешность взвешивания (мг).

Допускаемая погрешность взвешивания для двух измерений $\Delta_m^{взвеш.}$ (пустого стаканчика и стаканчика с навеской):

$$\Delta_m^{взвеш.} = \sqrt{\Delta_m^2 + \Delta_m^2},$$

Относительная погрешность используемой мерной посуды δ_V :

$$\delta_V = \pm \cdot \Delta_V / V,$$

где Δ_V - допускаемая погрешность от номинальной вместимости мерной посуды (мл), V - объем используемого раствора (мл).

Относительная погрешность определения массовой доли основного вещества δ_ϖ в препарате:

$$\delta_\varpi = \pm \cdot \Delta_\varpi / \varpi,$$

где Δ_ϖ - допускаемая погрешность от содержания примесей в основном веществе (%).

Погрешность приготовления растворов δ_C (%):

$$\delta_C = \pm 100 \cdot \sqrt{\delta_m^2 + \delta_V^2 + \delta_\varpi^2}$$

3.3.2. Приготовление растворов

1 M NaOAc-HOAc, pH 5.5. 8.2 г ацетата натрия растворяли в 50 мл воды, в раствор добавляли концентрированную уксусную кислоту до *pH* 5.5 и объем раствора доводили до 100 мл.

1 M N(Et)₃-HOAc, pH 5.5. 10.1 г триэтиламина растворяли в 50 мл подкисленной воды, в раствор добавляли эквимольное количество концентрированной уксусной кислоты и доводили разбавленной кислотой *pH* до 5.5, объем раствора доводили водой до 100 мл.

0.01 M N(Et)₄OH-HOAc, pH 5.5. К 0.4922 г 30% раствора тетраэтиламина гидроксида добавляли эквимольное количество концентрированной уксусной кислоты, 50 мл раствора NaOAc (навеска 8.2 мг), доводили разбавленной уксусной кислотой *pH* до 5.5, объем раствора доводили водой до 100 мл.

1 M N(Me)₃-HOAc, pH 5.5. 9.6 г триметиламина гидрохлорида растворяли в 50 мл воды, в раствор добавляли конц. раствор аммиака до *pH* 5.5, объем раствора доводили до 100 мл.

1 M NH₂(*t*-But)-HOAc, pH 5.5. 7.31 г третбутиламина растворяли в 50 мл подкисленной воды, в раствор добавляли эквимольное количество концентрированной уксусной кислоты и доводили разбавленной кислотой *pH* до 5.51, объем раствора доводили водой до 100 мл.

0.1 M [N(But)₄]₂SO₄-HOAc, pH 5.5. 7.3 г тетрабутиламмония сульфата растворяли в 50 мл буферного раствора NH₄OAc, доводили разбавленной уксусной кислотой *pH* до 5.5, объем раствора доводили водой до 100 мл.

0.01 M [N(Me)₃(C₁₆H₃₃)]Br-HOAc, pH 5.5. 0.3642 г цетилтриметиламмония бромида растворяли в 50 мл раствора NaOAc (навеска 8.1 мг, 82.0340 г/моль), доводили разбавленной уксусной кислотой *pH* до 5.5, объем раствора доводили водой до 100 мл.

Растворы фильтровали через фильтр "MILLIPORE 0.22 μ m Filter Unit" (Millipore Corp., США).

Раствор dA (1.1 мг/мл). 5.4 мг 2'-дезоксиаденозина растворяли в 5 мл воды.

Раствор dG (0.9 мг/мл). 4.5 мг 2'-дезоксигуанозина растворяли в 5 мл воды.

Раствор dT (0.9 мг/мл). 4.7 мг 2'-дезокситимидина растворяли в 5 мл воды.

Раствор dC (1.0 мг/мл). 5.0 мг 2'-дезоксцитидин гидрохлорида растворяли в 5 мл воды.

Элюенты и пробы необходимой концентрации готовили разбавлением соответствующих концентрированных растворов.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Обычная и ион-парная ВЭЖХ олигонуклеотидов на обращенной фазе

Среди многих вариантов жидкостной хроматографии обращенно-фазная (ОФ) ВЭЖХ является в настоящее время наиболее распространенным. Это вызвано, главным образом, тем, что в ОФ ВЭЖХ селективность разделения можно изменять в широких пределах путем изменения состава подвижной фазы. Отсюда следует, что изучение влияния состава подвижной фазы на хроматографическое поведение аналитов – важнейшая задача, которую аналитик должен решать при разработке методики анализа для каждого класса веществ.

В основе ОФ ЖХ лежит распределение молекул вещества между неполярной неподвижной и полярной подвижной фазами. Полярные вещества удерживаются слабее неполярных или "гидрофобных". Если говорить об олигонуклеотидах, то следует отметить, что в своей структуре они содержат одновременно как гидрофильные группы (отрицательно заряженные концевые и межнуклеотидные фосфаты, а также остатки дезоксирибозы), так и гидрофобные - пуриновые и пиримидиновые основания. Из общих соображений можно заключить, что удерживание олигонуклеотидов будет определяться набором их оснований, а фосфаты и дезоксирибозильные остатки будут препятствовать удерживанию.

Для того, чтобы изучить влияние состава подвижной фазы на хроматографическое поведение олигонуклеотидов в ОФ ВЭЖХ и выбрать наиболее подходящие условия анализа, мы хроматографировали олигонуклеотиды $d(A)_{5,10}$ и $d(T)_{5,10}$, а также соответствующие нуклеозиды в различных подвижных фазах. Хроматограммы олигоаденилатов и олиготимидилатов на рис. 4. Полученные результаты позволяют заключить следующее:

1. Из хроматограмм **I**, **II** и **III** следует, для того, чтобы $d(A)_{10}$ и $d(T)_{10}$ хроматографировались в виде узких симметричных пиков, подвижная фаза должна обладать фиксированным значением pH и достаточной буферной емкостью, что достигается введением в ее состав ацетата натрия с pH 5.5 (концентрация 0.01 M).
2. Из хроматограмм **III** и **IV** следует, что при снижении скорости возрастания концентрации ацетонитрила разрешение пента- и декаолигонуклеотидов улучшается.
3. Из хроматограмм **III** и **V** следует, что добавление в подвижную фазу гидрофобного триметиламмония практически не изменяет удерживание олигонуклеотидов, хотя тип хроматографирования изменился с обычного обращенно-фазового на ион-парный.

4. Из хроматограмм V и VI следует, что замена в подвижной фазе ацетонитрила на метанол приводит к значительному увеличению удерживания веществ.

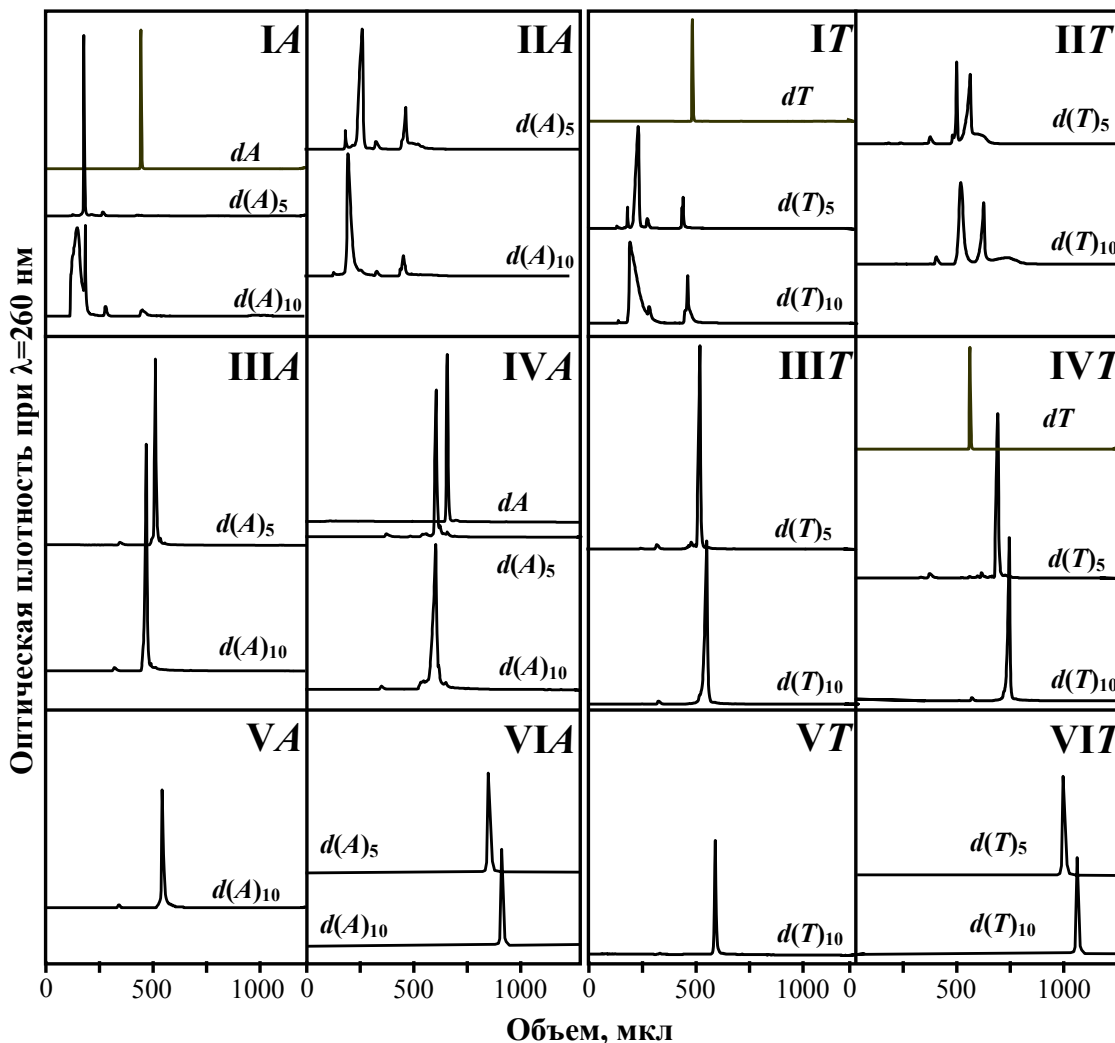


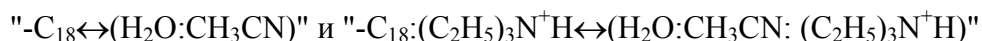
Рис. 4. Влияние состава подвижной фазы на хроматографическое поведение дезоксиолигонуклеотидов.

Колонка 2x75 мм с ProntoSIL-120-5-C18 AQ. Скорость потока 100 мкл/мин. Температура колонки 40°C; объём пробы 5 мкл; линейный градиент от 5 до 100%Б за 15 мин. Состав элюентов для каждого эксперимента приведен в таблице:

№№	Элюент А	Элюент Б
I	H ₂ O	CH ₃ CN
II	H ₂ O	CH ₃ CN:H ₂ O (1:1)
III	[1 M NaOAc-HOAc, pH 5.5]:H ₂ O (1:99)	CH ₃ CN:H ₂ O (1:1)
IV	[1 M NaOAc-HOAc, pH 5.5]:H ₂ O (1:99)	CH ₃ CN:H ₂ O (3:7)
V	[1 M N(Et) ₃ -HOAc, pH 5.5]:H ₂ O (1:99)	CH ₃ CN:H ₂ O (1:1)
VI	[1 M N(Et) ₃ -HOAc, pH 5.5]:H ₂ O (1:99)	MeOH:H ₂ O (1:1)

Выводы 1, 2 и 4 хорошо согласуются с современными представлениями о ОФ ВЭЖХ [44] и в комментариях не нуждаются, тогда как вывод 3 требует объяснения. В

данном случае совпадение объемов удерживания олигонуклеотидов в режимах обычной и ион-парной ЖХ (см. схему на рис. 5) связано, очевидно, с простым совпадением коэффициентов распределения олигонуклеотидов в системах:



Как нами было показано позже, при замене триэтиламмония на более гидрофобный агент – тетрабутиламмоний – удерживание олигонуклеотидов значительно возросло (рис. 6).

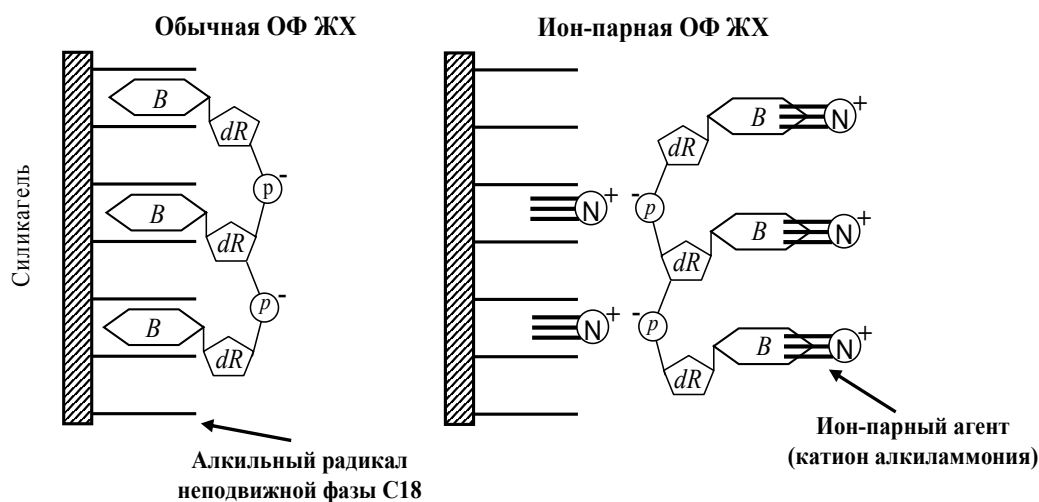


Рис. 5. Схема удерживания олигонуклеотидов в обычной и ион-парной ОФ ЖХ. *dR*- остаток дезоксирибозы, *B* – основание нуклеозида, *p* – остаток фосфорной кислоты.

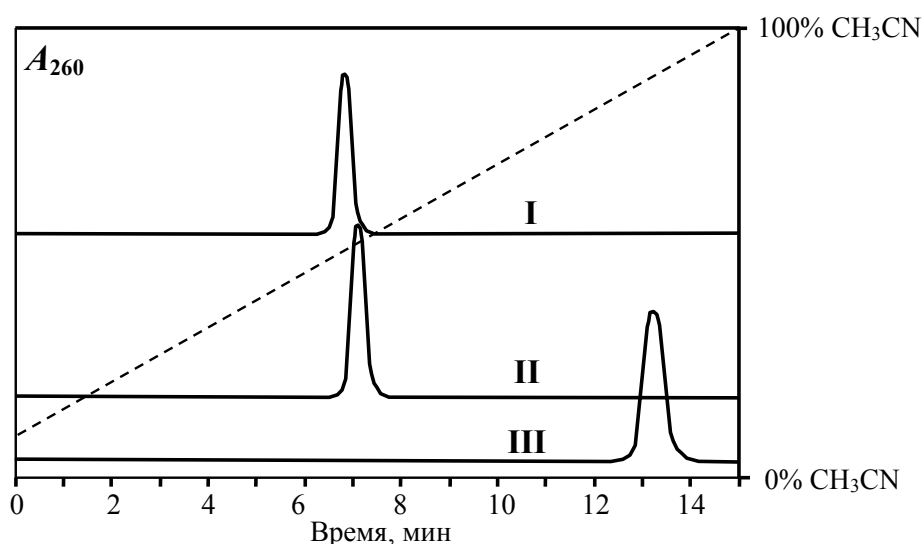


Рис. 6. Хроматограммы олигонуклеотида $d(T)_{10}$ в разных подвижных фазах.

Колонка 2x75 мм с ProntoSIL-120-5-C18 AQ. Скорость потока 100 мкл/мин. Температура 40°C. Линейный градиент от 5 до 100%**Б** за 15 мин. Элюент **Б**- CH₃CN:H₂O (1:1).

Элюенты **А**: I- [1 M NaOAc-HOAc, pH 5.5]:H₂O (1:99)

II- [1 M N(Et)₃-HOAc, pH 5.5]:H₂O (1:99)

III- [0.1 M [N(But)₄]₂SO₄-HOAc, pH 5.5]:H₂O (1:9).

Применение еще более гидрофобных ион-парных агентов (например, цетилтри-метиламмония) для хроматографирования олигонуклеотидов на фазе C18 уже нецелесообразно, т.к. удерживание анализов становится слишком сильным. Оптимальным агентом, с нашей точки зрения, является ион тетрабутиламмония (см. рис. 7).

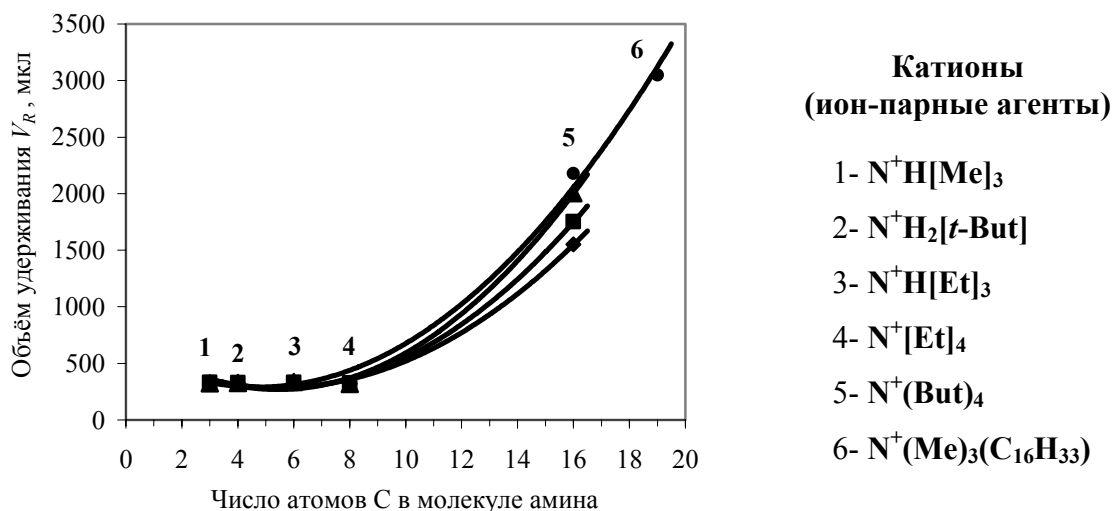


Рис. 7. Зависимость удерживания олигонуклеотидов от гидрофобности (от числа атомов C) в молекуле ион-парного агента.

Олигонуклеотиды: ●- $d(A)_5$, ▲- $d(T)_5$, ■- $d(A)_{10}$, ◆- $d(T)_{10}$.

Колонка 2x75 мм с ProntoSIL-120-5-C18 AQ. Линейный градиент от 5 до 100%Б за 30 мин. Скорость потока 100 мкл/мин. Температура 40°C; Объем пробы 5 мкл.

Элюент Б- CH_3CN . Элюенты А:

- 1- [1 M $N(Me)_3$ -HOAc, pH 5.5]: H_2O (1:99)
- 2- [1 M $NH_2(t-But)$ -HOAc, pH 5.5]: H_2O (1:99)
- 3- [1 M $N(Et)_3$ -HOAc, pH 5.5]: H_2O (1:99)
- 4- [0.01 M $N(Et)_4$ OH-HOAc, pH 5.5]
- 5- [0.1 M $[N(But)_4]_2SO_4$ -HOAc, pH 5.5]: H_2O (1:9)
- 6- [0.01 M $[N(Me)_3(C_{16}H_{33})]Br$ -HOAc, pH 5.5].

4.2. Градиентная ион-парная ОФ ВЭЖХ олигонуклеотидов

Короткие и длинные олигонуклеотиды имеют существенные различия в средстве к сорбенту – удерживание веществ в данном случае возрастает с ростом длины молекулы. Для того, чтобы в одних и тех же условиях можно было хроматографировать и короткие, и длинные олигомеры, в ходе разделения необходимо увеличивать элюирующую силу подвижной фазы. Такой способ в хроматографии называется градиентным элюированием и для анализа олигонуклеотидов методом ионообменной и ОФ ЖХ применяется часто, однако возможность его использования в ион-парной ОФ ВЭЖХ весьма спорна. Это связано с тем, что при изменении состава элюента происходит адекватный сдвиг равновесия "ион-парный агент ↔ неподвижная фаза" и в каждом эксперименте перед вводом пробы в колонку необходимо восстанавливать первоначальное

состояние хроматографической системы. В противном случае получить приемлемую воспроизводимость времен удерживания аналитов от эксперимента к эксперименту невозможно. Для лучшего понимания процессов, происходящих в колонке при градиентной ион-парной ВЭЖХ олигонуклеотидов, мы исследовали влияние скорости возрастания концентрации элюента "Б", скорости потока элюента и температуры колонки на их хроматографическое поведение.

Во всех экспериментах применяли только линейный градиент концентрации элюента "Б" (ацетонитрил):

$$[\text{CH}_3\text{CN}] = a \cdot t + b,$$

где a - наклон градиента (крутизна); t - текущее время; b - свободный член (у нас всегда $b = 5\% \text{ "Б"}$).

Очевидно, что изменение концентрации всех компонентов подвижной фазы носит синхронный характер, как показано на рис. 8.

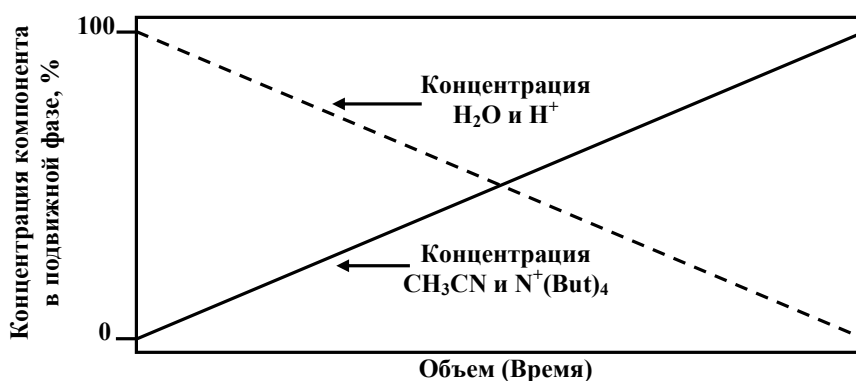


Рис. 8. Изменение концентрации компонентов в подвижной фазе при линейном возрастании концентрации элюента "Б".

На рис. 9 приведены результаты исследования влияния крутизны градиента на хроматографическое поведение олигонуклеотидов $d(A)_5$ и $d(A)_{10}$, из которых следует, что ширина хроматографических пиков практически линейно уменьшается с увеличением скорости возрастания концентрации ацетонитрила. С другой стороны, увеличивается разрешение пиков олигонуклеотидов, вычисленное по уравнению

$$R_s = 1.177 \cdot \frac{V_{R2} - V_{R1}}{w_1 + w_2},$$

где V_{R1} и V_{R2} - объемы удерживания веществ 1 и 2; w_1 и w_2 - ширины пиков 1 и 2 на уровне половины высоты пика.

Отсюда следует важный практический вывод: лучшее разрешение олигонуклеотидов в градиентной ИП ОФ ВЭЖХ достигается при более пологих градиентах. Аналогичный результат был получен в работе [45] для ОФ ВЭЖХ пептидов.

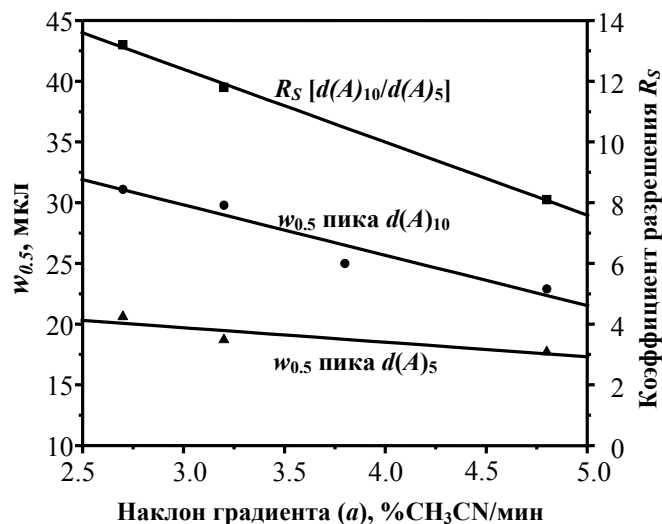


Рис. 9. Зависимость ширины пика олигоаденилатов на уровне $0.5h$ ($w_{0.5}$) и коэффициента их разрешения (R_s) от крутизны градиента концентрации ацетонитрила (a). Колонка 2x75 мм с ProntoSIL-120-5-C18 AQ. Элюент А- [0.1 М [N(But)₄]₂SO₄-НОAc, pH 5.5]:H₂O (1:9); элюент Б- CH₃CN. Скорость потока 100 мкл/мин. Температура колонки 40°C. Проба 5 мкл. Линейный градиент от 5 до 100%Б за 20, 25, 30 и 35 мин.

В качестве оптимально градиента мы выбрали линейный градиент от 5 до 100%Б за 30 мин.

На рис. 10 приведена зависимость ширины пика $d(A)_{10}$ от скорости потока элюента. Минимальная ширина пика наблюдается при элюировании со скоростью потока 50-100 мкл/мин (линейная скорость 0.4-0.8 мм/сек для колонки Ø2x75 мм с $V_0 \approx 150$ мкл), что близко соответствует принятому в ВЭЖХ оптимуму для сорбентов с $d_p=5$ мкм [44].

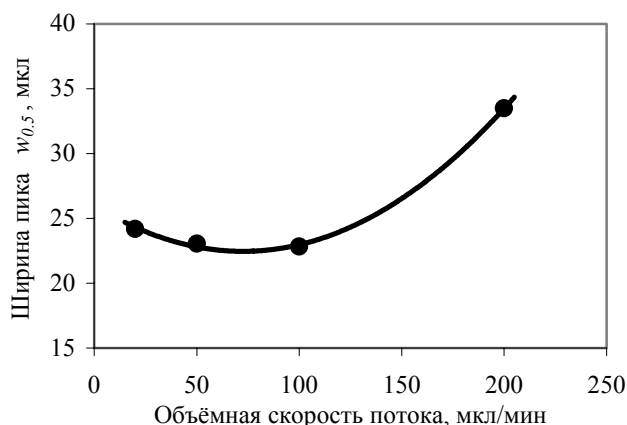


Рис. 10. Зависимость ширины пика $d(A)_{10}$ на уровне $0.5h$ ($w_{0.5}$) от скорости потока.

Колонка 2x75 мм с ProntoSIL-120-5-C18 AQ. Элюент А- [0.1 М [N(But)₄]₂SO₄-НОAc, pH 5.5]:H₂O (1:9). Элюент Б- CH₃CN. Скорости потока 20, 50, 100 и 200 мкл/мин; линейные градиенты от 5 до 100%Б за 150, 60, 30 и 15 мин соответственно. Температура 40°C. Проба 5 мкл.

В качестве оптимальной скорости потока мы использовали далее скорость 100 мкл/мин.

Зависимость коэффициента адсорбции вещества (k') от температуры ($T^{\circ}\text{K}$) в ОФ ВЭЖХ описывается эмпирическим уравнением $\log k' = a/T + b$, в котором константы a и b обычно больше 0 [45]. Для олигонуклеотидов $d(A)_{10}$ и $d(T)_{10}$ нами были получены аналогичные результаты (рис. 11), причем константы a и b для данных веществ заметно различаются, что можно использовать на практике для улучшения разделения конкретных олигонуклеотидов. В качестве оптимального значения температуры мы выбрали 40°C . При более высоких температурах уменьшается время жизни колонки.

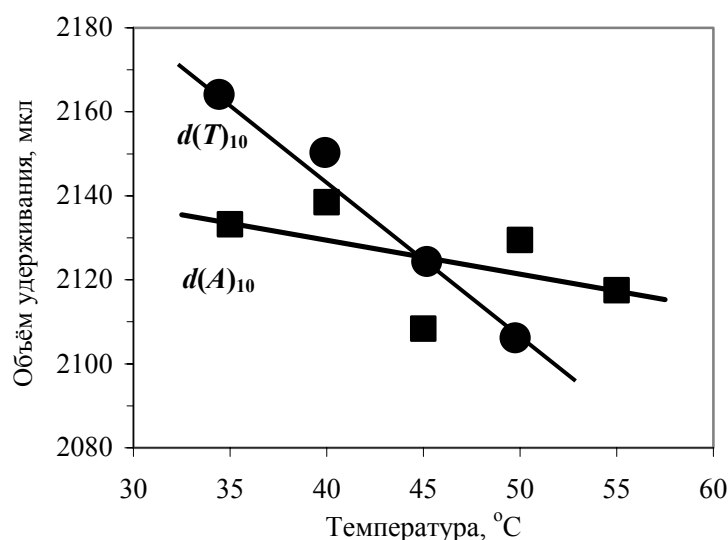


Рис. 11. Зависимость удерживания олигонуклеотидов от температуры.

Колонка 2x75 мм с ProntoSIL-120-5-C18 AQ. Элюент А- [0.1 М [N(But)₄]₂SO₄-НОАс, рН 5.5]:Н₂О (1:9). Элюент Б- CH₃CN. Линейный градиент от 5 до 100%Б за 30 мин. Скорость потока 100 мкл/мин. Проба 4 мкл. Температура колонки 35, 40, 45, 50 и 55°С

Выбранные нами в результате исследований условия ИП ОФ ВЭЖХ позволяют за 30 мин хорошо разделять дезоксиолигонуклеотиды, содержащие до 10 и более оснований. Из рис. 12 и 13 видно, что это относится к олигонуклеотидам как гомогенного, так и гетерогенного состава, т.е. удерживание олигонуклеотида определяется с одной стороны количеством входящих в его состав оснований, а с другой – природой этих оснований. Сопоставляя времена удерживания олигонуклеотидов с их составом (рис. 12 и 13), можно сделать два качественных вывода:

- вклад оснований в удерживание олигонуклеотидов увеличивается в ряду $C < A < T < G$;
- присутствие концевой 5'-фосфата заметно увеличивает удерживание олигонуклеотида.

Очевидно, что для получения количественного выражения вклада каждого основания и фосфатов в удерживание олигонуклеотидов необходим более обширный массив экспериментальных данных.

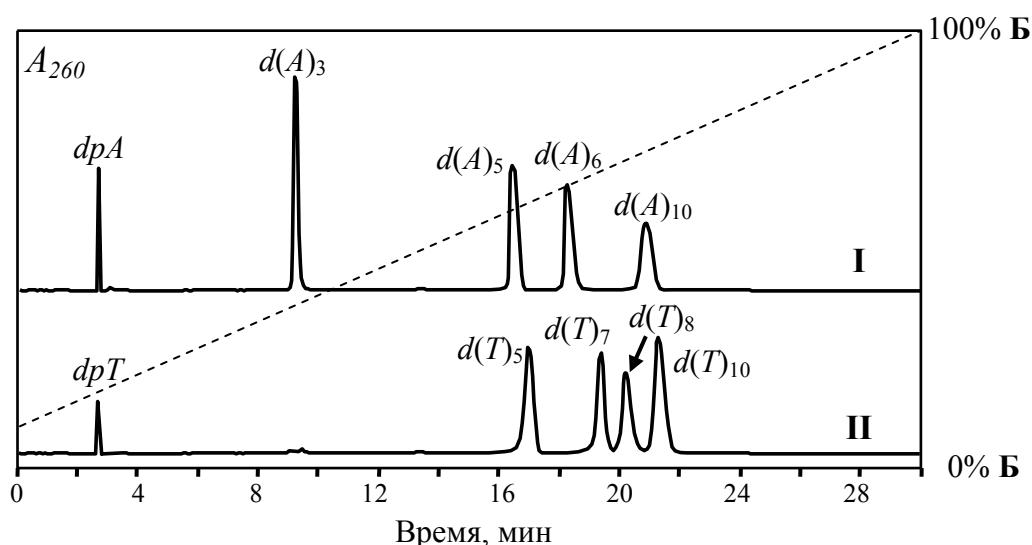


Рис. 12. Хроматография олигодезоксинуклеотидов и нуклеозидмонофосфатов.

Колонка 2x75 мм с ProntoSIL-120-5-C18 AQ. Элюент А- [0.1M [N(But)₄]₂SO₄-НОAc, pH 5.5]:H₂O (1:9). Элюент Б- CH₃CN. Линейный градиент от 5 до 100%Б за 30 мин. Скорость потока 100 мкл/мин. Температура 40°C.

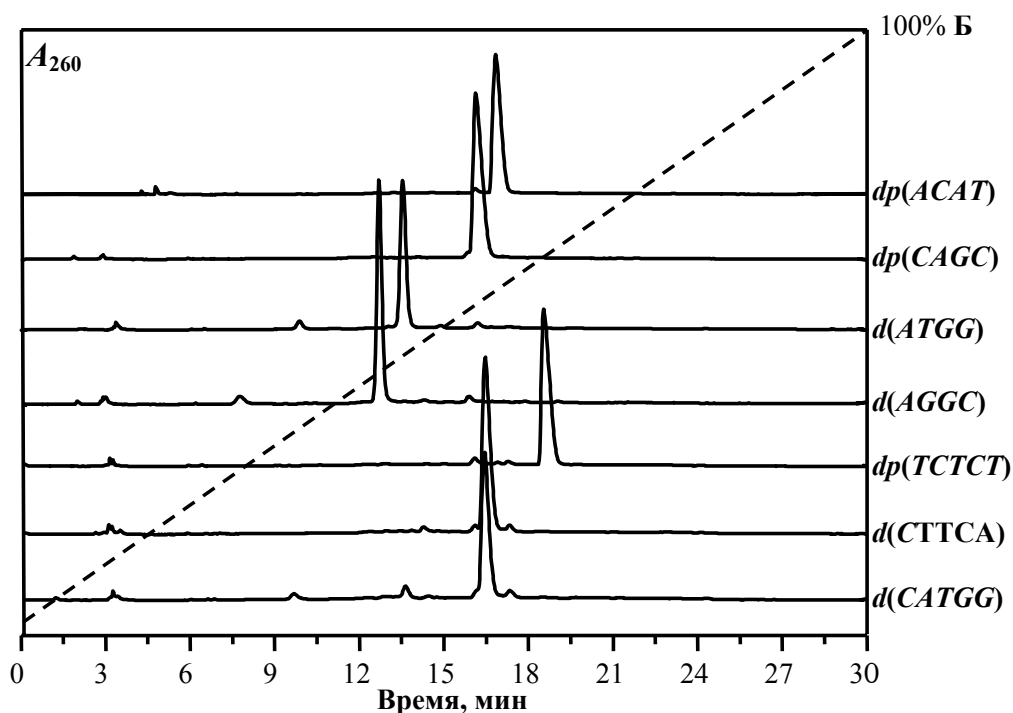


Рис.13. Хроматография олигонуклеотидов гетерогенного состава.

Колонка 2x75 мм с ProntoSIL-120-5-C18 AQ. Элюент А- [0.1 M [N(But)₄]₂SO₄-НОAc, pH 5.5]:H₂O (1:9). Элюент Б- CH₃CN. Линейный градиент от 5 до 100%Б за 30 мин. Скорость потока 100 мкл/мин. Температура колонки 40°C. Длины волн детектора 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280 и 300 нм. Объем пробы 5 мкл. Пробы готовили разбавлением растворов олигонуклеотидов до $A_{260} \approx 20$ е.о.п.

4.3. УФ-спектроскопия олигонуклеотидов

Известно, что электронные спектры растворов веществ в зависимости от свойств растворенного вещества могут быть весьма заметно меняться при изменении состава растворителя, температуры и концентрации [46]. Кроме того, спектры одного раствора также могут отличаться друг от друга, если они записаны в разных условиях или на разных спектрофотометрах. Эти особенности существенно затрудняют реализацию многих уникальных возможностей, которыми обладает электронная спектроскопия, но при соблюдении определенных условий ограничения можно преодолеть.

В сочетании с ВЭЖХ УФ-спектроскопия как метод детектирования открывает такие уникальные возможности, как идентификация веществ по спектрам и оценка "гомогенности хроматографического пика", т.е. проверка однородности химического состава элюата, соответствующего хроматографическому пику в процессе элюирования вещества из колонки [33]. Для осуществления ВЭЖХ с УФ-спектрофотометрическим детектированием мы использовали хроматограф "Милихром А-02", который позволяет фотометрировать элюат квазинепрерывно при 8 длинах волн. Благодаря уникальным метрологическим характеристикам детектора, получаемая спектральная информация количественно воспроизводится от прибора к прибору с малой погрешностью.

Олигонуклеотиды и их компоненты имеют выраженные электронные спектры в области 200-300 нм, (УФ область спектра) с максимумами поглощения около 260 нм, обусловленные присутствием в молекуле хромофоров – азотистых оснований *A*, *C*, *G* и *T*, поглощающие в указанной области. Так как спектр олигонуклеотида в области спектра 200-300 нм определяется только азотистыми основаниями, то, в первом приближении, его можно рассматривать как сумму спектров оснований, входящих в состав олигонуклеотида, взятых в молярных пропорциях в соответствии с их числом в олигомере. Другими словами, УФ-спектр олигонуклеотида известного состава можно вычислить, сравнить со спектром анализируемого олигонуклеотида и сделать вывод о правильности набора входящих в его состав нуклеозидов.

Решение такой аналитической задачи превращает ВЭЖХ-УФ в метод, который пригоден не только для определения чистоты олигонуклеотида, но и для подтверждения его некоторых структурных особенностей. Отдельно отметим, что применительно к анализу олигонуклеотидов это особенно важно, так как их "стандартные образцы", т.е. вещества с гарантированно правильным строением, практически отсутствуют.

4.3.1. УФ-спектры 2'-дезоксинуклеозидов

Для вычисления спектра олигонуклеотида, предназначенного для сравнения его со спектром, записываемым в процессе хроматографии, необходимо знать спектры всех четырех оснований, записанные в том же растворителе. Эта проблема решается просто только для изократической ВЭЖХ, т.е. для случая, когда состав подвижной фазы со временем не меняется. Однако, для анализа олигонуклеотидов разной длины требуется градиентная ВЭЖХ, при которой состав растворителя переменен и спектр каждого олигонуклеотида записывается в том растворителе (в подвижной фазе), в котором он попадает после колонки в кювету. Поэтому, мы приняли, что изменениями в спектрах, связанными с переменным составом элюента $\{[0.01 \text{ M } [\text{N}(\text{But})_4]_2\text{SO}_4\text{-HOAc, pH } 5.5]\leftrightarrow\text{CH}_3\text{CN}\}$ в диапазоне от 10 до 50% CH_3CN (область элюирования большинства олигонуклеотидов), в первом приближении можно пренебречь.

Спектры нуклеозидов записывали в процессе ИП ОФ ВЭЖХ после остановки потока. Все они в нормированном виде приведены на рис. 14. Спектры, записанные в процессе ЖХ, являются более правильными, так как они не искажены спектрами примесей, возможно присутствующими в препаратах нуклеозидов, при условии, что эти примеси отделяются от основного вещества.

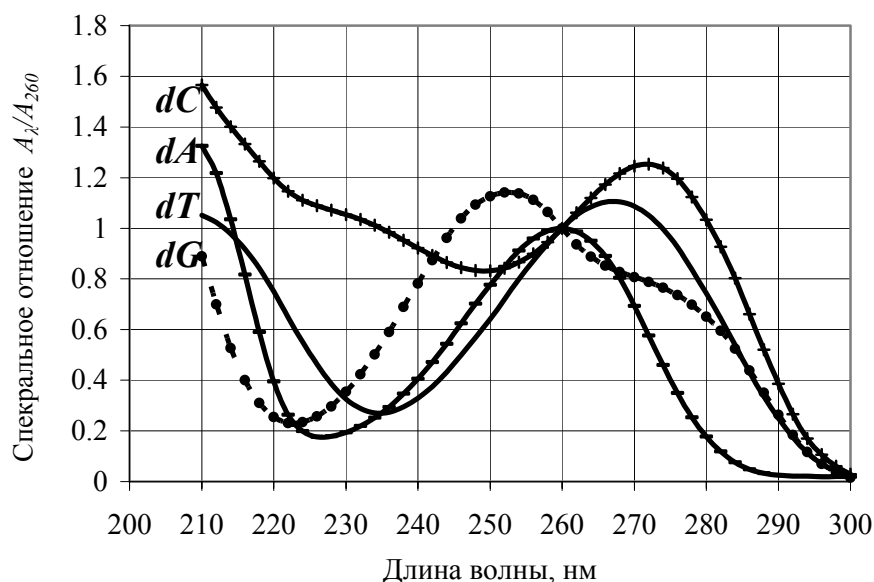


Рис. 14. Нормированные спектры 2'-дезоксинуклеозидов.

Спектры записывали после остановки потока в процессе ВЭЖХ в следующих условиях: Колонка 2x75 мм с ProntoSIL-120-5-C18 AQ. Элюент А- $[0.1 \text{ M } [\text{N}(\text{But})_4]_2\text{SO}_4\text{-HOAc, pH } 5.5]:\text{H}_2\text{O}$ (1:9). Элюент Б- CH_3CN . Линейный градиент от 5 до 100%Б за 30 мин. Скорость потока 100 мкл/мин. Температура колонки 40°C. Длины волн детектора 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280 и 300 нм. Объем пробы 5 мкл.

Сравнение спектральных отношений, вычисленных из полученных спектров, с литературными данными приведено в табл. 2. К ним добавленные спектральные отношения, вычисленные из хроматограмм как отношение площадей пиков S_{250}/S_{260} , S_{270}/S_{260} и S_{280}/S_{260} . Наблюдаемые отклонения не превышают ± 0.02 от среднего значения.

Таблица 2. Сравнение спектральных отношений нуклеозидов, полученных из хроматограмм и спектров.

Нуклеозид	Источник данных	Спектральные отношения $A(S)_\lambda/A(S)_{260}$:		
		$\lambda=250$	$\lambda=270$	$\lambda=280$
<i>dA</i>	Хроматограмма	0.79	0.70	0.18
	Спектр	0.78	0.69	0.18
<i>dC</i>	Хроматограмма	0.80	1.20	0.98
	Спектр	0.83	1.24	1.03
<i>dG</i>	Хроматограмма	1.11	0.81	0.66
	Спектр	1.13	0.81	0.65
<i>dT</i>	Хроматограмма	0.64	1.09	0.75
	Спектр	0.64	1.09	0.74

Особенностью детектора хроматографа "Миличром А-02" является то обстоятельство, что во время хроматографии он позволяет проводить фотометрирование максимум при 8 длинах волн. Очевидно, что эти длины волн не могут быть произвольными и необходимо выбрать наиболее информативные, т.е. при которых наблюдается наибольшее различие в спектрах олигонуклеотидов разного состава. Такой выбор 8 длин волн мы сделали по разностным нормированным спектрам (рис. 15), рассчитанным для всех возможных шести пар нуклеозидов – *A-C*, *A-T*, *A-G*, *C-T*, *C-G*, *G-T*. Из разностных спектров ясно видно, что характерными длинами волн детектирования, обеспечивающими регистрацию наибольших изменений в спектре после добавления очередного нуклеозида, являются длины волн 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 300 нм.

Вычисление спектров олигонуклеотидов требует знания молярных коэффициентов экстинкции (ϵ_λ) для каждого нуклеозида в растворе подвижной фазы. Величины ϵ_λ рассчитывали по значениям площадей хроматографических пиков нуклеозидов (см. табл. 3), исходя из уравнения материального баланса:

$$S_\lambda = A_\lambda \cdot V_{\text{пробы}} = (\epsilon_\lambda \cdot C_M \cdot l) \cdot V_{\text{пробы}},$$

где S_λ – площадь пика (е.о.п.*мкл), $V_{\text{пробы}}$ – объём пробы (2 мкл), A_λ – поглощение вещества, ϵ_λ – молярный коэффициент экстинкции, C_M – молярная концентрация (моль/л), l – длина кюветы (1 см).

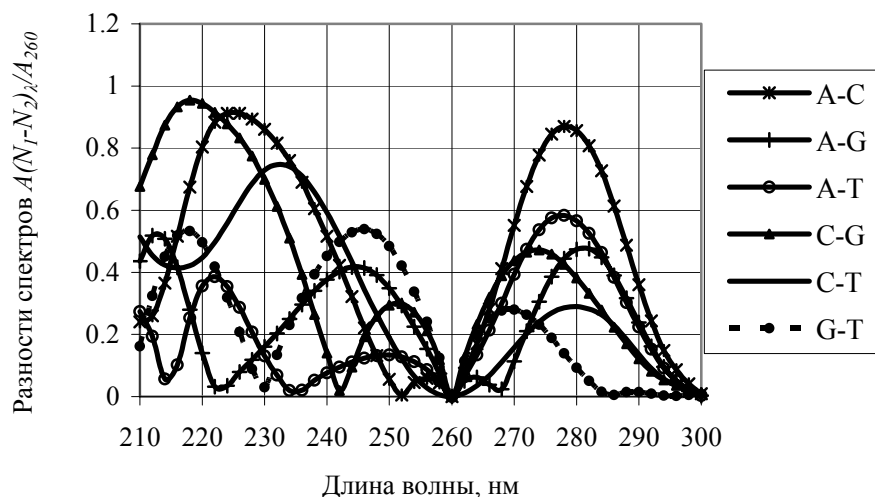


Рис. 15. Разностные нормированные спектры для пар нуклеозидов.

Таблица 3. Вычисленные коэффициенты молярной экстинкции нуклеозидов. Растворитель - элюат.

λ , нм	$\epsilon_{\lambda} \pm 2\%$			
	dA	dC	dG	dT
220	5510	9890	2960	9500
230	2620	8880	3990	4090
240	5750	7810	8440	4140
250	11500	7530	11780	8030
260	14560	8750	10620	12550
270	10190	10320	8640	13700
280	2620	8590	7150	9410

При оценке погрешности учитывали вклады погрешности площади пика и погрешности приготовления раствора. Содержание основного вещества в препаратах нуклеозидов принималось за 100%.

4.3.2. УФ-спектроскопия олигонуклеотидов

Спектр олигонуклеотида можно представить в виде суммы спектров входящих в его состав нуклеозидов. Для каждой длины волны коэффициент экстинкции будет равен:

$$\epsilon_N = n_A \cdot \epsilon_A + n_C \cdot \epsilon_C + n_G \cdot \epsilon_G + n_T \cdot \epsilon_T,$$

где ϵ_N – теоретическое значение молярной экстинкции олигонуклеотида; $\epsilon_A, \epsilon_C, \epsilon_G, \epsilon_T$ – молярные экстинкции нуклеозидов аденозина, тимидина, гуанозина и цитидина; n_A, n_C, n_G, n_T – число соответствующих нуклеозидов, входящих в состав олигонуклеотида.

При вычислении спектров олигонуклеотидов эффекты, связанные с явлениями гипо- и гиперхромизма и приводящими к отклонениям от аддитивности [22, 47] нами не учитывались. В табл. 4 приведены вычисленные для олигонуклеотидов спектральные отношения A_{250}/A_{260} , A_{270}/A_{260} и A_{280}/A_{260} в сравнении с экспериментально полученными в процессе хроматографии отношениями S_{250}/S_{260} , S_{270}/S_{260} и S_{280}/S_{260} .

Таблица 4. Сравнение вычисленных и экспериментальных спектральных отношений некоторых олигонуклеотидов.

№	Олигонуклеотид	Источник данных	Спектральные отношения $A(S)_\lambda/A(S)_{260}$		
			$\lambda=250$	$\lambda=270$	$\lambda=280$
1.	dA (для справки)	Эксперимент	0.79±0.01	0.70±0.01	0.18±0.01
2.	$d(AAA)$	Эксперимент	0.82±0.01	0.70±0.01	0.22±0.01
		Расчёт	0.79±0.02	0,69±0.02	0.18±0.01
3.	$d(AAAAA)$	Эксперимент	0.81±0.01	0.69±0.01	0.20±0.01
		Расчёт	0.79±0.02	0,69±0.02	0.18±0.01
4.	$d(AAAAAA)$	Эксперимент	0.81±0.01	0.69±0.01	0.23±0.01
		Расчёт	0.79±0.02	0,69±0.02	0.18±0.01
5.	$d(AAAAAAAA)$	Эксперимент	0.81±0.01	0.69±0.01	0.24±0.01
		Расчёт	0.79±0.02	0,69±0.02	0.18±0.01
6.	dT (для справки)	Эксперимент	0.64±0.01	1.09±0.01	0.75±0.01
7.	$d(TTTTT)$	Эксперимент	0.65±0.01	1.06±0.01	0.70±0.01
		Расчёт	0.64±0.02	1.09±0.03	0.75±0.02
8.	$d(TTTTTTT)$	Эксперимент	0.65±0.01	1.05±0.01	0.69±0.01
		Расчёт	0.64±0.02	1.09±0.03	0.75±0.02
9.	$d(TTTTTTTT)$	Эксперимент	0.65±0.01	1.05±0.01	0.69±0.01
		Расчёт	0.64±0.02	1.09±0.03	0.75±0.02
10.	$d(TTTTTTTTTT)$	Эксперимент	0.65±0.01	1.05±0.01	0.69±0.01
		Расчёт	0.64±0.02	1.09±0.03	0.75±0.02
11.	$d(AGGC)$	Эксперимент	0.99±0.01	0.81±0.01	0.54±0.01
		Расчёт	0.95±0.02	0.84±0.02	0.57±0.02
12.	$d(ATGG)$	Эксперимент	0.94±0.01	0.79±0.01	0.49±0.01
		Расчёт	0.88±0.02	0.85±0.02	0.54±0.02
13.	$dp(ACAT)$	Эксперимент	0.79±0.01	0.83±0.01	0.43±0.01
		Расчёт	0.77±0.02	0.92±0.02	0.53±0.02
14.	$dp(CAGC)$	Эксперимент	0.95±0.01	0.92±0.01	0.72±0.01
		Расчёт	0.89±0.02	0.92±0.02	0.63±0.02
15.	$d(CATGG)$	Эксперимент	0.92±0.01	0.88±0.01	0.72±0.01
		Расчёт	0.88±0.02	0.90±0.02	0.61±0.02
16.	$d(CTTCA)$	Эксперимент	0.78±0.01	0.99±0.01	0.63±0.01
		Расчёт	0.74±0.02	1.02±0.03	0.67±0.02
17.	$dp(TCTCT)$	Эксперимент	0.75±0.01	1.09±0.01	0.80±0.01
		Расчёт	0.71±0.02	1.12±0.03	0.82±0.02

Как видно из таблицы, для всех олигонуклеотидов хотя бы одно из трех расчетных спектральных отношений отличается от значения, определенного из хроматограммы. Это дает основания говорить о том, что все элюаты, соответствующие пикам олигонуклеотидов, содержат не только целевое вещество, но и какое-то количество примесей. Хотя пики олигонуклеотидов вполне симметричны, тем не менее можно ожидать,

что вещества-примеси частично разделяются с основным веществом, но на форму суммарного пика это влияет незаметно.

Чтобы проверить это предположение, мы провели математический анализ хроматографических пиков с целью проверки их на "гомогенность". Под термином "гомогенный" в хроматографии понимают такой пик, все части которого представляют собой раствор только одного вещества. Очевидно, что если в правой или в левой его части вместе с основным веществом элюируется вещество-примесь, то на суммарном сигнале детектора это можно не увидеть, но при многоканальном детектировании неоднородность пика регистрируется по характерному искривлению кривой отношения сигналов разных каналов (при многоволновом фотометрировании – спектральное отношение). Ясно, что для гомогенного пика, представляющего из себя вытекающий раствор чистого вещества с переменной концентрацией, профиль спектрального отношения, которое не зависит от концентрации, должен представлять прямую, параллельную оси объема [33]. Соответствующее пояснение сказанного мы приводим на рис. 16.

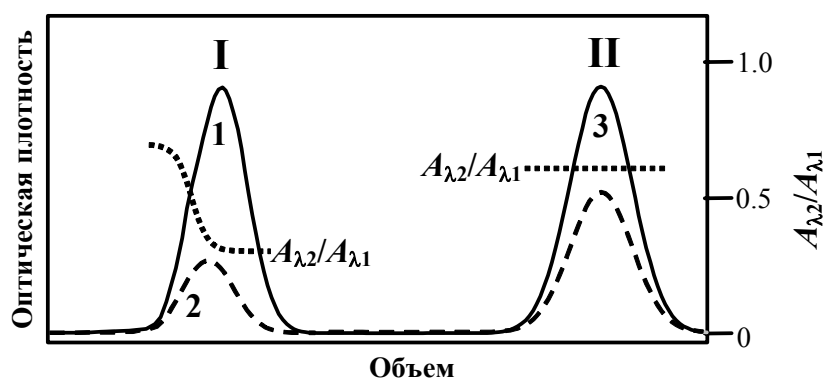


Рис. 16. Иллюстрация гомогенного (II) и негомогенного (I) хроматографических пиков.

Результаты оценки некоторых хроматографических пиков на гомогенность по спектральному отношению A_{280}/A_{260} приведены на рис. 17. Для вычисления величин спектральных отношений вдоль пика хроматограмму записывали в табличном виде (колонка 1 – текущий объем, колонки 2 и 3 – оптическое поглощение при $\lambda=260$ и 280 нм соответственно), выделяли часть таблицы, в которой значения оптической плотности были больше 10% от максимальных значений (вершина пика) и затем делили построчно числа из колонки 3 (A_{280}) на числа из колонки 2 (A_{260}).

Как видно из рис. 17, для четырех олигонуклеотидов из семи величина спектрального отношения вдоль их пиков постоянна и это формально свидетельствует о том, что пик соответствует чистому веществу, т.е. пики гомогенны. Однако, обращает на себя внимание то, что сами значения этих спектральных отношений не соответствуют расчетным и это требует объяснения. Одно из таких возможных объяснений за-

ключается в том, что спектральное отношение A_{280}/A_{260} для данного случая не является характерным и необходимо исследовать гомогенность пика по другим отношениям.

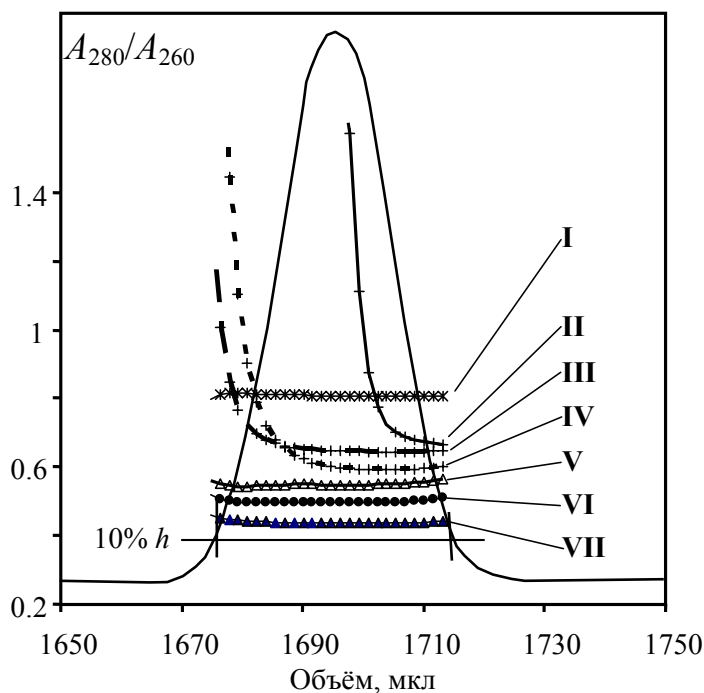


Рис. 17. Оценка чистоты вещества в пиках олигонуклеотидов по спектральному отношению A_{280}/A_{260} .

I– $dp(TCTCT)$, II– $d(CTTCA)$, III– $dp(CAGC)$, IV– $d(CATGG)$,
V– $d(AGGC)$, VI– $d(ATGG)$, VII– $dp(ACAT)$.

Такое исследование было нами выполнено для заведомо бесспорного случая, когда мы выбрали пик гарантированно чистого вещества-мономера – dT – и пик гомоолигомера – декатимидилата $d(T)_{10}$. Результаты приведены на рис. 18 и 19.

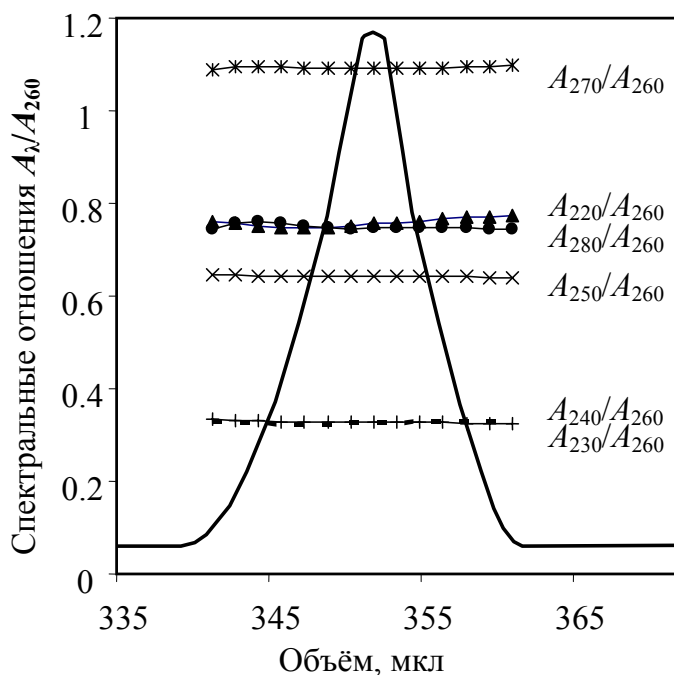


Рис. 18. Оценка чистоты вещества в пике dT по спектральным отношениям.

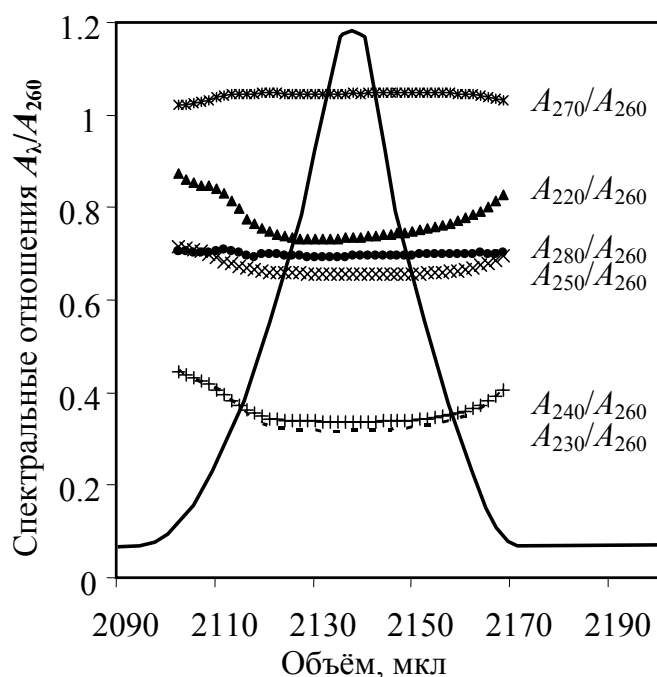


Рис. 19. Оценка чистоты вещества в пике $d(T)_{10}$ по спектральным отношениям.

Из рис. 18 следует, что пик dT является гомогенным по всем без исключения спектральным отношениям. Поскольку это вещество было по происхождению реактивом высокой чистоты, то полученный результат является вполне ожидаемым. Что касается другого вещества – $d(T)_{10}$ – то в его пике по спектральным отношениям A_{220}/A_{260} , A_{230}/A_{260} , A_{240}/A_{260} и A_{250}/A_{260} явно присутствуют пики примесей. Следует отметить, что отношение A_{280}/A_{260} действительно, как мы предположили, оказалось малоинформативным, так как оно практически не меняется вдоль пика, хотя и отличается от расчетно по своей величине.

Таким образом, все олигонуклеотиды, любезно предоставленные нам в качестве модельных веществ НИХБФМ СО РАН, по обычным хроматографическим критериям (наличие пиков примесей и симметрия пика основного вещества) оказались вполне чистыми, но по спектральным данным назвать их чистыми нельзя. Мы можем отметить загрязнение олигонуклеотидов лишь качественно. Для количественного анализа требуются дополнительные исследования, которые были бы весьма полезны.

5. ВЫВОДЫ

1. В работе предложен комплексный подход к решению задач контроля качества синтетических дезоксиолигонуклеотидов, сочетающий анализ методом ион-парной обращено-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектральным анализом в области УФ-спектра.

2. Проведено исследование влияния на хроматографическое поведение олигонуклеотидов таких факторов, как природа ион-парного агента, скорость потока элюента, градиент концентрации компонентов подвижной фазы, температура колонки. Оптимизирована методика разделения коротких (до 10 оснований) олигонуклеотидов.

3. Разработанный метод анализа апробирован на образцах синтетических олигонуклеотидов.

6. ЛИТЕРАТУРА

1. *Кнорре Д.Г., Мызина С.Д.* Биологическая химия. М.: Высшая школа, 1998, С.293-299.
2. *Юои Т., Ицука Э., Онарис С. и др.* (пер. с япон.) Биополимеры. М.: Мир, 1988, С.322.
3. *Веньяминова А.Г., Горн В.В., Зенкова М.А., Комарова Н.И., Репкова М.Н.* Автоматический *H*-фосфанатный синтез олигорибонуклеотидов с использованием 2'-*o*-тетрапиранильной защитной группы. //Биоорганическая химия. 1990. Т.16. Вып.7. С.941-950.
4. *Звонкова Е.Н., Зотчик Н.В., Филиппович Е.И., Митрофанова Т.К., Мягкова Г.И., Серебренникова Г.А.* Химия биологически активных природных соединений. М.: Химия, 1970, С.370.
5. *Фёдорова О.С., Коваль В.В., Карнаухова С.Л., Добриков М.И., Власов В.В., Кнорре Д.Г.* Кооперативные взаимодействия при фотосенсибилизированной модификации ДНК бинарными реагентами на основе олигонуклеотидов. //Молекулярная биология. 2000. Т.34. №6. С.956-965.
6. *Yastrebov, S. I.; Lomakin, A. I.; Gorn, V. V.* Use of sodium pyrophosphate in the ion-exchange chromatography of oligonucleotides. //Khimiya Prirodnikh Soedinenii. 1992. V.1. P.148-149. (CODEN: KPSUAR. ISSN: 0023-1150. Chemical Abstracts. 2002).
7. *Грачёв М.А.* Микроспектрофотометр МСФП-1 и его применение для микроколоночной хроматографии и спектрального анализа олигонуклеотидов. – Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот – М.: Наука, 1973. С.104-121.
8. *Zeno Földes-Papp, Eckhard Birich-Hirschfeld, Rudi Rösch, Manfred Hartmann, Albrecht K. Kleinschmidt, Hartmut Seliger.* Efficiency of oligonucleotide synthesis evaluated by ion-exchange high-performance liquid chromatography. //J. Chromatogr. A. 1995. V.706. P.405-419.
9. *J. Weiss, D. Jensen.* Modern stationary phases for ion chromatography. //Anal. Bioanal. Chem. 2003. V.375. P.81-98.
10. *Стыскин Е.Л., Ицксон Л.Б., Брауде Е.В.* Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М.: Химия, 1986. С.24.
11. *Potaman V.N., Soyfer V.N.* Oligonucleotide model with non-identical complementary strands for chromatographic studies of structure-dependent photo susceptibility. //J. Chromatogr. A. 1995. V.690. P.65-70.
12. *Kumar P., Gupta K.C.* Novel conditions for rapid and clean deprotection of oligodeoxyribonucleotides from universal polymer supports. //Reactive & Functional Polymers. 1999. V.41. P.197-204.

13. *Барам Г.И., Грачёв С.А.* Использование перхлората лития при выделении и анализе олиго- и полинуклеотидов. //Биоорганическая химия. 1985. Т.11. №10. С.1420-1422.
14. *Басова Е.М., Большова Т.А., Иванов В.М.* Модели и закономерности удерживания сорбатов в ион-парной хроматографии. //Журнал Аналитической химии. 1996. Т.51. №7. С.694-704.
15. *Gilar, Martin; Fountain, Kenneth J.; Budman, Yeva; Neue, Uwe D.; Yardley, Kurt R.; Rainville, Paul D.; Russell, Reb J., II; Gebler, John C.* Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography analysis of oligonucleotides: Retention prediction. //J. Chromatogr. A. 2002. V.958 (1-2). P.167-182.
16. *Hecker K.H., Green S.M., Kobayashi K.* Analysis and purification of nucleic acids by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography. //J. Biochem. Biophys. Methods. 2000. V.46. P.83-93.
17. *Georgopoulos D.E., Leibowitz M.J.* Use of high-performance liquid chromatography fractionation of RNA molecules in assay of group I intron ribozym activity. //J. Chromatogr. A. 2000. V.868. P.109-114.
18. *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.
19. *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.
20. *Huber C.G, Krajete A.* Sheath liquid effects in capillary high-resolution liquid chromatography-electrospray mass spectrometry of oligonucleotides. //J. Chromatogr. A. 2000. V.870. P.413-424.
21. *Nebojsa M. Djordjevic, Fabrice Houdiere, Patrich Fowler, Francois Natt.* HPLC separation of oligonucleotides in isocratic and temperature-programming mode. //Analytical chemistry. 1998. V.70. P.1921-1925.
22. *Микельсон А. (пер. с англ. под ред. Прокофьева М.А.)* Химия нуклеозидов и нуклеотидов. М.: Мир, 1966. С.520.
23. *Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. (пер. с англ.)* Справочник биохимика. М.: Мир, 1991. С.70-98.
24. *Biochemical Journal A. 1959. V. 59.P.397. (J.P. Phillips, F.C. Nachod., ed. Organic electronic spectral data. 1963. V.4. P.296.).*
25. *The Sadtler standard spectra: Ultraviolet spectra. 1986. V.127. № 36901UV. – Phyladelphia: Sadtler research lab.*

26. *Biochemical Journal A.* 1952. V. 52. P.369. (*J. Mortinor Kamlet, ed. Organic electronic spectral data.* 1960. V.1. P.349.).
27. *Biochemical Journal A.* 1952. V.52. P.384. (*J. Mortinor Kamlet, ed. Organic electronic spectral data.* 1960. V.1. P.349.).
28. *The Sadtler standard spectra: Ultraviolet spectra.* 1972. V.71. № 1845UV. – Philadelphia: Sadtler research lab.
29. *The Sadtler standard spectra: Ultraviolet spectra.* 1980. V.106. № 29652UV. – Philadelphia: Sadtler research lab.
30. *Biochemical Journal A.* 1952. V.52. P.384. (*J.P. Phillips, F.C. Nachod., ed. Organic electronic spectral data.* 1960. V.1. P.344.).
31. *Huber C. G.; Oberacher, Herbert.* Analysis of nucleic acids by on-line liquid chromatography-mass spectrometry. //*Mass Spectrometry Reviews (Volume Date 2001).* 2002. V.20 (5). P.310-343.
32. *Alex Appfel, John A. Chakel, Steven Fischer, Kay Lichtenwalter, William S. Hancock* New procedure for the use of high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of nucleotides and oligonucleotides. //*J. Chromatogr A.* 1997. V.777. P.3-21.
33. *Хубер Л. (Ред.)* Применение диодно-матричного детектирования в ВЭЖХ. М.: Мир, 1993.
34. *Gilar Martin.* Analysis and purification of synthetic oligonucleotides by reversed-phase high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometry detection. //*Analytical Biochemistry.* 2001. V.298 (2). P.196-206.
35. *Ranjit R. Deshmukh et al.* Large-scale purification of antisense oligonucleotides by high-performance membrane adsorber chromatography. //*J. Chromatogr. A.* 2000. V.890. P.179-192.
36. *Кузьмин С.В.* Микроспектрофотометрия. – Ультрамикрoанализ нуклеиновых кислот – М.: Наука, 1973. С.95-103.
37. *Baram G.I., Grachev M.A., Komarova N.I., Perelroyzen M.P., Bolvanov Yu A., Kuzmin S.V., Kargaltsev V.V., Kuper E.A.* Micro-column liquid chromatography with multi-wavelength photometric detection. I. The OB-4 Micro-column liquid chromatograph //*J. Chromatography.* 1983. V264. P.69-90.
38. *Kalambet Yu.A., Kozmin Yu.P., Perelroyzen M.P.* //Computer spectrochromatography. Principles and practice of multi-channel chromatographic data processing. *J. Chromatography.* 1991. V.542. P.247-261.

39. *Baram G.I.* Portable liquid chromatograph for mobile laboratories. I. *Aims. // J. Chromatogr A.* 1996. V.782. P.387-399.
40. *van Boon. J.H., De Rooij J.F.M.* // *J. Chromatogr.* 1977. V.131. P.169 (*Хенишен А., Хуне К.-П., Лотинайх Ф., Вёльтер В.* (пер. с англ. под ред. *Березина И.В.*) Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии. М.: Мир, 1988. С.476.).
41. *Gillam S., Rottman F., Smith M.* // *Proc. Natural Academical Science USA*, 1977. V.74. P.96. (*Хенишен А., Хуне К.-П., Лотинайх Ф., Вёльтер В.* (пер. с англ. под ред. *Березина И.В.*) Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии. М.: Мир, 1988. С.476.).
42. *Кузьмин С.В., Перельройзен М.П.* Дифференциальный спектральный метод определения первичной структуры олигонуклеотидов. // Тез. докл. 3 Семинар "Использование вычислительных машин в спектроскопии молекул". Новосибирск, 1975, С.67-68.
43. *Peter M. Vallone, Joseph M. Devaney, Michael A. Marino, John M. Butler.* A strategy for examining complex mixtures of deoxyoligonucleotides using ion-pair-reverse-phase high-performance liquid chromatography, matrix-assisted laser desorbtion ionization time-of-flight mass spectrometry, and informatics. // *Analytical Biochemistry.* 2002. V.304. P.257-265.
44. *Схунмакерс П.* Оптимизация селективности в хроматографии. М.: Мир, 1989. С.399.
45. *Барам Г.И.* Развитие метода микроколоночной высокоэффективной жидкостной хроматографии и его применение для решения комплексных аналитических задач. /Докторская диссертация. Лимнологический институт СО РАН, Иркутск, 1997.
46. *Кочетков Н.К., Будовский Э.И., Свердлов Е.Д., Симукова Н.А., Турчинский М.Ф., Шibaев В.Н.* Органическая химия нуклеиновых кислот. М.: Химия, 1970. С.235.
47. *Барам Г.И., Беликов С.И., Веняминава А.Г., Гринёва Н.И., Зарытова В.Ф., Козоровицкий А.Я., Шамовский Г.Г.* Алкилирующие производные компонентов нуклеиновых кислот. XIII. Синтез 4-(N-2-хлорэтил-N-метиламино)бензилиденовых производных адениловых олигонуклеотидов. /– Известия Сибирского отделения академии наук СССР. Серия химические науки. Выпуск 1. – Сибирское отделение: Наука, 1972. С.116.