

УДК 541.183.12 : 543.854

## ИОНООБМЕННЫЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ХРОМАТОГРАФИИ

*E. Г. Давидова и В. В. Рачинский*

### ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение . . . . .	253
II. Получение ионообменных целлюлоз . . . . .	253
III. Свойства ионообменных целлюлоз . . . . .	255
IV. Техника применения ионообменных целлюлоз . . . . .	259
V. Применение ионообменных целлюлоз . . . . .	264

### I. ВВЕДЕНИЕ

Успехи развития сорбционной техники и хроматографии в значительной степени связаны с открытием и использованием новых типов синтетических сорбентов. Синтез и внедрение в сорбционную технологию и в особенности в хроматографию нового типа ионообменных сорбентов — ионообменных целлюлоз — выдающееся достижение современной химии и биохимии.

За последние годы число работ, посвященных применению в хроматографии ионообменных целлюлоз, быстро растет. Уже опубликовано около 500 работ. Хроматография и различные другие варианты сорбционной техники с использованием ионообменных целлюлоз дали возможность значительно продвинуться вперед в разрешении труднейших задач биохимии — разделении белков, ферментов, нуклеиновых кислот и других высокомолекулярных и низкомолекулярных веществ живой природы.

Можно ожидать, что применение ионообменных целлюлоз будет быстро расширяться и захватывать все новые и новые отрасли химии.

Настоящий обзор имеет целью дать освещение современного состояния вопроса об изучении свойств ионообменных целлюлоз и их применению.

### II. ПОЛУЧЕНИЕ ИОНООБМЕННЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗ

Мы не будем останавливаться на характеристике ионообменных свойств природных, технических и в том числе хроматографических целлюлоз. Эти сведения можно найти в ряде монографий, например<sup>1, 2</sup>. Отметим, что как природная целлюлоза, так и различные виды технических целлюлоз обладают ионообменными свойствами главным образом из-за наличия в их составе карбоксильных групп. Однако емкость поглощения таких целлюлоз ничтожно мала и составляет ~0,05 мг-экв/г, что соответствует приблизительно одной карбоксильной группе на 90—130 глюкозных структурных единиц<sup>3, 4</sup>.

Фактически использование ионообменных форм целлюлозы для хроматографических целей имеет более чем полувековую давность. Еще Гоппельсердер<sup>5</sup> упоминал об оксицеллюлозе (карбоксильный слабо-

кислотный катионит) как материале для капиллярного анализа. Оксциеллюз получается в процессе омыления эфиров, присутствующих в исходной целлюзах, и путем окисления первичных спиртовых групп, находящихся в глюкозных структурных единицах в положении 6<sup>1,2</sup>. Уже при получении оксицеллюз столкнулись с определенными ограничениями в содержании карбоксильных групп в оксицеллюзах. Существует некоторый критический предел включения ионогенных групп в состав целлюзы — при превышении этого предела целлюза теряет свойства нерастворимого сорбента. Для оксицеллюзы оказалось, что содержание карбоксильных групп не должно превышать 1—4%. При содержании более 5% (при этом каждая пятая глюкозная структурная единица окислена в положении C6) оксицеллюза становится растворимой в воде при pH выше 9<sup>2</sup>.

К «пионерским» работам, посвященным получению различных типов ионообменных целлюз, следует отнести работы Лауча с сотрудниками<sup>6</sup>, Михееля и Альбертса<sup>7</sup>, Собера и Петерсона<sup>8,9</sup> и Пората<sup>11</sup>. Лауч с сотрудниками получили ряд ионитов — производных целлюзы: карбоксильный катионит — простой эфир гликолиевой кислоты (группа  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) — действием хлоруксусной кислоты на целлюзу в щелочном растворе; сильнокислый катионит — производное бутансульфокислоты (группа  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{SO}_3\text{H})-\text{CH}_3$ ) — действием бутансульфона; анионит (группа  $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{R}_3)\text{X}^-$ ) — этерификацией *p*-толуольсульфохлорида и действием третичных аминов на полученный эфир. Во всех этих синтезах удавалось включать ионогенные группы из расчета одна группа на 20—30 глюкозных структурных единиц. Это было пределом ионообменной емкости таких ионитов, при повышении числа ионогенных групп целлюз разрушалась.

Михеель и Альбертс<sup>7</sup> получили карбоксильную катионообменную целлюзу в виде полуэфира фталевой кислоты. Такой слабокислый катионит не растворялся в щелочах при 5%-ном содержании карбоксильных групп.

Систематическая работа над получением ионообменных целлюз для целей хроматографии была осуществлена Собером, Петерсоном и сотрудниками<sup>8,9</sup> и Поратом<sup>11</sup>.

Собер и Петерсон<sup>8,9</sup> описали методику получения ряда новых катионообменных и анионообменных целлюз: СМ-целлюзы (карбоксиметил-целлюзоза); Р-целлюзы (фосфорилированная целлюзоза); ДЕАЕ-целлюзы (диэтиаминоэтил-целлюзоза); ЕСТЕОЛА-целлюзы. На основе DEAE-целлюзы Порат<sup>11</sup> получил анионит ТЕАЕ-целлюзу (триэтиламиноэтил-целлюзозу). Им также разработана методика получения сильнокислых катионитов: SE-целлюзы (сульфоэтил-целлюзоза) и SM-целлюзы (сульфометил-целлюзоза). Сокращенное и полное название некоторых ионообменных целлюз и их свойства приведены в табл. 1. В качестве исходных материалов использовали природную  $\alpha$ -целлюзозу.

Собер и Петерсон<sup>8,9</sup> использовали порошок хлопковой целлюзозы для получения катионитов и порошок древесной целлюзозы для получения анионитов.  $\alpha$ -Целлюзоза оказалась самой подходящей матрицей для включения ионогенных групп.

Емкость поглощения ионообменных целлюз лимитировалась необходимостью, с одной стороны, получения нерастворимого сорбента и, с другой, — придания сорбенту хороших физических свойств, обеспечивающих их применение как в бумажной, так и в колоночной хроматографии.

Полученные указанной группой ученых ионообменные целлюлозы имели емкость поглощения менее 1 мг-экв/г, т. е. значительно ниже, чем ионообменные смолы. Однако в большинстве случаев такая емкость оказалась вполне достаточной.

Ионообменные целлюлозы получали обычной реакцией этерификации целлюлозы. Например, анионит DEAE-целлюлоза был получен путем нагревания смеси  $\beta$ -хлорэтилдиэтиламина и целлюлозы в щелочной среде<sup>9</sup>. Были также получены SM- и SE-целлюлозы<sup>11</sup>.

Разработанные методики получения ионообменных целлюлоз давали хорошую воспроизводимость как физических свойств сорбентов, так и их физико-химических показателей (емкость поглощения и др.). Значительная часть работ, посвященных применению ионообменных целлюлоз, выполнена на ионообменных целлюлозах собственного приготовления. В настоящее время ионообменные целлюлозы производятся рядом иностранных фирм: «Ватман» (США), «Серва» (ФРГ) и другие. Производство ионообменных целлюлоз осваивается также и в нашей стране: Институт антибиотиков АН СССР (Ленинград) и Текстильный институт (Москва). В табл. 1 приведены основные известные виды ионообменных целлюлоз, применяющихся в хроматографии. Катиониты расположены в порядке убывания кислотности, аниониты — в порядке возрастания основности.

Из табл. 1 видно, что сейчас уже имеется целая гамма целлюлозных ионитов. Это дает возможность исследователям осуществлять подбор целлюлозных ионитов с нужными физико-химическими свойствами.

### III. СВОЙСТВА ИОНООБМЕННЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗ

*Структура.* По химической структуре ионообменные целлюлозы следует отнести к линейным полимерам. Это длинные макромолекулярные цепочки  $\beta$ -глюкопираноз, соединенные между собой  $\beta$ -глюкозидной связью в положении 1—4. На расстоянии порядка 50 Å водород гидроксильных групп целлюлозы замещен различными ионогенными группами. Взаимодействие между отдельными линейными макромолекулами, как указывает Роговин<sup>1</sup>, осуществляется посредством связей молекулярного типа (главным образом полярных связей), а также посредством водородной связи.

Различное соотношение между водородными связями и молекулярными связями обусловливает различие в растворимости и реакционной способности целлюлозы и ее производных. Таким образом, хотя линейные цепочки целлюлозы сшиты между собой, однако сшиты они весьма непрочно.

Введение в состав целлюлозы различных групп, вызывающих частичный разрыв водородных связей, может увеличивать ее растворимость. Следует иметь также в виду, что сохраняющиеся в ионообменных целлюлозах связи могут разрушаться в процессе хроматографирования различных веществ. Так, например, установлено<sup>11</sup>, что при хроматографировании белков на ионообменных целлюлозах сорбция белковых молекул происходит не только за счет ионных и полярных связей, но и за счет водородных связей. Возникает своего рода конкуренция за водородные связи между макромолекулами целлюлозы, с одной стороны, и молекулами целлюлозы и белков, с другой. Этим объясняется высокая емкость поглощения ионообменных целлюлоз в процессе сорбции белков и других высокомолекулярных веществ. Макромолекулы целлюлозы могут соединяться между собой также и через обычные валентные связи (глюкозидные и сложноэфирные).

**Физические свойства.** Неправильная, нитеобразная форма целлюлозных частиц не позволяет дать точную оценку дисперсности и размеров частиц. При прямом измерении длины частиц под микроскопом были получены кривые распределения, показывающие, что максимальная длина частиц составляет 350—500 мкм. Максимумы кривых распределения приходятся на интервал 50—100 мкм. Диаметр частиц составляет 15—20 мкм. Влажность воздушно-сухих ионообменных целлюлоз колеблется в пределах 10—15 %. Объемный вес ионообменных целлюлоз находится в интервале 0,1—0,2 г/мл, т. е. подобно технической целлюлозе это довольно «рыхлый» материал. Удельный объем ионообменной целлюлозы в набухшем состоянии составляет 10—15 см<sup>3</sup>/г, набухаемость ~2.

Ионообменные целлюлозы обладают хорошими фильтрационными свойствами. При использовании ионообменных целлюлоз в колончной хроматографии скорость потока может регулироваться в пределах 5—25 мл/см<sup>2</sup>час. Данных о количестве связанной воды в составе ионообменных целлюлоз нет.

**Физико-химические свойства.** О степени диссоциации ионогенных групп ионообменных целлюлоз, их кислотности и основности можно судить по кривым титрования<sup>19</sup>. В табл. 1 приведена качественная характеристика кислотных и основных свойств ионообменных целлюлоз. Там же указаны приблизительные значения полных емкостей поглощения.

Известно, что полная емкость поглощения ионита является сорбционной константой и определяется числом ионогенных групп, удер-

ТАБЛИЦА 1  
Виды ионообменных целлюлоз

Сокращенное название	Полное название	Ионогенная группа	Кислотные или основные свойства	Полная емкость поглощения *, мг-экв./г
Катиониты	Сульфоэтил-целлюлоза	—C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ·SO <sub>3</sub> H	сильнокислотный	0,4
	Фосфорилированная целлюлоза	—PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	сильнокислотный	0,8
	Карбоксиэтил-целлюлоза	—C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> COOH	среднекислотный	0,7
	Карбоксиметил-целлюлоза	—CH <sub>2</sub> ·COOH	слабокислотный	0,7
	Карбоксил-целлюлоза (оксицеллюлоза)	—COOH	слабокислотный	0,7
Аниониты	Параамиnobензил-целлюлоза	—CH <sub>2</sub> ·C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	слабоосновный	0,6
	Продукт реакции этилхлоридрина, 3-этиламина с целлюлозой	структура ионогенной группы не установлена	слабоосновный	0,5
	Аминоэтил-целлюлоза	—C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	слабоосновный	0,7
	Продукт реакции этилбромида с DEAE-целлюлозой	структура ионогенной группы не установлена	среднеосновный	1,0
	Дизтиламиноэтил-целлюлоза	—C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ·N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	среднеосновный	1,0
GE	Гуанидоэтил-целлюлоза	—C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NHC—NH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub> OH	среднеосновный	0,7

\* Указаны приблизительные значения емкости поглощения.

живающих обменные ионы. Иначе говоря, полная емкость поглощения как константа не зависит от состава раствора, находящегося в контакте с ионитом. Однако замещение этой полной емкости поглощения различными ионами происходит по-разному в зависимости от энергии связи, которую устанавливают сорбируемые ионы. Если изучается сорбция какого-либо иона в присутствии других ионов, то характер распределения их определяется в соответствии с уравнением изотермы ионного обмена и законом эквивалентности обмена.

Сорбируемые ионы конкурируют в соответствии с их энергией связи за сорбционные места на ионите. В этой конкуренции, естественно, участвуют и ионы водорода (для катионитов), и ионы гидроксила (для анионитов), которые, сорбируясь на ионите, блокируют часть полной обменной емкости поглощения. В результате, реальная емкость поглощения ионита является величиной, зависящей от pH раствора.

Сорбция диссоциирующих высокомолекулярных соединений (полиэлектролитов), а также многих низкомолекулярных органических соединений на ионитах имеет сложный характер, и с теоретической и экспериментальной стороны мало изучена. Диссоциирующие органические соединения, как правило, являются амфотерными соединениями с различными по степени диссоциации ионогенными группами. В зависимости от pH раствора, содержания и концентрации других веществ количество свободных ионных связей будет различным. Помимо полярной ионной сорбции, связывание молекул органических веществ может происходить также с участием и других типов связей.

Поэтому законы ионного обмена, установленные для сорбции ненеорганических ионов, для сорбции диссоциирующих органических соединений не будут соблюдаться. При определении емкости поглощения ионообменных целлюлоз по отношению к сорбции органических соединений уже невозможно выражать емкость поглощения в мг-экв на грамм сорбента. А если говорить о сорбции высокомолекулярных соединений, молекулярный вес которых является неопределенной величиной, то невозможно выражать емкость поглощения даже в мМ/г сорбента. В таких случаях ионообменные целлюлозы по отношению к конкретным веществам в конкретных условиях будут иметь свою специфическую емкость поглощения и ее следует выражать в мг вещества на грамм сорбента. Если подходить более строго, то в качестве универсальной стандартной единицы массы ионита необходимо брать 1 г матрицы ионита (масса ионита за вычетом массы сорбированных ионов или сорбированных веществ). Однако в настоящее время такая единица измерения массы ионита не получила еще распространения, и емкость поглощения, как правило, измеряют в расчете на 1 г воздушно-сухого (или сухого) ионита в исходной (взятой для опыта) ионной форме.

Необходимо отметить, что сорбционные свойства ионообменных целлюлоз изучены еще очень мало. Отсутствуют систематические исследования по определению емкости поглощения, изотерм сорбции, кинетики и динамики сорбции.

Петерсон и Собер<sup>9</sup> определяли емкость поглощения некоторых ионообменных целлюлоз в отношении сорбции белков. Ими получены следующие значения емкости поглощения:

DEAE — 0,498 г белка сыворотки крови/г сорбента,  
ECTEOLA — 0,05 г белка сыворотки крови/г сорбента,  
CM — 0,98 г СО-глобулина/г сорбента,  
P — 0,93 г СО-глобулина/г сорбента.

О'Донелл и Томпсон<sup>13</sup> исследовали зависимость емкости поглощения ионообменных целлюлоз от температуры. Например, понижение температуры от 25 до 1° сильно снижает емкость поглощения DEAE-целлюлозы при сорбции инсулина.

Как известно, скорость сорбции определяется скоростью прохождения ряда последовательно идущих стадий сорбционного процесса: диффузии и собственно сорбции. Роль этих стадий в установлении сорбционного равновесия на ионообменных целлюлозах не изучена. Рассмотрение структурных особенностей ионообменных целлюлоз позволяет сделать предположение, что сорбция различных веществ на ионообменных целлюлозах будет носить экстрамицеллярный характер — внутридиффузионная стадия сорбции здесь практически исключается.

Экстрамицеллярный характер сорбции, а также высокая дисперсность ионообменных целлюлоз (диаметр частиц порядка 10—20  $\mu$ ) с теоретической точки зрения должны обусловливать более быструю сорбцию веществ на ионообменных целлюлозах по сравнению с сорбцией на ионообменных смолах. Для неорганических ионов и низкомолекулярных органических веществ время установления сорбционного равновесия, вероятно, должно лимитироваться временем внешнедиффузионной стадии сорбции. Однако возможно, что в случае сорбции высокомолекулярных веществ время установления сорбционного равновесия будет существенно зависеть также и от времени протекания самого акта сорбции.

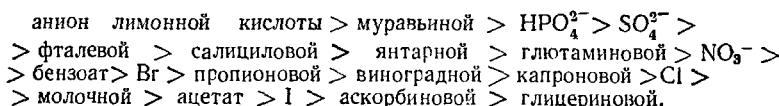
В литературе приведены крайне скучные сведения о кинетике сорбции веществ на ионообменных целлюлозах. Экспериментальная оценка<sup>14</sup> времени установления сорбционного равновесия в условиях перемешивания сорбента с раствором для SE- и P-целлюлоз в различных ионных формах при сорбции  $\text{Ca}^{2+}$  показала, что сорбционное равновесие устанавливается в течение 10 сек. Это время соответствует времени внешней диффузии обменивающихся неорганических ионов. Для DEAE-целлюлозы время установления равновесия при замене иона хлора на ион иода было несколько больше ~30 сек., т. е., как и в случае ионообменных смол, сорбция на анионитах протекает несколько медленнее, чем на катионитах. Возможно, в этом различии проявляется влияние скорости протекания химической стадии сорбции, которая не всегда мгновенна. Гусев<sup>15</sup> исследовал кинетику сорбции ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Fe}^{3+}$  в несколько необычных условиях — сорбция ионов плотным слоем СМ-целлюлозы. Он установил, что сорбция поверхностью плотного слоя целлюлозы протекала очень быстро, тогда как дальнейший ход сорбции внутри слоя протекал очень медленно, и сорбционное равновесие устанавливалось в течение 3 часов. Этот результат можно объяснить только тем, что в указанных условиях время установления равновесия определялось диффузией внутрь очень плотного слоя сорбента (внутренняя диффузия). Однако при хроматографических опытах таких условий нет. В той же работе было установлено, что скорость сорбции в кислых средах была больше, чем в нейтральных. Это явление наблюдается также и для ионообменных смол, что связано с большей набухаемостью ионитов в кислых средах и большой подвижностью участвующих в обмене водородных ионов.

Николаев<sup>16</sup> установил, что равновесие при сорбции на ионообменных целлюлозах белков и ферментов наступает примерно в течение 5 минут. Сведений о изотермах сорбции различных веществ на ионообменных целлюлозах также очень мало.

Николаев<sup>16</sup> изучал статику сорбции аспарагиназы из 0,08 M раство-

ра NaCl и из буферных растворов с pH 7,0 и 6,5. Полученная им изотерма сорбции имела выпуклую форму.

В литературе имеются немногочисленные сведения о сорбционных рядах для некоторых ионообменных целлюлоз. Так, например, для Р-целлюлозы Хед и другие<sup>17</sup> получили следующие сорбционные ряды неорганических ионов:  $U^{4+} > UO_2^{2+}$ ,  $Th^{4+} > Fe^{3+} > La^{3+} > H > Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+} > Na^+$ . Эти данные согласуются с данными, полученными для фосфатных смол. Ведер и другие<sup>18</sup> установили сорбционный ряд анионов для ECTEOLA-целлюлозы:



При изучении сорбции различных соединений на ионообменных целлюлозах следует иметь в виду возможность протекания реакции комплексообразования ионов как с ионогенными группами, так и сопутствующими ионами раствора<sup>17, 19</sup>.

Приведенный обзор литературных сведений о свойствах ионообменных целлюлоз показывает, что свойства этого типа ионитов изучены очень мало. Практически отсутствуют сведения о механизмах сорбционных процессов, о количественных законах сорбции неорганических и органических веществ на целлюлозных ионитах. Очевидно, в ближайшие годы этот пробел будет постепенно заполняться соответствующими исследованиями.

#### IV. ТЕХНИКА ПРИМЕНЕНИЯ ИОНООБМЕННЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗ

**Выбор сорбента.** Ионообменные целлюлозы выбирают в соответствии со свойствами и составом разделяемых смесей. Для разделения и анализа белков обычно используют DEAE-целлюлозу. Примерно 80% опубликованных работ по применению ионообменных целлюлоз посвящено хроматографическому анализу белков и из них ~75% выполнено с использованием DEAE-целлюлозы. Около 20% опубликованных работ выполнено с применением CM-целлюлозы, ~3% работ с применением TEAE-целлюлозы. Эти сведения взяты из каталога фирмы «Серва»<sup>12</sup> и иллюстрируются в сводной табл. 2 (см. стр. 268), заимствованной из того же каталога и дополненной нами.

DEAE-целлюлозу используют для разделения ферментов и белков с изоэлектрическими точками в нейтральной и кислой области pH. Ее также применяют для очистки вирусов, хроматографии полисахаридов, липтидов и нуклеотидов. Применение TEAE-целлюлозы аналогично применению DEAE-целлюлозы. В некоторых случаях TEAE-целлюлоза дает более четкие разделения белков и других высокомолекулярных соединений. Целлюлозы АЕ и GE пока находят сравнительно малое применение. Хорошие результаты при разделении нукleinовых кислот и вирусов получаются при использовании ECTEOLA-целлюлозы. CM-целлюлозу используют для анализа нейтральных и основных белков.

Сильнокислые целлюлозы, такие как SE и P, применяют главным образом для хроматографии низкомолекулярных веществ. Своеобразным сорбентом является PAB-целлюлоза. В первичном виде она может быть использована для разделения нукleinовых кислот. Однако этот сорбент имеет одно важное специфическое свойство. Аминогруппы

РАВ-целлюлозы легко диазотируются и соединяются с белками, ферментами, антигенами и другими веществами. Благодаря этому РАВ-целлюлоза приобретает свойства сорбента с избирательными свойствами. Так, например, РАВ-азоантитело избирательно сорбирует антигена, РАВ-азогистон — нуклеотиды, РАВ-азогуанин — нуклеотиды, РАВ-азотирозин — тирозиназу. Ферменты, связанные с РАВ-целлюлозой, теряют свою активность. Открытие такого сорбента предоставляет новые возможности в химии и биохимии. Получение специфических сорбентов имеет крайне важное значение для развития сорбционной техники и хроматографии.

В работе с ионообменными целлюлозами для разделения и анализа смесей веществ используют следующие технические приемы: колоночную, бумажную, тонкослойную хроматографию, дробную сорбцию. Техника эксперимента в каждом из перечисленных приемов различная. Поэтому их необходимо рассмотреть раздельно.

**Колоночная хроматография.** Для опытов обычно готовят колонки ионообменной целлюлозы с соотношением длины к диаметру 10 : 1. Размеры колонок и соответственно массу ионообменной целлюлозы выбирают в зависимости от количества разделяемой смеси, разделятельной способности колонки, требуемых выходов препаративно выделяемых компонентов смеси.

При разделении органических веществ, как правило, используют вытеснительную или элютивную колоночную хроматографию. В качестве элюирующих растворителей применяют буферные растворы. Опыт работы с ионообменными целлюлозами показал, что наилучшие результаты получаются в тех случаях, если сорбент предварительно будет обработан буферным раствором, который предполагается использовать в качестве элюента. При этом происходит насыщение сорбента ионами и другими компонентами в равновесных соотношениях.

При работе с ионообменными целлюлозами было замечено<sup>20</sup>, что в процессе хроматографирования происходит в некоторых случаях, в особенности при работе с концентрированными растворами элюатов, частичное растворение целлюлозы, в результате чего в раствор переходят растворенные целлюлозные фрагменты — полисахариды с иононными группами. Это может привести к ошибкам в результатах хроматографирования.

Появление указанных полисахаридов может быть обнаружено и проконтролировано путем анализа элюатов на содержание полисахаридов<sup>21, 22</sup>. Элюаты легко очищаются от этих примесей, например путем их пропускания через небольшие колонки ионообменных смол<sup>23</sup>.

Необходимо также учитывать, что целлюлоза может подвергаться разрушению под действием фермента целлюлазы<sup>24, 25</sup>. В работе<sup>24</sup> установлено, что есть ионообменные целлюлозы устойчивые и неустойчивые к действию этого фермента. В группу устойчивых ионитов входят целлюлозы Р, СМ и СМ, в группу неустойчивых — DEAE, а также целлюлоза, приготовленная из бумаги Ватман.

Использованные в хроматографическом анализе целлюлозные иониты можно подвергнуть регенерации обычными приемами<sup>26</sup>.

Ионообменные целлюлозы выдерживают непродолжительные воздействия сильных кислот и щелочей<sup>17</sup>.

Как сказано выше, хроматографическое разделение смесей веществ на ионообменных целлюлозах проводят методом вытеснительной хроматографии с применением в качестве растворителей буферных растворов. Коэффициенты распределения или сорбируемости разделенных веществ, различия в которых и предопределяют успех хроматографии

ческого разделения, зависят как от рН раствора, так и от концентрации солей в нем. Подбор и регулирование рН, концентрации солей, а также других компонентов в элюенте позволяют найти оптимальные условия разделения. Опыт работы в области разделения органических веществ на различных сорбентах, в том числе и на ионитах, показывает, что для разделения смесей веществ методом колоночной вытеснительной хроматографии необходимо применять не один элюент, а последовательно несколько элюентов или элюент с непрерывно меняющимся составом. В связи с этим в хроматографии получили распространение такие приемы хроматографирования, как одноступенчатое, многоступенчатое и непрерывное градиентное элюирование.

Существует ряд типов приспособлений для создания градиентов концентрации<sup>12</sup>. Они различаются формой зависимости концентрации элюента от времени.

Вопрос о градиентах элюции, о его теоретических предпосылках и способах практического осуществления активно обсуждается в литературе, в частности при использовании ионообменных целлюлоз<sup>20, 27-34</sup>.

Выбор элюентов и формы градиентов существенно зависит от механизма сорбции диссоциирующих органических веществ на ионитах. К сожалению, это один из мало изученных вопросов как с теоретической, так и с экспериментальной стороны. В рамках обзора можно отметить лишь ряд общих положений, касающихся природы сорбции диссоциирующих органических веществ на ионитах.

Известно, что диссоциирующие органические вещества, как правило, являются амфотерными соединениями. Это значит, что в зависимости от рН раствора у них преимущественно диссоциируют или кислые (отщепление иона водорода) или основные (отщепление иона гидроксила) ионогенные радикалы. В первом случае органические молекулы будут существовать в виде нейтральных молекул и анионов, во втором — в виде нейтральных молекул и катионов. Соотношение между содержанием нейтральных и ионных молекул будет зависеть от степени диссоциации ионогенных радикалов в молекуле органического соединения. При некотором рН — изоэлектрической точке — диссоциация тех и других ионогенных диссоциирующих групп равновероятна. При этом диссоциирующая молекула приобретает свойства дипольного иона (амфиона).

Сорбция диссоциирующих органических соединений на ионитах имеет сложный характер. Можно предположить, что в сорбционном процессе участвуют все типы связей.

Поскольку иониты являются полярными сорбентами, имеющими ионогенные группы с соответствующими ионными связями, то одним из главных механизмов сорбции диссоциирующих веществ на ионитах будет механизм ионообменной сорбции. Как и в случае неорганических веществ, ионитовые колонки можно использовать для выяснения природы органических соединений, их ионного состояния и т. д. Так, например, «основные» соединения при заданном рН будут прочно сорбироваться на катионитах и непрочно — на анионитах.

На сорбируемость диссоциирующих органических соединений будет существенно влиять состав других, сопутствующих ионов в растворе. К сопутствующим ионам можно отнести также водородные и гидроксильные ионы, концентрация которых характеризуется величиной рН раствора. Сопутствующие ионы будут связываться как с сорбентом, так и с диссоциирующими органическими ионами в составе раствора.

Характер распределения сопутствующих ионов между составом сорбента и составом изучаемых органических молекул в растворе зависит

от соответствующих энергий связи и концентрации ионов. Сопутствующие ионы и ионы органического соединения будут конкурировать за сорбционные места в ионите, и поэтому путем изменения концентрации сопутствующих ионов можно изменять коэффициенты распределения сорбируемого органического вещества. В этом процессе наблюдается одна общая закономерность: с увеличением концентрации сопутствующего иона сорбируемость органического диссоциирующего соединения будет падать. Это объясняется тем, что с увеличением концентрации сопутствующих ионов они будут замещать все в большем и большем количестве свободные ионные связи как в ионите, так и в диссоциированных органических молекулах. Таким образом, сопутствующие ионы выполняют роль своеобразного барьера, затрудняющего сорбцию диссоциирующего органического соединения. Именно поэтому растворы электролитов, в том числе и буферные растворы, применяют для элюирования сорбированных диссоциирующих органических веществ. Опыт работы по хроматографии органических веществ показал, что некоторые органические вещества, будучи введенными в колонку сорбента (или на бумагу), не подвергаются элюированию. Это значит, что в применяемом элюенте такие органические вещества не растворяются. Однако, если постепенно увеличивать концентрацию солей в элюенте, то при некоторой «критической» для данного вещества концентрации вещество приобретает практически полную растворимость и начинает передвигаться со скоростью потока элюента. Благодаря тому, что для каждого компонента имеется своя критическая концентрация элюирования, путем градиентного элюирования можно осуществить эффективное разделение смеси органических веществ. Этот способ хроматографического разделения был открыт Тизелиусом<sup>35, 36</sup> при хроматографическом анализе белков. Иногда в литературе его называют способом по принципу «все или ничего» или «высаливателной» хроматографией.

Следует отметить еще одно назначение способа градиентного элюирования.

Одним из отрицательных явлений в хроматографическом процессе разделения смесей веществ является размытие фронтов хроматографических зон. Градиентная элюция является одним из способов преодоления этого отрицательного явления. При градиентном элюировании передние и задние фронты хроматографических зон будут находиться при различных концентрациях элюента — на передних фронтах будут меньшие концентрации, на задних — большие концентрации элюента. Таким образом, в области задних фронтов создаются условия, при которых сорбируемость вещества будет меньшей, чем в области переднего фронта. Это значит, что на заднем фронте десорбция будет идти более интенсивно, чем на переднем. Вследствие этого хроматографические зоны должны стягиваться, превращаясь в острые пики. Эффективность хроматографического разделения при этом улучшается.

*Бумажная хроматография.* Для аналитических целей используют также ионообменную хроматографическую бумагу. Подробные библиографические данные и описание методики работы с ионообменными бумагами можно найти в монографии чехосlovakских ученых<sup>2</sup>. Ряд фирм производит наряду с порошкообразной ионообменной целлюлозой, также и ионообменные бумаги для хроматографии.

Используют два способа проведения хроматографирования на ионообменных бумагах<sup>37</sup>: с «сухим» и с «мокрым» стартом. В первом способе, обычно используемом в бумажной хроматографии, элюирующий растворитель впитывается сухой бумагой. Во втором способе предва-

рительно бумага пропитывается буферным раствором и используется по аналогии с ионообменной колонкой.

Найт<sup>38</sup> установил, что способ с «сухим» стартом дает лучшие результаты при разделении аминокислот.

**Тонкослойная хроматография.** За последние годы в практике хроматографии большим успехом стала пользоваться методика так называемой тонкослойной хроматографии, впервые предложенная Измайловым и Шрайбер<sup>39</sup> и развитая Шталем<sup>40, 41</sup> \*.

Сущность методики заключается в том, что сорбент смешивают с каким-либо цементирующим, связывающим материалом (например, гипсом), и получающуюся при этом пасту наносят тонким слоем ~0,5 мм на стеклянную пластинку. Такой тонкий слой является аналогом колонки или листа хроматографической бумаги. Получают одномерные или двумерные хроматограммы. Основное преимущество тонкослойной хроматографии заключается в том, что благодаря мелкодисперсности (<25  $\mu$ ) сорбирующего материала, нанесенного на стеклянную пластинку, происходит очень быстрое капиллярное поднятие растворителя, и процесс хроматографирования занимает мало времени. На пластинке размером 10×10 см<sup>2</sup> или 15×15 см<sup>2</sup> можно получить четкие разделения смесей веществ. В качестве сорбентов для тонкослойной хроматографии можно использовать ионообменные целлюлозы. Например, фирма «Серва» производит уже готовые порошкообразные ионообменные целлюлозы в смеси с цементирующим материалом, специально предназначенные для тонкослойной хроматографии<sup>12</sup>.

Рекомендуется следующая процедура приготовления пластинок с тонким слоем сорбента. 10 г сорбента интенсивно перемешивают с 60—80 мл воды. При помощи специального станка или другого приспособления наносят тонко ровный слой на пластинку. Успех хроматографирования существенно зависит от техники получения тонкого слоя. Очень важно обеспечить одинаковую толщину слоя. Стеклянная пластинка должна иметь хорошую плоскую ровную поверхность. Нанесенный слой сорбента высушивают при комнатной температуре до воздушно-сухого состояния. Нанесение проб на слой сорбента производят при помощи микропипеток. Пластинки погружают ребром в вертикальном положении в элюирующий растворитель. Фронт элюента передвигается со скоростью ~10 см за 15 минут.

Как и в случае бумажной хроматографии, так и в случае тонкослойной хроматографии очень удобно проводить проявление хроматограмм не только путем реагентов-индикаторов, но и в ультрафиолетовом свете. Например, нуклеотиды могут быть обнаружены в УФ свете ( $\lambda=253 \text{ } \mu$ ) как темные пятна. Белки обнаруживаются в УФ свете после нагревания влажной тонкослойной хроматограммы в течение нескольких минут при 150°.

**Дробная сорбция.** Хесс и Вальтер<sup>43</sup> показали, что в некоторых случаях можно осуществлять селективное выделение отдельных компонентов из анализируемого материала путем простого введения ионообменной целлюлозы в субстрат. Так, например, было осуществлено селективное извлечение некоторых дегидрогеназ из белковой плазмы. Такой способ получил название дробной сорбции. Как экспрессный метод он нашел применение в клинической диагностике. Для этих целей производят специально стандартизованные ионообменные целлюлозы: DEAE-целлюлозу и CM-целлюлозу<sup>12</sup>.

\* Подробный обзор работ по тонкослойной хроматографии см.<sup>42</sup>

### V. ПРИМЕНЕНИЕ ИОНООБМЕННЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗ

**Хроматография белков.** Первые систематические исследования в разработке методики хроматографии белков на ионообменных целлюлозах были проведены Собером, Петерсоном и сотрудниками<sup>8, 9, 10, 44</sup>. Колоночная хроматография на ионообменных целлюлозах была ими применена для анализа состава белков сыворотки крови человека и лошади. В работе использована анионообменная DEAE-целлюлоза. Хроматографирование проводили способом градиентного элюирования. Содержание белков в отдельных фракциях определяли спектроскопическим методом. Кроме того отдельные фракции подвергали дополнительно электрофоретическому разделению. Авторы обнаружили, что при уменьшении градиента pH и увеличении концентрации соли белковые компоненты, как правило, выходят из колонки в порядке уменьшения их изоэлектрических точек. «Загрузку» колонок анионита производили из расчета 170 мг белка на 1 г сорбента. По сравнению с электрофорезом разделительная способность нового метода была значительно выше. В дальнейшем методика Собера—Петерсона была использована для разделения белков сыворотки крови многими авторами<sup>45–50</sup>. Работы выполняли с применением DEAE-целлюлозы<sup>10, 46, 49</sup> и СМ-целлюлозы<sup>45, 47, 50</sup> способом градиентного элюирования.

Когент и Брова<sup>46</sup> разработали методику хроматографического разделения высокомолекулярных соединений сыворотки крови, неосаждающихся сульфосалициловой кислотой. Использовалась DEAE-целлюлоза в фосфатном буфере. При исследовании нормальной и патологической сыворотки крови ими установлено, что высокомолекулярные соединения, неосаждающиеся сульфосалициловой кислотой, оказались мукополисахаридами.

Моррисон и Кук<sup>45</sup> показали, что хорошие результаты в разделении белков можно получить при использовании СМ-целлюлозы. Хесс и Вальтер<sup>43</sup> применили ионообменные целлюлозы для анализа белков крови при клинической диагностике. Собер и др.<sup>51</sup> установили методом хроматографии на ионообменных целлюлозах, что СО-глобулин человека и лошади является более неоднородным белковым веществом, чем гемоглобин собаки.

Ряд работ посвящен хроматографическому анализу СО-гемоглобина<sup>52–54</sup>. Для разделения белков применяли СМ-целлюлозу. Элюирование проводили в фосфатном буфере 0,01 M, создавая «выпуклый» градиент pH от 6 до 8.

В процессе работы было осуществлено не только хроматографическое разделение белков, но и получен чистый глобулин в препаративных количествах. Гемоглобин крови анализировали методом хроматографии на ионообменных целлюлозах также и многие другие авторы<sup>55–58</sup>. Этот же метод был использован для хроматографического анализа различных других белков: меромиозина<sup>59, 60</sup>, I-миозина<sup>61</sup>, инсулина<sup>62</sup>, β-γ-казеина<sup>63</sup>, γ-глобулинов<sup>64</sup>, β-лактоглобулина<sup>65</sup> и других.

Были подвергнуты также хроматографическому анализу сложные биологические материалы, такие, как яичный белок<sup>66, 67</sup>, белки молока<sup>68, 69</sup> и другие. Методом хроматографии на ионообменных целлюлозах были открыты новые, неизвестные ранее белки. Например, Родес и другие<sup>67</sup> обнаружили в яичном белке ряд новых белковых компонентов, применяя элютивную хроматографию на СМ-целлюлозе.

Опубликован ряд работ по разделению растительных белков<sup>70, 72</sup>. При анализе белков соевых бобов было обнаружено несколько неидентифицированных пока белковых фракций<sup>71</sup>. В работе<sup>70</sup> авторы обнаружили 6 белковых фракций в белках семян ячменя.

**Хроматография ферментов.** В ряде работ хроматография на ионообменных целлюлозах была успешно применена для разделения и выделения ферментов. Например, Арне<sup>73</sup> при помощи колонки DEAE-целлюлозы анализировал желудочную инвертазу и мальтазу. Оказалось, что мальтаза состоит из трех компонентов, а инвертаза является однокомпонентным ферментом.

Таборски<sup>74</sup> хроматографией на СМ-целлюлозе разделил рибонуклеазу на четыре компонента.

Исполатовская, Ледвилова и Ларина<sup>75, 76</sup> использовали DEAE- и ECTEOLA-целлюлозы для разделения и препаративного выделения лейцитиназы, полигеназы и гиалуронидазы токсина бактерий. Хроматографический анализ ферментов был осуществлен также в работах ряда других авторов<sup>77, 78</sup>.

Опубликовано много работ, в которых ионообменные целлюлозы использованы для очистки ферментов<sup>79–88</sup>. Например, фермент дегидраза, выделенный из печени крысы, был очищен с помощью DEAE-целлюлозы, при этом его активность увеличилась в 250 раз<sup>86</sup>.

Гроссберг и др.<sup>87</sup> при помощи того же метода получили увеличение щелочно-фосфатазной активности фермента, выделенного из кишечника и печени человека, в 15–140 раз.

Описан метод 50-кратной очистки карбоксилазы дрожжей посредством хроматографии на колонке СМ-целлюлозы. Полученный таким путем фермент сохранял свою активность при 5° в течение длительного времени. Ионообменные целлюлозы использованы для очистки гормонов<sup>89–91</sup>, антигенов<sup>92, 93</sup>, плазмогена<sup>94</sup>.

Броун и Дуан<sup>95</sup> разработали методику препаративного выделения при помощи больших колонок ионообменной целлюлозы очищенного миоглобина и сырых мышечных экстрактов. Николаев показал возможность концентрирования белков при помощи колонок с DEAE-целлюлозой<sup>15</sup>.

**Хроматография нуклеиновых кислот и нуклеотидов.** Бендич и другие<sup>96</sup> впервые применили ионообменные целлюлозы для разделения и анализа состава нуклеиновых кислот, испытав с этой целью ряд ионообменных целлюлоз, из которых наилучшие результаты были получены с ECTEOLA-целлюлозой. Было осуществлено хроматографическое фракционирование ДНК, различающихся составом гетероциклических оснований. Хроматографическое фракционирование ДНК при помощи ECTEOLA-целлюлозы производили также и другие авторы<sup>97–99</sup>. В одной из работ<sup>100</sup> показана возможность разделения ДНК при помощи DEAE-целлюлозы.

Стекилин и другие<sup>101, 102</sup> использовали DEAE-целлюлозу при изучении нуклеотидной последовательности в РНК. При хроматографировании гидролизата дрожжевой РНК, обработанной панкреатической РНК-азой, обнаружен целый комплекс различных моно- и полинуклеотидов: мононуклеотиды — уридиновая и цитидиловая кислоты; динуклеотиды — АЦ, АУ, ТЦ, ТУ; тринуклеотиды — ААЦ, ААУ, ГАЦ, АГЦ, ГАУ, АГУ, ГГУ, ГГЦ, а также некоторые тетрануклеотиды. Даже нуклеотиды — изомеры ГАЦ и АГЦ были хорошо разделены.

Миколай и другие<sup>103</sup> применили ECTEOLA-целлюлозу для отделения РНК от миозина мышцы. При хроматографировании происходило разделение РНК и белка. Если первоначальное отношение РНК/белок составляло 1,3, то после хроматографирования субстрата оно изменилось до 0,02. В некоторых опытах содержание белка во фракции РНК было уменьшено в 50–60 раз. Вард и Патч<sup>104</sup> разработали путем применения ECTEOLA-целлюлозы метод разделения смеси ДНК и РНК.

Можно сослаться и на ряд других работ, в которых ионообменные целлюлозы были использованы для разделения нуклеиновых кислот и нуклеотидов<sup>105-108</sup>.

ECTE0ZA- и DEAE-целлюлозы использовали также для разделения и очистки вирусов<sup>109-113</sup>. Например, Хейер и Болтон<sup>111</sup> с помощью указанных ионообменных целлюлоз производили выделение и очистку некоторых животных вирусов. Перспективность этого способа для вирусологии и в особенности при производстве вакцин очевидна.

Рандерат<sup>114</sup> разделял смесь нуклеотидов методом тонкослойной хроматографии в течение 5 минут, используя ECTEOLA- и DEAE-целлюлозы.

*Хроматография низкомолекулярных органических веществ.* Раузер и другие<sup>115</sup> проводили на колонках с DEAE-целлюлозой хроматографическое разделение липидов, выделенных из мозга крупного рогатого скота. Установлен следующий состав липидов: холестерин 20,3%, церамид 0,3%, церабозид 16,8%, церабозидсульфат 3,5%, лейцинин 11%, фосфатилэтаниламин 17% и другие.

Хери и Ньюком<sup>116</sup> провели успешное разделение на колонках DEAE-целлюлозы пектиновых веществ, выделенных из свеклы и яблок. Было получено несколько фракций пектинов, отличающихся содержанием арабинозы и галактозы, а также степенью этерификации и полимеризации. Установлено также, что чем выше степень полимеризации и ниже степень этерификации, тем более прочно сорбируются пектиновые вещества на DEAE-целлюлозе.

Методом элютивной хроматографии на колонке DEAE-целлюлозой Мюллэр и др.<sup>117</sup> выделили из почвы пять фракций полисахаридов, различающихся содержанием уроновых кислот. Ионообменные целлюлозы использованы для выделения серомукоидов из сыворотки крови<sup>118</sup>.

Павелькевич<sup>119</sup> применил ионообменную целлюлозу для выделения и очистки витамина B<sub>12</sub>.

Серия работ посвящена применению ионообменных целлюлоз для разделения аминокислот<sup>38, 120, 121</sup>. Сравнительное изучение возможностей колоночной хроматографии аминокислот на ионообменных смолах и целлюлозах показало, что последние особыми преимуществами по сравнению со смолами не обладают<sup>120</sup>.

Ионообменные целлюлозы были с успехом использованы для разделения АМФ, АДФ и АТФ<sup>101</sup>, пептидов<sup>122</sup> и сахарофосфатов<sup>17</sup>.

*Хроматография неорганических ионов.* Выше уже были упомянуты работы Хеда и сотрудников по применению хроматографии на ионообменных целлюлозах для анализа неорганических веществ. Ими было показано, что ионы Fe<sup>3+</sup>, Ce<sup>4+</sup>, UO<sub>2</sub><sup>2+</sup>, U<sup>4+</sup>, Th<sup>4+</sup>, ZrO<sup>2+</sup> сильно сорбируются Р-целлюлозой из растворов кислот, в противоположность их поведению на сульфосмолах. Элюция этих ионов может быть осуществлена реагентами, которые связываются с ними в прочные комплексы. Так, например, Th<sup>4+</sup> и UO<sub>2</sub><sup>2+</sup> количественно элюируются 10%-ным раствором (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Fe<sup>3+</sup> — хлоруксусной кислотой, ZrO<sup>2+</sup> — фтористым аммонием и т. д.

Теми же авторами были успешно разделены смеси Bi и Pb, Cu и Cd, Cu и Co, Cu и Ni. Например, разделение Bi и Pb осуществлено путем элюирования Pb раствором 1N HNO<sub>3</sub>, Bi элюировали 1N раствором HCl, в котором Bi дает анионные комплексы. Отделение Cu от Cd, Co и Ni было осуществлено путем элюирования раствором 1M MgCl<sub>2</sub>. Оставшаяся в колонке после этого медь удалялась путем пропускания HCl.

Церал и Теста<sup>19</sup> синтезировали новый тип анионообменной целлюлозы TOAC (три-*n*-октиламинцеллюлоза) с очень высокой емкостью ~1 мг-экв/г. При помощи этого ионита они разделили смесь Fe<sup>3+</sup>, Co<sup>2+</sup> и Ni<sup>3+</sup>, использовав в качестве элюента 0,8 M HCl. В соляной кислоте Fe и Co дают анионные комплексы, сорбирующиеся анионитом, а Ni не образует комплексы и передвигается вместе с элюентом. Для разделения Co и Fe использовали в качестве элюента 3M HCl — происходила элюция кобальта, железо не элюировалось. Различия в ионообменной сорбции и комплексообразовательной способности были использованы для разделения смеси Th, Zr и U. Успешно осуществлено также разделение смесей La и Th, Zr и La, Zr и Hf и других.

*Применение ионообменной бумажной и тонкослойной хроматографии.* Ионообменная бумажная хроматография была успешно применена для разделения аминокислот<sup>38</sup>, барбитуратов<sup>123, 124</sup>, органических кислот<sup>125</sup>, белков<sup>126</sup>, неорганических ионов<sup>127—129</sup> и других веществ.

Картейн<sup>126</sup> разделил белки сыворотки крови на DEAE-целлюлозе с ионообменной емкостью ~0,003 мг-экв/см<sup>2</sup>. Разделение проведено методом градиентного элюирования с градиентом pH и ионной силы раствора. При этом нужные градиенты создавались с применением программного фотоэлектрического устройства. На бумажной полосе было получено разделение альбумина, β- и γ-глобулинов.

Стрит<sup>123, 124</sup> осуществлял на DEAE-бумаге разделение смеси 5,5-замещенных барбитуратов. В качестве элюента использован трет.-C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>OH с 0,1M раствором Na-соли этилендиаминететрауксусной кислоты (1:1). Разделение проводили способом круговой хроматографии. Удалось разделить смесь фенолбарбитона, барбитона, бутанолбарбитона и хинолбарбитона. Хроматографические зоны обнаруживались в УФ свете.

Майр<sup>125</sup> описал разделение органических кислот на СМ-бумаге. В качестве подвижной фазы использована смесь бутанол—этанол—вода (4:1:5).

Глюконовые и глюкуроновые кислоты разделяются лучше на более кислой целлюлозе.

Кембер и др.<sup>127</sup> применили фосфорилированную бумагу для разделения катионов. Для разделения анионов они получили бумагу, обработанную 2-аминоэтилсульфокислотой.

Черрай и Теста<sup>128</sup> изучали хроматографическое поведение неорганических катионов на бумаге ICB1, обработанной 0,02N раствором 3-*n*-октилфосфиноксида в циклогексане. В качестве подвижной фазы использовали растворы соляной, азотной и серной кислот различных концентраций. Они приводят зависимости величины R<sub>F</sub> от концентрации кислоты для 50 катионов металлов. Успешно проведено разделение таких смесей как Sr—Y, Bi—Hg—Rt, U—Mo—Y—La; Th—Y—La—Ca; U—Tl—Fe—Ge.

На анионообменной бумаге, полученной путем обработки бумаги Ватман 3-*n*-октиламином, разделяли смеси Fe—Co—Ni и Zn—Co—Mn—Ni, используя способность этих металлов образовывать анионные комплексы в растворах HCl<sup>22</sup>.

Рандерат и Струк<sup>37</sup> методом тонкослойной хроматографии на ионообменных целлюлозах осуществили разделение сложных смесей гетероциклических оснований и нуклеотидов. Ими предложена для этого следующая методика. На пластинку наносят тонкий слой ионообменной целлюлозы ECTEOLA, СМ или DEAE-целлюлозы (масса 10 г). Для хроматографирования берут количество вещества около 2—5 μ. В качестве подвижной фазы использовали воду, фронт которой перемещался со скоростью 10 см за 3 минуты.

ТАБЛИЦА 2

## Предметный библиографический указатель применения ионообменных целлюлоз

Вещества	Сорбенты	Ссылки на литературу	Вещества	Сорбенты	Ссылки на литературу
Аденозин-5'-фосфат	CM, DEAE	131	Глютамин декарбоксилаза	DEAE	195
Аланин, активирующий pH 5 энзимы	DEAE	132, 133	Глютамин дегидрогеназа	DEAE	196, 197
Альбумин (сыворотка человеческой крови)	CM, DEAE	134—136	Глютамин трансамилаза	CM	198
Альдегид дегидрогеназа	CM, DEAE	137	γ-Глютамин цистеин синтетаза	DEAE	199
Альдолаза	DEAE	138	Глютатион пероксидаза	DEAE	81
Алкоголь дегидрогеназа	CM, DEAE	139, 140	Глютатион синтетаза	DEAE	200
Аминоглюкозидаза	DFAE	141	Глютион (пищница)	CM	201
Аминокислоты	DEAE	120	Глюкопептиды	DEAE	202
L-Аминокислая оксидаза	DEAE	142	α-Глюкопротеин	DEAE	203
Аминоацил-p РНК-синтетаза	DEAE	143	Гонадотропин	DEAE	204, 205
Аминоацил-p РНК-ферменты рибосом	DEAE	144	Гормоны	CM	206—209, 120
γ-Аминобутиальдегид дегидрогеназа	DEAE	145	DНК	DEAE	89, 90, 211
Аминооксидаза	AE	84	DНК-полимераза	DEAE	212—218
Антисерум (дифтерия)	SE, SM	146	Дезоксирибонуклеотиды	DEAE	219, 220
Аспартатаза	DEAE	16	Дезоксирибонуклеаза	DEAE	221—224
Ацетиламонокирбоксикислая гидролаза	DEAE	147	Дигидроксидеидгидраза	DEAE	225, 226
Ацетилтрипсин	DEAE	148	Диафлораза	DEAE	228
Ацетилтрипсаноген	DEAE	149	Дифосфогалактоза-4-эпимераза	DEAE	230
Белки:			DГН-L-гулонат дегидрогеназа	DEAE	190
диглицин, триглицин	DEAE, ECTEOLA	150	Желатина	CM	231
альбумин	DFAE	151	Инсулин	DEAE	62
ацетилтрипсин	DEAE	152	Инсулиниаза	DEAE	232, 233
СО-фабриц	DEAE	153	Инвертаза	TEAE	234
γ-Глобулин	CM	154—157	Карбамилфосфат-синтаза	DEAE	235
Овальбумин	DEAE	158	Карбоангидраза	DEAE	236
Вирус (бактериофаг T2)	ECTEOLA	110, 159	Карбоксипептидаза	DEAE	237
Вирус (LCHO)	ECTEOLA	160	Каталаза	DEAE	238, 239
Вирус (табачная мозайка)	CM	161	Катепсин	DEAE	240
	DEAE	162	Клеточные белки	DEAE, CM, SM	241
	ECTEOLA	109, 113	Клеточные стимулирующие гормоны	CM	242
Вирус (картофель X)	DEAE	162	Кобаланин	DEAE	243
Вирус (вакцина)	ECTEOLA	163	Ко-руюлазмин	DEAE	244, 245
Витамин B <sub>12</sub>	P-целлюлоза	119	Колаген	CM	127
Витамин K <sub>1</sub> — редуктаза	DEAE	164—166	Колагеназа	DEAE	246
β-Галактозидаза	TEAE	167	Кортикотропин	DEAE	247, 248
Гаптоглобин	DEAE	168	Креатинин — диминаза	DEAE	249
Гемоглобин	CM	169	Креатинин — трансаминаза	DEAE	249
Гемоглобин (CO—A и F)	CM	51, 56—58	2-кето-3-д'окси-D-глюкоиназа	DEAE	250
Гексокиназа	DEAE	55	Лактатдегидрогеназа	DEAE	85
Гепарин	ECTEOLA	170	Лактоальдегид дегидрогеназа	DEAE	85
Гидрогеназа	DEAE	171, 172	Лактатдегидрогеназа	DEAE	43, 251—255
α-Дрокси-β-кетор-дуктоизомераза	DEAE	173, 174	Л-Лактатдегидрогеназа	DEAE	256
β-Дроксипропионат дегидрогеназа	DEAE	175	Л-Лактатдегидрогеназа	DEAE	257, 258
20-β-Гидроксисульфата-	DEAE	176	Л-Лактатдегидрогеназа	DEAE	257, 258
Гипоксантин — дегидрогеназа	DEAE	177	М-Лактатдегидрогеназа	DEAE	259
Гистон	CM	158, 179	Милат синтетаза	DEAE	260
Гистоген	P-целлюлоза	180	Милат-дегидрогеназа	DEAE	261
	CM	181	Малико-фермент	DEAE	262
Гликоловокислая оксидаза	DEAE	182	Малонил Ко — А дегидрогеназа	DEAE	263
Глицеральдегидрофосфат дегидрогеназа	DEAE	183	Малонил Ко — А оксидаза	DEAE	264
α-Глицерофосфат — дегидрогеназа	DEAE	184	Мальтаза	TEAE	234
Глицерилглицидаза	DEAE	185	Меромозин	DEAE	60, 264
γ-Глобулин	CM	154, 186	β-Метил-спартаза	DEAE	265
Глюказо-б-фосфат дегидрогеназа	DEAE	187—189	Метилмалнат изомераза	DEAE	266
	P-целлюлоза	188	Микросомальный экстракт	DEAE	267
Глюказо-б-фосфат	DEAE	190	Мукополисахарид — сульфотрансфераза	DEAE	268
Глюказидаза	DEAE	191	Миоглобин	DEAE	95, 269
α-Глюказидаза	DEAE	192	Миозин	CM	240, 271
β-Глюказидаза	DEAE	193	Неорганические ионы	DEAE	61, 225, 272
	TEAE	194	Р-целлюлоза	ECTEOLA	17, 127
			Нуклеопептиды	ECTEOLA	273
			Нуклеопротеины	ECTEOLA	274, 275

ТАБЛИЦА 2 (Продолж.)

Вещества	Сорбенты	Ссылки на литературу	Вещества	Сорбенты	Ссылки на литературу
5-Нуклеотидаза	DEAE	276	Сульфат оксидаза	DEAE	324
Нуклеотиды	DEAE	277	Сыворотка крови цыпленка	DEAE	325
	TEAE	278	Сыворотка крови человека	DEAE	10, 26, 47, 64, 326—328
Нуклеотид, трансфосфорилаза	ECTEOLA	279	Тиротропин	CM	90, 329, 330
Орнитин карбамил-трансамидаза	DEAE	280	Трансальдолаза	DEAE	331
Овомуконид	TEAE	281	Трансамида	AE, DE	101
Пенкреаза	CM, DEAE	282, 283	Транскетолаза	DEAE	189
Парацепсиноген	DEAE	284	T11H	DEAE	190
Пепсиноген	DEAE	285	Трипсин	CM	333—335
Пероксидаза	TEAE	286	Трипсин — ингибитор	CM, DEAE	336—338
	CM	287	Трипсиноген	CM	335
Пиридоксинфосфат-дегидрогеназа	DEAE	288	Триптантиприлаза	DEAE	339
Плазминоген	CM, DEAE	88, 289	Тиразиназа	DEAE	340—342
Полигалактуроназа	CM	290	Тиразин-трансаминаза	DEAE	343
Полиол-дегидрогеназа	DEAE	291	Уридин-фосфат-гальактозо-4-эпимераза	DEAE	344
Полисахариды	DEAE	58	Уридин-фосфат-глюказ-1-п-фосфат-иза	DEAE	345
Прокарбоксипептидаза	DEAE	117, 292	Уридин-фосфат-глюказ-п-фосфорилаза	DEAE	346
Прокарбоксипептидаза А	DEAE	293	Уридининаза	CM, DEAE	347
Прокарбоксипептидаза В	DEAE	215	Урокиназа	DEAE	348
Протеиназа	DEAE	294	Уропептиноген	DEAE	349
Протеин-fosfokinаза	DEAE	295	Фениксидаза	DEAE	349
Протеогликанский ингибитор	DEAE	296	Ферменты тимуса теленка	DEAE	350
Протромбин	DEAE	297	Ферритин	DEAE	351
Производные фолиевой кислоты	TEAE	298	Фбриноген	DEAE	352
Рибофлавин-5'-фосфат	DEAE	299	Флавин-нуклеотид	DEAE	353
Рибонуклеаза	CM	30	Флавон	DEAE	300
	DEAE	74, 301—305	Фосфагаза кислая	CM	354
	DEAE	306, 307	Фосфатаза основная	DEAE	355, 356
Рибонуклеазный ингибитор РНК	ECTEOLA	308	Фосфодиэтераза	ECTEOLA	357
РНК-«растворимая»	ECTEOLA	103, 107, 309—312	Фосфоглюконат	CM, DEAE	87
	DEAE	313—316	Фосфомоноэстераза	DEAE	358—361
	DEAE	106, 317	Фосфопротеин	TEAE	190
<i>Рибонуклеотиды:</i>					
Аденинмононуклеотиды	DEAE	101	Фосфопротеин-фосфата-за	DEAE	286, 362
Адениннуклеотиды	DEAE	108	Фосфоксидаза	DEAE	363
	ECTEOLA	318	Фосфорилаза (картофель)	ECTEOLA, TEAE	364
Олигонуклеотиды	DEAE	101, 102	Фосфогрансбутирилаза	DEAE	365
РНК-гидролаза	ECTEOLA	319	Хлорпроксидаза	DEAE	366
Полинуклеотид коэнзим	ECTEOLA	320	Химотрипсиноген	CM, DEAE	367
Сукцинатдиаминотрансамидаза	DEAE	321	α-Химотрипсиноген-производные	CM	368
Сульфат-нуклеотид	ECTEOLA	322	Цитохром С	CM	369, 370
Сульфат-редуцирующий фермент	DEAE	323	Эластаза	CM	371
			Энолаза	SM	372
					373
					60, 374, 375
					233, 375
					376

Получены следующие значения  $R_f$  для ряда оснований: аденин 0,30, аденоzin 0,53; гипоксантин 0,55, инозин 0,70, гуанин 0,37, гуанозин 0,58, урацил 0,72, уридин 0,81. Для разделения нуклеотидов использовали смесь бутанола, ацетона, уксусной кислоты, 5%  $\text{NH}_4\text{OH}$  и воды (4,5 : 1,5 : 1 : 1 : 2). Скорость движения фронта была  $\sim 10 \text{ см}$  на 1 минуту. Получены следующие значения  $R_f$ : АМФ 0,38, ЦДФ 0,22, УТФ 0,13, АДФ 0,26, АТФ 0,16. Более полный обзор применения тонкослойной хроматографии на ионообменной целлюлозе дан Рандератом в другой работе <sup>130</sup>.

## ЛИТЕРАТУРА

1. З. А. Роговин, Химия целлюлозы и ее спутников, Госхимиздат, 1953.
2. Хроматография на бумаге. Под редакцией И. Хайса и К. Мацека. ИЛ, 1963.
3. E. Broda, T. Schönfeld, Monatsh. Chem., 81, 459 (1950).
4. H. Bräuniger, Grundlagen und allgemeine Frangen der Papierchromatographie, Volk und Gesundheit, Berlin, 1955.

5. Goppelsröder, Kapillaranalyse. Birkhäuser, Basel, 1901.
6. W. Lautsch, G. Manecke, W. Broser, Naturforsch., **86**, 232 (1953).
7. F. Michel, P. Albers, Mikrochim. acta, **1954**, 489.
8. H. Sober, E. Peterson, J. Am. Chem. Soc., **76**, 1711 (1954).
9. E. Peterson, H. Sober, Там же, **78**, 751 (1956).
10. H. Sober, F. Gutte, Mary Wyckoff, E. Peterson, J. Am. Chem. Soc., **78**, 756 (1956).
11. J. Røgård, Arkiv Kemi, **B. 11**, № 2, 97 (1957).
12. «Serva» — Cellulose ion exchangers, Heidelberg, FRG, 1962.
13. J. O'Donnell, E. Thompson, Austral. J. Biol. Sci., **13**, № 1, 69 (1960).
14. В. В. Рачинский, Е. Г. Давидова. Доклады ТСХА, **84**, 350, 1963.
15. С. С. Гусев, М. А. Катибинков, И. Н. Ермоленко. Колл. ж. **25**, 140 (1961).
16. А. Я. Николаев, Биохимия, **27**, 487 (1962).
17. A. I. Head, N. F. Kember, R. P. Miller, P. A. Wells, J. Chem. Soc., **1958**, 3417.
18. H. A. Veder, C. N. Pascha, Biochim. Biophys. Acta, **47**, 408 (1961).
19. E. Cerral, C. Testa, J. Chromatogr., **6**, 443 (1961).
20. B. Drake, Arkiv Kemi, **8**, 1 (1955).
21. R. Dreywood, Ind. Eng. Chem. Anal. ed., **18**, 499 (1946).
22. E. H. Fischer, L. Kohties, Helv. Chim. Acta, **34**, 1123 (1951).
23. M. S. Doscher, P. C. Wilcock, J. Biol. Chem., **236**, 1328 (1960).
24. J. H. McClendon, Biochim. Biophys. Acta, **48**, 398 (1961).
25. E. A. Peterson, Mary Wyckoff, H. Sober, Arch. Bioch. Biophys., **93**, 428 (1961).
26. H. Sober, E. Peterson, Federat. Proc., **17**, 1116 (1958).
27. R. S. Alm, R. Williams, A. Tiselius, Acta chem. Scand., **6**, 826 (1952).
28. R. M. Bock, N. S. Ling, Anal. Chem., **26**, 1543 (1954).
29. E. Geiss, Physiol. Chem., **308**, 74 (1957).
30. C. W. Parr, Biochem. J., **56**, XXII (1954).
31. E. Peterson, Anal. Chem., **31**, 857 (1959).
32. A. Nikolajev, S. Mardashev, J. Chromatogr., **6**, 53 (1961).
33. Я. А. Николаев, С. Р. Мордашев, Биохимия, **27**, 330 (1962).
34. W. Björk, J. Svensson, J. Chromatogr., **8**, 479 (1962).
35. A. Tiselius, Angew. Chem., **67**, 245 (1955).
36. F. Turba, Advances in enzymology, **22**, 417 (1960).
37. R. Randerath, H. Struck, J. Chromatogr., **6**, 365 (1961).
38. C. S. Knight, Nature, **194**, 90 (1962).
39. Н. А. Измайлов, М. С. Шрайбер, Фармация, № 3, 1, (1938).
40. E. Stahl, Arch. Pharmazie, **292** 164, 411 (1959).
41. E. Stahl, Ztschr. analyt. Chem., **181**, 303 (1961).
42. Л. А. Николаев, Усп. химии, **32**, 1087 (1963).
43. B. Hess, S. Walter, Klin. Wochenschrift, **39**, 213 (1960).
44. F. J. Gutte, H. A. Sober, E. Peterson, Arch. Bioch. Biophys., **62**, 427 (1956).
45. M. Morrison, J. Cook, Fed. Proc., **16**, 763 (1957).
46. A. Kogent, L. Broda, J. Chromatogr., **5**, 542 (1961).
47. K. B. Cooke, M. P. Tombs, R. D. Weston, F. Souter, N. Madagan, Clin. chim. acta, **4**, 779 (1959).
48. H. C. Godal, E. F. Luscher, Scand. J. Chim. and Lab. Invest., **12**, 47 (1960).
49. M. Steinbuch, M. Quentin, Nature, **190**, 4781 (1961).
50. A. Barkorovainy, D. Donerty, Arch. Bioch. Biophys., **96**, 491 (1961).
51. F. Gutte, E. Peterson, H. Sober, Там же, **80**, 363 (1959).
52. Th. Huisman, E. Maritis, A. Dozy, J. Lab. Clin. Med., **52**, 312 (1958).
53. Th. Huisman, A. M. Dozy, Analys. Bioch., **2**, 400 (1961).
54. Th. Huisman, A. M. Dozy, J. Chromatogr., **7**, 180 (1962).
55. A. Saha, Biochim. Biophys. acta, **32**, 259 (1959).
56. H. K. Prins, J. Chromatogr., **2**, 445 (1959).
57. H. M. Dintzis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **47**, 247 (1961).
58. H. Holzer, H. W. Goede, Biochim. Biophys. Acta, **40**, 297 (1960).
59. H. Mueller, S. V. Perry, Biochim. J., **80**, 217 (1961).
60. H. Mueller, S. V. Perry, Biochim. Biophys. Acta, **40**, 187 (1960).
61. S. V. Perry, Biochim. J., **74**, 94 (1960).
62. M. Volini, M. A. Mitz, J. Am. Chem. Soc., **82**, 4572 (1960).
63. M. L. Groves, T. Mc. Meekin, N. Hipp, W. Gordon, Biochim. Biophys. Acta, **57**, 197 (1962).
64. J. L. Fahey, A. P. Horbett, J. Biol. Chem., **234**, 2645 (1959).
65. K. Piez, E. W. Davie, J. Folk, J. A. Gladner, Там же, **236**, 2912 (1961).
66. M. Stanley, J. Chromatogr., **3**, 256 (1960).
67. M. Rhodes, W. Bennet, R. Feeney, J. Biol. Chem., **234**, 2054 (1959).

68. N. R. Tarassuk, M. Yaguchi, J. Dairy Sci., **45**, 253 (1962).  
 69. M. Yaguchi, N. Tarassuk, H. Hunziker, Там же, **44**, 589 (1960).  
 70. G. Van, G. Preaux, R. Lontie, Arch. internat. physiol. biochim., **69**, 605 (1961).  
 71. Y. Birk, A. Gertler, H. Lis, N. Sharon, Bull. Res. Counseil Israel., **A10**, № 1, 41 (1961).  
 72. E. Tor-Magnus, Suomen Kemistiseuran tiedon, **70**, № 2, 73 (1961).  
 73. D. Arpe, Acta Chem. Scand., **13**, 1817 (1959).  
 74. G. Taborsky, J. Biol. Chem., **234**, 2652 (1959).  
 75. М. В. Исполатовская, Г. А. Левдикова, И. А. Ларина, Биохимия, **27**, 82 (1962).  
 76. М. В. Исполатовская, Г. А. Левдикова, Там же, **27**, 631 (1962).  
 77. W. S. Morgan, T. Hultin, Biochim. Biophys. Acta, **47**, 190 (1961).  
 78. H. M. Haddad, J. E. Rall, Condrocrinology, **67**, 413 (1960).  
 79. M. Chiga, A. E. Rogers, G. Plant, J. Biol. Chem., **236**, 1300 (1961).  
 80. C. Bublitz, J. L. Yock, Biochim. Biophys. Acta, **48**, 561 (1961).  
 81. G. C. Mills, J. Biol. Chem., **234**, 502 (1958).  
 82. S. Paleus, H. Tuppur, Acta Chem. Scand., **13**, 641 (1959).  
 83. M. A. Hennessey, A. M. Haffner, B. W. Gabrio, Fed. Proc., **19**, 65 (1960).  
 84. G. Semenza, Helv. Chim. Acta, **43**, 1057 (1960).  
 85. H. K. Gupta, N. G. Robinson, J. Biol. Chem., **235**, 1609 (1960).  
 86. H. Hakamura, D. Greenberg, Arch. Bioch. Biophys., **93**, 153 (1961).  
 87. A. L. Grossberg, E. H. Harris, R. Schlamowitz, Arch. Bioch. Biophys., **93**, 267 (1961).  
 88. V. Boffi, M. Lucarellit, Giorn. biochim., **18**, 161 (1959).  
 89. S. L. Steelman, A. Segaloff, R. Andersen, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **101**, 452 (1959).  
 90. P. G. Condliffe, R. W. Bates, R. M. Frap, Bioch. Biophys. Acta, **34**, 430 (1959).  
 91. S. Ellis, M. E. Simoson, J. Biol. Chem., **220**, 939 (1956).  
 92. D. Campbell, G. Lüscher, L. Lerman, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **37**, 575 (1950).  
 93. J. Bishop, Bioch. Biophys. Acta, **50**, 471 (1961).  
 94. J. I. Hagan, F. B. Abblondi, E. C. DeRenzo, J. Biol. Chem., **235**, 1005 (1960).  
 95. W. Brown, J. Biol. Chem., **236**, 2238 (1961).  
 96. A. Bendich, A. B. Pahl, G. C. Korngold, H. Rosenkranz, J. Fresco, J. Am. Chem. Soc., **80**, 3949 (1958).  
 97. H. M. Klouwen, J. Chromatogr., **7**, 45 (1962).  
 98. S. Kit, Arch. Bioch. Biophys., **87**, 318 (1960).  
 99. S. M. Beiser, H. B. Pahl, H. S. Rosenkranz, A. Bendich, Biochim. Biophys. Acta, **34**, 497 (1959).  
 100. B. Bakay, L. B. Kirschner, G. Toennies, Biochim. Biophys. Res. Commun., **2**, 459 (1960).  
 101. M. Staehelin, Bioch. Biophys. Acta, **49**, 11 (1961).  
 102. M. Staehelin, E. Peterson, H. Sober, Arch. Bioch. Biophys., **85**, 292 (1960).  
 103. E. Mihalyi, F. Bradley, M. Knoller, J. Am. Chem. Soc., **79**, 6387 (1957).  
 104. D. N. Ward, I. D. Putch, Makromol. Chem., **38**, 230 (1960).  
 105. H. B. Pahl, S. M. Baiser, A. Bendich, Fed. Proc., **16**, 230 (1956).  
 106. R. Monier, H. Stephenson, P. G. Zamechik, Biochim. Biophys. Acta, **43**, I (1960).  
 107. D. Goldthwait, J. Biol. Chem., **234**, 3245, 3251 (1959).  
 108. A. Stevens, R. Hilmoe, J. Biol. Chem., **235**, 3050 (1958).  
 109. B. Commoner, G. Cochran, Nature, **178**, 767 (1956).  
 110. E. H. Greaser, A. Taussig, Virology, **4**, 200 (1957).  
 111. B. H. Hayter, B. T. Bolton, Science, **127**, 859 (1958).  
 112. H. G. Kemperer, G. Pereiran, Virology, **9**, 536 (1959).  
 113. P. Tavel, Arch. Bioch. Biophys., **85**, 491 (1959).  
 114. R. Randerath, Angew. Chem. **73**, 674 (1961).  
 115. G. Rouser и другие, J. Amer. Oil. Chem. Soc., **38**, 544 (1961).  
 116. W. Heri, H. Neukom, Helv. Chim. Acta, **44**, 1939 (1961).  
 117. Max Muller, N. C. Mehta, H. Denel, Ztschr. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde, **90**, 139 (1960).  
 118. G. Biserte, R. Havez, I. Laturaz, L. Hayem, Compt. Rend. Soc. Biol., **154**, (1960—1961).  
 119. J. Pawelkiwcz, W. Walerych, W. Fridrich, K. Bernhayu, J. Chromatogr., **3**, 359 (1959).  
 120. D. L. Buchanan, Anal. Chem., **32**, 1400 (1960).  
 121. C. S. Knight, J. Chromatogr., **8**, 205 (1962).  
 122. S. Yanari, M. Volini, A. M. Mitz, Biochim. Biophys. Acta, **45**, 595 (1960).  
 123. H. V. Steet, S. K. Niyogi, Nature, **190**, 537 (1961).  
 124. H. V. Steet, J. Chromatogr., **7**, 64 (1962).

125. D. V. Myhre, F. Smith, *J. Org. Chem.*, **23**, 1229 (1958).  
 126. C. C. Curtain, *Nature*, **191**, 1269 (1961).  
 127. N. F. Kember, R. A. Wells, *Nature*, **175**, 512 (1955).  
 128. E. Cerrai, C. Testa, *J. Chromatogr.*, **7**, 112 (1962).  
 129. C. Testa, *Tam же*, **5**, 236 (1961).  
 130. R. Randerath, *Angew. Chem.*, **74**, 48 (1962).  
 131. T. H. Farmer, *Biochem. J.*, **73**, 321 (1958).  
 132. R. W. Hollay, J. Goldstern, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1765 (1959).  
 133. G. C. Webster, *Bioch. Biophys. Acta*, **49**, 141 (1961).  
 134. J. H. Cohen, A. H. Gordon, *Biochem. J.*, **70**, 544 (1958).  
 135. J. I. Fahey, J. L. Steinfield, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **97**, 281 (1958).  
 136. S. Keller, R. J. Blok, *Arch. Bioch. Biophys.*, **85**, 366 (1959).  
 137. E. E. Maxwell, Y. I. Topper, *J. Biol. Chem.*, **236**, 1032 (1961).  
 138. U. Kaletta-Gmunder, H. P. Wolf, *Helv. Chim. Acta*, **40**, 1027 (1957).  
 139. A. D. Merritt, G. M. Tomkins, *J. Biol. Chem.*, **234**, 2778 (1959).  
 140. K. Dalziel, *Acta Chem. Scand.*, **12**, 459 (1958).  
 141. J. H. Pazur, T. Ando, *J. Biol. Chem.*, **234**, 1966 (1959).  
 142. D. Wellner, A. Meister, *Tam же*, **235**, 2013 (1960).  
 143. F. H. Bergman, P. Berg, M. Dieckmann, *Tam же*, **236**, 1735 (1961).  
 144. M. Takanami, *Bioch. Biophys. Acta*, **51**, 85 (1961).  
 145. W. B. Jacobi, J. Fredericks, *J. Biol. Chem.*, **234**, 2145 (1959).  
 146. J. Porath, *Arkiv Kemi*, **11**, 97 (1956).  
 147. E. W. Yamada, W. B. Jakoby, *J. Biol. Chem.*, **234**, 941 (1959).  
 148. A. D. Merritt, G. M. Tomkins, *Tam же*, **234**, 2778 (1959).  
 149. S. Lindskog, *Bioch. Biophys. Acta*, **39**, 218 (1960).  
 150. S. Yanari, M. Volini, M. Mitzi, *Tam же*, **45**, 595 (1960).  
 151. A. J. Richard, G. Regeles, *Arch. Bioch. Biophys.*, **80**, 125 (1959).  
 152. I. Diener, T. Viswanatha, *Bioch. Biophys. Acta*, **36**, 250 (1959).  
 153. J. A. Gladner, J. E. Fokl, R. Laki, W. Carroll, *J. Biol. Chem.*, **234**, 62 (1959).  
 154. H. F. Deutsch, E. R. Striehm, J. Morton, *Tam же*, **236**, 2216 (1961).  
 155. E. Helmreich, M. Kern, H. Eisen, *Tam же*, **236**, 464 (1961).  
 156. S. Hsiao, F. Putnam, *Tam же*, **236**, 122 (1961).  
 157. R. Rorter, *Biochem. J.*, **73**, 119 (1959).  
 158. L. W. Cunningham, B. J. Nuenke, R. B. Nuenke, *Bioch. Biophys. Acta*, **26**, 660 (1957).  
 159. E. H. Creaser, A. Taussig, *Tam же*, **24**, 448 (1957).  
 160. B. H. Hoyer, E. T. Bolton, R. A. Ormsbee, *Science*, **127**, 859 (1958).  
 161. G. W. Cochran, J. L. Chidester, D. Stocks, *Nature*, **180**, 1281 (1957).  
 162. O. Levin, *Arch. Bioch. Biophys.*, **78**, 33 (1958).  
 163. B. H. Hoyer, R. A. Ormsbee, E. Bolton, *Fed. Proc.*, **17**, 507 (1958).  
 164. R. S. Mendelson, D. M. Watkin, A. P. Horbett, *Blood*, **13**, 740 (1958).  
 165. E. S. Holdsworth, *Bioch. Biophys. Acta*, **51**, 284 (1961).  
 166. W. D. Wosilait, *J. Biol. Chem.*, **235**, 1196 (1960).  
 167. A. S. L. Lu, R. G. Wolfe, F. Reithel, *Arch. Bioch. Biophys.*, **81**, 500 (1959).  
 168. A. Dahlquist, *Bioch. Biophys. Acta*, **50**, 55 (1961).  
 169. R. Kluthe, H. Islicker, *Helv Physiol. Pharm. Acta*, **18**, 404 (1960).  
 170. V. A. Trayser, S. P. Colowick, *Arch. Bioch. Biophys.*, **94**, 177 (1961).  
 171. T. C. Laurent, *Tam же*, **92**, 224, (1961).  
 172. N. R. Ringertz, P. Reichard, *Acta Chem. Scand.*, **13**, 1467 (1959).  
 173. R. E. Rittenberg, *J. Biol. Chem.*, **236**, 2527, 1961.  
 174. J. C. Sadana, A. V. Morey, *Bioch. Biophys. Acta*, **50**, 153 (1961).  
 175. F. G. Armstrong, R. P. Wagner, *J. Biol. Chem.*, **236**, 2025 (1961).  
 176. H. Den, W. G. Robinson, M. J. Coon, *Tam же*, **234**, 1666 (1959).  
 177. H. J. Hübener, F. G. Sahroholz, J. Schmidt-Thomé, G. Nesemann, R. Junk, *Bioch. Biophys. Acta*, **35**, 270 (1959).  
 178. E. J. Landon, C. E. Carter, *J. Biol. Chem.*, **235**, 819 (1960).  
 179. O. M. P. Phillips, E. W. Johns, *Biochem. J.*, **72**, 538 (1959).  
 180. G. L. Brown, A. V. Brown, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **12**, 6 (1958).  
 181. J. R. Davis, H. Busch, *Cancer Research*, **19**, 1157 (1959).  
 182. N. A. Frigerio, H. A. Harbury, *J. Biol. Chem.*, **231**, 135 (1958).  
 183. F. H. Brenneman, W. A. Volk, *Tam же*, **234**, 2443 (1959).  
 184. R. L. Ringer, *Tam же*, **236**, 1192 (1961).  
 185. A. T. Matheson, C. S. Hanes, *Bioch. Biophys. Acta*, **33**, 292 (1959).  
 186. R. R. Williams, L. C. Stewart, J. C. Jenkins, *Proc. Soc. Exp. Med.*, **99**, 554 (1958).  
 187. E. A. Holtmann, C. J. Gubler, S. A. Ruby, *J. Biol. Chem.*, **236**, 1225 (1961).  
 188. R. L. Metzerberg, M. Marshall, P. Cohen, *Tam же*, **233**, 1560 (1958).  
 189. R. Srere, J. Cooper, M. Tabochnik, E. Racher, *Arch. Bioch. Biophys.*, **74**, 295 (1958).

190. E. J. Pastore, M. Friedkin, *J. Biol. Chem.*, **236**, 2314 (1961).  
 191. B. Borgstöm, A. Dahlquist, *Acta Chem. Scand.*, **12**, 1997 (1958).  
 192. I. R. Lehman, E. A. Pratt, *J. Biol. Chem.*, **235**, 3254 (1960).  
 193. J. O. Duerksen, H. Halvorson, Там же, **233**, 1113 (1958).  
 194. A. Dahlquist, *Bioch. Biophys. Acta*, **50**, 55 (1961).  
 195. R. Shukuya, G. W. Schwert, *J. Biol. Chem.*, **235**, 1649 (1960).  
 196. G. M. Tomkins, K. L. Yielding, *J. Curran, Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 270 (1961).  
 197. B. D. Snavall, *Arch. Bioch. Biophys.*, **93**, 377 (1961).  
 198. H. Lis, *Bioch. Biophys. Acta*, **28**, 191 (1958).  
 199. O. H. Strumeyer, K. Bloch, *J. Biol. Chem.*, **235**, XXVII (1960).  
 200. H. M. Bates, F. Lipman, Там же, **235**, XXII (1960).  
 201. J. N. Woychik, R. J. Dimer, F. R. Sant, *Arch. Bioch. Biophys.*, **91**, 235 (1960).  
 202. R. H. Nuenke, L. W. Cunningham, *J. Biol. Chem.*, **236**, 2452 (1961).  
 203. W. Bürgi, K. Schmid, *J. Biol. Chem.*, **236**, 1066 (1961).  
 204. R. Reisfeld, J. Berhenstal, R. Hertz, *Arch. Bioch. Biophys.*, **81**, 456 (1959).  
 205. R. Reisfeld, R. Hertz, *Bioch. Biophys. Acta*, **43**, 540 (1960).  
 206. P. Condliffe, R. Bates, *J. Biol. Chem.*, **223**, 899 (1956).  
 207. H. Lee, A. Lerner, V. Buetter-Janusch, *J. Biol. Chem.*, **236**, 1390 (1961).  
 208. S. L. Stallmann, R. W. Andersen, R. McGregor, *Bioch. Biophys. Acta*, **33**, 256 (1959).  
 209. D. Ward, R. McGregor, A. Griffin, Там же, **32**, 305 (1959).  
 210. S. Friedman, P. Munson, Там же, **35**, 509 (1959).  
 211. L. Steelman, Там же, **24**, 405 (1958).  
 212. A. Bendich, H. B. Pahl, H. S. Rosenkranz, M. Rosoff, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, Cambridge, Univ. Press, XII, 31, 1958.  
 213. N. Kondo, S. Osawa, *Nature*, **183**, 1602 (1959).  
 214. H. S. Rosenkranz, A. Bendich, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 902 (1959).  
 215. J. E. Pechère, G. H. Dixon, R. H. Mayburg, *J. Biol. Chem.*, **233**, 1364 (1958).  
 216. H. S. Rosenkranz, A. Bendich, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 6255 (1959).  
 217. S. Kits, *Arch. Bioch. Biophys.*, **87**, 330 (1960).  
 218. M. Friedkin, H. Wood, *J. Biol. Chem.*, **220**, 639 (1956).  
 219. F. J. Bollum, *Biochem. J.*, **235**, 2399 (1960).  
 220. I. R. Lehman, M. J. Bessman, E. S. Simms, A. Kornberg, *J. Biol. Chem.*, **223**, 163 (1958).  
 221. I. R. Lehman, Там же, **235**, 1479 (1960).  
 222. J. H. Soenier, E. Chargaff, *Bioch. Biophys. Acta*, **51**, 209 (1961).  
 223. L. Astrachan, E. Volkin, M. Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 130 (1957).  
 224. G. Tener, H. Khorana, R. Markham, E. Pol, Там же, **80**, 6323 (1958).  
 225. M. E. Mayer, E. Peterson, H. Sober, A. Greco, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **81**, 599 (1959).  
 226. H. G. Boman, *Arkiv Kemi*, **12**, 467, 1958.  
 227. M. Shimura, M. Laskowski, *Bioch. Biophys. Acta*, **26**, 198 (1957).  
 228. J. W. Myers, *J. Biol. Chem.*, **236**, 1414 (1960).  
 229. L. Ernster, M. Lunggren, L. Danielson, *Bioch. Biophys. Res.*, **2**, 111 (1960).  
 230. E. S. Maxwell, H. Roblichon-Szulmajster, H. M. Ralchar, *Arch. Bioch. Biophys.*, **78**, 407 (1958).  
 231. K. A. Piez, E. Weiss, M. S. Lewis, *J. Biol. Chem.*, **235**, 1987 (1960).  
 232. U. J. Lewis, N. G. Brink, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 4429 (1958).  
 233. U. I. Lewis, E. N. Thiele, Там же, **79**, 755 (1957).  
 234. A. Dahlquist, *Acta chem. Scand.*, **13**, 1817 (1959).  
 235. M. Marshal, R. L. Matzenberg, P. P. Cohen, *J. Biol. Chem.*, **233**, 102 (1958).  
 236. H. Lis, *Bioch. Biophys. Acta*, **28**, 191 (1958).  
 237. J. E. Folk, K. A. Piez, W. R. Carroll, J. A. Gladner, *J. Biol. Chem.*, **235**, 2272 (1960).  
 238. R. A. Clayton, *Bioch. Biophys. Acta*, **36**, 40 (1959).  
 239. M. A. Mits, S. S. Yanary, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 2650 (1956).  
 240. E. M. Press, R. R. Porter, *J. Cebra Biochem. J.*, **74**, 501 (1960).  
 241. D. B. Cowie, G. H. Cohen, C. T. Balton, *Bioch. Biophys. Acta*, **34**, 39 (1959).  
 242. P. G. Squire, E. H. Li, *Science*, **127**, 32 (1958).  
 243. P. K. Choudhury, *J. Indian Chem. Soc.*, **34**, 586 (1957).  
 244. G. Curzon, L. Vallet, *Biochem. Ztschr.*, **74**, 279 (1960).  
 245. H. F. Deutsch, *Arch. Bioch. Biophys.*, **89**, 225 (1960).  
 246. N. H. Grant, H. C. Alburg, Там же, **82**, 245 (1959).  
 247. W. T. Koch, F. J. Wolf, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 489 (1955).  
 248. T. H. Lee, A. B. Lerner, V. Buetter-Janusch, Там же, **81**, 6084 (1959).  
 249. J. Szulmajster, *Bioch. Biophys. Acta*, **29**, 154 (1958).  
 250. M. A. Cynkin, G. Ashwell, *J. Biol. Chem.*, **235**, 1576 (1960).

251. D. Dennis, N. Kaplan, Там же, 235, 810 (1960).  
 252. B. W. Moore, B. Wortman, Bioch. Biophys. Acta, 34, 260 (1959).  
 253. A. P. Nygaard, Там же, 35, 212 (1959).  
 254. A. M. Snoswell, Там же, 35, 574 (1959).  
 255. B. Wortman, A. Schneider, Bioch. Biophys. Res., 2, 179 (1960).  
 256. J. Folk, J. Gladner, T. Viswanatha, Bioch. Biophys. Acta, 36, 256 (1959).  
 257. W. S. Lynn, N. C. Perrymann, J. Biol. Chem., 235, 1912 (1960).  
 258. G. Marchis-Moureu, M. J. Constantin, P. Desnuelle, Bull. Soc. Chem. Biol., 40, 2019 (1958).  
 259. G. H. Dixon, H. L. Kornberg, P. Lund, Bioch. Biophys. Acta, 41, 217 (1960).  
 260. C. R. Thorne, Там же, 42, 175 (1960).  
 261. G. Semenza, L. Prestidge, D. Menard-Becker, Helv. Chim. Acta, 42, 669 (1959).  
 262. H. Nakamura, F. Berheim, Bioch. Biophys. Acta, 50, 147 (1960).  
 263. E. W. Yamada, W. B. Jakoby, J. Biol. Chem., 235, 589 (1960).  
 264. A. Szemt-Gyorgyi, C. Cohen, D. Philpott, J. Molecular. Biol., 2, 133 (1960).  
 265. H. J. Bright, L. Ingram, Bioch. Biophys. Acta, 44, 586, i960.  
 266. R. Stjernholm, H. Wood, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 47, 303 (1961).  
 267. P. W. Jungblut, N. Heimburger, F. Turba, Ztschr. physiol. Chem., 314, 250 (1959).  
 268. S. Suzuki, R. H. Trum, J. L. Strominger, Bioch. Biophys. Acta, 50, 169 (1961).  
 269. A. Akeson, H. Theorell, Arch. Biochem. Biophys., 91, 316 (1961).  
 270. A. Akeson, G. Ehrenstein, G. Hevesi, H. Theorell, Там же, 91, 310 (1960).  
 271. N. M. Rumen, Acta Chem. Scand., 13, 1549 (1959).  
 272. D. S. Love, Fed. Proc., 19, 256 (1960).  
 273. D. Steinberg, M. Vaughan, F. Sherman, Bioch. Biophys. Acta, 40, 225 (1960).  
 274. A. Taussig, E. Creaser, Arch. Bioch. Biophys., 83, 436, (1959).  
 275. S. V. Perry, M. Zydow, Biochem. J., 72, 220 (1959).  
 276. G. W. Cochran, J. Chidester, G. Welkue, Bioch. Biophys. Acta, 35, 190 (1959).  
 277. E. C. Herman, J. Barbara, E. Wright, J. Biol. Chem., 234, 122 (1959).  
 278. J. Glomset, Acta Chem. Scand., 12, 641 (1958).  
 279. E. Korn, Bioch. Biophys. Acta, 32, 554 (1959).  
 280. P. Reichard, Acta Chem. Scand., 11, 523 (1957).  
 281. F. R. Jeavons, Bioch. Biophys. Acta, 45, 384 (1960).  
 282. P. J. Keller, E. Cohen, H. Neurath, J. Biol. Chem., 233, 344 (1958).  
 283. P. Keller, E. Cohen, H. Neurath, Там же, 234, 311 (1959).  
 284. A. P. Ryle, Biochem. J., 75, 145 (1960).  
 285. E. Liener, Bioch. Biophys. Acta, 37, 522 (1960).  
 286. H. G. Boman, L. Westlund, Arch. Bioch. Biophys., 70, 572 (1957).  
 287. K. G. Paul, Acta Chem. Scand., 12, 1312 (1958).  
 288. S. Wada, M. Pallansch, E. Diener, J. Biol. Chem., 232, 395 (1958).  
 289. P. Wallen, K. Bergström, Acta Chem. Scand., 13, 1464 (1959).  
 290. C. W. Nagel, R. Vaughn, Arch. Bioch. Biophys., 94, 328 (1961).  
 291. C. W. Nagel, R. Vaughn, Там же, 93, 344 (1961).  
 292. N. Neukomm, H. Denel, W. Heri, W. Kündig, Helv. Chim. Acta, 34, 64 (1960).  
 293. P. Keller, E. Cohen, H. Neurath, J. Biol. Chem., 230, 905 (1958).  
 294. M. D. Lane, D. Halex, O. Rosow, C. Hegre, Там же, 235, 3082 (1960).  
 295. P. Todd, V. Trikojus, Bioch. Biophys. Acta, 45, 234 (1960).  
 296. M. Rabinowitz, F. Lipman, J. Biol. Chem., 235, 1043 (1960).  
 297. J. Gray, S. Priest, W. Blatt, U. Westphal, Там же, 235, 60 (1956).  
 298. W. Thomas, W. Seegers, Bioch. Biophys. Acta, 42, 557 (1960).  
 299. E. Usdin, J. Porath, Arkiv Kemi, 11, 41 (1956).  
 300. J. G. Moffat, H. G. Khorana, J. Am. Chem. Soc., 80, 3756 (1958).  
 301. S. Aquist, C. Anfinsen, J. Biol. Chem., 234, 1112 (1959).  
 302. E. Haber, C. Anfinsen, Там же, 236, 422 (1961).  
 303. G. Taborsky, Там же, 234, 2915 (1959).  
 304. F. White, мл. J. Biol. Chem., 236, 1353 (1961).  
 305. F. White, Fed. Proc., 19, 333 (1960).  
 306. T. W. Tuve, C. Anfinsen, J. Biol. Chem., 235, 3437 (1960).  
 307. M. Edmonds, J. Roth, Arch. Bioch. Biophys., 89, 207 (1960).  
 308. M. Shortman, Bioch. Biophys. Acta, 51, 37 (1961).  
 309. D. F. Bradley, A. Rich, J. Am. Chem. Soc., 78, 5898 (1956).  
 310. L. Rosch, H. Bloemendaal, M. Sluyser, Bioch. Biophys. Acta, 41, 545 (1960).  
 311. D. Goldthwait, J. Starr, J. Biol. Chem., 235, 2025 (1960).  
 312. M. E. Rafelson, Arch. Bioch. Biophys., 90, 68 (1960).  
 313. M. Hoagland, L. Stephenson, J. Scott, L. Hecht, P. Zamechik, J. Biol. Chem., 231, 241 (1958).

314. L. Bosch, H. Bloemendaal, M. Sluyser, Bioch. Biophys. Acta, **41**, 454 (1960).  
 315. E. Ofengand, M. Dieckmann, P. Berg, J. Biol. Chem., **236**, 1741 (1961).  
 316. S. Osawa, Bioch. Biophys. Acta, **43**, 110 (1960).  
 317. K. Nishiyama, T. Okamoto, L. Watanabe, M. Takamori, Там же, **47**, 194 (1961).  
 318. R. F. Beers, J. Biol. Chem., **235**, 2393 (1960).  
 319. K. Tanaka, Bull. Chem. Soc., Japan, **31**, 393 (1958).  
 320. S. Shibako, G. Pinchot, Arch. Bioch. Biophys., **94**, 257 (1961).  
 321. B. Peterkofsky, C. Gilvary, J. Biol. Chem., **236**, 1432 (1961).  
 322. N. Ringertz, P. Reichart, Acta Chem. Scand., **12**, 641 (1958).  
 323. T. Asahi, R. Bandurki, L. Wilson, J. Biol. Chem., **236**, 1830 (1961).  
 324. P. M. Macleod, W. Farkay, J. Friedovich, Там же, **236**, 1841 (1961).  
 325. R. Block, S. Keller, D. Miller, Arch. Bioch. Biophys. **83**, 426 (1959).  
 326. J. Fahey, P. McCoy, M. Goulian, J. Clin. Invest., **37**, 272 (1958).  
 327. H. Sober, E. Peterson, Vox Sanguinis, **2**, 62 (1957).  
 328. R. J. Speer, M. Prager, T. Kelley, J. Hill, J. Lab. Clin. Med., **54**, 685 (1959).  
 329. L. Wynston, C. Free, J. Pierce, J. Biol. Chem., **235**, 85 (1960).  
 330. M. Heideman, J. Bakke, L. Lawrence, Arch. Bioch. Biophys., **82**, 62 (1959).  
 331. P. G. Condiffe, R. Bates, M. Garrison, Bioch. Biophys. Acta, **37**, 150 (1960).  
 332. R. Venkataraman, E. Racker, J. Biol. Chem., **236**, 1876 (1961).  
 333. G. Krampitz, F. Knappen, J. Chromatogr., **5**, 174 (1961).  
 334. A. J. Vithaythil, F. Burk, M. Bier, Arch. Bioch. Biophys., **92**, 532 (1961).  
 335. I. Liener, Там же, **98**, 226 (1961).  
 336. M. Rhodes, W. Bennett, R. Feeney, J. Biol. Chem., **235**, 1686 (1960).  
 337. F. C. Wu, M. Laskowski, Там же, **235**, 1680 (1960).  
 338. M. Laskowski, B. Kassall, G. Hagerty, Bioch. Biophys. Acta, **24**, 300 (1957).  
 339. A. M. Nemeth, Там же, **48**, 189 (1960).  
 340. F. C. Brown, B. Ward, J. Am. Chem. Soc., **79**, 2647 (1957).  
 341. F. C. Brown, D. Ward, J. Biol. Chem., **233**, 77 (1958).  
 342. F. C. Brown, D. Ward, Proc. Soc. Exp. Med., **100**, 701 (1959).  
 343. L. S. Lerman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **39**, 232 (1953).  
 344. A. Keseler, H. Rosen, S. Lecenson, J. Biol. Chem., **235**, 989 (1960).  
 345. G. Semenza, Chimia, **14**, 326 (1960).  
 346. C. Villar-Pilasi, J. Larner, Arch. Bioch. Biophys., **86**, 61 (1960).  
 347. V. Ginsburg, J. Biol. Chem., **233**, 55 (1958).  
 348. O. Sköld, Там же, **235**, 3273 (1960).  
 349. B. Kickhöfen, F. Struwe, B. Bramsfield, Bioch. Ztschr., **330**, 467 (1958).  
 350. E. Frieden, M. Ottesen, Bioch. Biophys. Acta, **34**, 648 (1959).  
 351. R. Abrams, M. Bentley, Arch. Bioch. Biophys., **79**, 91 (1959).  
 352. A. Mazur, S. Green, A. Carleton, J. Biol. Chem., **235**, 595 (1960).  
 353. M. Prager, R. Speer, P. Work, Fed. Proc., **19**, 73 (1960).  
 354. R. Neu, J. Chromatogr., **4**, 489 (1961).  
 355. H. G. Boman, Arkiv Kemi, **12**, 453 (1958).  
 356. O. Rogers, F. Reithel, Arch. Bioch. Biophys., **89**, 97 (1960).  
 357. A. Garen, G. Levinthal, Bioch. Biophys. Acta, **38**, 470 (1960).  
 358. F. Felix, J. Potter, M. Laskowski, J. Biol. Chem., **235**, 1150 (1960).  
 359. M. Laskowski, G. Hagerty, Nature, **180**, 1181 (1957).  
 360. W. Björk, H. Boman, Bioch. Biophys. Acta, **34**, 503 (1959).  
 361. E. Anderson, L. Heppel, Bioch. Biophys. Acta, **43**, 79 (1960).  
 362. H. G. Boman, V. E. Westlund, Arch. Bioch. Biophys., **64**, 217 (1956).  
 363. W. Ostrowski, A. Tsugita, Там же, **94**, 68 (1961).  
 364. J. Glomset, Acta Chim. Scand., **11**, 512 (1957).  
 365. J. Glomset, Bioch. Biophys. Acta, **32**, 349 (1959).  
 366. A. Yunis, E. Fischer, E. Krebs, Fed. Proc., **19**, 260 (1960).  
 367. T. P. Lee, Bioch. Biophys. Acta, **43**, 16 (1960).  
 368. R. C. Valentine, R. Wolfe, J. Biol. Chem., **235**, 1948 (1960).  
 369. P. D. Shaw, J. Beckwith, Fed. Proc., **19**, 47 (1960).  
 370. P. D. Shaw, L. Hager, J. Biol. Chem., **236**, 1626 (1961).  
 371. M. Rovere, O. Guy, P. Desnuelle, Bioch. Biophys. Acta, **42**, 554 (1960).  
 372. M. S. Doscher, P. Wilcox, J. Biol. Chem., **236**, 1328 (1960).  
 373. S. T. Paleus, Acta Chem. Scand., **11**, 905 (1957).  
 374. J. Thomas, E. Partridge, Biochem. J., **74**, 600 (1960).  
 375. F. J. Joubert, Arch. Bioch. Biophys., **91**, 11 (1960).  
 376. B. G. Malmström, Там же, **70**, 58 (1957).