

УДК 541.183.12 : 543.854

ИОНООБМЕННЫЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ХРОМАТОГРАФИИ

Е. 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^{1,2}. 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^{3,4}.

Фактически использование ионообменных форм целлюлозы для хроматографических целей имеет более чем полувековую давность. Еще Гоппельсредер⁵ упоминал об оксигеллюлозе (карбоксильный слабо-

кислотный катионит) как материале для капиллярного анализа. Оксигеллюлоза получается в процессе омыления эфиров, присутствующих в исходной целлюлозе, и путем окисления первичных спиртовых групп, находящихся в глюкозных структурных единицах в положении 6^{1,2}. Уже при получении оксигеллюлоз столкнулись с определенными ограничениями в содержании карбоксильных групп в оксигеллюлозе. Существует некоторый критический предел включения ионогенных групп в состав целлюлозы — при превышении этого предела целлюлоза теряет свойства нерастворимого сорбента. Для оксигеллюлозы оказалось, что содержание карбоксильных групп не должно превышать 1—4%. При содержании более 5% (при этом каждая пятая глюкозная структурная единица окислена в положении С6) оксигеллюлоза становится растворимой в воде при pH выше 9².

К «пионерским» работам, посвященным получению различных типов ионообменных целлюлоз, следует отнести работы Лауча с сотрудниками⁶, Михееля и Альбертса⁷, Собера и Петерсона^{8,9} и Пората¹¹. Лауч с сотрудниками получили ряд ионитов — производных целлюлозы: карбоксильный катионит — простой эфир гликолиевой кислоты (группа $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOH}$) — действием хлоруксусной кислоты на целлюлозу 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*-толуолсульфохлорида 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 целлюлоза разрушалась.

Михеель и Альбертс⁷ получили карбоксильную катионообменную целлюлозу в виде полуэфира фталевой кислоты. Такой слабокислый катионит не растворялся в щелочах при 5%-ном содержании карбоксильных групп.

Систематическая работа над получением ионообменных целлюлоз для целей хроматографии была осуществлена Собером, Петерсоном и сотрудниками^{8,9} и Поратом¹¹.

Собер и Петерсон^{8,9} описали методику получения ряда новых катионообменных и анионообменных целлюлоз: SM-целлюлозы (карбоксиметил-целлюлоза); P-целлюлозы (фосфорилированная целлюлоза); DEAE-целлюлозы (диэтиламиноэтил-целлюлоза); ECTEOA-целлюлозы. На основе DEAE-целлюлозы Порат¹¹ получил анионит TEAE-целлюлозу (триэтиламиноэтил-целлюлозу). Им также разработана методика получения сильнокислых катионитов: SE-целлюлозы (сульфоэтил-целлюлоза) и SM-целлюлозы (сульфометил-целлюлоза). Сокращенное и полное название некоторых ионообменных целлюлоз и их свойства приведены в табл. 1. В качестве исходных материалов использовали природную α -целлюлозу.

Собер и Петерсон^{8,9} использовали порошок хлопковой целлюлозы для получения катионитов и порошок древесной целлюлозы для получения анионитов. α -Целлюлоза оказалась самой подходящей матрицей для включения ионогенных групп.

Емкость поглощения ионообменных целлюлоз 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 β -хлорэтилдиэтиламина и целлюлозы в щелочной среде⁹. Были также получены SM- и SE-целлюлозы¹¹.

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 β -глюкопираноз, соединенные между собой β -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 Роговин¹, осуществляется посредством связей молекулярного типа (главным образом образом полярных связей), а также посредством водородной связи.

Различное соотношение между водородными связями и молекулярными связями обуславливает 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, установлено¹¹, 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 сложнэфирные).

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 μ . Максимумы кривых распределения приходится на интервал 50—100 μ . Диаметр частиц составляет 15—20 μ . 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 см³/г, набухаемость ~2.

Ионообменные целлюлозы обладают хорошими фильтрационными свойствами. При использовании ионообменных целлюлоз в колоночной хроматографии скорость потока может регулироваться в пределах 5—25 мл/см²час. 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 титрования¹⁹. 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, удерживающих ион.

Виды ионообменных целлюлоз

ТАБЛИЦА 1

Сокращенное название	Полное название	Ионогенная группа	Кислотные или основные свойства	Полная емкость поглощения *, мг-экв/г
Катиониты				
SE	Сульфозтил-целлюлоза	$-\text{C}_2\text{H}_4\cdot\text{SO}_3\text{H}$	сильнокислотный	0,4
P	Фосфорилированная целлюлоза	$-\text{PO}_3\text{H}_2$	сильнокислотный	0,8
CE	Карбокснэтил-целлюлоза	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH}$	среднекислотный	0,7
CM	Карбоксиметил-целлюлоза	$-\text{CH}_2\cdot\text{COOH}$	слабокислотный	0,7
C	Карбоксил-целлюлоза (оксицеллюлоза)	$-\text{COOH}$	слабокислотный	0,7
Аниониты				
PAB	Парааминобензил-целлюлоза	$-\text{CH}_2\cdot\text{C}_6\text{H}_4\text{NH}_2$	слабоосновный	0,6
ESTEOLA	Продукт реакции этилхлоргидрина, 3-этиламина с целлюлозой	структура ионогенной группы не установлена	слабоосновный	0,5
AE	Аминоэтил-целлюлоза	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NH}_2$	слабоосновный	0,7
TEAE	Продукт реакции этилбромидом с DEAE-целлюлозой	структура ионогенной группы не установлена	среднеосновный	1,0
DEAE	Диэтиламиноэтил-целлюлоза	$-\text{C}_2\text{H}_4\cdot\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	среднеосновный	1,0
GE	Гуанидоэтил-целлюлоза	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{NHC}-\text{NH}_2\text{NH}_2\text{OH}$	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 неорганических 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 Собер⁹ 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,
ЕСТЕОЛА — 0,05 г белка сыворотки крови/г сорбента,
СМ — 0,98 г СО-глобулина/г сорбента,
Р — 0,93 г СО-глобулина/г сорбента.

О'Донелл и Томпсон¹³ 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 μ) с теоретической точки зрения должны обуславливать 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 скудные сведения о кинетике сорбции веществ на ионообменных целлюлозах. Экспериментальная оценка¹⁴ времени установления сорбционного равновесия в условиях перемешивания сорбента с раствором для SE- и P-целлюлоз в различных ионных формах при сорбции 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. Гусев¹⁵ исследовал кинетику сорбции ионов Na^+ и Fe^{3+} в несколько необычных условиях — сорбция ионов плотным слоем CM-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.

Николаев¹⁶ 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.

Николаев¹⁶ изучал статику сорбции аспарагиназы из 0,08 М 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 другие¹⁷ 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 другие¹⁸ установили сорбционный ряд анионов для ЕСТЕОЛА-целлюлозы:

анион лимонной кислоты > муравьиной > $HPO_4^{2-} > SO_4^{2-} >$
 > фталевой > салициловой > янтарной > глютаминовой > $NO_3^- >$
 > бензоат > Br > пропионовой > виноградной > капроновой > Cl >
 > молочной > ацетат > I > аскорбиновой > глицериновой.

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^{17, 19}.

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»¹² 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, пептидов и нуклеотидов. Применение TEAE-целлюлозы аналогично применению DEAE-целлюлозы. В некоторых случаях TEAE-целлюлоза дает более четкие разделения белков и других высокомолекулярных соединений. Целлюлозы AE и GE пока находят сравнительно малое применение. Хорошие результаты при разделении нуклеиновых кислот и вирусов получаются при использовании ЕСТЕОЛА-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 РАВ-целлюлоза. В первичном виде она может быть использована для разделения нуклеиновых 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-азоантиген избирательно сорбирует антитела, РАВ-азогистон — нуклеотиды, РАВ-азогуанин — нуклеотиды, РАВ-азо-тирозин — 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 отдельно.

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, разделительной 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 замечено²⁰, 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 ионгенными группами. Это может привести к ошибкам в результатах хроматографирования.

Появление указанных полисахаридов может быть обнаружено и проконтролировано путем анализа элюатов на содержание полисахаридов^{21, 22}. Элюаты легко очищаются от этих примесей, например путем их пропускания через небольшие колонки ионообменных смол²³.

Необходимо также учитывать, что целлюлоза может подвергаться разрушению под действием фермента целлюлазы^{24, 25}. В работе²⁴ установлено, что есть ионообменные целлюлозы устойчивые и неустойчивые к действию этого фермента. В группу устойчивых ионитов входят целлюлозы Р, SM и CM, в группу неустойчивых — DEAE, а также целлюлоза, приготовленная из бумаги Ватман.

Использованные в хроматографическом анализе целлюлозные иониты можно подвергнуть регенерации обычными приемами²⁶.

Ионообменные целлюлозы выдерживают непродолжительные воздействия сильных кислот и щелочей¹⁷.

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 хроматографи-

ческого разделения, зависят как от pH раствора, так и от концентрации солей в нем. Подбор и регулирование pH, 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 концентрации¹². 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^{20, 27-34}.

Выбор элюентов и формы градиентов существенно зависят 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 pH 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 анионитов, 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 pH — 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 pH 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 pH 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^{35, 36} при хроматографическом анализе белков. Иногда в литературе его называют способом по принципу «все или ничего» или «высаливательной» 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 чехословацких ученых². Ряд фирм производит наряду с порошкообразной ионообменной целлюлозой, также и ионообменные бумаги для хроматографии.

Используют два способа проведения хроматографирования на ионообменных бумагах³⁷: 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.

Найт³⁸ 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 Шрайбер³⁹ и развитая Шталем^{40, 41} *.

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 м) сорбирующего материала, нанесенного на стеклянную пластинку, происходит очень быстрое капиллярное поднятие растворителя, и процесс хроматографирования занимает мало времени. На пластинке размером 10×10 см² или 15×15 см² 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 хроматографии¹².

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. Пластины 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 ($\lambda=253$ мμ) как темные пятна. Белки обнаруживаются в УФ свете после нагревания влажной тонкослойной хроматограммы в течение нескольких минут при 150°.

Дробная сорбция. Хесс и Вальтер⁴³ 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 стандартизированные ионообменные целлюлозы: DEAE-целлюлозу и CM-целлюлозу¹².

* Подробный обзор работ по тонкослойной хроматографии см.⁴²

У. ПРИМЕНЕНИЕ ИОНООБМЕННЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗ

Хроматография белков. Первые систематические исследования в разработке методики хроматографии белков на ионообменных целлюлозах были проведены Собером, Петерсоном и сотрудниками^{8, 9, 10, 44}. 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^{45–50}. Работы выполняли с применением DEAE-целлюлозы^{10, 46, 49} и CM-целлюлозы^{45, 47, 50} способом градиентного элюирования.

Когент и Брода⁴⁶ 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 Кук⁴⁵ показали, что хорошие результаты в разделении белков можно получить при использовании CM-целлюлозы. Хесс и Вальтер⁴³ применили ионообменные целлюлозы для анализа белков крови при клинической диагностике. Собер и др.⁵¹ 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^{52–54}. Для разделения белков применяли CM-целлюлозу. Элюирование проводили в фосфатном буфере 0,01 М, 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^{55–58}. Этот же метод был использован для хроматографического анализа различных других белков: меромиозина^{59, 60}, I-миозина⁶¹, инсулина⁶², β-γ-казеина⁶³, γ-глобулинов⁶⁴, β-лактоглобулина⁶⁵ и других.

Были подвергнуты также хроматографическому анализу сложные биологические материалы, такие, как яичный белок^{66, 67}, белки молока^{68, 69} и другие. Методом хроматографии на ионообменных целлюлозах были открыты новые, неизвестные ранее белки. Например, Родес и другие⁶⁷ обнаружили в яичном белке ряд новых белковых компонентов, применяя элютивную хроматографию на CM-целлюлозе.

Опубликован ряд работ по разделению растительных белков^{70, 72}. При анализе белков соевых бобов было обнаружено несколько неидентифицированных пока белковых фракций⁷¹. В работе⁷⁰ 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, Арне⁷³ при помощи колонки ТЕАЕ-целлюлозы анализировал желудочную инвертазу и мальтазу. Оказалось, что мальтаза состоит из трех компонентов, а инвертаза является однокомпонентным ферментом.

Таборски⁷⁴ хроматографией на СМ-целлюлозе разделил рибонуклеазу на четыре компонента.

Исполатовская, Ледвинова и Ларина^{75, 76} использовали ДЕАЕ- и ЕСТЕОЛА-целлюлозы для разделения и препаративного выделения лейцитиназы, положеназы и гиалуронидазы токсина бактерий. Хроматографический анализ ферментов был осуществлен также в работах ряда других авторов^{77, 78}.

Опубликовано много работ, в которых ионообменные целлюлозы использованы для очистки ферментов^{79–88}. Например, фермент дегидраза, выделенный из печени крысы, был очищен с помощью ДЕАЕ-целлюлозы, при этом его активность увеличилась в 250 раз⁸⁶.

Гроссберг и др.⁸⁷ 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^{89–91}, антигенов^{92, 93}, плазмогена⁹⁴.

Броун и Дуан⁹⁵ 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 ДЕАЕ-целлюлозой¹⁵.

Хроматография нуклеиновых кислот и нуклеотидов. Бендич и другие⁹⁶ 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 ЕСТЕОЛА-целлюлозой. Было осуществлено хроматографическое фракционирование ДНК, различающихся составом гетероциклических оснований. Хроматографическое фракционирование ДНК при помощи ЕСТЕОЛА-целлюлозы производили также и другие авторы^{97–99}. В одной из работ¹⁰⁰ показана возможность разделения ДНК при помощи ДЕАЕ-целлюлозы.

Стехилин и другие^{101, 102} использовали ДЕАЕ-целлюлозу при изучении нуклеотидной последовательности в РНК. При хроматографировании гидролизата дрожжевой РНК, обработанной панкреатической РНК-азой, обнаружен целый комплекс различных моно- и полинуклеотидов: мононуклеотиды — уридиловая 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.

Миколаи и другие¹⁰³ применили ЕСТЕОЛА-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 Патч¹⁰⁴ разработали путем применения ЕСТЕОЛА-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^{105–108}.

ЕСТЕОЗА- и DEAE-целлюлозы использовали также для разделения и очистки вирусов^{109–113}. Например, Хейер и Болтон¹¹¹ с помощью указанных ионообменных целлюлоз производили выделение и очистку некоторых животных вирусов. Перспективность этого способа для вирусологии и в особенности при производстве вакцин очевидна.

Рандерат¹¹⁴ разделял смесь нуклеотидов методом тонкослойной хроматографии в течение 5 минут, используя ЕСТЕОЛА- и DEAE-целлюлозы.

Хроматография низкомолекулярных органических веществ. Раузер и другие¹¹⁵ 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 Ньюком¹¹⁶ 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 Мюллер и др.¹¹⁷ выделили из почвы пять фракций полисахаридов, различающихся содержанием уроновых кислот. Ионообменные целлюлозы использованы для выделения серомукоидов из сыворотки крови¹¹⁸.

Павелькевич¹¹⁹ применил ионообменную целлюлозу для выделения и очистки витамина В₁₂.

Серия работ посвящена применению ионообменных целлюлоз для разделения аминокислот^{38, 120, 121}. Сравнительное изучение возможностей колоночной хроматографии аминокислот на ионообменных смолах и целлюлозах показало, что последние особыми преимуществами по сравнению со смолами не обладают¹²⁰.

Ионообменные целлюлозы были с успехом использованы для разделения АМФ, АДФ и АТФ¹⁰¹, пептидов¹²² и сахарофосфатов¹⁷.

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 Fe³⁺, Ce⁴⁺, UO₂²⁺, U⁴⁺, Th⁴⁺, ZrO₂²⁺ 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, Th⁴⁺ и UO₂²⁺ количественно элюируются 10%-ным раствором (NH₄)₂CO₃, Fe³⁺ — хлоруксусной кислотой, ZrO₂²⁺ — 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 HNO₃, Bi элюировали 1N раствором HCl, в котором Bi дает анионные комплексы. Отделение Cu от Cd, Co и Ni было осуществлено путем элюирования раствором 1 M MgCl₂. Оставшаяся в колонке после этого медь удалялась путем пропускания HCl.

Церал и Теста¹⁹ синтезировали новый тип анионообменной целлюлозы ТОАС (три-*n*-октиламинцеллюлоза) с очень высокой емкостью ~ 1 мг-экв/г. При помощи этого ионита они разделили смесь Fe^{3+} , Co^{2+} и Ni^{3+} , используя в качестве элюента 0,8 М НСl. 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 3М НСl — 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 аминокислот³⁸, барбитуратов^{123, 124}, органических кислот¹²⁵, белков¹²⁶, неорганических ионов^{127–129} и других веществ.

Картейн¹²⁶ разделил белки сыворотки крови на DEAE-целлюлозе с ионообменной емкостью $\sim 0,003$ мг-экв/см². 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^{123, 124} осуществлял на DEAE-бумаге разделение смеси 5,5-замещенных барбитуратов. В качестве элюента использован трет.- $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{OH}$ с 0,1М раствором Na-соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (1:1). Разделение проводили способом круговой хроматографии. Удалось разделить смесь фенолбарбитона, барбитона, бутанолбарбитона и хинолбарбитона. Хроматографические зоны обнаруживались в УФ свете.

Майр¹²⁵ описал разделение органических кислот на CM-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.¹²⁷ применили фосфорилированную бумагу для разделения катионов. Для разделения анионов они получили бумагу, обработанную 2-аминоэтилсульфокислотой.

Черраи и Теста¹²⁸ изучали хроматографическое поведение неорганических катионов на бумаге ICBL1, 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_F 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—Ti—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 НСl²².

Рандерат и Струк³⁷ 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 ЕСТЕОЛА, CM 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 декарбоксидаза	DEAE	195
Аланин, активирующий pH 5 энзимы	DEAE	132, 133	Глютамин дегидрогеназа	DEAE	196, 197
Альбумин (сыворотка человеческой крови)	CM, DEAE	134—136	Глютамин трансамидазы	CM	198
Альдегид дегидрогеназа	CM, DEAE	137	γ-Глютамин цистеин синтетаза	DEAE	199
Альдолаза	DEAE	138	Глютатион пероксидаза	DEAE	81
Алькоголь дегидрогеназа	CM, DEAE	139, 140	Глютатион синтетаза	DEAE	200
Аминоглюкозидаза	DEAE	141	Глютин (пшеница)	CM	201
Аминокислоты	DEAE	120	Глюкопептиды	DEAE	202
L-аминокислота оксидазы	DEAE	142	α-Глюкопротеин	DEAE	203
Аминоацил-р РНК-синтетаза	DEAE	143	Гонадотропин	DEAE	204, 205
Аминоацил-р РНК-ферменты рибосом	DEAE	144	Гормоны	CM	206—209, 120
γ-Аминобутиральдегид дегидрогеназа	DEAE	145	ДНК	DEAE	89, 90, 211
Аминооксидаза	AE	84	ДНК-полимераза	DEAE	90, 98, 99, 212—218
Ангисерум (дифтерия)	SE, SM	146	Дезоксирибонуклеотиды	DEAE	219, 220
Аспарагиназа	DEAE	16	Дезоксирибонуклеаза	DEAE	221—224
Ацетилмонооксирбон-сиксидная гидролаза	DEAE	147	Дегидроксидегидраза	ECTEOLA	225, 226
Ацетилтрипсин	DEAE	148	Диафороза	CM	171, 227
Ацетилтрипсиноген	DEAE	149	Дифосфоталактоза-4-эпимераза	DEAE	228
Белки:			ДПН	DEAE	229
диглицин, триглицин	DEAE, ECTEOLA	150	ДПН-L-гулонат дегидрогеназа	DEAE	190
альбумин	DEAE	151	Желатина	CM	80
ацетилтрипсин	DEAE	152	Инсулин	DEAE	231
СО-фibrин	DEAE	153	Инсулиназа	DEAE	62
γ-Глобулин	CM	154—157	Инвертаза	DEAE	232, 233
Овальбумин	DEAE	158	Карбамилфосфат-синтетаза	DEAE	234
Вирус (бактериофаг T2)	ECTEOLA	110, 159	Карбоангидраза	DEAE	235
Вирус (ICHO)	ECTEOLA	160	Карбоксипептидаза	DEAE	236
Вирус (табачная мозаика)	CM	161	Каталаза	DEAE	237
Вирус (картофель X)	DEAE	162	Катепсин	DEAE	238, 239
Вирус (вакцина)	ECTEOLA	109, 113	Клеточные белки	DEAE, CM, SM	239
Витамин B ₁₂	DEAE	163	Клеточные стимулирующие гормоны	DEAE	240
Витамин K ₁ — редуктаза	P-целлюлоза	119	Кобаламин	DEAE	241
β-Галактозидаза	DEAE	164—166	Коэрулоплазмин	DEAE	242
Гаптоглобин	DEAE	167	Колаген	CM	243
Гемоглобин	DEAE	168	Колагеназа	DEAE	244, 245
Гемоглобин (CO—A и F)	CM	51, 56—58	Кортикотропин	DEAE	127
Гексокиназа	DEAE	169	Креатинин — диаминаза	DEAE	246
Гепарин	ECTEOLA	170	Креатинин — трансминаза	DEAE	247, 248
Гидрогеназа	DEAE	171, 172	2-кето-3-докси-D-глюкокиназа	DEAE	249
α-Гидроксид-β-кеторедуктоизомераза	DEAE	173, 174	Лактоальдегид дегидрогеназа	DEAE	250
β-Гидроксипропионат дегидрогеназа	DEAE	175	Лактоальдегид редуктаза	DEAE	85
20-β-Гидроксенульфатаза	DEAE	176	Ликтатдегидрогеназа	DEAE	85
Гипоксантин — дегидрогеназа	DEAE	177	Лизинаминопептидаза	DEAE	43, 251—255
Гистон	CM	178	Липазы	DEAE	256
Гистоген	P-целлюлоза	158, 179	Малат синтетаза	DEAE	257, 258
Гликолевая кислота оксидазы	CM	180	Малат-дегидрогеназа	DEAE	259
Глицеральдегидфосфат дегидрогеназа	DEAE	181	Малако-фермент	DEAE	260
α-Глицерофосфат — дегидрогеназа	DEAE	182	Малонил Ко — А дегидрогеназа	DEAE	261
Глициллицидаза	DEAE	183	Малонил Ко — А оксидазы	DEAE	262
γ-глобулин	CM	184	Мальтаза	DEAE	263
Глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа	DEAE	185	Меромизин	DEAE	234
Глюкозо-6-фосфат	P-целлюлоза	154, 186	β-Метил-аспартаза	DEAE	60, 264
Глюкозидаза	DEAE	187—189	Метилмалонат изомеразы	DEAE	265
α-Глюкозидаза	DEAE	188	Микросомальный экстракт	DEAE	266
β-Глюкозидаза	DEAE	189	Мукопсидсахарид — сульфотрансфераза	DEAE	267
	DEAE	190	Миоглобин	DEAE	268
	DEAE	191	Миозин	DEAE	95, 269
	DEAE	192	Неорганические ионы	CM	270, 271
	DEAE	193	Нуклеопептиды	DEAE	61, 225, 272
	DEAE	194	Нуклеопротенины	P-целлюлоза	17, 127
				ECTEOLA	273
				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			
	ECTEOALA	279	Сыворотка крови человека	DEAE	10, 26, 47, 64, 326—328
Нуклеотид трансфосфорилаза	CM	79	Тиротропин	CM	90, 329, 330
Орнитин карбамил-трианмидаза	DEAE	280		DEAE	331
Овомукоид	TEAE	281	Трансальдолаза	DEAE	189, 332
Пепкрейза	CM, DEAE	282, 283	Трансамидазы	AE, DE	101
Парапепсиноген	DEAE	284	Транскетолаза	DEAE	189
Пепсиноген	DEAE	285	ТНН	DEAE	190
Пероксидаза	TEAE	286	Трипсин	CM	333—335
	CM	287	Трипсин — ингибитор	CM, DEAE	336—338
	DEAE	288	Трипсиноген	CM	335
Пиридоксинфосфат-дегидрогеназа			Триптофанпирилаза	DEAE	339
Плазминоген	CM, DEAE	88, 289	Тирозиназа	DEAE	340—342
Полигалактуроназа	CM	290	Тирозин-трансаминаза	RAV-изофенол	343
	DEAE	291	Уридиндифосфат-галактозо-4-эпимераза	DEAE	344
Полиол-дегидрогеназа	DEAE	58	Уридиндифосфат-глюкозо-6-пирофосфорилаза	DEAE	345
Полисахариды	DEAE	117, 292		DEAE	346
Прокاربоксипептидаза	DEAE	293		DEAE	347
Прокاربоксипептидаза А	DEAE	215			
Прокاربоксипептидаза В	DEAE	294	Уридинкиназа	CM, DEAE	348
Протеиназа	DEAE	295	Урокиназа	DEAE	349
Протеин-фосфокиназа	DEAE	296	Уропепсиноген	DEAE	349
Протектический ингибитор	DEAE	297	Феноксидаза	DEAE	350
Протромбин	DEAE	298	Ферменты тимуса теленка	DEAE	351
Производные фолевой кислоты	TEAE	299	Ферратин	DEAE	352
Рибофлавин-5'-фосфат	DEAE	30	Фибриноген	DEAE	353
Рибонуклеаза	CM	74, 301—305	Флавиин-нуклеотид	DEAE	300
	DEAE	306, 307	Флавон	CM	354
	DEAE	308	Фосфатаза кислая	DEAE	355, 356
Рибонуклеазный ингибитор	DEAE	308	Фосфатаза основная	ECTEOALA	357
RHK	ECTEOALA	103, 107, 309—312	Фосфодиастераза	CM, DEAE	87
RHK-«растворимая»	ECTEOALA	313—316	Фосфоглюконат	DEAE	358—361
	DEAE	106, 317	Фосфомоноэстераза	DEAE	190
Рибонуклеотиды:			Фосфопротенин	TEAE	286, 362
Аденинмононуклеотиды	DEAE	101	Фосфопротенин-фосфатаза	DEAE	363
Аденозиндигуанулеотиды	DEAE	108	Фосфокиназа	ECTEOALA, TEAE	364
	ECTEOALA	318	Фосфокиназа (картофель)	TEAE	365
Олигонуклеотиды	DEAE	101, 102	Фосфотрансбутирилаза	DEAE	366
RHK-гидролизат	ECTEOALA	319	Хлорпироксидазы	DEAE	367
Поли-нуклеотид коэнзим	ECTEOALA	320	Химотрипсиноген	CM, DEAE	368
Сукцинатдиаминотранс-амидазы	DEAE	321	α -Химотрипсиноген-производные	CM	369, 370
Сульфат-нуклеотид	ECTEOALA	322	Цитохром С	CM	371
Сульфат-редуцирующий фермент	DEAE	323	Эластаза	CM	372
			Энолаза	CM	82, 373
				DEAE	60, 374, 375
				DEAE	233, 375
				SM	376

Получены следующие значения R_F для ряда оснований: аденин 0,30, аденозин 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% NH_4OH и воды (4,5:1,5:1:1:2). Скорость движения фронта была ~ 10 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 работе¹³⁰.

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 Frängen 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. Micheel, 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. Gutter, Mary Wyckoff, E. Peterson, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 756 (1956).
11. J. Porath, *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.*, **1955**, 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. Kohles, *Helv. Chim. Acta*, **34**, 1123 (1951).
23. M. S. Doscher, P. C. Wilcop, *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. Biochem. 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. Gutter, H. A. Sober, E. Peterson, *Arch. Biochem. 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. Biochem. Biophys.*, **96**, 491 (1961).
51. F. Gutter, E. Peterson, H. Sober, *Там же*, **80**, 363 (1959).
52. Th. Huisman, E. Maritiis, A. Dozy, *J. Lab. Clin. Med.*, **52**, 312 (1958).
53. Th. Huisman, A. M. Dozy, *Analyt. Biochem.*, **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, *Biochem. 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. Council Israel*, **A10**, № 1, 41 (1961).
72. E. Tor-Magnus, *Suomen Kemistiseuran tiedon*, **70**, № 2, 73 (1961).
73. D. Arne, *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, *Endocrinology*, **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. Tuppy, *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. Schlamawitz, *Arch. Bioch. Biophys.*, **93**, 267 (1961).
88. V. Boffi, M. Lucarelli, *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. Ablondi, 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, *Biochem. 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, *Biochem. Biophys. Acta*, **43**, 1 (1960).
107. D. Goldthwait, *J. Biol. Chem.*, **234**, 3245, 3251 (1959).
108. A. Stevens, R. Hilmo, *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. Hayer, 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. Roussier 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. Pawelkiewicz, 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. Miltz, *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, Там же, **5**, 236 (1961).
130. R. Randerath, *Angew. Chem.*, **74**, 48 (1962).
131. T. H. Farmer, *Biochem. J.*, **73**, 321 (1958).
132. R. W. Holloy, 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. Steinfeld, *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-Gmünder, 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, Там же, **235**, 2013 (1960).
143. F. H. Bergman, P. Berg, M. Dieckmann, Там 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, Там же, **234**, 2778 (1959).
149. S. Lindskog, *Bioch. Biophys. Acta*, **39**, 218 (1960).
150. S. Yanari, M. Volini, M. Mitz, Там 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, Там же, **236**, 2216 (1961).
155. E. Helmreich, M. Kern, H. Eisen, Там же, **236**, 464 (1961).
156. S. Hsiao, F. Putnam, Там же, **236**, 122 (1961).
157. R. Rortter, *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, Там 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, Там 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, Там же, **234**, 1666 (1959).
177. H. J. Hübener, F. G. Sahroholz, J. Schmidt-Thomé, G. Neesemann, 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, Там же, **234**, 2443 (1959).
184. R. L. Ringer, Там 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. Metzgerberg, M. Marshall, P. Cohen, Там 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. Borgström, 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. Sanval, 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. K. Reisfeld, R. Herth, Bioch. Biophys. Acta, **43**, 540 (1960).
206. P. Condliffe, R. Bates, J. Biol. Chem., **223**, 899 (1956).
207. H. Lee, A. Lerner, V. Buettner-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. Soencer, 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. Alburn, 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. Buettner-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. Perryman, 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. Korner, 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, 1960.
266. R. Stjernholm, H. Wood, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **47**, 303 (1961).
267. P. W. Jungblut, N. Heimbürger, 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. Hevesy, 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. Zydowo, 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. Jevons, 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 (1958).
310. L. Rosch, H. Bloemendal, 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. Bloemendal, M. Sluysen, *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. Takanami, 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. Friedoviciu, 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. Condliffe, 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. Bramsfeld, *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. Bjork, 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. Rovey, 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).