

УДК 547.962.32 : 543.544.45

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ
ДЛЯ АНАЛИЗА СТРУКТУРНЫХ КОМПОНЕНТОВ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ**

В. К. Каграманова, С. Н. Бубенщикова, Л. А. Баратова

Изложены и обобщены достижения в области анализа структурных компонентов нуклеиновых кислот методом жидкостной хроматографии высокого давления. Суммированы общие представления о требованиях, предъявляемых в настоящее время к сорбентам с целью увеличения эффективности хроматографического процесса. Кратко рассмотрены методики и результаты использования эффективных ионообменных сорбентов для разделения и ультрамикроанализа смесей гетероциклических оснований, нуклеозидов, нуклеотидов и их производных.

Библиография — 82 ссылки.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	957
II. Ионообменные сорбенты, используемые в эффективной жидкостной хроматографии высокого давления	958
III. Разделение структурных компонентов нуклеиновых кислот	962

I. ВВЕДЕНИЕ

Развитие эффективных методов анализа в настоящее время играет решающую роль в области исследования структуры нуклеиновых кислот. Совершенствование техники бумажной и тонкослойной хроматографии, использование этих методов в совокупности с техникой электрофореза и радиометрии позволило значительно повысить их чувствительность и разрешающую способность^{1—4}. Однако сложность и продолжительность этих аналитических методов до сих пор не позволяют считать решенной проблему структурного анализа нуклеиновых кислот.

Введение в практику ультрамикроанализа специальной спектрофотометрической техники, использование насосов с малым регулируемым расходом, а также преформированных в капилляре градиентов^{5, 6} дало возможность успешно решить некоторые частные вопросы разделения и анализа олигонуклеотидов с помощью жидкостной колоночной хроматографии⁷. Однако необходимость увеличения скорости разделения и использование для этой цели значительно более высоких давлений требовали изменения хроматографической техники. Создание в последние годы хроматографов высокого давления, оснащенных надежной системой автоматического управления и высокочувствительными детектирующими устройствами, а также появление новых эффективных сорбентов расширило перспективы развития аналитической химии нуклеиновых кислот^{8—10}, позволив использовать для осуществления быстрого ультрамикроанализа разнообразных структурных компонентов технику жидкостной хроматографии высокого давления.

К сожалению, широкое практическое внедрение жидкостной хроматографии высокого давления в область структурных исследований нуклеиновых кислот в значительной степени сдерживается недостаточной, на наш взгляд, информацией относительно возможностей современных ионообменных сорбентов и в связи с этим сложностью выбора оптимальных условий проведения того или иного анализа. Поэтому представляется своевременным и целесообразным обобщить и систематизировать опубликованные к настоящему времени работы, касающиеся использования этого метода для анализа структурных компонентов нуклеиновых кислот, а также выявить тенденции развития и дальнейшие перспективы его применения.

В данном обзоре не рассматриваются общие вопросы теории хроматографии, подробно изложенные в ряде статей и монографий^{8, 9, 11–17}.

II. ИОНООБМЕННЫЕ СОРБЕНТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ

Теория хроматографии, разработанная Мартином и Синджем¹¹, Лапидусом и Амундсоном¹², Гиддингсом^{13, 18}, а также рядом других исследователей¹⁹, позволяет сформулировать требования к сорбентам, используемым в жидкостной колоночной хроматографии, выполнение которых необходимо для оптимизации процесса разделения компонентов анализируемых смесей. Мы остановимся здесь лишь на некоторых принципах, положенных в основу теории жидкостной хроматографии высокого давления.

В соответствии с законом Ламберта — Бера в области линейности рабочих характеристик спектрофотометрического детектора (наиболее часто используемого в жидкостной колоночной хроматографии при анализе компонентов нуклеиновых кислот), т. е. при условии пропорциональности сигнала детектора концентрации поглощающего вещества в ячейке, величина поглощения вещества A задается уравнением

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon cl, \quad (1)$$

где I_0 и I — интенсивность падающего и пропущенного излучения соответственно; ε — молярный коэффициент экстинкции вещества, l — длина оптического пути. В случае распределения Гаусса максимальная концентрация вещества (c_{\max}) при отсутствии «размывания» пика в ячейке детектора определяется выражением¹⁹:

$$c_{\max} = 4M/w_v \sqrt{2\pi}, \quad (2)$$

где M — количество вещества в молях; w_v — ширина пика, выраженная в единицах объема. Таким образом, поглощение вещества в максимуме кривой распределения (A_{\max}) описывается уравнением

$$A_{\max} = \varepsilon l \frac{4M}{w_v \sqrt{2\pi}}. \quad (3)$$

Создание в настоящее время высокочувствительных спектрофотометрических детекторов с малым объемом ячеек (до 8–10 мкл) дает возможность регистрировать чрезвычайно малые (пикомольные) количества нуклеотидного вещества¹⁷. Детекторы такого класса обеспечивают минимальный вклад в величину дисперсии пика (до 8%). Следовательно, нижний предел чувствительности, определяемый величиной A_{\max} , зависит от «размывания» полосы вещества во всех остальных частях хроматографической системы, и в первую очередь в хроматографической колонке.

Эффективность хроматографической колонки, выраженная числом теоретических тарелок (N) или высотой, эквивалентной теоретической тарелке (H), связана с шириной пика следующим образом¹¹:

$$N = \frac{16t^2}{w_t^2} \quad (4)$$

или

$$H = \frac{L}{N} = \frac{Lw_t^2}{16t^2}, \quad (5)$$

где t — время удерживания вещества на колонке; w_t — ширина пика, выраженная в единицах времени; L — длина колонки (в см).

Обобщенная неравновесная теория Гиддингса^{12, 13} позволяет оценить вклады основных составляющих в суммарную величину дисперсии, обусловленные вихревой и продольной молекулярной диффузией, а также сопротивлением массопередаче. Общая высота, эквивалентная теоретической тарелке, равна сумме высот, соответствующих вкладам перечисленных выше факторов «размывания» пика:

$$H = H_1 + H_2 + H_3, \quad (6)$$

где H_1 , H_2 и H_3 — составляющие, обусловленные соответственно вихревой и продольной диффузией и сопротивлением массопередаче. Согласно теории Гиддингса¹³, величины H_1 , H_2 и H_3 можно рассчитать из уравнений:

$$H_1 = 2\lambda d_p, \quad (7)$$

$$H_2 = \frac{2\tau D_m}{v}, \quad (8)$$

$$H_3 = \frac{qr d_p^2 v}{D_s} + \frac{\omega d_p v}{D_m}, \quad (9)$$

где λ , τ , q и ω — постоянные величины, зависящие от структуры наполнителя, а также формы и размера колонки; d_p — диаметр частиц наполнителя; v — линейная скорость перемещения подвижной фазы; D_m — коэффициент диффузии вещества в подвижной фазе; D_s — коэффициент диффузии вещества в стационарной фазе; r — величина, зависящая от относительной скорости перемещения анализируемого вещества и подвижной фазы. Как правило, размывание полосы вещества, связанное с продольной молекулярной диффузией, при обычно используемых в жидкостной хроматографии скоростях перемещения подвижной фазы невелико. Дисперсия же пика за счет вихревой диффузии и сопротивления массопередаче, очевидно, будет тем меньше, чем меньше диаметр частиц сорбента (d_p).

Таким образом, прямой подход к увеличению предела детектирования состоит в сокращении пути диффузии молекул вещества в частицы сорбента, что может быть достигнуто двумя путями: а) уменьшением собственного размера частиц сорбента и б) ограничением толщины слоя сорбента за счет нанесения его на поверхность других (инертных и непроницаемых) частиц. В современной технике приготовления эффективных сорбентов реализуются оба указанных приема.

Развитие технологий получения полимеризационных (на основе сополимера стирола и дивинилбензола) ионообменных сорбентов тонкого зернения привело к созданию эффективных катионо- и анионообменных ми-

ТАБЛИЦА 1
Некоторые характеристики микросферических полимеризационных сорбентов

Коммерческое наименование	d_p , мкм	Функциональные группы	Емкость, мэкв/г	Фирма
Катионообменные сорбенты				
DC-X8	6—10	SO_3^-	5	Durrum Chemical Corp., США
Aminex A-6	15—19	SO_3^-	5	Bio-Rad Laboratories, США
Aminex A-7	7—11	SO_3^-	5	То же
VC-10 ($\times 10$)	7—14	SO_3^-	5	Sondell Scientific Instr., США
Анионообменные сорбенты				
DA-X8	20	NR_4^+	4	Durrum Chemical Corp., США
	6—10	NR_4^+	4	То же
Aminex A-27	12—15	NR_4^+	4	Bio-Rad Laboratories, США
Aminex A-28	7—11	NR_4^+	4	То же

кросферических смол, нашедших успешное применение для быстрого анализаnano- и пикограммовых количеств нуклеозидов и нуклеотидов^{20, 21}. Например, на рис. 1 показано разделение смеси рибонуклеозидов, полученное Бартисом²¹ при использовании колонки с катионообменником марки VC-10 ($\times 10$) (Sondell Scientific Instruments, США). Некоторые характеристики микросферических полимеризационных ионообменных сорбентов, применяемых в жидкостной хроматографии высокого давления, приведены в табл. 1. Следует отметить, что использование сорбентов с очень малым диаметром частиц приводит к необходимости значительного увеличения давления для обеспечения требуемой скорости элюирования. Это в свою очередь накладывает ограничение на использование сорбентов, полимерная матрица которых представлена сополимером стирола и дивинилбензола с невысокой (до 7—8%) степенью сшивости. Как свидетельствуют данные работы²², гелевые свойства таких сор-

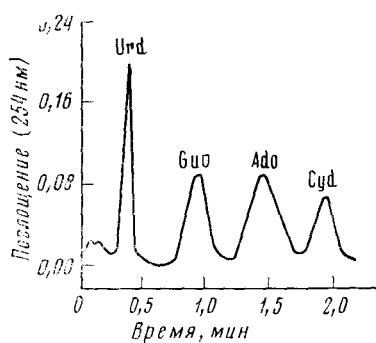


Рис. 1

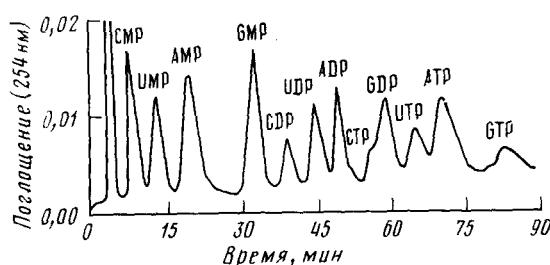


Рис. 2

Рис. 1. Разделение смеси рибонуклеозидов (300 нМ) на колонке (2,4 мм \times 25 см) с катионообменником «VC-10» ($\times 10$) в 0,4 M растворе HCOONH_4 (рН 4,75) при 55° С²¹

Рис. 2. Разделение смеси моно-, ди- и трифосфатов нуклеозидов (по 1,5—3,5 нМ каждого) на колонке (1 мм \times 193 см) с анионообменником «Pellionex» в растворе с линейным градиентом концентрации HCOONH_4 (0,04—1,5 M, рН 4,35) при 25° С. Скорость элюирования 12 мл/час, давление 50 at²⁹

ТАБЛИЦА 2

Некоторые характеристики пелликулярных ионообменных сорбентов и сорбентов с контролируемой поверхностью пористостью

Коммерческое наименование	$d_p, \text{ мкм}$	Функциональные группы	Емкость, мэк/г	Фирма
Катионообменные сорбенты				
Pellionex SCX	40	SO_3^-	10	M. Reeve Angel and Co., США
Zipax-SCX™	25—37	SO_3^-	3,2	Du Pont Wilmington Del., США
Анионообменные сорбенты				
Pellionex SCX	40	NR_4^+	10	H. Reeve Angel and Co., США
Zipax-SAX™	25—37	NR_4^+	12	Du Pont Wilmington Del., США
Zipax-WAX™	25—37	NH_2	12	То же

бентов, проявляющиеся в их набухании, сжатии, уплотнении, уменьшении проницаемости и т. п., создают практически непреодолимые технические трудности в условиях хроматографии высокого давления.

Возможность уменьшения толщины слоя сорбента, в который дифундируют молекулы вещества, путем превращения в ионообменник лишь поверхности частиц носителя впервые обсуждалась в литературе еще Пеппером²³ и Вайссом²⁴. Успешное практическое осуществление этой идеи при разделении белков на частицах цеолита, покрытых катионообменной смолой^{25, 26}, стимулировало появление других поверхностных ионообменных сорбентов и изучение их хроматографических свойств^{27, 28}. Дальнейшая разработка методических приемов нанесения тонких ионообменных покрытий на частицы стекла, тефлона и кремнезема привела к созданию так называемых пелликулярных сорбентов^{29, 30} и сорбентов с «контролируемой поверхностью пористостью»³¹.

Некоторые характеристики этих сорбентов, известных под коммерческими названиями «Pellionex» приведены в табл. 2. Сорбенты типа «Pellionex» получают путем осуществления реакции сополимеризации стирола и дивинилбензола на поверхности стеклянных сферических частиц с последующим введением соответствующих функциональных групп³⁰. В сорбентах типа «Zipax», полимер, содержащий функциональные группы, вводится в поры частиц³¹. Анионообменные сорбенты с контролируемой поверхностью пористостью содержат четвертичные алкиламмониевые радикалы, присоединенные к поликарболовой матрице, а катионообменные сорбенты — сульфированный фторополимер.

Использование пелликулярных ионообменников и сорбентов с контролируемой поверхностью пористостью позволяет проводить быстрое разделение сложных смесей нуклеотидов, а также других структурных компонентов нукleinовых кислот^{9, 32, 33}. В качестве примера на рис. 2 приведено разделение смеси моно-, ди- и трифосфатов нуклеозидов²⁹.

Несомненным преимуществом поверхностных ионообменных сорбентов является возможность использования частиц более крупного (до 40—50 мкм) размера для достижения той же эффективности разделения смесей, что и в случае применения мелких (3—7 мкм) полимеризационных сорбентов⁹. Это позволяет осуществлять разделение в условиях высокой скорости элюирования при значительно более низком давлении. К числу недостатков этих сорбентов следует отнести их малую емкость³⁴, а также механическую непрочность ионообменных покрытий, приводящую иногда к разрушению поверхностного слоя при обычном перемешивании суспен-

зии сорбента⁹. Кроме того, необходимо отметить сложность приготовления таких сорбентов и их высокую стоимость.

К поверхностным ионообменным сорбентам могут быть отнесены также системы с обращенной фазой, известные в литературе под индексами «RPC-1»—«RPC-5»^{35–38}. Некоторые из них успешно используются в настоящее время для разделения транспортных РНК³⁸ и фракционирования олиго- и полинуклеотидов^{39, 40}. В качестве стационарной фазы в этих системах применяются гранулы силикагеля или фторополимера, покрытые тонкой пленкой солей жидкых четвертичных аминов типа trimetiloktil- или trimetildesilammonий хлорида. Установление равновесия между жидкой стационарной и подвижной фазами в процессе элюирования приводит к постепенному «вымыванию» стационарной фазы. Для увеличения срока службы этих сорбентов не рекомендуется применение градиентов элюирования и высоких скоростей потока⁴¹.

Таким образом, общей тенденцией развития современной жидкостной хроматографии высокого давления является переход к применению сорбентов, обеспечивающих высокую скорость массопередачи и эффективность хроматографического процесса. Для анализа структурных компонентов нуклеиновых кислот может быть использовано сравнительно большое число эффективных ионообменных сорбентов, разнообразных по своей структуре и хроматографическим свойствам. Характер используемого ионообменного сорбента во многом определяет условия проведения анализа. В следующем разделе мы подробно рассмотрим методические особенности разделения в условиях хроматографии высокого давления смесей важнейших структурных компонентов нуклеиновых кислот.

III. РАЗДЕЛЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ

1. Анализ гетероциклических оснований

Наличие в молекулах пуриновых и пиримидиновых оснований, по крайней мере одной, а в большинстве случаев — нескольких функциональных групп, способных диссоциировать по кислотному или основному типу, позволяет в зависимости от кислотности среды превращать их в анионы либо в катионы и использовать для их хроматографического разделения ионообменную хроматографию. В условиях жидкостной колоночной хроматографии высокого давления для разделения гетероциклических оснований чаще используют катионообменные сорбенты^{30, 42, 43}, хотя эти соединения могут быть разделены и с помощью анионообменников⁴⁴.

Как свидетельствуют данные работ^{30, 42, 43}, эффективное разделение стандартных смесей гетероциклических оснований может быть достигнуто за 5–10 мин при использовании сорбентов типа «Pellionex» или «Zirax-SCH™». Подробные условия разделения смесей гетероциклических оснований приведены в табл. 3.

Вследствие сравнительно небольшого различия в величине положительного заряда молекул гетероциклических оснований их разделение осуществляют обычно в условиях изократического* режима элюирования. Наиболее удовлетворительное разделение четырех нуклеиновых оснований на колонках с катионообменником типа «Pellionex» достигается при элюировании 0,02 M раствором $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (рН 5,2–5,5) при 68° С³⁰ (рис. 3).

Известно, что поведение соединений в процессе хроматографического анализа определяется как величиной заряда их молекул, так и неион-

* Изократическое элюирование — элюирование раствором постоянной ионной силы.

ТАБЛИЦА 3

Условия разделения гетероциклических оснований с помощью катионообменной хроматографии на пелликулярных сорбентах и сорбентах с контролируемой поверхностью пористостью

Состав разделяемой смеси *	Тип сорбента	Размеры колонки	Состав элюента	Скорость элюирования, мл/час	Давление, atm	Температура элюирования, °C	Продолжительность разделения, мин	Ссылки
Ura, Gua, Ade, Cyt	Pellionex SCX	1 мм×300,7 см	0,02 M NH ₄ H ₂ PO ₄ (рН 5,50)	33,4	180	68	6	30
Ura (Thy), Gua, Cyt, Ade	Pellionex SCX	1 мм×300 см	0,05 M NH ₄ H ₂ PO ₄ (рН 2,55)	40	115—143	70	10	42
Ura, Gua, Cyt, Ade	Pellionex SCX	1 мм×250 см	0,025 M NH ₄ H ₂ PO ₄ (рН 4,40)	36	200	70	5	42
Ura, Hyp, Gua, Cyt, Ade, 6-MePu	Zipax-SCX™	2,1 мм×100 см	0,1 N HNO ₃	120	53	63	15	43

* Соединения приводятся в порядке возрастания величин времени удерживания на колонке. Использованы следующие сокращения: Ura — урацил; Gua — гуанин; Ade — аденин; Cyt — цитозин; Thy — тимин; Hyp — гипоксантин; 6-MePu — 6-метилпурин.

ТАБЛИЦА 4

Условия разделения нуклеозидов с помощью катионообменной хроматографии высокого давления

Состав разделяемой смеси *	Тип сорбента	Размер колонки	Состав элюента	Скорость элюирования, мл/час	Давление, atm	Температура элюирования, °C	Продолжительность разделения, мин	Ссылки
Urd, Guo, Ado, Cyd	Pellionex SCX	1 мм×151,7 см	0,02 M NH ₄ H ₂ PO ₄ (рН 5,60)	25,5	140	39	4	30
dThd, dGuo, dAdo, dCyd	Aminex A-7	2,4 мм×25 см	0,4 M HCOONH ₄ (рН 4,55)	10	70	55	20	42
Urd, Guo, Ado, Cyd	Pellionex SCX	1 мм×300 см	0,012 M NH ₄ H ₂ PO ₄ (рН 3,50)	33	150—170	50	16	42
Urd, Ino, Guo, Ado, Cyd	DC-X8	2,4 мм×25 см	0,4 M HCOONH ₄ (рН 4,75)	40	340	55	4	9
Urd, Guo, Ado, Cyd	VC-10 (×10) (17—14 мкм)	2,4 мм×24 см	0,4 M HCOONH ₄ (рН 4,50)	50	215	75	7	21
Urd, Guo, Ado, Cyd	VC-10 (×10) (7—10 мкм)	2,4 мм×25 см	0,4 M HCOONH ₄ (рН 4,50)	50	330	75	4	21

* Соединения приводятся в порядке возрастания величин времени удерживания на колонке. Использованы следующие сокращения: Urd — уридин; (d) Ado — дезоксиаденозин; (d) Guo — дезоксигуанин; dThd — дезокситимидин; dCyd — дезоксизидин; Ino — инозин.

ным сродством к сорбенту. Анализируя последовательность элюирования гетероциклических оснований при разделении их на колонках с сорбентами типа «Pellionex» и «Zipax-SCXTM» (см. табл. 3), можно заключить, что взаимодействия ионного характера выражены здесь более сильно, нежели при использовании обычных полимеризационных катионообменных сорбентов типа «Dowex-50», «Amberlite IRC-50» и др.⁴⁵. Действительно, при элюирующем буфере с pH 5,5 последовательность элюирования урацила, гуанина ($pK_a' 3,3$), аденина ($pK_a' 4,2$) и цитозина ($pK_a' 4,6$) соответствует увеличению pK_a' оснований (т. е. возрастанию положительного заряда молекул)⁴⁶. В области же более низких значений pH порядок элюирования аденина и цитозина меняется^{42, 43}. Данные, полученные Хорватом и Липски³⁰, свидетельствуют также об аномальном поведении гуанина на колонках с катионообменником «Pellionex» при pH 5,2 (наблюдалось «двоение» пика, соответствующего гуанину).

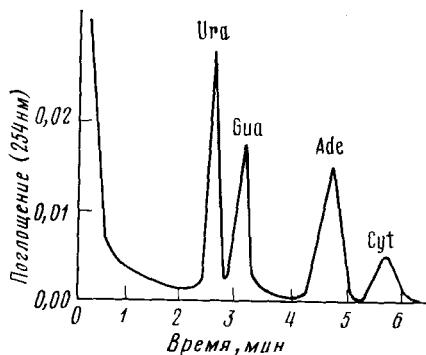


Рис. 3. Разделение смеси гетероциклических оснований (по 0,8 нМ каждого) на колонке (1 мм × 300,7 см) с катионообменником «Pellionex» в 0,02 M растворе $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (pH 5,5) при 68°С. Скорость элюирования 33,4 мл/час, давление 177 at³⁰

Объяснить эти явления с точки зрения неполярных взаимодействий молекул вещества с частицами сорбента, по-видимому, невозможно, поскольку неполярное сродство практически не зависит от pH среды⁴⁵. Неубедительным представляется также предположение авторов о том, что аномальное поведение соединений на пелликулярных сорбентах может быть связано с кинетическими эффектами в процессе установления равновесия сорбции — десорбции молекул вещества в стационарной и подвижной фазах³⁰.

Следует отметить, что использование катионообменного сорбента «Zipax-SCXTM» с контролируемой поверхностью пористостью, благодаря его меньшей емкости (см. табл. 2), позволяет осуществлять элюирование оснований раствором с меньшей ионной силой (даже при более низком значении pH элюента)⁴³.

Возможность использования микросферических полимеризационных катионообменных смол в условиях хроматографии высокого давления для анализа гетероциклических оснований была впервые продемонстрирована⁴⁷ при определении количества ДНК в различных тканях по содержанию тимина. В работе⁴⁸ осуществлено разделение смеси гетероциклических оснований, образующихся в результате кислотного гидролиза ДНК на колонке с сорбентом «Aminex A-7» в 1 M растворе NaH_2PO_4 (pH 3,4). При этом неионные взаимодействия компонентов смеси с органической матрицей сорбента подавлялись за счет повышения температуры элюирования и добавления в раствор спирта.

Необходимость в разделении смесей гетероциклических оснований возникает довольно часто в процессе целого ряда биохимических исследований, в частности при определении состава РНК и ДНК, при выяснении возможных путей превращения свободных нуклеотидов *in vivo*,

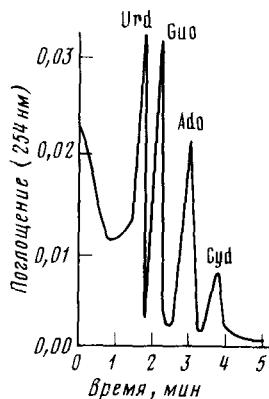
при изучении механизма действия некоторых ферментов и т. д., и во всех случаях ионообменная хроматография высокого давления является, как правило, одним из наиболее действенных аналитических методов^{8, 9, 49, 50}.

2. Анализ нуклеозидов

Разделению и анализу смесей нуклеозидов и их производных в условиях ионообменной хроматографии высокого давления посвящено большое число работ^{9, 21, 30, 42}. Это связано прежде всего с возросшей в последние годы доступностью высокоочищенных ферментов, позволяющих осуществлять в мягких условиях гидролиз рибо- и дезоксирибонуклеотидных цепей до нуклеозидов, благодаря чему ряд проблем при исследовании структуры нуклеиновых кислот может быть решен именно на уровне анализа нуклеозидов.

В табл. 4 суммированы литературные данные относительно типов сорбентов и условий разделения, наиболее часто применяемых для анализа нуклеозидов. Видно, что для разделения нуклеозидов и ряда их производных в условиях жидкостной хроматографии высокого давления могут быть использованы и микросферические полимеризационные катионообменные смолы²¹, и пелликуллярные катионообменники типа «Pellionex»^{22, 41}, а также сорбенты с контролируемой поверхностью пористостью «Zipax-SCX™»⁹. Однако более детальный анализ результатов разделения, полученных при использовании перечисленных сорбентов, заставляет отдать предпочтение микросферическим полимеризационным смолам, поскольку сорбция уридинина и тимидина на колонках с сор-

Рис. 4. Разделение смеси рибонуклеозидов (по $\sim 0,3 \text{ нМ}$ каждого) на колонке ($1 \text{ мм} \times 151,7 \text{ см}$) с катионообменником «Pellionex» в $0,02 \text{ M}$ растворе $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (рН 5,5) при 24°C . Скорость элюирования $32,5 \text{ мл/час}$, давление 38 ат ²²



бентами типа «Pellionex» и «Zipax-SCX™» в условиях наилучшего разрешения пиков нуклеозидов, как отмечает Хорват⁹, крайне мала. Вследствие этого указанные нуклеозиды элюируются в очень узкой зоне, и их пики, как правило, накладываются на «пик инъекции», сопровождающий обычно введению анализируемого раствора в колонку (рис. 4). Это затрудняет, а зачастую и делает невозможным, правильную интерпретацию результатов разделения. Использование же микросферических катионообменных смол, полимерная матрица которых, по всей вероятности, обеспечивает более сильную сорбцию, позволяет преодолеть эти трудности. Лучшие результаты разделения нуклеозидов и ряда их производных получил Бартис²¹ на колонках с наиболее мелкой катионообменной смолой марки «DC-x8» (см. рис. 1) и «VC-10». Бартисом подтвержден также теоретический вывод о том, что наибольшая эффективность разделения может быть достигнута при заполнении колонки более мелкими частицами (см. табл. 5).

ТАБЛИЦА 5

Эффективность колонок с микросферическими катионообменными полимеризационными сорбентами при разделении нуклеозидов в 0,4 M растворе формата аммония (рН 4,55)⁴²

Сорбент	d_p , мкм	Размеры колонки	Температура, °C	Скорость элюирования		Давление, atm	N	H , мм
				мл/час	см/сек			
DC-×8	3—7	2,4 мм × 25 см	55	40	0,61	326	1042	0,24
Aminex A-7	7—10	2,4 мм × 25 см	55	35	0,54	300	806	0,31
VC-10 (×10)	7—14	2,4 мм × 25 см	85	85	1,30	334	338	0,74

Микросферические полимеризационные катионообменные сорбенты с успехом применялись для анализа ферментативных гидролизатов ряда РНК с целью выяснения их нуклеозидного состава^{9, 21, 42}, а также для изучения содержания различных миорных нуклеозидов в препаратах ДНК⁹¹ и индивидуальных транспортных РНК^{34, 50}.

Для сравнительно быстрого разделения смесей, одновременно содержащих рибо- и дезоксирибонуклеозиды, могут быть использованы условия разделения этих нуклеозидов на колонках с сорбентом «Aminex A-7», предложенные Дашем и Ласковским⁵². Различие в величинах времени удерживания производных рибозы и дезоксирибозы можно объяснить скорее вторичными взаимодействиями нуклеозидов с сорбентами (водородными связями и т. д.), чем взаимодействиями ионного характера. Метод с успехом был применен для определения примесных количеств (до 0,2—0,4%) РНК в препаратах ДНК после проведения ферментативной деградации полимерных молекул до нуклеозидов⁵².

Успешное использование для разделения рибо- и дезоксирибонуклеозидов в условиях эффективной жидкостной хроматографии нашел также и традиционный прием получения углеводно-боратных комплексов, предложенный еще в 1951 г.⁵³ и детально разработанный позже^{45, 54}. Помощью сочетания ионоэкслюзионной и распределительной хроматографии на колонках с сорбентом «Aminex A-6», при использовании в качестве элюента 0,1 M раствора бората аммония (рН 7,4) удается разделить рибо- и дезоксирибонуклеозиды за счет способности первых к комплексообразованию с борат-ионами элюента. Превратившиеся при этом в анионы производные рибозы «выталкиваются» из отрицательно заряженной стационарной фазы.

Ион-экслюзионная хроматография вообще в последние годы находит все большее применение для разделения смесей нуклеозидов. Принцип этого метода неоднократно обсуждался в литературе^{55, 56}. Различие в величине отрицательных зарядов молекул, а также их разная неспецифическая сорбция позволяют осуществлять в условиях щелочной среды (рН 9,5) сравнительно быстрое разделение сложных смесей нуклеозидов на колонках с катионообменными смолами типа «Aminex A-6»^{57, 58}.

Применение в ионо-экслюзионной хроматографии более мелких полимеризационных смол и высоких скоростей потока позволит, по-видимому, значительно увеличить эффективность метода, открывая тем самым широкие перспективы для использования техники хроматографии высокого давления.

3. Анализ мононуклеотидов и их производных

Для разделения смесей мононуклеотидов применяют обычно анионообменные сорбенты, поскольку во всей области значений рН элюентов, используемых обычно в ионообменной хроматографии, эти соединения и

большинство их производных за счет кислотной диссоциации фосфатных групп ($pK_a^1 1$; $pK_a^2 6-7^{59}$) находятся в форме анионов. Приведенные в табл. 6 данные свидетельствуют о том, что анионообменники типа «Pellonex» и сорбенты «Zipax-SAXTM» наиболее широко используются для анализа этих соединений в условиях хроматографии высокого давления. Применение для этих же целей колонок с микросферическими полимеризационными анионообменными смолами ограничено^{60, 61}, что, на наш взгляд, обусловлено нарушением упаковки колонок вследствие изменения набухания сорбента. Кроме того, изменение состава элюирующего буфера приводит обычно к уплотнению полимеризационных сорбентов, что крайне нежелательно в условиях хроматографии высокого давления.

Рис. 5. Разделение смеси нуклеозид-5'-фосфатов на колонке (2,1 мм × 100 см) с сорбентом «Zipax SAXTM» в 0,002 M растворе KH_2PO_4 (рН 3,75) при 60°С. Скорость элюирования 114,6 мл/час, давление 64 ат⁴³

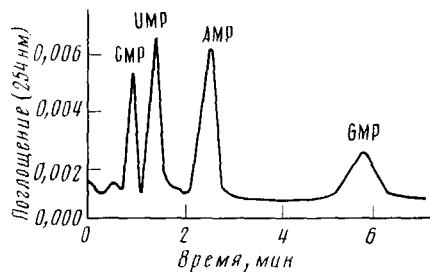
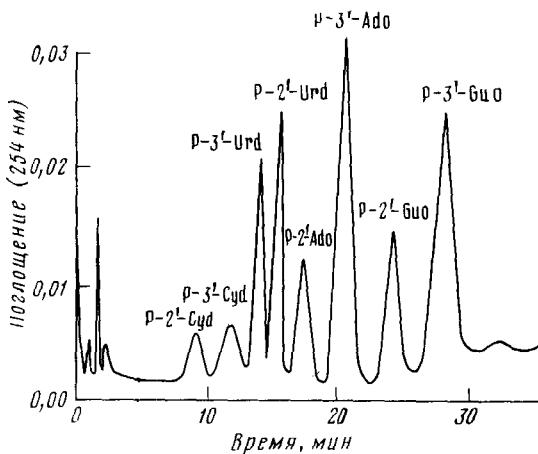


Рис. 6. Разделение смеси нуклеозид-2',3'-фосфатов (по ~1 нМ каждого) на колонке (1 мм × 300 см) с анионообменником «Pellonex» в растворе с линейным градиентом концентрации KH_2PO_4 (0,01 M, рН 3,35—1,0 M, рН 4,20) при 75°С. Скорость элюирования 48 мл/час, давление 207 ат⁶⁴



Следует обратить внимание на различие условий разделения смесей нуклеотидов на разных сорбентах (см. табл. 6), что может быть обусловлено различием химической структуры самих сорбентов. Так, на колонках с анионообменником «Zipax-SAXTM» удается осуществлять разделение некоторых смесей (например, рибонуклеотидов, дезоксирибонуклеотидов и др.) в условиях изократического элюирования^{43, 62}. В частности, хорошее и быстрое разделение нуклеозид-5'-фосфатов было достигнуто на колонках с этим сорбентом при использовании 0,002 M раствора KH_2PO_4 , рН 3,75 (рис. 5). Использование же для этой цели анионообменного носителя «Pellonex» требует применения градиентного элюирования^{9, 42}. Очень часто для улучшения разрешения и формы пиков наряду с изменением концентрации используют также изменение величины рН элюента^{9, 42, 43}.

Положение фосфатной группы в молекуле нуклеотида влияет на степень протонизации гетероциклического основания⁵⁹ и, следовательно, на

ТАБЛИЦА 6

Условия разделения нуклеотидов и их производных с помощью анионообменной хроматографии высокого давления

Состав разделения смеси *	Тип сорбента	Размер колонки	Состав элюента	Скорость элюирования, мл/час	Температура элюирования, °C	Давление, atm	Продолжительность разделения, мин	Ссылки
P-2'-Cyd, P-3'-Cyd, P-2'-Urd, P-3'-Urd, P-2'-Ado, P-3'-Ado, P-2'-GuO, P-3'-GuO	Dowex-1x8 (~ 10 мкм)	0,25 см × 75 см	(0,05—1,0 M) CH ₃ COONa (pH 4,40) **	60	45	285	240	60
AMP, ADP, ATP CMP, UMP, AMP, GMP, CDP, UDP, ADP, GDP, CTP, UTP, ATP, CTP	Pellionex Pellionex	1 мм × 300 см 1 мм × 193 см	0,75 M KH ₂ PO ₄ (pH 4,2) ** (0,04—1,5 M) HCOONH ₄ (pH 4,35) **	55 12	80 25	186—214 54	4 90	42 30
CMP, UMP, AMP, IMP, GMP, XMP	Pellionex	1 мм × 300 см	0,01 M KH ₂ PO ₄ (pH 3,25)— 1 M KH ₂ PO ₄ (pH 4,20) **	15	70	200	55	42
dCMP, dTMP, dAMP, dGMP	Pellionex	1 мм × 300 см	0,01 M KH ₂ PO ₄ (pH 3,25)— 1 M KH ₂ PO ₄ (pH 4,20) **	57	80	170—200 207	10 30	42 9
P-2'-Cyd, P-3'-Cyd, P-2'-Urd, P-3'-Urd P-2'-Ado, P-3'-Ado, P-2'-GuO, P-3'-GuO	Pellionex	1 мм × 300 см	0,01 M KH ₂ PO ₄ (pH 3,35)—1 M KH ₂ PO ₄ (pH 4,20) **	48	75	170—200 207	10 30	42 9
CMP, UMP, AMP, GMP	Zipax-SAX™	2,1 мм × 100 см	0,006 M H ₃ PO ₄ , 0,002 M KH ₂ PO ₄ (pH 3,75) ***	114,6	60	64	7	43
dCMP, dTMP, dAMP, dGMP	Zipax-SAX™	1 мм × 100 см	0,008 M KH ₂ PO ₄ (pH 4,40) ***	2,5	20	150	70	62

* Соединения приводятся в порядке возрастания величин времени удерживания на колонке. Использованы следующие сокращения: P-2'(3')-Cyd — цитидин-2'(3')-фосфат; P-2'(3')-Urd — уридин-2'(3')-фосфат; P-2'(3')-Ado — аденоzin-2'(3')-фосфат; P-2'(3')-Guo — гуанин-2'(3')-фосфат; (d)CMP — (дезоксирибоцитидин-5'-фосфат; (d)TMP — дезоксирибонуклеотид-5'-фосфат; (d)UMP — уридин-5'-фосфат; (d)AMP — (дезоксирибоаденоzin-5'-фосфат; (d)GMP — дезоксирибогуанозин-5'-фосфат; IMP — инозин-5'-фосфат; XMP — ксантизин-5'-фосфат.

** Градиентное элюирование.

*** Изократическое элюирование.

ТАБЛИЦА 7

Величины времени удерживания нуклеотидов и их производных при хроматографии на колонке ($1 \text{ мм} \times 300 \text{ см}$) с анионообменником «Pellionex»*

Соединение**	Время, мин	Соединение**	Время, мин	Соединение**	Время, мин
CMP	10	NAD ⁺	8,5	CTP	46
UMP	12	UDP-Glc	24	UTP	49,5
TMP	14	CDP	29	TTP	54
IMP	18	UDP	31	ATP	60
AMP	19	TDP	33	GTP	65
GMP	23	ADP	38		
6Me-sPuMP	27	NADH	39		
sGMP	32	GDP	43		
XMP	34	UDP-GlcCOOH	44		

* Условия хроматографирования⁶⁶: элюирование в линейном градиенте фосфатного буфера [$0,015 \text{ M}$ KH_2PO_4 (pH 3,25)] — $0,25 \text{ M}$ KH_2PO_4 (pH 4,20), $2,2 \text{ M}$ KCl при 75°C . Скорость элюирования 12 мл/час .

** Использованы следующие сокращения: 6Me-sPuMP — 6-метилсаркапторобизипурин-5'-фосфат; sGMP — меркаптуганин-5'-фосфат; NAD⁺, NADH — никотинамид-аденин-динуклеотид (окисленный и восстановленный); UDP-Glc — уридиндиfosфатглюкоза; UDP-GlcCOOH — уридинфосфатглюконовая кислота.

величину суммарного заряда молекулы, и позволяет тем самым осуществлять разделение изомерных фосфатов нуклеозидов⁹. Приведенные на рис. 6 условия разделения смеси 2',3'-фосфатов нуклеозидов были использованы для анализа щелочных гидролизатов РНК⁶³.

Техника анионообменной хроматографии высокого давления и применение эффективных сорбентов позволяют осуществлять сравнительно быстрое разделение моно-, ди- и трифосфатов рибо- и дезоксирибонуклеозидов^{9, 29, 64} (см. также рис. 7), требующее в условиях обычной хроматографии многочасового элюирования⁶⁵. В табл. 7 приведены полученные Брауном⁶⁶ величины времени удерживания моно-, ди- и трифосфатов нуклеозидов, а также ряда их производных при хроматографии на анионообменнике типа «Pellionex», которые весьма полезны при интерпретации хроматограмм, получаемых при разделении смесей свободных нуклеотидов и их производных из различных экстрактов.

Возможность осуществления быстрого анализа пикомольных количеств аденоzin-5'-фосфата, аденоzin-3',5'-циклофосфата и аденоzin-5'-трифосфата на колонках с анионообменником «Pellionex» была использована рядом исследователей для определения активности аденоzinкиназы и аденоzin-3',5'-циклофосфатдизтеразы, катализирующих превращения соответствующих производных адениловой кислоты в клетках тканей⁶⁷⁻⁶⁹.

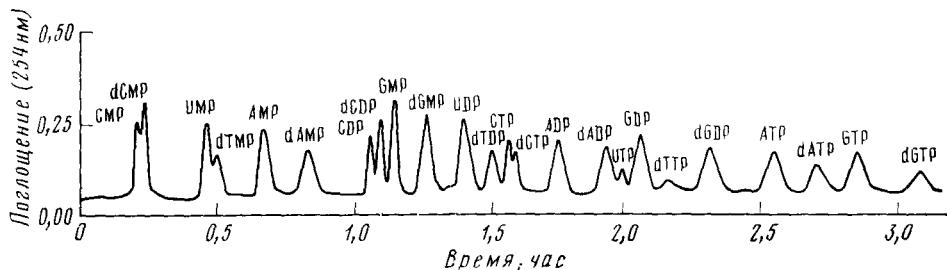


Рис. 7. Разделение смеси рибо- и дезоксирибонуклеозидфосфатов на колонке ($0,62 \text{ мм} \times 20 \text{ см}$) с сорбентом «Ampex A-28» в растворе с градиентом концентрации цитрата натрия (pH 8,6) при 70°C . Скорость элюирования 36 мл/час , давление 15 ат ⁶⁴

Успешное разделение смеси нуклеозидов и нуклеотидов на колонках с полимеризационным анионообменником «Ампекс А-28»⁴⁸ (рис. 8) позволяет выполнять быстрый анализ концевых групп олигонуклеотидов, что является одной из необходимых стадий при исследовании первичной структуры фрагментов нативных нукleinовых кислот.

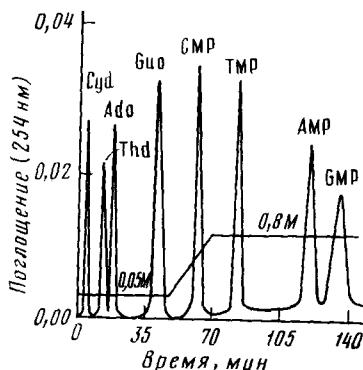


Рис. 8. Разделение смеси дезоксирибонуклеозидов и дезоксирибонуклеозид-5'-фосфатов на колонке (1,8 мм×50 см) с сорбентом «Ампекс А-28» в растворе с градиентом концентрации фосфат-боратного буфера (0,05—0,8 М, pH 7,8) при 60°С. Скорость элюирования 25 мл/час, давление 220 ат⁴⁸

Многочисленные работы, посвященные изучению содержания мононуклеотидов и их производных в различных экстрактах с целью проведения биохимических и медикобиологических исследований^{70—73}, также свидетельствуют об уникальных возможностях жидкостной хроматографии высокого давления, с которой в этой области исследований не может в настоящее время конкурировать ни один из известных аналитических методов.

4. Хроматография олиго- и полинуклеотидов

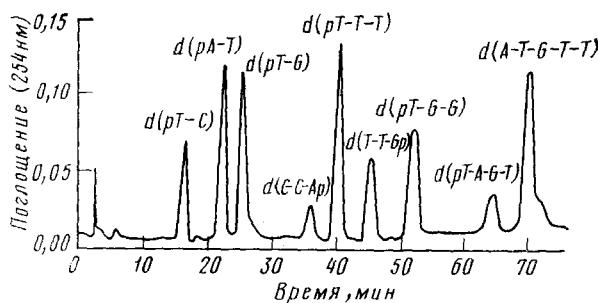
Осуществление высокоэффективного разделения различных по длине цепи и нуклеотидному составу олиго- и полинуклеотидов является одной из актуальнейших проблем аналитической химии нукleinовых кислот. Возможности жидкостной хроматографии высокого давления для решения этой проблемы к настоящему времени изучены явно недостаточно. Выбор сорбентов для разделения олиго- и полинуклеотидов, поведение которых при хроматографии определяется не только структурой гетероциклических оснований, природой сахарных остатков и величиной суммарного заряда молекул, но также молекулярным весом и особенностями стерического взаимодействия с поверхностью ионообменника^{77, 78}, представляет довольно сложную задачу. В связи с этим особое значение имеет проницаемость частиц сорбента для крупных молекул. Так, используемые в жидкостной хроматографии высокого давления микросферические полимеризационные анионообменники с высоким содержанием поперечных связей (до 8—10%) оказываются либо вовсе не проницаемым для полианионов с большим молекулярным весом, либо их проницаемость крайне мала вследствие очень малой скорости диффузии этих соединений в частицы сорбента. Сорбенты же с меньшим содержанием поперечных сшивок, как уже отмечалось выше, не применяются в жидкостной хроматографии высокого давления из-за более сильно выраженных гелевых свойств. Они могут быть использованы лишь в качестве пленочного ионообменного покрытия в так называемых пелликулярных сорбентах⁹. Однако практическая возможность применения таких сорбентов в хроматографии олигонуклеотидов пока не выяснена. До настоящего времени пелликулярные анионообменники использовались лишь для разделения динуклеотидов^{9, 42, 64}.

Наиболее часто для анализа олиго- и полинуклеотидов применяют анионообменные системы с обращенной фазой; «RPC-3» — «RPC-5»^{35—38}.

Эти сорбенты, впервые введенные в практику жидкостной хроматографии Келмерсом и соавт.³⁵ для фракционирования транспортных РНК, находят сейчас успешное применение и для разделения олиго- и полинуклеотидов^{39, 40}. Хроматографические характеристики таких сорбентов зависят от химической природы жидкой стационарной фазы, в качестве которой обычно используются жидкие тетраалкиламмониевые соли, а также от структуры частиц, служащих твердой подложкой.

В системах «RPC-3» и «RPC-4» в качестве твердой подложки используют частицы кремнезема или силикагеля. Для прочного связывания пленки жидкого кватернированного амина с поверхностью таких частиц их подвергают процессу силилирования, т. е. обработке триалкил- или триарилхлорсиланами^{37, 39}. Данные, полученные в³⁹, дают основание считать, что использование для этой цели трифенилхлорсилана является предпочтительным, поскольку в значительной степени улучшает хроматографические свойства сорбента. С помощью таких сорбентов авторам³⁹ удалось осуществить разделение олигонуклеотидов тимидиловой кислоты в условиях изократического элюирования 0,5 M раствором аммонийформиатного буфера (рН 5,25). Эффективной для фракционирования олиго- и полинуклеотидов в соответствии с длиной их цепи оказалась система «RPC-5», в которой в качестве твердой подложки служат частицы фторополимера⁴⁰. Применение этой системы позволило авторам⁴⁰ осуществить разделение 60-компонентной смеси гомологичных олигонуклеотидов с общей формулой $(Ap)_xU$ ($x=1, 2, 3, \dots$).

Рис. 9. Хроматография олигодезоксирибонуклеотидов⁴¹ в колонке (2 мм×25 см), наполненной силикагелем (размер частиц ~10 мкм) с ковалентно присоединенными радикалами первичных аминов, в растворе с линейным градиентом концентрации фосфатного буфера (0,10 M K₂HPO₄, рН 3,30—0,75 M K₂HPO₄, рН 4,25) при комнатной температуре. Скорость элюирования 60 мл/час, давление 180 ат⁸¹



Отсутствие информации относительно разделения на таких сорбентах смесей, более сложных по структуре олиго- и полинуклеотидов, не позволяет пока оценить перспективы и границы их использования. Безусловно лишь, что способность некоторых олигонуклеотидов к самоагрегации в водных солевых растворах⁷⁹ и связанное с этим возрастание роли вторичных взаимодействий неионного характера создает известные трудности при хроматографии их на этих сорбентах. Невозможность же применения в условиях жидкко-жидкостной хроматографии высокого давления таких органических соединений, как мочевина, диоксан и др., обычно используемых для подавления подобных вторичных взаимодействий^{80, 81}, вследствие значительного возрастания вязкости мобильной фазы и увеличения растворимости в ней жидкой стационарной фазы еще более усугубляет эти трудности.

В связи с этим очень многообещающим представляется изучение возможности использования для разделения смесей олиго- и полинуклеотидов появившихся в последние годы объемнопористых сорбентов со связанный ионообменной фазой⁴¹, в которых радикалы аминов присоединены к частицам силикагеля посредством прочных ковалентных связей.

К таким сорбентам следует отнести «Partisil-10 SAX» («Whatman», Англия) и «Lichrosorb NH₂» («E. Merk», ФРГ). Обладая всеми достоинствами систем с обращенной фазой, они допускают широкую вариацию состава элюентов, значительно расширяя тем самым возможности их применения.

Как свидетельствуют данные, полученные в работе ⁸¹, колонки с силикагелем с привитыми аминоалкильными радикалами с успехом могут быть использованы для фракционирования олигонуклеотидов как по длине, так и по составу (рис. 9). Устойчивость стационарной фазы таких колонок к органическим растворителям и в широком диапазоне pH (1—8,5) обеспечивает хорошую воспроизводимость результатов анализа и длительность службы колонок ⁸².

* * *

Обобщая рассмотренный в настоящем обзоре материал, следует заключить, что применение современной ионообменной хроматографии высокого давления позволяет в настоящее время осуществлять успешное разделение ультрамикроаналитических количеств самых разнообразных по сложности смесей структурных компонентов нуклеиновых кислот. Коммерческая доступность необходимой хроматографической аппаратуры и ионообменных сорбентов, обеспечивающих высокую скорость массопередачи и связанную с этим эффективность хроматографического процесса, дает возможность использовать технику жидкостной хроматографии высокого давления для решения огромного числа задач в области исследования состава, строения и функциональной роли нуклеиновых кислот. Следует надеяться, что дальнейшее изучение возможностей уже имеющихся сорбентов, а также появление новых ионообменных материалов позволит со временем еще более расширить границы применения техники жидкостной хроматографии высокого давления, которая по эффективности в целом ряде случаев сравнима с газовой хроматографией.

ЛИТЕРАТУРА

1. F. Sanger, G. G. Brownlee, Methods in Enzymology, v. 12, pt. A, 1967, p. 361.
2. M. Szekey, F. Sanger, J. Mol. Biol., 43, 607 (1969).
3. E. Randerath, J. W. TenBrocke, K. Randerath, Febs Letters, 2, 10 (1968).
4. K. Randerath, S. K. MacKinnan, E. Randerath, Там же, 15, 31 (1969).
5. С. В. Кузьмин, в кн. Ультрамикроанализ нуклеиновых кислот, «Наука», М., 1973, стр. 95.
6. С. В. Кузьмин, В. В. Матвеев, С. К. Прессман, Л. С. Сандахчиев, Биохимия, 34, 706 (1969).
7. М. А. Грачев, в кн. Ультрамикроанализ нуклеиновых кислот, «Наука», М., 1973, стр. 104.
8. P. R. Brown, High Pressure Liquid Chromatography: Biochemical and Biomedical Applications, Acad. Press, N. Y., 1973.
9. C. Horvath, Meth. Biochem. Anal., 21, 79 (1973).
10. Р. Стивенсон, в кн. Основы жидкостной хроматографии, «Мир», М., 1973, стр. 202.
11. A. J. P. Martin, R. L. M. Syngle, Biochem. J., 35, 1358 (1941).
12. L. Lapidus, N. R. Amundsen, J. Phys. Chem., 59, 416 (1955).
13. J. C. Giddings, Dynamics of Chromatography, pt. 1, Marcel Dekker, N. Y., 1965.
14. O. Samuelson, Ion Exchange Separation in Analytical Chemistry, Wiley Intersci., N. Y., 1963.
15. H. F. Walton, in Chromatography, ed. E. Heftmann, Reinhold, N. Y., 1967, p. 287.
16. Ф. Бауманн, в кн. Основы жидкостной хроматографии, «Мир», М., 1973, стр. 35.
17. J. J. Kirkland, Modern Practice of Liquid Chromatography, Wiley Intersci., N. Y., 1971.
18. J. C. Giddings, J. Chem. Phys., 31, 1492 (1959).
19. J. J. Van Deenter, F. J. Zniderweg, A. Klinkenberg, Chem. Eng. Sci., 5, 271 (1956).
20. C. D. Scott, N. E. Lee, J. Chromatogr., 42, 263 (1969).
21. C. A. Burtis, Там же, 51, 183 (1970).
22. C. Horvath, S. R. Lipsky, J. Chromatogr. Sci., 7, 109 (1969).
23. K. W. Pepper, Chem. Research. Her Majesty's Stationery Office, London, 1952.
24. D. E. Weiss, Austral. J. Appl. Sci., 4, 510 (1953).
25. J. Feitelson, S. M. Patridge, Biochem. J., 64, 601 (1956).

26. N. K. Boardman, *J. Chromatogr.*, **2**, 388, 398 (1959).
27. J. R. Parrish, *Nature*, **207**, 402 (1965).
28. M. Skaf, K. H. Lieser, *Z. Anal. Chem.*, **251**, 177 (1970).
29. C. Horvath, B. Press, S. R. Lipsky, *Anal. Chem.*, **39**, 1422 (1967).
30. C. Horvath, S. R. Lipsky, Там же, **41**, 1227 (1969).
31. J. J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, **7**, 361 (1969).
32. H. W. Schmukler, Там же, **8**, 653 (1970).
33. H. W. Schmukler, Там же, **10**, 38 (1972).
34. R. W. Stout, C.-D. Chang, J. R. Coward, *Anal. Biochem.*, **76**, 342, (1976).
35. J. F. Weiss, A. D. Kelmers, *Biochemistry*, **6**, 2507 (1967).
36. J. F. Weiss, R. L. Pearson, A. D. Kelmers, Там же, **7**, 3749 (1968).
37. R. L. Pearson, J. F. Weiss, A. D. Kelmers, *Biochim. Biophys. Acta*, **228**, 770 (1971).
38. A. D. Kelmers, D. E. Heartherly, *Anal. Biochem.*, **44**, 486 (1971).
39. R. A. Holton, D. M. Spatz, E. E. Van Tamelen, W. Wierenga, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **58**, 605 (1974).
40. G. C. Walker, O. C. Ulenbeck, E. Bedows, R. I. Gumpert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 122 (1975).
41. R. W. Majors, D. R. Gere, in *Basic Liquid Chromatography*, N. Y., Varian Aerograph, pt 4, 1972.
42. C. A. Burlis, M. N. Munk, F. R. MacDonald, *Clin. Chem.*, **16**, 667 (1970).
43. J. J. Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 72 (1970).
44. N. G. Anderson, J. C. Green, M. R. Barber, F. C. Ladd, *Anal. Biochem.*, **6**, 153 (1963).
45. В. Кон, в сб. *Нуклеиновые кислоты*, ред. Э. Чареафф, Дж. Дэвидсон, ИЛ, М., 1957, стр. 464.
46. D. O. Jordan, *The Chemistry of Nucleic Acids*, Butterworths, Washington, 1960, p. 134.
47. G. Gauchel, F. D. Gauchel, K. Beyermann, R. K. Jahn, *Z. Anal. Chem.*, **259**, 183 (1972).
48. В. П. Демушкин, Ю. Г. Пляшкевич, *Биоорганская химия*, 2, 1652 (1976).
49. B. C. Pol, I. D. Regan, F. D. Hamilton, *Anal. Biochem.*, **67**, 625 (1975).
50. G. C. Sen, H. P. Ghosh, Там же, **58**, 578 (1974).
51. H. I. Breiter, G. Seibert, R. K. Zahn, *J. Chromatogr.*, **118**, 242 (1976).
52. D. S. Duch, Sr. M. Laskowski, *Anal. Biochem.*, **44**, 42 (1971).
53. I. X. Khym, L. P. Zill, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 2399 (1951).
54. I. X. Khym, W. E. Cohn, Там же, **76**, 1818 (1954).
55. O. Samuelson, *Ion Exchange Separation in Analytical Chemistry*, N. Y., 1963, p. 46.
56. D. Reichenberg, *Ion Exchange in Organic and Biochemistry*, ed. C. Calmon, T. R. E. Kressman, N. Y., 1957, p. 178.
57. R. P. Singhal, *Arch. Biochem. Biophys.*, **152**, 800 (1972).
58. R. P. Singhal, W. E. Cohn, *Biochim. Biophys. Acta*, **262**, 565 (1972).
59. J. Claunwaert, J. Stockx, *Z. Naturforsch.*, **23b**, 25 (1968).
60. J. G. Grend, C. E. Nunley, N. G. Anderson, *Nat. Canc. Inst. Monogr. (USA)*, **21**, 431 (1966).
61. Б. К. Караганова, М. Ф. Аукати, Г. Ф. Федорова, З. А. Шабарова, *Биохимия*, **41**, 394 (1976).
62. T. F. Gabriel, J. Michalewsky, *J. Chromatogr.*, **67**, 309 (1972).
63. W. P. Kennedy, J. C. Lee, Там же, **51**, 203 (1970).
64. I. X. Khym, *Chromatogr.*, **124**, 415 (1976).
65. W. E. Cohn, in *Chromatography*, ed. E. Heftmann, Reinhold, N. Y., 1967, p. 627.
66. P. R. Brown, *J. Chromatogr.*, **52**, 257 (1970).
67. G. Brooker, *Anal. Chem.*, **42**, 1108 (1970).
68. G. Brooker, *J. Biol. Chem.*, **246**, 7810 (1971).
69. S. N. Pennington, *Anal. Chem.*, **43**, 1701 (1971).
70. C. D. Scott, *Clin. Chem.*, **14**, 521 (1968).
71. P. R. Brown, *Anal. Chem.*, **44**, 1072 (1972).
72. M. Uziel, C. K. Koh, W. E. Cohn, *Anal. Biochem.*, **25**, 77 (1968).
73. C. A. Burlis, K. S. Warren, *Clin. Chem.*, **14**, 290 (1968).
74. A. J. Clifford, J. A. Riutallo, B. S. Baliga, H. N. Muuro, P. R. Brown, *Biochim. Biophys. Acta*, **277**, 443 (1972).
75. A. Carisano, *J. Chromatogr.*, **40**, 386 (1969).
76. A. Bendich, H. B. Paul, G. C. Korngold, H. S. Rosenkranz, I. B. Fresco, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 3949 (1958).
77. A. Tener, G. Khorana, R. Markham, Там же, **80**, 6223 (1958).
78. M. N. Lipsett, L. A. Heppel, Там же, **85**, 118 (1963).
79. R. V. Tomlinson, G. M. Tener, Там же, **84**, 2644 (1962).
80. R. V. Tomlinson, G. M. Tener, *Biochemistry*, **2**, 697 (1963).
81. M. F. Aukati, V. K. Kaраганова, S. N. Bubenshikova, L. A. Baratova, *J. Chromatogr.*, **137**, 351 (1977).
82. K. Karch, I. Sebastian, I. Halasz, *J. Chromatogr.*, **132**, 3 (1976).