

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 ультрамикροанализа 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 способность¹⁻⁴. Однако сложность и продолжительность этих аналитических методов до сих пор не позволяют считать решенной проблему структурного анализа нуклеиновых кислот.

Введение в практику ультрамикροанализа 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 кислот⁸⁻¹⁰, позволив использовать для осуществления быстрого ультрамикροколичественного анализа 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, ИСПОЛЗУЕМЫЕ В ЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ВЫСОКОГО ДАВЛЕНИЯ

Теория хроматографии, разработанная Мартином и Синджем¹¹, Лapidусом 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 образом ¹¹:

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

или

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

где t — время удерживания вещества на колонке; ω_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 Гиддингса ¹³, 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 технологии 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 анализа нано- 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 сшитости. Как свидетельствуют данные работы²², гелевые свойства таких сор-

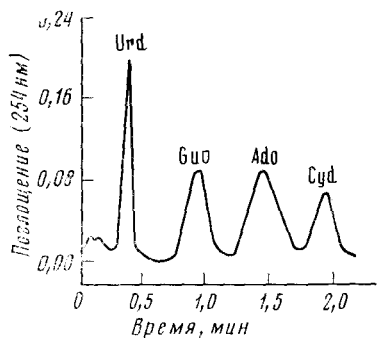


Рис. 1

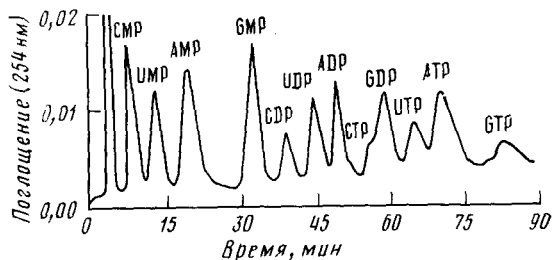


Рис. 2

Рис. 1. Разделение смеси рибонуклеозидов (300 нМ) на колонке (2,4 мм \times 25 см) с катионообменником «VC-10» ($\times 10$) в 0,4 М растворе HCOONH_4 (pH 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 М, pH 4,35) при 25° С. Скорость элюирования 12 мл/час, давление 50 ат²⁹

ТАБЛИЦА 2

Некоторые характеристики пелликулярных ионообменных сорбентов и сорбентов с контролируемой поверхностной пористостью

Коммерческое наименование	d_p , мкм	Функциональные группы	Емкость, мг/г	Фирма
Катионообменные сорбенты				
Pellionex SCX	40	SO_3^-	10	M. Reeve Angel and Co., США
Zipax-SCX TM	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 TM	25—37	NR_4^+	12	Du Pont Wilmington Del., США
Zipax-WAX TM	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 диффундируют 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 поверхностной 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 поверхностной пористостью содержат четвертичные алкиламмониевые радикалы, присоединенные к полиакриловой матрице, а катионообменные сорбенты — сульфированный фторополимер.

Использование пелликулярных ионообменников и сорбентов с контролируемой поверхностной пористостью позволяет проводить быстрое разделение сложных смесей нуклеотидов, а также других структурных компонентов нуклеиновых 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 жидких четвертичных аминов типа триметилхлорид- или триметилдециламмоний 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 большее 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 «Zi-рах-SCXTM». 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 М 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 неон-

* Изократическое элюирование — элюирование раствором постоянной ионной силы.

ТАБЛИЦА 3

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

Состав разделяемой смеси *	Тип сорбента	Размеры колонки	Состав элюента	Скорость элюирования, мл/час	Давление, ат	Температура элюирования, °С	Продолжительность разделения, мин	Ссылки
Ura, Gua, Ade, Cyt	Pellionex SCX	1 мм×300,7 см	0,02 М NH ₄ H ₂ PO ₄ (pH 5,50)	33,4	180	68	6	30
Ura (Thy), Gua, Cyt, Ade	Pellionex SCX	1 мм×300 см	0,05 М NH ₄ H ₂ PO ₄ (pH 2,55)	40	115—143	70	10	42
Ura, Gua, Cyt, Ade	Pellionex SCX	1 мм×250 см	0,025 М NH ₄ H ₂ PO ₄ (pH 4,40)	36	200	70	5	42
Ura, Hyp, Gua, Cyt, Ade, 6-MePu	Zipax-SCX TM	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, ат	Температура элюирования, °С	Продолжительность разделения, мин	Ссылки
Urd, Guo, Ado, Cyt	Pellionex SCX	1 мм×151,7 см	0,02 М NH ₄ H ₂ PO ₄ (pH 5,60)	25,5	140	39	4	30
dThd, dGuo, dAdo, dCyt	Aminex A-7	2,4 мм×25 см	0,4 М HCOONH ₄ (pH 4,55)	10	70	55	20	42
Urd, Guo, Ado, Cyt	Pellionex SCX	1 мм×300 см	0,012 М NH ₄ H ₂ PO ₄ (pH 3,50)	33	150—170	50	16	42
Urd, Ino, Guo, Ado, Cyt	DC-×8	2,4 мм×25 см	0,4 М HCOONH ₄ (pH 4,75)	40	340	55	4	9
Urd, Guo, Ado, Cyt	VC-10 (×10) (17—14 мкм)	2,4 мм×24 см	0,4 М HCOONH ₄ (pH 4,50)	50	215	75	7	21
Urd, Guo, Ado, Cyt	VC-10 (×10) (7—10 мкм)	2,4 мм×25 см	0,4 М HCOONH ₄ (pH 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 — дезоксигуанидин; dThd — дезоксатимидин, dCyd — дезоксцитидин; Ino — инозин.

ным средством 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).

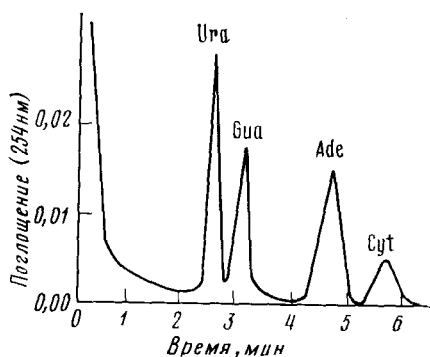


Рис. 3. Разделение смеси гетероциклических оснований (по 0,8 нМ каждого) на колонке (1 мм×300,7 см) с катионообменником «Pellionex» в 0,02 М растворе $NH_4H_2PO_4$ (pH 5,5) при 68° С. Скорость элюирования 33,4 мл/час, давление 177 ат³⁰

Объяснить эти явления с точки зрения неполярных взаимодействий молекул вещества с частицами сорбента, по-видимому, невозможно, поскольку неполярное средство 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 поверхностной 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 М 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*,

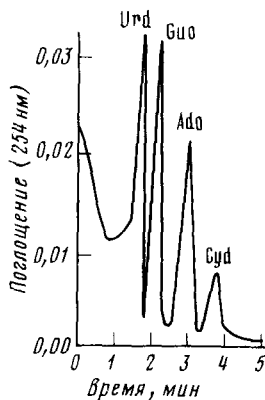
при изучении механизма действия некоторых ферментов и т. д., и во всех случаях ионообменная хроматография высокого давления является, как правило, одним из наиболее действенных аналитических методов^{8, 9, 40, 49}.

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 пелликулярные катионообменники типа «Pellionex»^{22, 41}, а также сорбенты с контролируемой поверхностной пористостью «Zipax-SCXTM»⁹. Однако более детальный анализ результатов разделения, полученных при использовании перечисленных сорбентов, заставляет отдать предпочтение микросферическим полимеризационным смолам, поскольку сорбция уридина и тимидина на колонках с сор-

Рис. 4. Разделение смеси рибонуклеозидов (по ~0,3 нМ каждого) на колонке (1 мм×151,7 см) с катионообменником «Pellionex» в 0,02 М растворе $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (рН 5,5) при 24° С. Скорость элюирования 32,5 мл/час, давление 38 ат²²



бентами типа «Pellionex» и «Zipax-SCXTM» 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», сопутствующий 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 М растворе формиата аммония (рН 4,55) ⁴²

Сорбент	d_p , мкм	Размеры колонки	Температура, °С	Скорость элюирования		Давление, ат	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 минорных нуклеозидов в препаратах ДНК ³¹ 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 Ласковским ⁵². 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 нуклеозидов ⁵².

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}. Посредством сочетания ионоэкслюзионной и распределительной хроматографии на колонках с сорбентом «Aminex A-6», при использовании в качестве элюента 0,1 М раствора бората аммония (рН 7,4) удастся 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—7⁵⁹) находятся в форме анионов. Приведенные в табл. 6 данные свидетельствуют о том, что анионообменники типа «Pellionex» и сорбенты «Zirax-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 «Zirax-SAXTM» в 0,002 М растворе KH_2PO_4 (рН 3,75) при 60°С. Скорость элюирования 114,6 мл/час, давление 64 ат⁴³

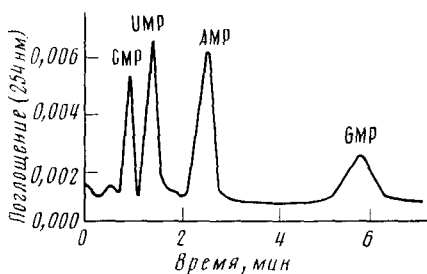
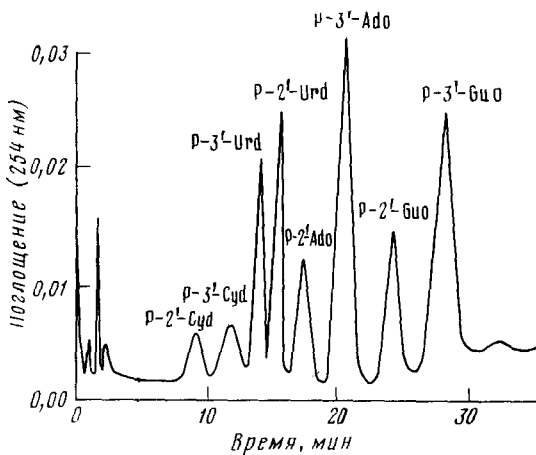


Рис. 6. Разделение смеси нуклеозид-2',3'-фосфатов (по ~1 нМ каждого) на колонке (1 мм×300 см) с анионообменником «Pellionex» в растворе с линейным градиентом концентрации KH_2PO_4 (0,01 М, рН 3,35—1,0 М, рН 4,20) при 75°С. Скорость элюирования 48 мл/час, давление 207 ат⁶⁴



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 «Zirax-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 М раствора KH_2PO_4 , рН 3,75 (рис. 5). Использование же для этой цели анионообменного носителя «Pellionex» 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, °С	Давление, ат	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 М) CH ₃ COONa (pH 4,40) **	60	45	285	240	60
AMP, ADP, ATP	Pellionex	1 мм×300 см	0,75 М KH ₂ PO ₄ (pH 4,2) **	55	80	186—214	4	42
CMP, UMP, AMP, GMP, CDP, UDP, ADP, GDP, CTP, UTP, ATP, CTP	Pellionex	1 мм×193 см	(0,04—1,5 М) HCOONH ₄ (pH 4,35) **	12	25	54	90	30
CMP, UMP, AMP, IMP, GMP, XMP	Pellionex	1 мм×300 см	0,01 М KH ₂ PO ₄ (pH 3,25)—1 М KH ₂ PO ₄ (pH 4,20) **	15	70	200	55	42
dCMP, dTMP, dAMP, dGMP	Pellionex	1 мм×300 см	0,01 М KH ₂ PO ₄ (pH 3,25)—1 М KH ₂ PO ₄ (pH 4,20) **	57	80	170—200	10	42
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 М KH ₂ PO ₄ (pH 3,35)—1 М KH ₂ PO ₄ (pH 4,20) **	48	75	207	30	9
CMP, UMP, AMP, GMP	Zipax-SAX TM	2,1 мм×100 см	0,006 М H ₃ PO ₄ , 0,002 М KH ₂ PO ₄ (pH 3,75) ***	114,6	60	64	7	43
dCMP, dTMP, dAMP, dGMP	Zipax-SAX TM	1 мм×100 см	0,008 М KH ₂ PO ₄ (pH 4,40) ***	2,5	20	150	70	62

* Соединения приводятся в порядке возрастания величин времени удерживания на колонке. Используются следующие сокращения: P-2'(3')-Cyd — цитидин-2'(3')-фосфат; P-2'(3')-Urd — уридин-2'(3')-фосфат; P-2'(3')-Ado — аденозин-2'(3')-фосфат; P-2'(3')-Guo — гуанозин-2'(3')-фосфат; (d)CMP — (дезоксирибо)цитидин-5'-фосфат; (d)TMP — (дезоксирибо)тимидин-5'-фосфат; UMP — уридин-5'-фосфат; (d)AMP — (дезоксирибо)аденозин-5'-фосфат; (d)GMP — (дезоксирибо)гуанозин-5'-фосфат; IMP — инозин-5'-фосфат; XMP — ксантозин-5'-фосфат.

** Градиентное элюирование.

*** Изократическое элюирование.

ТАБЛИЦА 7

Величины времени удерживания нуклеотидов и их производных при хроматографии на колонке (1 мм×300 см) с анионообменником «Pellionex»*

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

* Условия хроматографирования⁶⁶: элюирование в линейном градиенте фосфатного буфера [0,015 М КН₂РO₄ (рН 3,25)] — 0,25 М КН₂РO₄ (рН 4,20), 2,2 М КСl при 75° С. Скорость элюирования 12 мл/час.

** Использованы следующие сокращения: 6Me-sPuоMP—6-метилмеркапторибозилпури-5'-фосфат; sGMP—меркаптогуанозин-5'-фосфат; NAD⁺, NADH—никотинамид-аденин-динуклеотид (окисленный и восстановленный); UDP-Glc — уридиндифосфатглюкоза; UDP-GlcCOOH — уридинфосфатглюкуроновая 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 аденозин-5'-фосфата, аденозин-3',5'-циклофосфата и аденозин-5'-трифосфата на колонках с анионообменником «Pellionex» была использована рядом исследователей для определения активности аденозинциклазы и аденозин-3',5'-циклофосфатдиэстеразы, катализирующих превращения соответствующих производных адениловой кислоты в клетках тканей⁶⁷⁻⁶⁹.

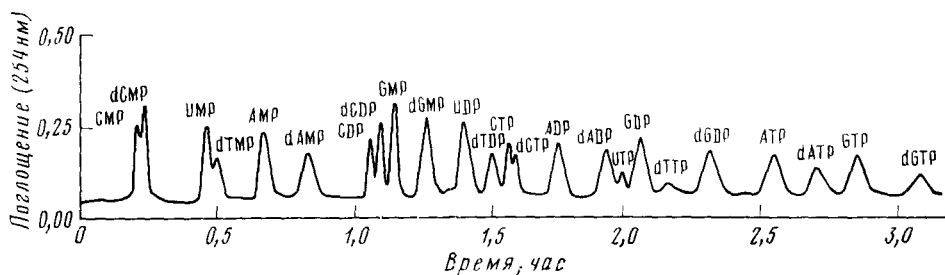


Рис. 7. Разделение смеси рибо- и дезоксирибонуклеозидфосфатов на колонке (0,62 мм×20 см) с сорбентом «Апипех А-28» в растворе с градиентом концентрации цитрата натрия (рН 8,6) при 70° С. Скорость элюирования 36 мл/час, давление 15 ат⁶⁴

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

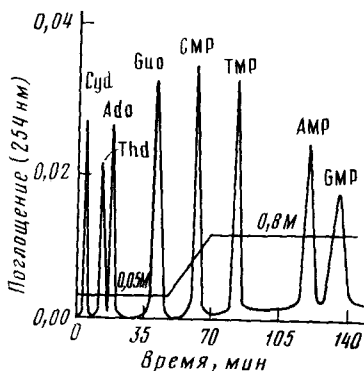


Рис. 8. Разделение смеси дезоксирибонуклеозидов и дезоксирибонуклеозид-5'-фосфатов на колонке (1,8 мм×50 см) с сорбентом «Аминех А-28» в растворе с градиентом концентрации фосфат-боратного буфера (0,05—0,8 М, рН 7,8) при 60°С. Скорость элюирования 25 мл/час, давление 220 ат⁴⁸

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

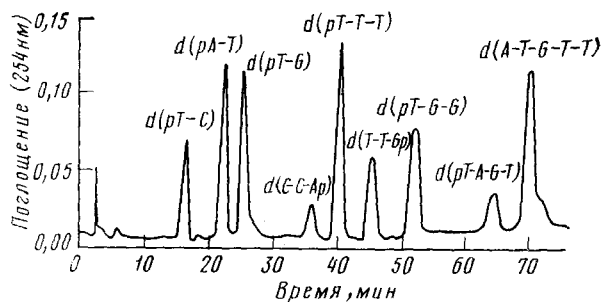
Осуществление высокоэффективного разделения различных по длине цепи и нуклеотидному составу олиго- и полинуклеотидов является одной из актуальнейших проблем аналитической химии нуклеиновых кислот. Возможности жидкостной хроматографии высокого давления для решения этой проблемы к настоящему времени изучены 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 практически 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 кватернизованного 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 М раствором аммоний-форматного 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 олигодезоксирибонуклеотидов на 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 М KH_2PO_4 , рН 3,30—0,75 М KH_2PO_4 , 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 жидко-жидкостной хроматографии высокого давления таких органических соединений, как мочевины, 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 связанной 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. Merck», 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. Szekely, 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. MacKinnon, 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. Стувенсон, в кн. *Основы жидкостной хроматографии*, «Мир», М., 1973, стр. 202.
11. A. J. P. Martin, R. L. M. Synge, *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. С. А. Буртис, 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 Stationary 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. Skaji, 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. Kelmars, *Biochemistry*, **6**, 2507 (1967).
36. J. F. Weiss, R. L. Pearson, A. D. Kelmars, Там же, **7**, 3749 (1968).
37. R. L. Pearson, J. F. Weiss, A. D. Kelmars, *Biochim. Biophys. Acta*, **228**, 770 (1971).
38. A. D. Kelmars, 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. Gunport, *Proc. Nat. 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. Burtis, 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. Чаргафф, 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, *Биоорг. 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. Breter, 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. Grenn, C. E. Nunley, N. G. Anderson, *Nat. Canc. Inst. Monogr. (USA)*, **21**, 431 (1966).
61. В. К. Каграманова, М. Ф. Аукати, Г. Ф. Федорова, Э. 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. Burtis, K. S. Warren, *Clin. Chem.*, **14**, 290 (1968).
74. A. J. Clifford, J. A. Riumallo, 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. Kagramanova, S. N. Bubenshikova, L. A. Baratova, *J. Chromatogr.*, **137**, 351 (1977).
82. K. Karch, I. Sebestian, I. Halasz, *J. Chromatogr.*, **132**, 3 (1976).