

УДК 547.963.32.001.8

ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В. В. Тец

Рассмотрены вопросы газохроматографического анализа компонентов нуклеиновых кислот. Приведены данные по условиям проведения исследований. Поскольку изучение состава нуклеиновых кислот кроме процесса газохроматографии включает их выделение из природного объекта и получение летучих производных, особое внимание уделено вопросу приготовления проб для проведения анализа. Обсуждены основные направления практического применения метода.

Библиография — 120 ссылок

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	931
II. Приготовление проб для газохроматографического анализа нуклеиновых кислот	932
III. Условия проведения анализа	937
IV. Примеры применения газохроматографического анализа нуклеиновых кислот	940

I. ВВЕДЕНИЕ

Неослабевающий интерес к нуклеиновым кислотам (НК) обусловлен их связью с такими важнейшими процессами жизнедеятельности, как наследственность, развитие и регуляция различных функций. Одним из важнейших аспектов изучения НК является исследование их состава, т. е. разделение, идентификация и количественное определение пуриновых и пиримидиновых производных НК. С этой целью использованы разнообразные методы фракционирования, включающие ионообменную хроматографию¹⁻⁴, хроматографию на бумаге⁵⁻⁸, электрофорез на бумаге⁹⁻¹², тонкослойную хроматографию¹³⁻¹⁵. С их помощью выполнена большая часть работ по изучению состава НК. Особенности упомянутых методов широко обсуждены в ряде подробных обзоров¹⁶⁻²¹.

Большинство применяемых методов требует для исследования микрограммы материала, если дополнительно не применяется радиоизотопная метка. Поскольку биологические пробы часто имеют очень малые объемы (микрограммы материала), требовались методы, которые могли бы и в этом случае давать хорошие количественные результаты. В связи с этим внимание исследователей обратилось на жидкостную и газожидкостную хроматографии. Газожидкостная хроматография (ГЖХ), которая обеспечивает для разделяемых объектов высокую скорость, избирательность и чувствительность анализа, завоевывает все большую популярность при изучении различных биологических субстанций. К настоящему времени разработана техника проведения ГЖХ-исследований многочисленных биологических компонентов: жирных кислот, циклических соединений, спиртов, альдегидов, кетонов, эфирных масел, стероидов, липополисахаридов, аминокислот и других²²⁻²⁴.

Первая попытка использовать ГЖХ-анализ для изучения НК была предпринята в 1962 г.²⁵ В связи с тем, что составляющие НК являются инертными и нелетучими в интервале температур, применяемом при газовой хроматографии, авторы использовали их ацетил-, метил-, и изопропилиденовые производные. В 1964 г. Мак-Ги²⁶ исследовал N-метил

производные пуриновых и пиримидиновых оснований. Однако представленные данные были непригодны для количественного анализа в связи с тем, что для каждого из компонентов НК были получены после этерификации многочисленные производные (так, только для аденина их было четыре). Несмотря на то, что Мак-Ги²⁷ в 1966 г. сумел получить некоторые количественные данные, этот метод для анализа НК не получил широкого распространения. Прогресс в применении ГЖХ для анализа НК стал возможен, когда для получения их летучих соединений начали применяться силилирующие агенты.

Большинство работ по изучению НК методом газовой хроматографии выполнено к настоящему времени на их триметилсилиловых (ТМС) эфирах и только в отдельных исследованиях использовано их ацетилирование и метилирование^{28–33}. Впервые силилированные производные НК были получены Хэнкоком и Коулменом³⁴, использовавшими для этого гексаметилдисилазан (I) и триметилхлорсилан (II) в пиридине. Авторы получили многочисленные производные для составляющих компонентов, а на хроматограмме регистрировались несимметричные пики. В том же году Хэнкок³⁵ сообщил об успешном разделении различных производных аденозина и показал, что после силилирования они могут быть использованы для количественного анализа.

В 1966–1968 гг. Хашизуме и Сазаки^{36–38} опубликовали работы, посвященные разделению и количественному определению ТМС-производных оснований, нуклеозидов и нуклеотидов, полученных при использовании в качестве силилирующих агентов соединений (I) и (II). В этих исследованиях также была продемонстрирована возможность применения данного метода для анализа оснований, входящих в состав ДНК и РНК. В³⁹ предложен количественный метод ГЖХ-анализа ТМС-производных НК, полученных при реакции с N,O-бис-триметилсилилацетамидом (III) и N,O-бис-(триметилсилил)трифторацетамидом (IV), который ранее был использован для модификации аминокислот⁴⁰. В дальнейшем для силилирования производных НК применялись: N-триметилсилилимидазол, N-триметилсилил-N-диэтиламин, N-метил-N-триметилсилилацетамид и их различные комбинации^{41–44}. Все перечисленные выше агенты используются в настоящее время для получения ТМС-производных НК. Силилирование компонентов НК позволило получить количественные данные при газохроматографии микрообъемов исследуемого материала, что обуславливает возможность широкого применения этого метода.

В настоящем обзоре рассмотрены вопросы приготовления проб НК для ГЖХ-анализа, техника проведения исследования и аспекты его практического применения.

II. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОБ ДЛЯ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

1. Гидролиз нуклеиновых кислот

Для проведения ГЖХ-анализа НК необходимо прежде всего гидролизовать полимер на различные мономеры: пурины, пиримидины, нуклеозиды или нуклеотиды (в зависимости от способа деполимеризации). Особенности процесса силилирования показывают, что наиболее предпочтительным способом является дезинтеграция до оснований или нуклеозидов, проводимая с помощью различных кислот и энзимов^{45–47}. Широкое распространение получил метод гидролиза НК под действием HClO_4 . Этот метод с последующей очисткой полученных продуктов ионообменной хроматографией применен для приготовления проб при ГЖХ-анализе^{36, 37}. Однако более целесообразными следует считать ме-

тоды гидролиза НК трифторуксусной кислотой или смесью трифторуксусной и муравьиной кислот, так как они могут быть удалены из пробы простым выпариванием и, следовательно, отпадает необходимость в дополнительной очистке пробы. Деполимеризация НК, проведенная таким способом, значительно упрощает процедуру приготовления пробы и увеличивает общую надежность и чувствительность метода. Пурины и пиримидины, приготовленные подобным образом, успешно исследованы с помощью ГЖХ-анализа^{48, 49}.

2. Силилирование нуклеиновых кислот

Подробные сведения о свойствах силилирующих агентов и о характере их взаимодействия с компонентами НК приведены в ряде обзоров^{50–52}. По данным⁵³ при образовании ТМС-эфиров производных НК происходит замещение активного протона на триметилсилильную группу. Это явление уменьшает возможность образования водородной связи и увеличивает стабильность смеси. Силилированные производные пуринов и пиримидинов менее связаны и более летучи по сравнению с их немодифицированными аналогами.

Превращение НК в летучие соединения можно считать идеальным, когда оно идет по принципу «одно основание (нуклеозид, нуклеотид) — одно производное». Однако такое соотношение для каждого из компонентов исследуемой смеси наблюдается не всегда. В некоторых случаях пурины и пиримидины, содержащие функциональную аминогруппу, образуют по два производных^{52, 54}. Причиной этого является целый ряд факторов: характер силилирующего агента, растворитель, температурный режим проведения реакции и некоторые другие⁵⁵. Вместе с тем наличие двух пиков, соответствующих на хроматограмме одному основанию (нуклеозиду, нуклеотиду) не мешает количественному анализу и является полностью воспроизводимым^{39, 56, 57}. Наиболее часто два таких соединения дают цитозин и соответствующие ему нуклеозид и нуклеотид^{48, 56}. По данным масс-спектрометрического анализа ТМС-цитозина, два пика его производных соответствуют ди-ТМС-цитозину и три-ТМС-цитозину⁵⁸.

Сведения о предполагаемой структуре различных ТМС-нуклеозидов и нуклеотидов, а также их изомеров приведены в ряде работ^{44, 59–63}. Согласно полученным данным, цитидин образует *тетра*-ТМС-цитидин и *пента*-ТМС-цитидин. Минорные производные цитозина (5-метилцитозин) и аденина (6-метиладенин) при реакции с (III) или (IV) также образовывали по два ТМС-производных^{56, 64, 65}. Следует отметить, что при использовании других силилирующих агентов или других режимов модификации можно получить только одно производное оснований^{49, 66, 67}.

В настоящее время большое внимание уделяется подбору как наилучшего силилирующего агента, так и оптимального метода проведения этерификации. Данные о режимах силилирования и о примененных агентах приведены в табл. 1. Среди всех перечисленных веществ, использованных для получения ТМС-эфиров НК, наибольшей популярностью пользуются (III) и (IV). Это обусловлено их высокой модифицирующей активностью по отношению к НК по сравнению с другими силилирующими агентами^{44, 54, 68, 69}.

При взаимодействии оснований и нуклеотидов с (III) в качестве оптимального режима предлагается 45-минутное нагревание реакционной смеси при 150° С в присутствии 100 молей избытка этого агента³⁹. Для обработки нуклеозидов соединением (III) предложено двухчасовое нагревание при 120° С с 225 молями избытка силилирующего вещества⁴⁴. При оптимизации режима модифицирования оснований и нуклеозидов

Экспериментальные условия силилирования и газохроматографического анализа пуринов и пиримидинов *

Изученные компоненты	Силилирующий агент	Растворитель	Режим силилирования		Носитель	Жидкая фаза (%)	Тип детектора	Газ-носитель	Ссылки
			t, °C	τ, мин					
Нуклеотиды	(I) : (II) = 2 : 1	пиридин	155	60	диазолит, 30—50 меш	DC-430 (5)	ДТП	азот	36
Основания	(I) : (II) = 2 : 1	пиридин	155	60	цеолит 540, 80—100 меш	DC-430 (5)	ДТП	гелий	38
Основания, нуклеозиды	(I) : (II) = 2 : 1	пиридин	155	60	диазолит, 30—50 меш	апиезон L(5); SE-30 (2); SE-52 (5); QF-1 (1); DC-430 (5); LAC-2R446 (1) DS-430 (5)	ДТП	гелий	66
Основания, нуклеотиды	(I) : (II) = 2 : 1	пиридин	155	60	то же		ДТП	гелий	74
Нуклеозиды	(III)	пиридин	120	120	газохром Q, 100—120 меш	OV-17 (4)	ДИП	аргон	75
Основания, нуклеозиды	(III)	пиридин	150	45	газохром Q, 100—120 меш	SE-30 (3)	ДИП	азот	64
Основания, нуклеозиды	(IV) + 1, 0% (II)	пиридин	60	960	хромосорб W, 80—100 меш	OV-1 (3)	ДИП	гелий	67
Основания	(IV)	пиридин	150	45	хромосорб W, 60—80 меш	OV-17 (3)	ДИП	азот	72
Основания	(IV)	ацетонитрил дихлорэтан (1 : 1)	150	15	хромосорб W, 80—100 меш	OV-101 (10)	ДИП	азот	76
Основания	(II), (III), (IV) и др.	пиридин	комн.		диатопорт, S	OV-17 (3)	ДИП	гелий	43
Нуклеозиды	(IV)	ацетонитрил	150	15	супелкопорт, 120 меш	SE-30 (4); SE-30 (3); OV-17 (3); OV-11 (4); SE-30 (10); OV-3 (5); OV-7 (5)	ДИП	азот	70
Основания	(IV)	ацетонитрил	150	15	то же	OV-17 (3); OV-101 (3); OV-101 (3); OV-17 (3)	ДИП	азот	65
Основания, нуклеозиды	(III), (IV)	пиридин	150	45, 20, 30	хромосорб W, 100—120 меш	OV-17 (3); OV-101 (3); OV-101 (3); OV-17 (3)	ДИП	аргон	54, 77
5-Фторурацил, фторафур, 6-азауридин, аллопуринол	(IV)	пиридин	150	20	хромосорб W, 100—120 меш	OV-17 (3)	ДИП	аргон	51

Нуклеозиды	(III), (IV), триметилс- дидиметилазол	ацетонитрил	**	**	супелкопорт, 120 меш	100—	OV-11 (4)	ДИП	аргон	44
Нуклеозиды	(IV)+1,0% (II)	пиридин	75	180	хромосорб 100 меш	W,	SE-30 (5)	ДИП	гелий	68
Нуклеозиды	IV+1,0% (II)	пиридин	75	180	газохром Q	100—120 меш	SE-30 (3)	ДИП	гелий	78
Основания	(IV)	ацетонитрил	150	45	супелкопорт, 120 меш	100—	SE-30 (10)	ДИП	азот	73
Нуклеозиды	(III)	гексан	150	40	хромосорб W	W,	OV-1 (1)	ДИП	гелий	79
Нуклеозиды	(IV)	ацетонитрил ; ди- хлорэтан = 1 : 1	150	15	хромосорб	100 меш	OV-7 (3)	ДИП	гелий	80
Основания	(III), (IV)	пиридин	комн.	—	газохром	Q,	SE-30 (3); OV-225(2); OV-17 (3); OV-210(2)	ДИП	азот	49
Нуклеозиды	(II) + (IV)	пиридин	80	60	газохром P,	100—120 меш	SE-30 (4); OV-17 (1)	ДИП	азот	59

* Обозначения: (I) — гексаметилдисилазан, (II) — триметилхлорсилан, (III) — N, O-бис-(триметил)-трифторацетамид, (IV) — N, O-бис-(триметил)-трифторацетамид; ДТП — де-
тектор по теплопроводности, ДИП — ионизационно-пламенный детектор.
** Значения, различные для разных силилирующих агентов.

с использованием (IV) наилучшие результаты получены при 15-минутном нагревании смеси при 150°С в присутствии 225 молей его избытка^{57, 70}. Такое же количество (IV) выбрано как оптимальное и при силилировании нуклеотидов. Увеличение объема силилирующего агента в данном случае приводило к появлению в смеси соответствующих ТМС-оснований. Дезоксицитозин давал на хроматограмме пик ТМС-цитозина также при всех других режимах силилирования при использовании как (III), так и (IV)⁴⁴.

Исследование оптимальных условий этерификации нуклеотидов и динуклеотидов при применении в качестве силилирующего вещества соединения (IV) выполнено в⁷¹. Авторы пришли к выводу, что для более успешной модификации и хроматографии моно- и динуклеотиды из биологических проб должны быть превращены в соответствующие нуклеозиды или основания. По данным⁵⁴ оптимальное силилирование с использованием (IV) в случае оснований достигается нагреванием при 150°С в присутствии 100 молей избытка (IV) в течение 15 мин, а для нуклеозидов в течение 30 мин. Следует отметить, что силилирование НК происходит и при комнатной температуре, но с меньшей эффективностью^{42, 44, 49}. Количественное изучение процесса силилирования НК выполнено в работе⁷². Авторы, используя для контроля спектрофотометрический и радиоизотопные методы, установили, что, если этот процесс идет в течение 45 мин при 150°С в присутствии 50 молей избытка (IV), то по меньшей мере 95% от исходного количества изученных оснований образуют ТМС-производные.

В качестве растворителей для приготовления летучих производных НК использованы: дихлорэтан, гексан, бензол, ацетонитрил, пиридин, диметилформамид, толуол и некоторые другие. Наиболее широкое распространение в настоящее время получили пиридин и ацетонитрил. Сравнительные данные об использованных растворителях приведены в табл. 1. Согласно сведениям о влиянии различных растворителей на процесс силилирования, лучшим среди них следует считать

ацетонитрил^{44, 65}. Данные об эффективности силилирования нуклеозидов с использованием различных растворителей приведены в табл. 2.

Кроме всех перечисленных факторов на процесс приготовления ТМС-эфиров пуринов и пиримидинов и на результаты их последующего ГЖХ-анализа могут влиять различные соли и вода, которые остаются иногда в пробе НК после ее выделения или гидролиза. Выполненные для выяснения этого вопроса исследования показали, что компоненты НК по-разному реагируют на наличие тех или иных солей. При добавлении к реакционной смеси таких соединений, как Na_2SO_4 и CaSO_4 , результаты ГЖХ-анализа не изменялись, а добавление CaCl_2 вызывало некоторое уменьшение пика, соответствующего гуанину⁵⁷. Катионы Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , добавленные в реакционную смесь при силилировании гуанина и гипоксантина, отрицательно влияли на процесс этерификации, по-видимому, за счет уменьшения летучести ТМС-производных⁴³. Наличие катионов NH_4^+ на этом процессе не сказывалось.

Авторы работы⁷¹, изучая влияние на силилирование и хроматографию нуклеозидов таких солей, как NaCl , KCl , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MgCl_2 , CaSO_4 , CaCl_2 , Na_2SO_4 , установили, что наиболее чувствительным к ним при модификации с (IV) является тимидин. Если в реакции участвовала смесь перечисленных солей, наблюдалось значительное снижение относительного весового коэффициента чувствительности всех нуклеозидов. По мнению авторов⁷¹, эти соли могут уменьшать степень силилирования нуклеозидов за счет понижения их растворимости, снижения молярного избытка (IV) в силу образования таких производных ТМС-анионов, как TMC-SO_4 , TMC-PO_4 и разрушения ТМС-нуклеозидов в пробе. Видимо, подобная реакция на присутствие этих солей имеет место и при силилировании оснований.

Различными авторами получены данные, согласно которым соблюдение безводных условий является обязательным для успешного проведения ГЖХ-анализа производных НК. После силилирования гуанина и гипоксантина с (III), когда к пробе, содержащей по 5 мг каждого из них, было добавлено 100 мкл воды, пики этих веществ на хроматограмме не определялись⁴³. Согласно данным⁵⁷, наличие 5 мкл воды в пробе оснований объемом в 200 мкл вызывало уменьшение на хроматограмме величины второго из соответствующих цитозину пиков вплоть до его полного исчезновения. При дальнейшем повышении концентрации воды наблюдалось уменьшение и первого пика, а также уменьшение пика, соответствующего гуанину. При реакции нуклеозидов с (III), (IV) и триметилсилилилимидазолом наблюдалось отрицательное действие во-

ТАБЛИЦА 2

Действие различных растворителей (относительный весовой коэффициент чувствительности) на силилирование нуклеозидов с (IV)⁷⁰

Соединения	Ацетонитрил	Пиримидин	Диметилформамид	Метиленхлорид	Хлороформ	Бензол	Толуол	Гексан
Пиримидины								
Тимидин	0,50	0,48	*	0,48	0,44	0,36	0,38	0,43
Уридин	0,78	0,75	0,67	0,76	0,74	0,32	0,33	0,56
Цитидин	0,37	0,35	0,01	0,34	0,31	0,16	0,17	0,28
Пурины								
Инозин	0,78	0,78	0,76	0,38	0,33	0,05	0,16	0,48
Аденозин	1,01	0,97	0,99	0,58	0,51	0,54	0,56	0,85
Ксантозин	0,78	0,73	0,78	0,38	0,34	0,13	0,19	0,40
Гуанозин	0,70	0,70	0,70	0,30	0,28	0,12	0,19	0,40

* Пик не получен.

ды на процесс силилирования. О необходимости соблюдать безводные условия при проведении ГЖХ-анализа НК сообщают и другие авторы⁵³.

Важное практическое значение имеет сохранение ТМС-производных НК от момента их получения до проведения газохроматографического исследования. Так, ТМС-производные оснований, когда они сохранялись при комнатной температуре в течение пяти дней, давали при ГЖХ-анализе четко воспроизводимый результат⁵⁷. ТМС-производные нуклеозидов при хранении их в таких же условиях оставались стабильными в течение 48 час. При более длительном хранении проб на их хроматограмме были получены многочисленные лики, соответствующие ТМС-основаниям исходных нуклеозидов и другим продуктам разрушения ТМС-производных нуклеозидов⁷⁰. Вместе с тем имеются данные⁵³, согласно которым большинство силилированных пуринов и пиримидинов являются хроматографически стабильными в течение года и более при хранении их в плотно закрытом сосуде в присутствии избытка силилирующего агента при 3—5° С.

Таким образом, в настоящее время разработаны надежные методы количественного приготовления летучих производных оснований и нуклеозидов, пригодных для ГЖХ-анализа.

III. УСЛОВИЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

1. Жидкие фазы

Для разделения ТМС-производных НК с успехом применяются неполярные и умеренно полярные жидкие фазы. С их помощью удастся разделить ТМС-основания, нуклеозиды, фосфаты (табл. 1). Из неполярных жидких фаз для ГЖХ-анализа нуклеиновых кислот применяются такие, как SE-30, OV-1, OV-101, DC-430 и некоторые другие. Из умеренно полярных используются фазы, содержащие финишные радикалы: OV-3, OV-17, XE-60, OV-7 и другие. Характеристики этих фаз приведены в справочнике⁸¹. Наиболее часто для разделения производных НК применяют неполярную жидкую фазу SE-30, представляющую собой метилсилоксановый полимер.

Концентрации жидких фаз колеблются в довольно широких пределах от 0,2 до 10%^{39, 65, 72}. Универсальные показатели концентраций для каждой из них отсутствуют. Выбирая концентрацию жидкой фазы, следует учитывать, что при большом ее количестве возрастает время разделения, а при малом — она не может полностью покрывать инертность носителя, что приводит к ухудшению качества разделения и к уменьшению чувствительности метода. Подбор жидких фаз и их концентраций связан с характером разделяемых смесей и целями исследования. Так, при разделении рибонуклеозидов хорошие результаты получены при применении таких фаз, как 4% OV-11 и 3% OV-17⁷⁰. Наилучшее разделение минорных оснований достигалось в фазе 5% OV-3⁶⁵. Отделение 5-метилцитозина от цитозина в препаратах оснований, полученных из ДНК-тимуса быка и бактериофагов, наблюдалось в жидких фазах: 3% SE-30 и 2% OV-225⁴⁹. По данным⁵³, удовлетворительное разделение ТМС-пуринов и пиримидинов получено при использовании фаз 3—5% SE-30 и OV-17.

В качестве носителя для жидкой фазы применяют лишенные каталитической активности вещества, обладающие минимальной адсорбцией и высокой однородностью поверхности, размеров и форм. Такими веществами являются в первую очередь диатомитовые носители типа хромосорба W, супелкопорта, анахрома, газохрома Q и др. (табл. 1). Часто используется силилирование носителя^{54, 56}.

2. Режимы проведения ГЖХ-анализа НК

Для изучения НК может быть использован относительно широкий набор режимов проведения ГЖХ-анализа. После того как выбрана жидкая фаза, носитель и длина колонки, температура и скорость потока газа обычно регулируются так, чтобы было обеспечено требуемое разделение в удовлетворяющее время. ГЖХ-анализ НК может проводиться как в изотермическом режиме, так и при программировании температуры. Выбор способа проведения исследования во многом зависит от его целей. Разделение многокомпонентной системы в основном проводят в режиме программирования температур^{38, 64, 65, 67, 75}. Разделение ТМС-производных оснований, нуклеозидов и нуклеотидов, как правило, осуществляют в интервале от 80 до 325°С^{38, 65, 67, 75, 78}.

Хроматографические колонки в подавляющем большинстве случаев имеют длину 1—2 м и внутренний диаметр 2—4 мм. Для хроматографии ТМС-производных НК используются как стеклянные, так и металлические колонки. Однако авторы работы⁸² считают, что весь ГЖХ-анализ должен проводиться в стеклянной аппаратуре, поскольку при контакте с нагретыми металлическими частями происходит разрушение ТМС-производных. Аналогичная картина наблюдается и при газохроматографии аминокислот²³.

В качестве детекторной системы в большинстве работ использован ионизационно-пламенный детектор, реже — детекторы теплопроводности, аргонный ионизационный и электронного захвата. Газ-носитель выбирают в зависимости от примененного типа детектирования: азот, аргон, гелий (табл. 1). Поскольку ТМС-производные пуринов и пиримидинов высокочувствительны к влаге, необходимо тщательное осушение подаваемого газа.

3. Количественный анализ

Количественное определение оснований, нуклеозидов и нуклеотидов в процессе ГЖХ-анализа производится методом внутренней стандартизации. В качестве внутренних стандартов используются фенантрен, пирен, пурин, аценафтен, *n*-октакозан, *n*-тетратриаконтан, *n*-нондекан и др.^{42, 43, 76, 83, 84}. Наиболее широкое распространение среди них получили фенантрен и пирен. Внутренний стандарт добавляется к исходной смеси и проходит все этапы приготовления ТМС-производных. Для расчета количества исследуемого вещества обычно применяют величину «относительного молярного коэффициента чувствительности» или величину «относительного весового коэффициента чувствительности»^{65, 66}.

Воспроизводимость данных, полученных при ГЖХ-анализе НК, оценивали с помощью относительного стандартного отклонения, рассчитываемого по результатам нескольких измерений. Так для ТМС-производных минорных компонентов, определяемых в биологических жидкостях, относительное стандартное отклонение по результатам четырех измерений в среднем равно 3,8%⁶⁵. Данные по определению относительных молярных коэффициентов чувствительности, а также величины стандартного отклонения различных нуклеозидов приведены в табл. 3.

Для получения количественно воспроизводимых данных нежелательно введение сравнительно больших концентраций вещества. Так, при использовании ионизационно-пламенного детектора введение более 25 мкг ТМС-производных вызывало появление на элюционной кривой дополнительных пиков, что, возможно, связано с умеренным охлаждением пламени в течение горения органосиликоновой субстанции⁸⁵. Минимальным определяемым количеством ТМС-производных пуринов и пиримидинов при ГЖХ-анализе с применением ионизационно-пламен-

ТАБЛИЦА 3

Воспроизводимость результатов этерификации и ГЖХ-анализа
ТМС-производных метилированных оснований⁶⁵

Соединение	Время удерживания, мин	Относительный молярный коэффициент чувствительности	Стандартное отклонение *
6-Метиладенин	13,2	0,58	0,024
6-Деметиладенин	13,0	0,64	0,029
6-Изоаденин	18,4	0,86	0,025
2-Метиладенин	16,4	0,57	0,008
2-Метилгуанин	17,2	0,58	0,017
2,2-Диметилгуанин	18,0	0,83	0,020
7-Метилгуанин	19,6	0,39	0,320
5-Метилцитозин	9,6—12,0	0,73**	0,024
Тимин	6,8	0,63	0,025

* Стандартное отклонение определено по результатам четырех самостоятельных экспериментов.

** Были получены два пика, каждый независимо интегрирован, затем сложены для определения общей площади и вычисления относительного молярного коэффициента чувствительности.

ного детектора является $(3-5) \cdot 10^{-9}$ г, что соответствует $3 \cdot 10^{-11}$ м каждого из введенных оснований³⁹.

При количественном исследовании состава оснований ДНК спермы лосося и тимуса быка, РНК дрожжей и вируса табачной мозаики с помощью ГЖХ на макро-(1 мг), полумикро-(100 мкг) и микро-(5 мкг) уровнях получены данные, идентичные полученным ранее для этих объектов при изучении их с помощью других методов фракционирования^{48, 75}.

4. Качественный анализ

Газохроматографический анализ состава НК является чрезвычайно чувствительным; он обеспечивает высокую степень разрешения и обнаружения компонентов, имеющих в очень низкой концентрации. Идентификация неизвестных ТМС-компонентов смеси при использовании метода ГЖХ в чистом виде в большинстве случаев выполняется путем сравнения между собой времен удерживания их и известных стандартов. Другим способом является сравнение поведения ТМС-производных на различных фазах. Для получения данных, позволяющих идентифицировать неизвестные компоненты и в первую очередь те из них, которые не имеют готовых стандартов для сравнения, требуется дополнительная техника. В связи с этим были изучены возможности использования для идентификации ТМС-производных НК таких спектрометрических методов, как УФ- и ИК-сканирование, ЯМР, масс-спектрометрия и некоторые другие^{64, 66, 86-88}. Сочетание современного ГЖХ-анализа с этими методами^{64, 72} значительно расширяет возможности анализа НК.

Поглощение пуринов и пиримидинов в УФ- и ИК-областях спектра высоко специфично и широко используется для их идентификации и количественного определения⁸⁹⁻⁹⁴. Исследование спектральных свойств ТМС-производных НК, полученных с помощью ГЖХ, показало, что УФ-поглощение, хотя в значительной мере и отличается от наблюдаемого для интактных пуринов и пиримидинов, тем не менее является специфичным^{53, 64}. В качестве характеристики ТМС-производных НК, как и для их немодифицированных предшественников, используют отношения поглощения при 260 и 280 нм или при 250 и 280 нм. Поглощение ТМС-производных НК в ИК-области также является достаточно характерным^{64, 66}.

Специфичность свойств ТМС-оснований продемонстрирована и при исследовании их с помощью ЯМР-спектроскопии^{64, 66}. Однако следует отметить, что применение этого метода является ограниченным, поскольку требует для исследования сравнительно большого количества исходного материала.

Одним из наиболее перспективных для изучения смеси компонентов ТМС-производных НК является метод ГЖХ — масс-спектрометрии. Возможность его использования с этой целью впервые была показана в работе⁶⁸. Масс-спектры оснований, нуклеозидов и нуклеотидов, полученных при силилировании с (III) и (IV) и триметилсилилимидазолом, оказались простыми для интерпретации. Данным методом изучены производные, полученные из компонентов НК метилированием, ацетилированием, трифторацетилированием, триметилсилилированием и синтезом 2',3'-изопропилиденовых и 2',3'-О-фенилборатных эфиров^{33, 58, 60, 88, 95}. Этот комбинированный метод с успехом использован для изучения РНК бактерий и редких компонентов НК^{79, 87, 96, 97}. Для анализа ТМС-производных НК совместно с газовой хроматографией применен также новый метод масс-спектрометрического анализа — масс-фрагментография. Использование для качественного анализа НК других методов совместно с ГЖХ в значительной мере повышают его точность.

Из приведенных данных следует, что пуриновые и пиримидиновые составляющие НК могут быть с успехом разделены ГЖХ-методом. Разработаны различные условия проведения ГЖХ-анализа нуклеиновых кислот, обеспечивающие количественное и качественное исследование НК. Учитывая гибкость метода, обусловленную возможностью использовать различные жидкие фазы и режимы проведения самого ГЖХ-анализа, можно утверждать, что с его помощью могут быть разделены и идентифицированы практически любые компоненты НК.

IV. ПРИМЕРЫ ПРИМЕНЕНИЯ ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Газожидкостная хроматография НК в настоящее время нашла уже широкое применение и вызывает все возрастающий интерес, о чем в частности свидетельствует увеличение числа опубликованных за последние несколько лет работ, выполненных с ее помощью. С помощью этого метода изучен состав РНК микроорганизмов, имеющих научное и практическое значение в сельском хозяйстве, медицине, промышленной микробиологии^{38, 39, 48, 75, 79, 87, 96, 98, 99}. Исследованы препараты ДНК ряда животных и бактериальных клеток, причем особое внимание уделено минорным компонентам^{38, 48, 49, 74}. Биологическое значение этих соединений сейчас интенсивно изучается.

ГЖХ-анализ нашел применение в фармакологии как для контроля химического состава и чистоты препаратов, так и для изучения их распределения в организме. Применение метода в этой области обусловлено использованием в качестве лечебных средств при ряде заболеваний (гипертония, сахарный диабет, злокачественные новообразования и др.) некоторых производных оснований и нуклеозидов. Для изучения лечебных химических препаратов — стандартных и в биологических жидкостях — с помощью ГЖХ-анализа использованы их различные летучие производные^{28—31, 54, 77, 100—102}. Изученные в этих работах субстанции включают 5-фторурацил, 6-меркаптопурин-нуклеозид, 5-фтор-2-дезоксидеоксиуридин, фторафур, 6-азауридин, аллопуринол, β -фенилэтилбигуанидин и некоторые другие.

Большое значение ГЖХ-анализ НК приобретает для клинической лабораторной диагностики. К настоящему времени наиболее подробно

разработана методика выявления минорных компонентов НК в биологических жидкостях. Известно, что при некоторых заболеваниях в них повышается количество этих соединений за счет деградации транспортной РНК^{103, 104}. Повышение содержания этих оснований наблюдается при таких заболеваниях, как острая лейкемия, псориаз, меланома и др.¹⁰⁵⁻¹¹⁰. Возможность получать и анализировать с помощью ГЖХ ТМС-производные пуринов и пиримидинов, встречающиеся в моче, показана в работах⁷⁸ и⁶⁷. Сравнительное ГЖХ-изучение минорных производных НК, находящихся в моче здоровых и больных людей, позволило выявить наличие между ними диагностически значимых различий. Такие исследования выполнены для случаев лейкемии, различных злокачественных новообразований и других заболеваний^{65, 76, 80, 83, 111, 112}.

Приведенные в обзоре сведения дают основания утверждать, что ГЖХ-метод обеспечивает высококачественное разделение и идентификацию минимальных количеств исследуемого вещества при высокой воспроизводимости. Большие возможности использования газожидкостной хроматографии при производстве содержащих компоненты нуклеиновых кислот препаратов и в клинической лабораторной диагностике обусловлены кроме перечисленных уже достоинств также тем, что этот метод может быть полностью автоматизирован.

* *
*

За время подготовки рукописи к печати были опубликованы некоторые принципиально важные работы, посвященные ГЖХ-анализу НК. Предложены условия для ГЖХ-изучения в изотермическом режиме оснований, входящих в состав ДНК^{113, 114}, а также сделана первая успешная попытка по разделению ТМС-производных компонентов НК с использованием капиллярных колонок¹¹⁵. Показана возможность исследования ГЖХ-методом некоторых пиримидинов без предварительного их превращения в летучие производные¹¹⁶. Следует отметить, что метод пиролитического ГЖХ-исследования НК, который применялся ранее¹¹⁷⁻¹¹⁹, но не нашел широкого распространения, в настоящее время с успехом использован для сравнительного анализа биологических проб, содержащих НК¹²⁰.

ЛИТЕРАТУРА

1. М. Мукарами, Методы исследования нуклеиновых кислот. «Мир», М., 1970, стр. 113.
2. A. Sibatani, N. Mizuno, Biochim. et biophys. acta, 76, 188 (1963).
3. R. B. Hurlbert, H. Schautz, A. F. Brumm, V. R. Potter, J. Biol. Chem., 209, 23 (1954).
4. M. Adler, B. Weissman, A. B. Gutman, Там же, 230, 717 (1958).
5. Б. Ф. Ванюшин, в сб. Современные методы в биохимии, Медгиз, М., 1964, стр. 236.
6. R. Markham, Methods in Enzymology, 111, 743 (1957).
7. P. L. Bergquist, R. E. Mathews, Biochem. J., 85, 305 (1962).
8. K. K. Tsuboi, T. D. Price, Arch. Biochem. Biophys., 81, 223 (1959).
9. A. H. Gordon, P. Reichard, Biochem. J., 48, 569 (1951).
10. T. D. Price, H. A. Hinds, R. S. Brown, J. Biol. Chem., 29, 430 (1963).
11. F. Sanger, G. G. Brownlee, B. G. Barrel, J. Mol. Biol., 13, 373 (1965).
12. A. M. Tometsko, N. Delihias, Anal. Biochem., 18, 72 (1967).
13. K. Randerath, E. Randerath, Methods in Enzymology, 12A, 323 (1967).
14. T. W. Munns, K. C. Podratz, P. A. Katzman, J. Chromatogr., 76, 401 (1973).
15. D. P. Holdgate, T. W. Goodwin, Biochim. et biophys. acta, 91, 328 (1964).
16. Э. Н. Будовский, в сб. Физико-химические методы изучения, анализа и фракционирования биополимеров, «Наука», М.—Л., 1966, стр. 320.
17. К. Кирби, Нуклеиновые кислоты, «Мир», М., 1966, стр. 10.
18. Г. А. Георгиев, в сб. Химия и биохимия нуклеиновых кислот, ред. И. Б. Збарский, С. С. Дебов, «Медицина», Л., 1968, стр. 74.
19. Дж. Дэвидсон, Биохимия нуклеиновых кислот, «Мир», М., 1976.
20. Л. И. Гуськова, В. П. Дёмушкин, Успехи химии, 43, 1241 (1974).

21. W. E. Cohn, *Nucleic Acid*, 1, 211 (1955).
22. К. М. Суняк, З. П. Васюренко, *Изв. АН СССР, сер. биол.*, 1974, 715.
23. С. В. Витт, М. Б. Сапоровская, Т. В. Авакумов, В. М. Беликов, *Успехи химии*, 45, 548 (1976).
24. Т. П. Ефимова, И. М. Терешин, *Успехи современной биологии*, 83, 2 (1977).
25. A. T. Miles, H. M. Fales, *Anal. Chem.*, 34, 860 (1962).
26. J. MacGee, *Fed. Proc.*, 23, 2 (1964).
27. J. MacGee, *Anal. Biochem.*, 14, 305 (1966).
28. K. Beyermann, A. Wiesser, *Z. Anal. Chem.*, 245, 376 (1969).
29. J. H. Hengstmann, F. C. Falkner, J. T. Watson, J. Oates, *Anal. Chem.*, 46, 34 (1974).
30. P. Erdtmansky, T. J. Goehl, *Anal. Chem.*, 47, 750 (1975).
31. M. Mottale, C. J. Sewart, *J. Chromatogr.*, 106, 263 (1975).
32. T. Kawabata, H. Ohshima, T. Ishibashi, M. Matsui, T. Kitsuwa, Там же, 140, 47 (1977).
33. D. L. Von Minden, J. A. McCloskey, *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 7480 (1973).
34. R. L. Hancock, D. L. Coleman, *Anal. Biochem.*, 10, 365 (1965).
35. R. L. Hancock, *J. Gas Chromatogr.*, 4, 363 (1966).
36. T. Hashizume, Y. Sasaki, *Anal. Biochem.*, 15, 199 (1966).
37. T. Hashizume, Y. Sasaki, Там же, 21, 316 (1967).
38. T. Hashizume, Y. Sasaki, Там же, 24, 232 (1968).
39. C. W. Gehrke, C. D. Ruyle, *J. Chromatogr.*, 38, 473 (1968).
40. D. L. Stalling, C. W. Gehrke, R. W. Zumwalt, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31, 616 (1968).
41. E. Chambaz, E. C. Horning, *Anal. Biochem.*, 30, 7 (1969).
42. V. Pacáková, W. Miller, J. I. Cernohorsky, Там же, 42, 549 (1971).
43. H. Iwase, T. Kimura, T. Sugiyama, A. Murai, *J. Chromatogr.*, 106, 213 (1975).
44. C. W. Gehrke, A. B. Patel, Там же, 130, 102 (1977).
45. N. I. Gold, S. H. Sturgis, *J. Biol. Chem.*, 196, 143 (1952).
46. A. Bendich, *Methods in Enzymology*, 111, 751 (1957).
47. А. Шаткин, *Методы вирусологии и молекулярной биологии*, «Мир», М., 1972, стр. 405.
48. D. B. Lakings, C. W. Gehrke, *Clin. Chem.*, 18, 810 (1972).
49. A. Razin, J. Sedat, *Anal. Biochem.*, 77, 370 (1977).
50. М. В. Кашутина, С. П. Иоффе, В. А. Тартаковский, *Успехи химии*, 44, 1620 (1975).
51. R. J. Helbes, *Tijdschr. Chem. Instr.*, 1968, 118.
52. V. Miller, V. Pacáková, *Chem. Listy*, 67, 1121 (1973).
53. J. A. Muni, C. H. Altschuler, *Amer. Lab.*, 6, 5 (1975).
54. V. Miller, V. Pacáková, E. Smolková, *J. Chromatogr.*, 119, 355 (1976).
55. A. M. Lawson, K. N. Stillwell, M. M. Tacker, K. Tsuboyama, J. A. McCloskey, *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 1014 (1971).
56. C. W. Gehrke, D. L. Stalling, C. D. Ruyle, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28, 869 (1967).
57. C. W. Gehrke, D. B. Lakings, *J. Chromatogr.*, 61, 45 (1971).
58. J. J. Dolhum, J. L. Wiehers, *Org. Mass Spectrom.*, 3, 669 (1970).
59. S. E. Hattok, J. A. McCloskey, *Anal. Chem.*, 46, 1378 (1974).
60. S. Tsuboyama, J. A. McCloskey, *J. Org. Chem.*, 37, 166 (1972).
61. D. L. Von Minden, R. N. Stillwell, W. A. Koenig, K. J. Liman, J. A. McCloskey, *Anal. Biochem.*, 50, 110 (1972).
62. J. B. Westmore, D. C. K. Lin, K. K. Ogilvie, H. Wayborn, J. Berestinsky, *Org. Mass Spectrom.*, 6, 1243 (1972).
63. M. A. Quilliam, K. K. Ogilvie, J. B. Westmore, *Biomed. Mass Spectrom.*, 1, 78 (1974).
64. J. A. Muni, C. H. Altschuler, J. C. Neicheril, *Anal. Biochem.*, 50, 354 (1972).
65. D. B. Lakings, C. W. Gehrke, T. P. Waalkes, *J. Chromatogr.*, 116, 69 (1976).
66. Y. Sasaki, T. Hashizume, *Anal. Biochem.*, 16, 1 (1966).
67. W. C. Butts, Там же, 46, 187 (1972).
68. W. C. Butts, *J. Chromatogr. Sci.*, 8, 474 (1970).
69. S. V. Alam, R. H. Hall, *Biochem.*, 40, 424 (1971).
70. C. W. Gehrke, A. B. Patel, *J. Chromatogr.*, 123, 335 (1976).
71. N. B. Patel, C. W. Gehrke, Там же, 130, 115 (1977).
72. V. Reháč, V. Pacáková, *Anal. Biochem.*, 61, 294 (1974).
73. D. B. Lakings, C. W. Gehrke, *J. Chromatogr.*, 62, 347 (1971).
74. T. Hashizume, S. Higa, Y. Sasaki, H. Yamazaki, H. Iwamura, H. Matsuda, *Agr. Biol. Chem.*, 30, 319 (1966).
75. M. Jacobson, J. F. O'Brien, C. Hedgooth, *Anal. Biochem.*, 25, 363 (1968).
76. S. Y. Chang, D. B. Lakings, R. W. Zumwalt, C. W. Gehrke, T. P. Waalkes, *J. Lab. Clin. Med.*, 83, 816 (1974).
77. V. Miller, V. Pacáková, E. Smolková, *J. Chromatogr.*, 123, 216 (1976).
78. J. E. Mrochek, W. C. Butts, W. T. Rainey, Jr, C. A. Burtis, *Clin. Chem.*, 17, 72 (1971).

79. J. P. Seiler, *Anal. Biochem.*, **75**, 45 (1976).
80. T. P. Waalkes, C. W. Gehrke, R. W. Zumwalt, S. Y. Chang, D. B. Lakings, D. C. Torrey, D. L. Ahmann, C. G. Moertel, *Cancer*, **36**, 390 (1975).
81. H. Коцев, Справочник по газовой хроматографии, «Мир», М., 1976.
82. C. W. Gehrke, K. Leimer, *J. Chromatogr.*, **57**, 219 (1971).
83. G. Casale, G. B. Cerber, *Clin. Chem. Acta*, **69**, 545 (1976).
84. B. H. Most, J. C. Williams, K. J. Parquer, *J. Chromatogr.*, **38**, 136 (1968).
85. V. Pacáková, J. Nekvasil, Там же, **91**, 459 (1974).
86. R. L. Hancock, *J. Gas Chromatogr.*, **6**, 431 (1968).
87. H. Kasai, K. Murao, S. Nichimura, J. G. Liehr, P. F. Crain, J. A. McCloskey, *Europ. J. Biochem.*, **69**, 435 (1976).
88. J. A. McCloskey, A. M. Lawson, K. Tsuboyama, P. M. Krueger, R. N. Stillwell, *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 4182 (1968).
89. А. С. Спиринов, А. Н. Белозерский, *Биохимия*, **21**, 768 (1956).
90. Т. В. Венкстерн, А. А. Баев, Спектры поглощения минорных компонентов и некоторых олигонуклеотидов рибонуклеиновых кислот, «Наука», М., 1967.
91. G. H. Beaven, E. R. Holiday, E. A. Johnson, *The Nucleic Acid*, v. 1, (ed. E. Chargaff, J. N. Davidson), N. Y., Acad. Press, 1955, p. 493.
92. С. К. Василенко, С. Г. Камзолова, А. Г. Кнорре, *Биохимия*, **27**, 142 (1962).
93. Ю. А. Ромаков, в сб. Химия и биохимия нуклеиновых кислот, ред. И. Б. Збарский, С. С. Дебов, «Медицина», Л., 1968, стр. 10.
94. G. L. Cantoni, H. V. Gelboin, S. M. Luborsky, H. H. Riehards, M. F. Sibger, *Biochim. et biophys. acta*, **61**, 354 (1962).
95. U. I. Krahmer, J. G. Liehr, K. J. Luman, E. A. Orr, R. N. Stillwell, J. A. McCloskey, *Anal. Biochem.*, **82**, 217 (1977).
96. D. F. Babcock, R. O. Morris, *Biochemistry*, **9**, 3701 (1970).
97. J. Z. Deutsch, A. Razin, J. Sedat, *Anal. Biochem.*, **72**, 586 (1972).
98. C. W. Gehrke, *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists*, **55**, 449 (1972).
99. C. D. Upper, J. P. Helgeson, J. D. Kemp, C. J. Schmitt, *Plant. Physiol.*, **45**, 543 (1970).
100. C. Pantarotte, A. Martini, G. Belvedere, A. Bossi, M. G. Donelli, A. Friegerio, *J. Chromatogr.*, **99**, 519 (1974).
101. F. Chrzanowski, P. J. Niebergall, R. Mayock, J. Taubin, E. Sugita, *J. Pharm. Sci.*, **65**, 735 (1976).
102. J. A. F. Wickromashinge, S. R. Shaw, *J. Chromatogr.*, **71**, 265 (1972).
103. E. S. McFarlane, G. J. Shaw, *Canad. J. Microb.*, **14**, 185 (1968).
104. E. Borek, *Cancer Res.*, **31**, 596 (1971).
105. B. Weissman, P. A. Bromberg, A. B. Guiman, *J. Biol. Chem.*, **224**, 423 (1957).
106. B. M. Bollard, R. H. Cuptan, N. Marks, H. McIlwain, *J. Mental. Sci.*, **106**, 1250 (1960).
107. K. Fink, W. S. Adams, F. W. Davis, *Cancer Res.*, **23**, 1824 (1963).
108. K. Fink, W. S. Adams, *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 27 (1968).
109. R. W. Park, J. F. Holland, A. Jenkins, *Cancer Res.*, **22**, 469 (1962).
110. K. Fink, W. S. Adams, *Arch. Biochem. Biophys.*, **126**, 33 (1968).
111. T. R. Waalkes, G. W. Gehrke, W. A. Bleyer, R. W. Zumwalt, C. L. M. Oeweny, K. C. Kuo, D. B. Lakings, S. A. Jacobs, *Cancer Chemother. Rep.*, **59**, 721 (1975).
112. K. R. Leimer, R. N. Loeppky, C. W. Gehrke, *J. Chromatogr.*, **143**, 104 (1977).
113. В. В. Теу, Вопросы медицинской химии, **5**, 585 (1979).
114. В. В. Теу, Материалы Научно-практ. конф. молодых специалистов учреждений здравоохранения Ленинграда, Л., 1979, стр. 71.
115. J. Stadler, *Anal. Biochem.*, **86**, 477 (1978).
116. O. Driessen, D. Devos, P. J. A. Timmermans, *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, **162**, 451 (1979).
117. L. P. Turner, *Anal. Biochem.*, **28**, 288 (1969).
118. L. P. Turner, W. R. Barr, *J. Chromatogr. Sci.*, **9**, 176 (1971).
119. E. S. Jennings, Jr., K. P. Dimick, *Anal. Chem.*, **34**, 1543 (1962).
120. B. S. Emswiler, A. W. Kotula, *Appl. Environm. Microbiol.*, **35**, 97 (1978).

1-й Ленинградский ордена Трудового Красного Знамени
медицинский институт им. ак. И. П. Павлова