

УДК 577.113.3.08 : (543.544+543.42.062+543.24) (047)

МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
НУКЛЕОТИДОВ, НУКЛЕОЗИДОВ, ОСНОВАНИЙ

Загребельный С. Н., Пупкова В. И., Хрипин Ю. Л.

Систематизированы и обсуждены результаты по методам разделения и количественного определения нуклеотидов, нуклеозидов, оснований<sup>1</sup>. Особое внимание удалено наиболее используемым в последнее десятилетие методам: тонкослойной хроматографии и различным вариантам высокоэффективной жидкостной хроматографии: ионообменной, обращенно-фазовой и ион-парной, а также спектрофотометрическому и титриметрическому методу.

Библиография — 180 ссылок.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение . . . . .	1913
II. Тонкослойная хроматография . . . . .	1914
III. Высокоэффективная жидкостная хроматография . . . . .	1917
IV. Другие методы определения компонентов нуклеиновых кислот . . . . .	1928

## I. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время разделение компонентов НК осуществляется в основном с использованием методов жидкостной хроматографии: тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), количество опубликованных работ с применением которых составляет более 80% всех используемых для этой цели методов [1, 2].

Разделение и количественное определение компонентов НК представляется очень важным в различных областях биохимических исследований и медицины. Компоненты НК обнаруживаются в физиологических жидкостях, клетках, тканях.

По наличию данных компонентов, их метаболитов, а также модифицированных оснований, нуклеозидов и нуклеотидов судят о катаболизме НК, их ферментативной деградации, о различных функциональных и онкологических заболеваниях. Не менее важно определение примесных компонентов в коммерческих препаратах нуклеозидов, нуклеотидов. Их использование в молекулярной биологии для синтеза генетических структур, а также в энзимологии в качестве субстратов, предъявляет высокие требования к хроматографической однородности препаратов. Нуклеотидный анализ необходим при подтверждении строения и оценке качества химически синтезированных олигонуклеотидов. Новой областью, где используется анализ компонентов НК, стала пищевая промышленность. Недавно была предложена методика анализа пуринов и пиримидинов (методом ВЭЖХ) в молоке для определения его качества [3].

Все это указывает на чрезвычайную актуальность выбора метода и условий разделения и количественного определения компонентов НК.

В данном обзоре систематизированы наиболее интересные, с нашей точки зрения, работы за последние 10 лет по методам разделения оснований, нуклеозидов и нуклеотидов: ТСХ, ВЭЖХ; указаны условия, позволяющие их разделить в сложных смесях, обращено внимание на количественное определение, особенно при использовании метода ТСХ; кратко обсуждены другие методы анализа.

<sup>1</sup> Далее по тексту — компоненты НК.

Объем обзора не позволяет рассмотреть вопросы, связанные с подготовкой образцов к анализу, но они подробно изложены в обзорах [4, 5] и в цитируемой литературе.

## II. ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

За последние 10 лет ТСХ стала высокоэффективным аналитическим методом, успешно применяемым для решения многих задач в различных областях биохимии, биоорганической химии, молекулярной биологии. Применение современных приборов количественного детектирования и элюирования, дозирующих устройств вместе с улучшением качества пластин и развитием методологии высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) и проточной тонкослойной хроматографии (ПТСХ) превратило метод ТСХ из качественного в количественный и поставило его в один ряд с ВЭЖХ [6—13].

В настоящее время метод ТСХ получил всеобщее признание благодаря быстроте выполнения анализов, относительной простоте оборудования, экономичности, универсальности, а с развитием метода ВЭТСХ, имеющего существенные преимущества перед обычной ТСХ, он стал обладать высокой эффективностью, экспрессностью, чувствительностью и воспроизводимостью [14—16]. Эти преимущества обеспечиваются применением тонкого слоя сорбента (силикагеля) с однородными частицами размером около 5 мкм, новыми способами подвода элюента, применением специальных *U*-камер для хроматографии, улучшением способа нанесения проб, применением рациональной системы обработки данных. Стандартное отклонение результатов определения нанограммовых количеств веществ этим методом не превышает 1,5—2,3%. Все эти достоинства ВЭТСХ позволяют разделять одновременно до 20 соединений в течение нескольких минут и определять фемтограммовые количества веществ ( $10^{-15}$  г) [17].

В последние 5—7 лет разработан новый метод ПТСХ, который объединяет аналитические возможности ТСХ и колоночной жидкостной хроматографии [18]. В ПТСХ растворитель непрерывно подается к тонкому слою сорбента с предварительно нанесенной пробой. В ходе разделения веществ растворитель и анализируемое вещество непрерывно отводятся из хроматографической системы, одновременно с этим в проточном методе проводят детектирование. Многократное использование одной и той же пластины, постоянные условия разделения, полное насыщение в разделительных камерах для ПТСХ, однородное смачивание слоя сорбента позволяют добиться воспроизводимости результатов почти в 10 раз большей, чем традиционной ТСХ. Проточный метод позволяет разделять сложные смеси веществ (разделяемые с трудом или вообще не разделяемые другими методами), являясь универсальным методом жидкостной хроматографии с исключительно широкими аналитическими возможностями.

В развитии ТСХ наступил новый этап — началось широкое применение инструментальных методов для количественной оценки результатов разделения на тонком слое сорбента, а также автоматизация всего хроматографического процесса [17—21]. Количественный анализ в ТСХ складывается из нескольких этапов: введение пробы, разделение компонентов на тонком слое сорбента и количественная оценка результатов анализа. После разделения веществ на пластине их можно извлечь одним из следующих способов: отбором веществ вместе со слоем сорбента и последующей их экстракцией; извлечением непосредственно со слоя сорбента, закрепленного на подложке, с прикреплением ячейки для элюирования и прокачиванием через нее соответствующей системы растворителей; извлечением веществ, присоединением к слою сорбента пористого материала, в который они переходят вместе с растворителем; непосредственным перенесением анализируемых веществ в детектирующие системы. Методы количественного определения разделенных веществ подразделяются на прямые и непрямые. Во вторую группу входят все

Таблица 1

## Методы количественного определения веществ после их экстракции с тонких слоев сорбента [22]

Определяемые вещества	1—100 мг	10—100 мг	10—100 нг
Методы определения	гравиметрия, титриметрия, поляриметрия	спектрометрия (УФ, ИК, ЯМР), масс-спектрометрия, изотопные методы, ГЖХ, рефрактометрия	флуоресценция, фосфоресценция, биологические методы

методы, предусматривающие экстракцию соединений перед их количественным определением. В табл. 1 указаны различные методы исследования экстрактов и интервалы определяемых количеств вещества [22].

Извлечение анализируемых веществ вместе с отбором сорбента проводят вручную или с помощью автоматических устройств. Зону сорбента отбирают отсасыванием ее в соответствующую емкость, откуда экстрагируют анализируемое вещество. Для определения микроколичеств веществ сорбент, отобранный в микропробирку с растворителем, отделяют центрифугированием или фильтрованием через соответствующие фильтры, после чего элюат может быть непосредственно использован для детектирования. Объем элюата обычно составляет 50—100 мкл, полнота извлечения более 90% [23].

Извлечение анализируемых веществ непосредственно из слоя сорбента проводят, не нарушая целостности слоя в самой зоне. Наиболее простым вариантом этого способа является способ, заключающийся в разрезании хроматограмм на гибкой подложке на полосы, помещаемые в сосуды с растворителем для извлечения анализируемых веществ [24]. Более совершенное решение такого способа заключается в создании герметичной установки, прокачивающей через полосы вокруг зоны с анализируемым веществом соответствующие системы растворителей. Элюат далее поступает в детектирующее устройство. Общее количество пропускаемого растворителя от 1 до 2 мл, стандартное отклонение результатов анализа от 0,2 до 1,3% в зависимости от количества анализируемого вещества [25]. Использование этого метода ограничено необходимостью четкого разделения анализируемых соединений.

Простые методы прямой элюции разделенных веществ в микрообъемах растворителя (40—100 мкл) заключаются в прокачивании растворителя насосом через слой сорбента с веществом; подаче его шприцем на полоски с сорбентом, прикрепленным к фильтровальной бумаге; предварительном концентрировании с последующей их элюцией [26, 27].

При этом с использованием последнего варианта стандартное отклонение результатов составляет 0,005—0,01 мкг [27]. Детекцию извлеченных веществ осуществляют спектрофотометрическими, флуориметрическими или радиохимическими методами.

Прямо количественное определение веществ на хроматограмме можно проводить, измеряя площадь пятна или интенсивность его окраски. Но такое определение сопряжено со значительными погрешностями и пригодно только для ориентировочных измерений. Более точные методы требуют применения специальных приборов. Все методы этой группы основаны на принципе фотометрии, причем чаще всего применяют денситометрию, затем спектрофотометрию, флуориметрию и радиохимические методы, обладающие высокой чувствительностью и дающие возможность идентифицировать и количественно определять большое число различных веществ [28—32]. Сравнение оптических методов количественной оценки результатов разделения смесей показано в табл. 2 [22]. Характеристика других инструментальных методов количественной оценки результатов подобна оптическим.

В настоящее время специальное оборудование для оптического сканирования в ТСХ пока еще труднодоступно, в связи с чем несколько

Таблица 2

Сравнение оптических методов количественной оценки результатов [22]

Метод	Стандартное отклонение, %	Необходимое количество вещества, мкг	Продолжительность анализа, мин
Визуальное сравнение Извлечение из слоя с последующим оптическим определением	10—30 2—5	1—10 10—100	0,1 20
Оптическое сканирование на основе измерений: поглощения излучения флуоресценции	1,5—2,5 1—2	0,1—10 $10^{-4}$ — $10^{-1}$	2

сдерживается его широкое применение в лабораторной практике. Наиболее распространенные методы оптического сканирования имеют определенные ограничения: недостаточно высокую химическую селективность, ограниченную область применения. Линейная зависимость сигнала от содержания вещества в зоне находится в узкой области измерения. По этой причине применение данных методов для определения примесей в количествах менее 1—2% в препаратах компонентов НК практически невозможно.

При оптическом сканировании качество нанесения пробы, наносимый объем, разделение, форма пятна, длина пробега являются решающими параметрами для получения количественных результатов. Для снижения пределов определения измерения следует проводить в режиме пропускания, а не отражения. При строгом соблюдении определенных условий стандартное отклонение результатов анализа составляет 1%.

В этой связи показано, что ТСХ под давлением является перспективным методом для разделения многокомпонентных смесей веществ с близкими свойствами при количественном сканировании.

Радиохимические методы детектирования в ТСХ характеризуются высокой чувствительностью и хорошей воспроизводимостью. Радиохроматограммы оценивают различными способами: непосредственно на слое сорбента, а также после извлечения вещества из слоя или путем предварительного отбора участков сорбента вместе с разделяемым веществом. Отбор сорбента для анализа радиоактивных веществ проводят с помощью механизированных и автоматизированных установок. Установки основаны на механическом соскабливании сорбента, переносе его в камеру для экстракции, где происходит десорбция определяемых соединений. Элюат через систему фильтров подается в коллекторы и на измерение. Установки пригодны для одновременного анализа нескольких проб. Данный способ можно применять для хроматограмм, зоны веществ на которых находятся на расстоянии 2—6 мм друг от друга.

Предел обнаружения радиохимическим методом составляет  $10^{-7}$ — $10^{-4}$  Ки и зависит от энергии образующихся при распаде ядер элементарных частиц, условий хроматографического анализа, особенностей детектирующей системы. Стандартное отклонение результатов составляет 1%. При анализе проб наблюдается линейная зависимость между количеством анализируемого вещества и сигналом детектирующей системы в широком диапазоне измерений [17].

Выбор неподвижной фазы в ТСХ имеет решающее значение для обеспечения необходимой селективности при разделении анализируемой смеси. Необходимость высокой эффективности хроматографического разделения предъявляет определенные требования к выбору сорбента. Для разделения сложных смесей компонентов НК в качестве сорбентов широкое применение нашли модифицированная полиэтиленимином целлюлоза и силикагель. Применение пластин с заранее нанесенным слоем сорбента способствует значительному упрощению метода ТСХ. Коммерческие пластины обеспечивают лучшую воспроизводимость результатов

по сравнению с пластиинами, изготовленными в лаборатории, благодаря высокой степени однородности по составу и толщине слоя сорбента. Пригодные для разделения компонентов НК пластины с силикагелем и полиэтиленимин(ПЭИ)-целлюлозой выпускают различные фирмы [33]. В качестве подложек наиболее удобна алюминиевая фольга, которую можно легко сгибать, резать и придавать пластиинам нужную форму. Эффективность разделения зависит от размера зерен, удельной поверхности, размера пор и содержания влаги [12].

Хорошее разделение соединений на ПЭИ-целлюлозе происходит при содержании 0,5—1% ПЭИ при низких значениях pH элюента [34]. Подвижность каждого вещества определяется величиной отрицательного заряда, зависящего от pH элюента. Для разделения дезокси- и рибопроизводных применяют системы с борной кислотой. Боратные комплексы рибонуклеотидов имеют дополнительный отрицательный заряд и движутся медленнее дезоксипроизводных. Для разделения соединений по количеству фосфатных групп применяют ступенчатое или градиентное элюирование растворами солей различной концентрации [35—39]. Разделение незаряженных соединений — пуриновых и пиримидиновых оснований и нуклеозидов проводят на немодифицированной целлюлозе или силикагеле.

Силикагель используется для разделения различных смесей компонентов НК. Подбор соответствующих систем растворителей обеспечивает разделение как по типу азотистого основания, так и по типу углеводного остатка [40—44]. Хорошее разделение сложных смесей, содержащих нуклеозид-5'-моно- и -полифосфаты пуриновых оснований, происходит при использовании систем, содержащих сильное основание — аммиак, который предотвращает образование водородных связей между аминогруппами анализируемых соединений и силикагелем. Для разделения нуклеозид-5'-полифосфатов наиболее пригодны кислые системы, содержащие изомасляную кислоту; для нуклеозидов — «обращенно-фазовые» системы, содержащие высокую концентрацию солей:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ .

В последние годы для разделения компонентов НК успешно применяется силикагель для ВЭТСХ, характеризующийся высокой эффективностью разделения и низким пределом обнаружения веществ; аминопропилированный силикагель, обладающий анионообменными свойствами, а также силикагель, модифицированный углеводородными радикалами. С использованием этих сорбентов выполнен ряд работ по разделению компонентов НК [45—53].

Наилучшие результаты по разделению сложных смесей компонентов НК, различающихся по типу азотистого основания, углеводного остатка и количеству фосфатных групп, получены с применением двумерной хроматографии и, в основном, на ПЭИ-целлюлозе [54—57]. Некоторые данные по разделению различных смесей компонентов НК приведены в табл. 3.

### III. ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Успехи в использовании ВЭЖХ объясняются ее высокой разрешающей способностью, мягкими условиями разделения и хорошим аппаратурным оформлением. Применение хроматографов высокого давления с высокочувствительными детекторами, новых типов сорбентов, а также создание спектрофотометров, обеспечивающих проведение ультрамикроанализа, способствовало тому, что метод ВЭЖХ опередил все другие методы по использованию для разделения компонентов НК и позволил эффективно разделять микрограммовые и панограммовые количества веществ за короткое время [61—68].

Общей тенденцией метода ВЭЖХ является переход к использованию в качестве сорбентов химически модифицированных силикагелей с размером частиц 5—10 и даже 3 мкм. Детектирование проводится с применением флуоресцентных, УФ-фотометрических электрохимических или атомноэмиссионных детекторов [68—77], а идентификация компонентов

Таблица 3

## Разделение компонентов нуклеиновых кислот на тонком слое сорбента

Разделяемые компоненты	Сорбент	Системы растворителей	Примечание	Ссылки
Основания, дезоксинуклеотиды, дезоксинуклеозиды	Силуфол, Kavalier, ЧССР	Диоксан — изопропанол — 2М аммиак — 1М аммоний уксуснокислый (3:2:4, 7:0,3); диоксан — изопропанол — 5М аммиак — 1М аммоний уксуснокислый (3:1,8:4,9:0,3)	—	[44]
Основания, дезоксинуклеозиды	Силуфол, Kavalier, ЧССР; RP-силикагель C <sub>12</sub> , Kodak, США	Диоксан — аммиак (7:3); изопропанол — аммиак (8—2); диоксан — изопропанол — аммиак (4:4:2) 1,5 mM TBA + 5% метанол; 0,4 M аммонийфосфат pH 3,5; 0,1 M аммоний ацетат pH 6,9+5% ацетонитрил	Детектирование радиохимическое	[44] [51]
Рибонуклеотиды	NH <sub>2</sub> -силуфол	1 M Уксусная кислота — этанол (10:1) pH 3,2	—	[52]
Основания, рибо- и дезокси- нуклеозиды, нуклеотиды	Силикагель GF-254 (ВЭТСХ), Merck, ФРГ; ПЭИ-целлюлоза, Merck, ФРГ	Хлороформ — метанол — уксусная кислота (3:2:1); хлороформ — метанол — вода (81:15:4) Хлороформ — метанол — уксусная кислота (3:2:1) в 0,1 M борной кислоте	Нуклеотиды остаются на старте	[58] [58]
Рибо- и дезоксинуклеотиды	ПЭИ-целлюлоза, Merck, ФРГ	0,25 M уксусная кислота (9 см), 0,8 M муравьиная кислота (4 см) — 1 направление; 0,22 M три-НCl pH 8,0 в метаноле (10 мин), метанол (10 мин) — 2 направление	Двумерная хроматография	[59]

Таблица 3 (продолжение)

Разделяемые компоненты	Сорбент	Системы растворителей	Примечание	Ссылки
Рибонуклеотиды	ПЭИ-целлюлоза, Merck, ФРГ	1 направление — 0,2 М LiCl (2 мин), 1 М LiCl (6 мин), 1,6 М LiCl (75 мин); 0,5 М натрийформиат pH 3,4 (0,5 мин), 2 М натрийформиат pH 3,4 (2 мин), 4 М натрийформиат pH 3,4 (60 мин) — 2 направление	Двумерная хроматография	[59]
Рибонуклеозид-5'-моно-, -ди- и -три-фосфаты	Силуфол, Kavalier, ЧССР; NH <sub>2</sub> -силикагель (ВЭТСХ), Merck, ФРГ	Диоксан — изопропанол — вода — аммиак (4:2:4:1); диоксан — вода — аммиак (6:4:1) Диоксан — изопропанол — аммиак — 1 М аммоний уксуснокислый (3:2:4:7:0,3) 0,2 М NaCl <sub>2</sub> в смеси: метанол — вода (3:7); 0,2 М NaCl в смеси с метанолом, этанолом, хлороформом	Детектирование радиохимическое	[43] [44] [47]
Дезоксинуклеозид-5'-моно-, -ди- и -три-фосфаты	NH <sub>2</sub> -силуфол NH <sub>2</sub> -силикагель	1 М уксусная кислота — этанол (10:1) pH 6,5 1 М уксусная кислота — этанол (10:1) pH 6,5	Детектирование радиохимическое; двумерная хроматография	[52]
Рибо- и дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты	ПЭИ-целлюлоза, Merck, ФРГ	1 направление — 1 М LiCl с 5%-ной борной кислотой pH 7,0, промывка метанолом, 2 М натрий формиат pH 3,4—1,6 М LiCl (1:1) при 4° С/0,85 М калий фосфорнокислый pH 3,4 — 2 направление	»	[60]
Рибо- и дезоксинуклеозиды	Целлюлоза, Merck, ФРГ	0,2 М; 2 М; насыщенный раствор (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	»	[35]

смеси может осуществляться сочетанием методов ВЭЖХ с масс-спектрометрией [78–80].

Для разделения компонентов НК используются почти исключительно такие виды ВЭЖХ, как ИОХ, ОФХ и ИП ОФХ. Адсорбционная («прямофазовая») ВЭЖХ в настоящее время применяется лишь в единичных случаях [81].

## 1. Ионообменная высокоеффективная жидкостная хроматография

Ионообменная хроматография (ИОХ) является традиционным методом разделения компонентов НК [34, 65, 82]. В ионообменной хроматографии разделение веществ основано на различии зарядов их молекул; определенную роль играют и гидрофобные взаимодействия. В настоящее время выпускается большое число различных ионообменников для ВЭЖХ; как правило, это либо модифицированные сополимеры стирола с дивинилбензолом с относительно высоким содержанием последнего, либо сорбенты на основе микропористых силикагелей [83]. Анионообменники обычно содержат четвертичные аммонийные группы (Partisil-10 SAX, Ultrasil-10 AX Lichrosorb AN и др.), реже — третичные аминогруппы (Nucleogen DEAE). В качестве анионообменника нередко используют аминопропилированный силикагель (APS-Hypersil, Lichrosorb-NH<sub>2</sub>). Преимуществом ионообменников на основе силикагеля является высокая эффективность разделения и малое время анализа, обеспечиваемое высокими скоростями массообмена, хотя стойкость данных сорбентов невелика, а рабочий диапазон рН ПФ — от 2 до 7,5 [59—63, 83—85]. Катионообменники чаще всего несут алкилсульфогруппы (Partisil-10 SCX, Ultrasil-10 CX). Довольно часто в последнее время используются ионообменные производные жестких гидрофильных смол типа Сферона, TSK-gel-PW [84] и др.

Анионообменная хроматография широко используется для анализа нуклеотидов, особенно нуклеозидполифосфатов [86—97]. Чаще используется градиентная элюция. С одной стороны, это позволяет за короткое время разделить более 20 соединений, с другой стороны, немало времени расходуется на регенерацию колонки после анализа. Кроме того, градиент концентрации солей приводит к дрейфу нулевой линии УФ-детектора. Дрейф можно компенсировать добавлением к стартовому буферу рассчитанного количества ацетона или частичной замены фосфата на хлорид, включение которого в состав ПФ может, однако, приводить к коррозии хроматографического оборудования [98—100].

Изократический режим разделения не предъявляет столь высоких требований к чистоте применяемых реагентов и дает лучшую, чем при градиентном элюировании, воспроизводимость результатов; недостатком изократической хроматографии является значительная ширина пиков с большими величинами удерживания хроматографической зоны *K'*, что снижает чувствительность и точность анализа [101, 102].

Порядок элюции нуклеотидов при анионообменной ВЭЖХ не всегда легко поддается интерпретации. Пожалуй, единственное правило, не имеющее исключений — это порядок элюции нуклеозидполифосфатов: NMP, NDP, NTP<sup>2</sup>. Сложнее обстоит дело с изомерными нуклеозидмонофосфатами и с разделением рибо- и дезоксирибонуклеотидов. Так, авторы работы [102] наблюдали следующие ряды элюции (колонка с сорбентом Partisil-10 SAX, элюент 3%-ный MeOH в 0,08 М фосфатном буфере, рН 4,15):

- |                                    |  |
|------------------------------------|--|
| 1) CMP, UMP, AMP, GMP              | 5) dCMP, CMP, 3'-CMP, 2'-CMP           |
| 2) dCMP, TMP, dAMP, dGMP           | 6) UMP, 2'-UMP, 3'-UMP                 |
| 3) 2'-UMP, 2'-AMP, 2'-CMP, 2'-GMP, | 7) AMP, dAMP, 3'-dAMP, 2'-AMP, 3'-AM   |
| 4) 3'-UMP, 3'-CMP, 3'-AMP, 3'-GMP  | 8) 3'-dGMP, GMP, dGMP, 3'-GMP, 2'GMPP. |

<sup>2</sup> Сокращения компонентов нуклеиновых кислот приведены в соответствии с рекомендациями IUPAC—IUB (Молекуляр. биология. 1972. Т. 6. № 1. С. 167—171).

Как видно, картина весьма сложная. Ясно, что не последнюю роль играют гидрофобные взаимодействия; хотя аденин значительно протонирован при рН 4,15, адениновые нуклеотиды элюируются после UMP и TMP. При более низких рН AMP все же «обгоняет» UMP, но порядок UMP и GMP сохраняется.

За счет гидрофобных взаимодействий на анионообменниках разделяются основания и нуклеозиды. Неионогенные взаимодействия с сорбентом частично подавляются повышением температуры, добавлением органических растворителей в ПФ [103, 104]. В изократическом режиме можно одновременно разделять основания, нуклеозиды и нуклеотиды.

В последнее время необходимость ускорения и упрощения анализов, а также потребность анализировать очень сложные образцы, в состав которых входят основания, нуклеозиды и их моно- и полифосфаты, а также UDPG, NAD, NADP и т. п. родственные соединения, привела к некоторому снижению интереса к анионообменной хроматографии и стимулировала исследования в области ион-парной ОФХ (см. ниже). Комбинированные хроматографические системы, состоящие из двух анионообменной и обращенно-фазовой колонок, также способны эффективно разделять подобные смеси, но методика анализа в этом случае существенно усложняется [105, 106].

Что касается катионообменной хроматографии, то этот метод традиционно применяется для анализа оснований. Если учесть, что заряд оснований при низких рН различается не более, чем на единицу, то разделение легко осуществляется в изократическом режиме. Примеры разделения компонентов НК приведены в табл. 4.

## 2. Обращенно-фазовая хроматография

Обращенно-фазовой называют хроматографию, в которой элюент более полярен, чем НФ. Обычно НФ по своей природе является силиалкиловым эфиром, а в качестве ПФ используются водные буферные растворы и (или) их смеси с полярными органическими растворителями [108]. Широкое распространение ОФХ обусловлено целым рядом достоинств [108, 109]: а) позволяет разделять вещества самых различных классов, причем, вещества, сильно отличающиеся по полярности и строению, могут быть разделены за один хроматографический цикл (например, смесь нуклеозидов и их фосфатов); б) метод характеризуется высокой эффективностью и селективностью; в) колонки быстро уравновешиваются и регенерируются; г) метод позволяет анализировать сильно разбавленные образцы большого объема; д) сорбенты коммерчески доступны.

Отмечаются следующие недостатки метода ОФХ [108]: а) НФ стабильны только в области рН 2—7,5; б) взаимодействие молекул разделяемых веществ с НФ характеризуется смешанным механизмом из-за присутствия на поверхности НФ остаточных силанольных групп (Si—OH); в) механизм удерживания веществ при ОФХ еще недостаточно изучен. Очевидно, что эти недостатки не являются принципиальными и практически всегда удается подобрать оптимальное сочетание НФ—ПФ для решения какой-то конкретной задачи.

В качестве НФ в ОФХ используют микропористые силикагели с химически связанными углеводородными группами, чаще всего  $\mu$ -октадецильными ( $C_{18}$  или ODS) или  $\mu$ -октильными ( $C_8$ ) [109]. Для их получения силикагели обычно обрабатывают алкилглеконидсиланами; из-за стерических препятствий, однако, до 30% имеющихся на поверхности силикагеля силанольных групп остаются немодифицированными, некоторую часть их можно удалить повторной обработкой, триметилсилилирующими реагентами, «кэппированием» [109—111]. Свойства НФ зависят от типа привитого лиганда, концентрации на поверхности алкильных и доступных силанольных групп, характеристики исходного силикагеля: удельной поверхности, удельного объема пор и др. [110—120].

Таблица 4

## Примеры разделения компонентов НК методом ионообменной ВЭЖХ

№ п/п	Характер образца	Сорбент *; размеры колонки, мм	Состав ПФ и характер элюции	Порядок элюции компонентов образца	Полное время анализа, мин	Ссылки
1	Искусственная смесь	TSK gel K-anion-BW (9 мкм); 0,19×450	30 мМ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,15	C <sub>yd</sub> < U <sub>rd</sub> < Cyt < Ura < Guo < Ado < Gua < Ade < CMP < UMP < 2'-CMP < 3'-CMP < 2'UMP < 3'-UMP < GMP < AMP < 2'-GMP < 2-AMP < 3'-GMP < 3'-AMP	60	[87]
2	Искусственная смесь	Partisil 10-SAX (10 мкм); 4,6×250	Градиент до 0,3 М KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> и 0,3 М KCl, pH 3,3 → 4,9	CMP < AMP < UMP < IMP < GMP < UDP < CDP < ITP < CTP < ATP < GTP < NADH < NADPH < UDPG	~40	[94]
3	Клеточные экстракты	APS-Hypersil (5 мкм); 5,0×100	Градиент до 0,5 М KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> и 0,8 М KCl, pH 2,9	XMP < CMP < AMP < NAD < TMP < IMP < GMP < CDP < UDPG < ADP < dADP < TDP < GDP < CTP < ATP < dATP < GTP	~15	[95]
4	Экстракт печени крыс	Lichrosorb-NH <sub>2</sub> (5 мкм); 4,6×150	0,1 М K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,1 М NH <sub>4</sub> Cl, 20% MeCN, pH 6,5	AMP < GMP < NADP < ADP NADPH < GDP < ATP < GTP	20—25	[106]
5	Гидролизаты ДНК из культуры фибропластов	Ultrasil-10CX (10 мкм); 4,6×250	0,02 М (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2,3	Thy < Gua < Cyt < Ade < <sup>m5</sup> Cyt	~15	[107]

\* В скобках указан диаметр частиц

В обзоре [108] перечислено более 70 сорбентов для ОФХ, производством которых было занято свыше 50 фирм. Можно предположить, что к настоящему времени число выпускаемых сорбентов еще более увеличилось.

Определенную трудность в работе с коммерческими сорбентами создает недостаток информации о методе их синтеза и свойствах. Поэтому неудивительно, что сравнительное изучение хроматографических характеристик коммерческих сорбентов явилось предметом многочисленных исследований, результаты которых можно свести к следующим положениям [121—129]:

1. При ОФХ неполярных веществ селективность разделения мало зависит от типа сорбента, эффективность также варьирует незначительно.

2. На разделение веществ, имеющих полярные группы, влияет не только тип сорбента, но и различие партий сорбентов одного типа. При этом часто наблюдается асимметрия и (или) уширение хроматографических пиков, что обычно объясняют наличием на поверхности доступных силанолов и ее загрязненности тяжелыми металлами.

3. Сорбенты с высоким содержанием остаточных силанолов (Nucleosil- $C_8$ , Partisil-ODS2, Partisil-ODS3) имеют меньшую, по сравнению с кэпированными сорбентами (Nucleosil- $C_{18}$ , Partisil-CDS $_8$ , CCS- $C_8$ , Ultra-sil-ODS и др.), стабильность в водно-солевых ПФ из-за более быстрого растворения силикагельной матрицы и возможной необратимой сорбции различных веществ.

Обращенно-фазовая хроматография (ОФХ) представляется важнейшим и широкоиспользуемым методом для разделения компонентов нуклеиновых кислот, основанным на высокой селективности неполярных сорбентов к гетероциклическим основаниям [130—140]. При изучении влияния параметров ОФХ на разделение компонентов НК установлено, что содержание органического растворителя в подвижной фазе не изменяет селективность разделения, а влияет только на удерживание; pH и ионная сила могут влиять на селективность разделения [129—131].

Основания и нуклеозиды можно разделять методом ОФХ при низких концентрациях органических растворителей. Для подавления неспецифических взаимодействий в элюент добавляют буфер (обычно фосфатный, pH 4—6) в низкой (10—50 mM) концентрации. Как видно из табл. 5, основания элюируются первыми, затем соответствующие нуклеозиды и, наконец, дезоксинуклеозиды, причем пурины обычно удерживаются сильнее пуримидинов. При решении частных задач методику анализа можно упростить изменением состава ПФ. Так, в работе [141] разделение смеси осуществляли при pH 2,5. При этом хорошо разделялись dU и T, а dA, dG и dC, не представлявшие интереса для авторов, в этих условиях почти не удерживались на обращенно-фазовой колонке.

Клинические образцы, а также гидролизаты тРНК, могут содержать до 20 минорных нуклеозидов, поэтому анализ таких сложных образцов вынуждает использовать градиентную элюцию (№ 1—3 табл. 5). Вопросы, связанные с анализом минорных нуклеозидов в клинике, подробно рассмотрены в обзорах [4, 5] и в работе [133], авторам которой удалось разделить и количественно определить более 20 нуклеозидов в образцах физиологического происхождения. Элюцию вели в ступенчатом градиенте MeOH, время анализа составляло более 100 мин. Для анализа менее сложного образца эти же авторы использовали изократическую элюцию; время анализа сократилось почти в 15 раз. Примеры разделения оснований и нуклеотидов приведены в табл. 5.

Наличие заряженной отрицательно фосфатной группы делает молекулы нуклеотидов более гидрофильными, чем молекулы нуклеозидов и оснований, поэтому нуклеотиды слабее удерживаются на обращенно-фазовых колонках. Для разделения нуклеотидов используют ПФ без органических растворителей; pH чаще всего около 4—5, что подавляет вторичную ионизацию фосфатной группы, а концентрацию буфера существенно увеличивают по сравнению с ОФХ нуклеозидов.

Таблица 5

## Примеры разделения оснований и нуклеозидов обращенно-фазовой ВЭЖХ

№ п/п	Характер образца	Сорбент; размеры колонки, мм	Состав ПФ и характер элюции	Порядок элюции компонентов образца	Полное время анализа, мин	Ссылки
1	Клинические анализы	Ultrasphera-ODS (5 мкм); 4,6×150	Градиент MeOH, 10 мМ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 4,9	Hyp < dCyd < Ado < Jun < dGuo < Thd < Ade < dAdo	25	[142]
2	Клинические анализы	Hypersil-ODS (3 мкм); 4,6×50+4,6×150	Градиент MeOH, фосфатный буфер, pH 6,0	Cyt < Ura < Cyd < Hyp < Xan < Urd < Ade < Jno <	~20	[143]
3	Гидролизаты тРНК или тканевые экстракты	μ-Bondapak C <sub>18</sub> (10 мкм); 4,0×300	Градиент MeOH, фосфатный буфер, pH 5,1 (36° C)	Guo < dURD < dCyd < Thd < Ado < dAdo Cyd < Urd < 1mAdo < 5mCyd < 7mGuo — всего около 15 нуклеозидов	35—40	[144]
4	Гидролизаты ДНК и РНК	Supelcosil C <sub>18</sub> -DB (5 мкм); 4,6×150	8% MeOH в 0,05 М KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 4,0	Cyd < dCyd < Urd < dUrd < m <sup>5</sup> dCyd < Jno < Guo < dJon < dGuo < dThd < Ado < dAdo	7	[145]
5	Экстракт плаценты человека	Micropak CH-10 (10 мкм); 4,0×300	Градиент MeOH, фосфатный буфер, pH 6,5	Xan < Hyp < NAD < Jno < Ado < Ade	~20	[146]

Повышение ионной силы ПФ приводит к увеличению времени удерживания нуклеотидов при ОФХ до приемлемых величин (подробно этот эффект исследован в работах [97, 129, 130]), в то же время из-за повышения собственного УФ-поглощения ПФ при этом снижается чувствительность детектора.

Молекулы нуклеозидполифосфатов еще более гидрофильны; порядок элюции полифосфатов ( $\text{NTP} < \text{NDP} < \text{NMP}$ ) при ОФХ обратен таковому при анионообменной хроматографии.

При необходимости одновременного разделения нуклеотидов и нуклеозидов в ПФ приходится добавлять метанол и вести градиентную элюцию [147—150].

Примеры разделения нуклеотидов приведены в табл. 6.

### 3. Ион-парная обращенно-фазовая хроматография

Ион-парная (ИП) обращенно-фазовая хроматография (ОФХ) — это вариант ОФХ, применяемый для разделения веществ, диссоциирующих в водно-органических растворах. В ПФ добавляются соединения, содержащие липофильные группы, способные к образованию ионных пар с противоположно заряженными ионами компонентов анализируемой пробы: додецилсульфат натрия, четвертичные аммониевые основания или цвиттер-ионы [152—154].

Как уже было сказано, нуклеотиды, особенно нуклеозидполифосфаты, из-за низкой гидрофобности слабо удерживаются на обращенно-фазовых сорбентах. Существует два способа увеличения удерживания ионизованных молекул при ОФХ. Во-первых, можно вести хроматографию при таком рН элюента, когда кислотная (или основная) диссоциация молекул разделяемых веществ несущественна. Этот способ, часто называемый «подавление ионов» (*ion suppression*) [155], применительно к нуклеотидам в какой-то степени реализуется в тех работах, которые были рассмотрены в предыдущем разделе. Во-вторых, нуклеотиды являются подходящими кандидатами для ИП ОФХ; в этом случае увеличение удерживания ионов достигается введением в состав ПФ гидрофобных ионов противоположного заряда.

Изучению механизма ИП ОФХ посвящено немало работ [155—157]; перечислим здесь основные выводы этих исследований:

1. Присутствие в составе ПФ гидрофобных ионов усиливает сорбцию ионов противоположного знака. Чем гидрофобнее ион, тем сильнее увеличение  $K'$  для противоиона; соответственно эффект проявляется при более низких концентрациях более гидрофобного иона. Так, добавление в ПФ 2,5 мМ ТБА повышает  $K'$  нуклеотидов сильнее, чем добавка 5 мМ ТЕА или 20 мМ ТМА [158].
2. Зависимость  $K'$  от концентрации гидрофобного противоиона для ионных компонентов смеси чаще всего имеет куполообразный вид; нуклеотиды не являются исключением из этого правила [159]. Для разных веществ в одинаковых условиях положение максимумов  $K'$  несколько различно. Как правило, концентрацию ион-парного агента выбирают в области максимумов  $K'$  компонентов разделяемой смеси.
3. Присутствие в ПФ гидрофобных ионов несколько снижает удерживание неионных веществ, например добавка в элюент ТБА снижает  $K'$  нуклеозидов [159].
4. Как и в обычной ОФХ, повышение концентрации органического растворителя уменьшает времена удерживания и ионных и неионных компонентов при ИП ОФХ.
5. Повышение концентрации солей снижает времена удерживания ионных компонентов при ИП ОФХ.
6. Зависимость времен удерживания от рН при ИП ОФХ противоположна зависимости при «ионном подавлении»: времена удерживания больше, если молекулы элюата ионизованы и способны образовать ионную пару. Так, при рН 3,0 добавление ТБА увеличивает  $K'$  для TMP и UMP и не влияет на  $K'$  для CMP и AMP, которые при рН 3,0 являются цвиттер-ионами.

Таблица 6

## Примеры разделения нуклеотидов обращенно-фазовой ВЭЖХ

Характер образца	Сорбент; размеры колонки, мм	Состав ПФ и характер элюции	Порядок элюции компонентов образца	Полное время анализа, мин	Ссылки
Бактериальные клеточные экстракты	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub> (10 мкм); 4,0×300	0,2 М (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 5,1	GTP < GDP < ATP < ADP < AMP	<20	[119]
Экстракты эритроцитов, гепатоцитов и различных тканей	LiChrospher 100 CH-18 (5 мкм); 4,0×250	Фосфатный буфер pH 6,0; градиент MeCN до 7,5%	GTP < GDP < GMP < IMP < ATP < ADP < Urd < AMP < NADP < NAD < Guo < Ado	30—40	[131]
Продукты химического фосфорилирования нуклеозидов	Ultrasphere-ODS (5 мкм); 4,6×250	10% MeOH, 0,05 М (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	AMP < 2'-AMP < Ade < 2', 3'-cAMP < 3'-AMP < 3,5'-cAMP < Ado	10—20	[140]
Гидролизаты ДНК и печени крыс	Spherisorb-ODS (10 мкм); 4,6×500	0,5 или 0,75 М Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 5,5	dCMP < <sup>m</sup> dCMP < TMP < dGMP < dAMP	~125	[147]
Экстракты печени человека	Spherisorb-ODS (10 мкм); 4,6×500	25 мМ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 5,5	ATP < ADP < AMP < NADP < NAD	120	[151]

Таблица 7

## Примеры разделения компонентов НК методом ИП ОФХ

№ п/п	Характер образца	Сорбент; размеры колонки, мм	Состав ПФ и характер элюции	Порядок элюции компонентов образцов	Полное время анализа	Ссылки
1	Экстракты различных тканей	Lichrosorb RP-8 (RP-18); 4,0×250	0,3% ТВА; 0,65% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 5,8; 240 мл MeCN, вода до 1100 мл	AMP < ADP < GTP < UTP < ATP	~10	[155]
2	Экстракты различных тканей	Ultrasphere ODS (5 мкм); 4,6×250	2,5 мМ ТВА; 12% MeCN pH 2,5 (HCOOH)	CMP < AMP < GMP < UMP < IMP < XMP	~30	[158]
3	Гидролизаты химически синтезированных олигонуклеотидов	Partisil-5C <sub>8</sub> ; 5 (мкм) 4,6×250	2,0 мМ ТВР; 0,005 М $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 4,9; 7% MeOH	dCyd < dCMP < dGuo < Thd < dGMP < TMP < dAdo < dAMP <	~60	[159]
4	Различные смеси	Servachrom ODS-S: 100; 4,6×250	5,0 мМ ТВА; фосфатный буфер, pH 6,0; градиент MeCN до 10%	Cyd < Urd < CMP < Guo < UMP < GMP < Ado < CDP < AMP < UDP < GDP < CTP < ADP < UTP < GTP < ATP	~60	[170]
5	Гидролизат ДНК	Ultrasphere-C <sub>8</sub> (5 мкм); —	10 мМ гексансульфонат; 5% MeCN; 10 мМ фосфатный буфер, pH 2,9	Ura < Hiy < Gus < Cyt < $m^3\text{cyt}$ < Ade	10	[171]

тер-ионами при рН 5,7 ТВА увеличивает  $K'$  для всех нуклеотидов [160—162].

Отметим, что истинный механизм ИП ОФХ до сих пор не установлен; гипотетические механизмы «ионных пар», «динамического ионного обмена» и «ионного взаимодействия» обсуждаются в обзоре [155].

Некоторые примеры анализа компонентов НК методом ИП ОФХ приведены в табл. 7. Здесь мы ограничились пятью примерами, однако, число работ в области ИП ОФХ нуклеотидов весьма велико [152, 163—169].

Порядок элюции нуклеозидполифосфатов тот же, что и при анионообменной хроматографии. Интересно, что в 2,5 мМ ТВА порядок элюции мононуклеотидов также соответствует порядку элюции при анионообменной хроматографии при низких рН; в 20 мМ ТМА УМР выходит вслед за СМР, как в обычной ОФХ.

Во всех примерах табл. 7, кроме № 4, элюция осуществляется в изократическом режиме, хотя в одних случаях разделяются нуклеозидполифосфаты, сильно отличающиеся по заряду молекулы, в других — нуклеотиды и нуклеозиды. В целом в ИП ОФХ градиентная элюция используется реже, чем в ионообменной хроматографии или в ОФХ смесей нуклеозидов с нуклеотидами, что является ее несомненным преимуществом.

Как отмечалось выше, для анализа очень сложных образцов используют либо довольно сложные системы, комбинирующие ИОХ и ОФХ, либо ИП ОФХ, что иллюстрирует пример № 4 табл. 7. Хотя разделение в примере № 4 не столь впечатляет, как в работах [105, 106], оно получено в значительно более простой системе, и можно предположить, что разделение 16-компонентной смеси — это не предел для ИП ОФХ, особенно при использовании градиентной элюции.

Наконец, нуклеиновые основания при низких значениях рН также можно разделять в условиях ИП ОФХ, введя в состав ПФ соответствующие добавки (ср. примеры № 5 табл. 7 и № 5 табл. 4).

Таким образом, ИПХ представляется наиболее перспективным методом ВЭЖХ для анализа нуклеотидов или их смесей с нуклеозидами.

#### IV. ДРУГИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

В последние 8—10 лет развиваются методы потенциометрического титрования компонентов НК, основанные на кислотно-основных свойствах оснований пуринового и пиридинового ряда; методы, основанные на избирательном окислении *цис*- $\alpha$ -гликольной группировки рибозной части рибонуклеозидов и их фосфатов; и методы, основанные на цветных реакциях пуриновых оснований и углеводной части нуклеозида.

Для раздельного анализа многокомпонентных смесей компонентов НК применяются дифференциальное алкалиметрическое или ацидиметрическое титрование в среде органических растворителей, не требующие предварительного разделения различных производных пурина и пиридинина [172—174].

Методы потенциометрического титрования специфичны и точны. Недостатками их является большой расход препаратов (20—200 мг) и невозможность определения примесей, составляющих менее 10%.

С целью избирательного определения рибонуклеозидов и их фосфатов используются методы окисления *цис*- $\alpha$ -гликольной группировки периодатом с последующим титрометрическим или колориметрическим определением иодата, образующегося при окислении анализируемых веществ [175—176].

Цветные реакции, применяемые для определения компонентов НК, основаны на свойствах: аденина — диазотироваться с образованием азо-соединения с  $\alpha$ -нафтиламином; гуанина — реагировать с реагентом Фолина; пуриновых нуклеотидов — образовывать окрашенные соединения рибозы с орцином, дезоксирибозы — с дифениламином [177—180].

Методы окисления *цис*- $\alpha$ -гликольной группировки рибозы и цветные реакции, применяемые к определению компонентов НК, селективны и чувствительны и используются для анализа определенного класса соединений, но не пригодны для дифференцированного определения компонентов НК внутри данного класса.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Яшин Я. И.//Журн. аналит. химии. 1985. № 2. С. 201.
- ✓2. Современное состояние и тенденции развития жидкостной хроматографии/Под ред. Канева А. С. и др. М.: ЦНИИТЭИ приборостроения, 1985. 106 с.
3. Tiemeier W.//Ernaehrung. 1986. V. 10. № 6. P. 388; С. А. 1986. V. 105. 151636.
4. Zakaria M., Brown P. R.//J. Chromatogr. 1981. V. 226. № 2. P. 267.
5. Simpson R. C., Brown P. R.//Ibid. 1986. V. 379. P. 269.
6. Беленчкий Б. Г., Волынец М. П., Ганкина Э. С.//Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1983. Т. 28. № 1. С. 30.
7. Sherma J., Fried B.//Anal. Chem. 1982. V. 54. № 5. P. 45.
8. Stahl E.//J. Chromatogr. 1979. V. 165. № 1. P. 59.
9. Sherma J., Fried B.//Anal. Chem. 1984. V. 55. № 5. P. 48.
- ✓10. Шаршунова Н., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. Ч. 2. М.: Мир, 1980. 621 с.
11. Березин В. Г., Виноградова Р. Г., Романов Ф. И. и др.//Журн. аналит. химии. 1984. Т. 39. № 8. С. 1369.
- ✓12. Кирхнер Ю. М. Тонкослойная хроматография. Т. 1, 2. М.: Мир, 1981. 616 с.
13. Moi J., Sehmutz H. P.//Amer. Lab. 1983. V. 15. № 1. P. 56.
- ✓14. Высокоэффективная тонкослойная хроматография/Под ред. Златкиса А. и Кайзера Р. М.: Мир, 1979. 245 с.
15. Andreev L. V.//J. Liquid Chromatogr. 1982. V. 5. № 8. P. 1573.
16. Fenimore D. C., Davis C. M.//Anal. Chem. 1981. V. 53. № 2. P. A252.
- ✓17. Березин В. Г., Бочков А. С. Количественная тонкослойная хроматография. М.: Наука, 1980. 183 с.
- ✓18. Бочков А. С., Лезин А. А., Павлушкин Г. Г. и др.//Измерение, контроль, автоматизация. 1981. Т. 5. С. 36.
19. Чобанов Д., Таранджийска Р.//Изв. хим. Бълг. АН. 1982. Т. 15. № 1. С. 45.
20. Rogers D.//Amer. Lab. 1979. V. 11. P. 77.
21. Variadi A., Ponger S., Devenyi T.//Chromatogr. and Mass Spectrom. Biomed. Sci. 2. Proc. Int. Conf. Bordighera. 1982. Amsterdam. 1983. P. 135.
- ✓22. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам. Ч. 2./Под ред. Березкина В. Г. М.: Мир, 1982. 783 с.
23. Dekker D. J.//Chromatogr. 1979. V. 169. P. 508.
24. Falk H., Krumer K. J.//Ibid. 1975. V. 103. № 2. P. 279.
25. Endo T., Kiawahara A., Tasai H., Ishigami T. J.//Chromatogr. 1977. V. 140. № 3. P. 263.
- ✓26. Adams P. A., Kurtz K. B.//Anal. Biochem. 1978. V. 84. № 1. P. 328.
- ✓27. Горохов А. Ф., Пупкова В. И.//Прикл. биохимия и микробиология. 1982. Т. 18. № 5. С. 725.
28. Amorese D. A., Bamburg J. K.//J. Chromatogr. Sci. 1983. V. 21. № 2. P. 190.
29. Kastelan-Macan M., Devcic A., Bego B.//Chromatographia. 1978. V. 11. № 1. P. 128.
30. Geipi E., Traveset J., Such V., Conzalo R.//Anal. Proc. 1983. V. 20. № 7. P. 362.
31. Zuber G. E., Warren R. J., Begosh P. P., O'Donnell E. L.//Anal. Chem. 1984. V. 56. № 14. P. 2935.
32. Butler H. T., Poole C. F.//J. Chromatogr. Sci. 1983. V. 21. № 9. P. 385.
33. Лурье А. А. Хроматографические материалы (справочник). М.: Химия, 1978. 440 с.
34. Гуськова Л. И., Демушкин В. П.//Успехи химии. 1979. Т. 43. № 7. С. 1241.
35. Bij K. E., Lederer M.//J. Chromatogr. 1983. V. 268. № 2. P. 311.
36. Bols N. C., Mossner D. D.//Ibid. 1982. V. 229. № 2. P. 460.
37. Payne R. C., Trant T. W.//Anal. Chem. 1982. V. 121. № 1. P. 49.
38. Mehta S. R., Laplyre J. N., Maisel A. L.//Chromatogr. 1979. V. 178. № 2. P. 344.
39. Rederson P. L., Catherall W. A.//Methods Enzymol. 1979. V. 55. P. 283.
40. Figueira A. M., Bibeiro J. A.//J. Chromatogr. 1985. V. 325. № 1. P. 314.
41. Зарубина И. В., Криворучко Б. И.//Укр. биохим. журн. 1982. Т. 54. № 4. С. 437.
42. Захарова Н. Б., Рубин В. И.//Лаб. дело. 1980. № 12 С. 735.
43. Куделин Б. К., Каминский Ю. Л., Иванова И. Ф., Гаврилин С. С.//Биохимия. 1979. Т. 44. № 2. С. 368.
44. Горохов А. Ф., Пупкова В. И.//Прикл. биохимия и микробиология. 1981. Т. 17. № 3. С. 448.
45. Hauck H. E., Jost W.//Amer. Lab. 1983. V. 15. № 3. P. 74.
46. Okamoto M., Yamada F.//Chromatographia. 1982. V. 16. № 1. P. 152.
47. Jost W., Hauck H. E.//Anal. Biochem. 1983. V. 135. № 1. P. 120.
48. Jost W., Hauck H. E.//J. Chromatogr. 1983. V. 261. № 2. P. 235.
49. Rekker R. F.//Ibid. 1984. V. 300. № 1. P. 109.
50. Siouffi A. M., Wawrzynowicz T., Bressolle F., Quiochon G.//J. Chromatogr. 1979. V. 186. № 1. P. 563.

51. Cadet J., Voitures L., Berger M.//Ibid. 1983. V. 259. № 1. P. 111.
52. Карпова С. Ф., Пупкова В. И., Хрипин Ю. Л. А. с. 1239588 СССР//Б. И. 1986. № 23.
53. Brinkman U. A., Th. De Vries G.//J. Chromatogr. 1983. V. 258. № 1. P. 43.
54. Zakaria M., Gonnord H. F., Guiochon G.//Ibid. 1983. V. 271. № 2. P. 127.
55. Beardsley G. P., Abelson H. T.//Anal. Biochem. 1980. V. 105. № 2. P. 311.
56. Bols N. C., Bowen W. M., Knoi K. G., Boltska S. A.//Ibid. 1980. V. 106. № 1. P. 230.
57. Bochner B. R., Ames B.//J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 16. P. 9759.
58. Kremmer T.//Magy Kem Lapic. 1977. V. 32. № 2. P. 71.
59. Sistoravis N.//Chromatographia. 1983. V. 17. Sl. 3. P. 17.
60. Baudendistel L. J., Ruth T. S. J.//Chromatogr. 1978. V. 148. № 2. P. 500.
61. Яшин Я. И.//Журн. аналит. химии. 1982. Т. 37. № 11. С. 2043.
62. Яшин Я. И.//Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева. 1983. Т. 28. № 1. С. 18.
63. Титкова Н. Ф., Помазанов В. В., Калинин Ю. Т., Сакодынский К. И.//Журн. аналит. химии. 1983. Т. 38. № 7. С. 1305.
- ✓ 64. Энгельгард Х. Жидкостная хроматография при высоких давлениях/Под ред. Чмутова К. В. М.: Мир, 1980. 245 с.
65. Glajch J. L., Kirkland J. J.//Anal. Chem. 1983. V. 55. № 2. P. A319.
66. Majors R. E., Barth H. G., Lochmuller C. H.//Ibid. 1984. V. 55. № 5. P. 340.
- ✓ 67. Ультрамикроанализ нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1973. 164 с.
- ✓ 68. Остреман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука. 1985. 536 с.
69. Zakaria M., Brown P. R.//J. Chromatogr. 1981. V. 226. № 2. P. 267.
70. Pogolotti A. L., Santi D. V.//Anal. Biochem. 1982. V. 126. № 1. P. 335.
71. Voshida K., Haraguchi H., Fuwa K.//Anal. Chem. 1983. V. 55. № 7. P. 1009.
72. Preston M. S.//J. Chromatogr. 1983. V. 275. № 1. P. 178.
73. McNair H. M.//Amer. Lab. 1980. V. 12. № 5. P. 34.
74. Dosiderio D. M., Fridland G. H., Stout C. B.//J. Liquid Chromatogr. 1984. V. 7. Sl. 1, 2. P. 317.
75. Smith R. M.//Trends Anal. Chem. 1984. V. 3. № 7. P. 186.
76. Kisehbaum J., Perlman S., Joseph J., Adamovics J.//J. Chromatogr. Sci. 1984. V. 22. № 1. P. 27.
77. Dwyer M. E., Brown P. R.//J. Chromatogr. 1985. V. 345. № 1. P. 125.
78. Alderweireldt F. C., Esman E. L., Geboes P.//Nucleosides and Nucleotides. 1985. V. 4. № 1—2. P. 135.
79. Arpino J. J.//Chromatogr. 1985. V. 323. № 1. P. 3.
80. Karger B. L., Vouros P.//J. Chromatogr. 1985. V. 323. № 1. P. 13.
81. Lawrence J. F., Leduc R., Ryan J. J.//Anal. Biochem. 1981. V. 116. № 2. P. 433.
82. Караганова В. К., Бубеницкова С. И., Баратова Л. А.//Успехи химии. 1979. Т. 48. № 5. С. 957.
83. Wood R., Cummings L., Kupille T.//J. Chromatogr. Sci. 1980. V. 18. № 2. P. 551.
84. Rokushika S., Zong Y. Q., Hatano H.//Ibid. 1985. V. 320. № 2. P. 335.
85. Abbott S. R.//J. Chromatogr. Sci. 1980. V. 18. № 10. P. 540.
86. Payne S. M., Ames B. N.//Anal. Biochem. 1982. V. 123. № 1. P. 151.
87. Pruneau D., Wufert E., Paseal M., Boron C.//Ibid. 1982. V. 119. № 2. P. 274.
88. Schweinberg P. D., Loo T.//J. Chromatogr. 1980. V. 181. № 1. P. 103.
89. Галкина О. В., Пупкова В. И.//Прикл. биохимия и микробиология. 1980. Т. 16. № 2. С. 275.
90. Eeriki N.//Anal. Biochem. 1980. V. 106. № 2. P. 497.
91. Webster H., Whaun J. M.//J. Chromatogr. 1981. V. 209. № 2. P. 238.
92. Brown E. G., Newton R. P., Shaw M. N.//Anal. Biochem. 1982. V. 123. № 2. P. 378.
93. Burnette B., McFarland C. R., Batra P.//J. Chromatogr. 1983. V. 277. P. 137.
94. De Abren A., Van Boal M., De Bruyn N. M. M. et al.//Ibid. 1982. V. 229. № 1. P. 67.
95. Cohen M. B., Maybaum J., Sadee W.//Ibid. 1980. V. 198. № 4. P. 435.
96. Standard S. A., Vaux P., Bray C. M.//Ibid. 1985. V. 318. № 2. P. 427.
97. Wulson A. N., Yakimov S. A.//J. High Resolut. Chromatogr. and Chromatogr. Commun. 1984. V. 7. № 8. P. 442.
98. Корбух И. А., Стукалов Ю. В., Зимакова Н. И., Преображенская Н. И.//Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 12. С. 1644.
99. Блохин Д. Ю., Потешных А. В.//Там же. 1983. Т. 9. № 5. С. 673.
100. Perrett D.//Chromatographia. 1982. V. 16. № 2. P. 211.
101. Sugino K., Yamada K., Kawasaki T.//J. Chromatogr. 1986. V. 361. № 1. P. 27.
102. Nguyen T. T., Sporrs P., Hadziyev D.//Ibid. 1986. V. 363. № 2. P. 361.
103. Бульфсон А. Н., Якимов С. А. Биоорг. химия. 1983. Т. 9. № 3. С. 365.
104. Nissinen E.//Anal. Biochem. 1980. V. 106. № 2. P. 497.
105. Halfpenny A. P., Brown P. R.//Chromatographia. 1986. V. 21. № 6. P. 317.
106. Lang H. R. M., Rizzi A.//J. Chromatogr. 1986. V. 356. № 1. P. 115.
107. Diala E. S., Plent M. M., Coalson D. W., Hoffman R. M.//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1981. V. 104. № 4. P. 1379.
108. Cooke N. H. C., Olsen K.//J. Chromatogr. Sci. 1980. V. 18. № 10. P. 512.
109. Majors R. E.//Ibid. 1980. V. 18. № 10. P. 488.
110. Engelhardt H., Dreyer B., Schmidt H.//Chromatographia. 1982. V. 16. № 1. P. 11.
111. Köhler J., Chase D. B., Farlee R. D. et al.//J. Chromatogr. 1986. V. 352. № 2. P. 275.
112. Jinno K.//Chromatographia. 1982. V. 15. № 10. P. 667.

113. Haaster P. J. M.//J. Chromatogr. 1981. V. 210. № 2. P. 229.
114. Rizzi A., Lang H. M.//Ibid. 1985. V. 331. № 1. P. 33.
115. Yi C., Fasching J. L., Brown P. R.//Ibid. 1985. V. 339. № 1. P. 75.
116. Foncault A.//Feuill. Biol. 1981. V. 22. № 122. P. 71.
117. Zakaria M., Brown P. R., Grushka E.//Anal. Chem. 1983. V. 55. № 3. P. 457.
118. Engelhardt H., Muller M.//J. Chromatogr. 1981. V. 220. № 2. P. 395.
119. Taylor M. W., Hershey H. V., Levine R. A. et al.//J. Chromatogr. 1981. V. 219. № 1. P. 133.
120. Antle P. E., Goldberg A. P., Spyder L. P., Heights N. J.//Ibid. 1985. V. 332. № 1. P. 1.
121. Goldberg A. P.//Anal. Chem. 1982. V. 54. № 2. P. 342.
122. Gonnet C., Borg C., Lachatre G.//Chromatographia. 1982. V. 16. № 2. P. 242.
123. Daldrup T., Kardel B.//Ibid. 1984. V. 18. № 2. P. 81.
124. Lehtonen P.//J. Chromatogr. 1985. V. 330. № 2. P. 243.
125. Verzele M., Dewaele C.//Chromatographia. 1984. V. 18. № 2. P. 84.
126. Verzele M., Dewaele C.//J. Chromatogr. 1981. V. 217. № 2. P. 399.
127. Dawkins J. V., Lloyd L. L., Warner F. P.//Ibid. 1986. V. 352. № 1. P. 157.
128. Tanaka N., Tokuda Y., Iwahucki K., Araki M.//Ibid. 1982. V. 239. Compl. P. 761.
129. Wouters J., Hendrickx S., Roets E. et al.//Ibid. 1984. V. 291. № 1. P. 59.
130. Gehrke C. W., Kuo K. C., Zumwalt R. W.//Ibid. 1980. V. 188. № 1. P. 129.
131. Wynants J., Belle H. V.//Anal. Biochem. 1985. V. 144. № 1. P. 258.
132. Pon R. T., Ogilvie K. K.//J. Chromatogr. 1981. V. 205. № 1. P. 202.
133. Zumwalt R. W., Kuo C. T., Agris P. F.//J. Liquid Chromatogr. 1982. V. 5. № 1. P. 2041.
134. Hartwick R. A., Brown P. R.//Anal. Chem. 1981. V. 10. № 3. P. 279.
135. Freese E., Olempaska-Berz Z., Eisenberg M.//J. Chromatogr. 1984. V. 284. № 1. P. 125.
136. Rao G. H. R., Peller J. D., Richards K. L. et al.//J. Chromatogr. 1982. V. 229. № 1. P. 205.
137. Martinez V. H., Kothari R. M., Hershey H. V., Taylor M. W.//Ibid. 1982. V. 247. № 2. P. 307.
138. Mischke C. F., Wickstrom E.//Anal. Biochem. 1980. V. 105. № 1. P. 181.
139. Assenza S. P., Brown P. R., Goldberg A. P.//J. Chromatogr. 1983. V. 277. № 2. P. 305.
140. Ramos D. L., Shoffstall A. M.//Ibid. 1983. V. 261. № 1. P. 83.
141. Fraser D. C., Pearson C. K.//Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986. V. 135. № 3. P. 886.
142. Agarwal R. P., Major P. P., Kuje D. W.//J. Chromatogr. 1982. V. 231. № 2. P. 418.
143. Boulten R., Borg C., Gonnet C.//Ibid. 1985. V. 339. № 2. P. 380.
144. Russo T., Salvatore F., Cimino F.//Ibid. 1984. V. 296. № 2. P. 387.
145. Gehrke C. W., McCune R. A., Gama-Sosa M. A. et al.//Ibid. 1984. V. 301. № 2. P. 199.
146. Maguire H. M., Westernmyer F. A., King C. R.//Ibid. 1986. V. 380. № 1. P. 55.
147. Christman J. K.//Anal. Biochem. 1982. V. 119. № 1. P. 38.
148. Wakizaka A., Kurosawa K., Okuhaza E.//J. Chromatogr. 1979. V. 161. № 3. P. 319.
149. Boulieu R., Bory C., Gonnett C.//Ibid. 1985. V. 339. № 2. P. 380.
150. Wilbur B. J., Gregorie M. W., Benz C. C., Cadman E. C.//Anal. Lett. 1985. B. 18. № 3. S. 315.
151. Gourdeau U., Lavoie R., Grose J. U., Belanger L.//Anal. Biochem. 1986. V. 86. № 1. P. 64.
152. Knox J. H., Jurand J.//J. Chromatogr. 1981. V. 203. № 1. P. 85.
153. Knox J. H., Jurand J.//Ibid. 1981. V. 218. № 2. P. 341.
154. Ramos-Salazar A., Baines A. D.//Anal. Biochem. 1985. V. 145. № 1. P. 9.
155. Bidlingmeyer B. A.//J. Chromatogr. Sci. 1980. V. 18. № 10. P. 525.
156. Tomlinson E.//Chem. Ind. 1981. № 10. P. 637.
157. Hung C. T., Taylor R. B.//J. Chromatogr. 1980. V. 202. № 3. P. 333.
158. Walseth T. F., Graff G., Moos M. C., Goldberg N. D.//Anal. Biochem. 1980. V. 107. № 1. P. 240.
159. Growther J. B., Caronia J. P., Hartwick R. A.//Anal. Biochem. 1982. V. 124. № 1. P. 65.
160. Perrone P. A., Brown P. R.//J. Chromatogr. 1984. V. 317. P. 301.
161. Gelykens C. F., De Leenheer A. P.//Ibid. 1980. V. 194. № 3. P. 305.
162. Mack D. O., Reed V. L., Smith L. D.//J. Liquid Chromatogr. 1985. V. 8. № 4. P. 591.
163. Juengling E., Kammermier H.//Anal. Biochem. 1980. V. 102. № 2. P. 35.
164. El Rassi Z., Horvath Cs.//Chromatographia. 1982. V. 15. № 2. P. 75.
165. Perrone P. A., Brown P. R.//J. Chromatogr. 1984. V. 307. № 1. P. 53.
166. Ingebretsen O. C., Bakken A. M., Segadal A.//J. Chromatogr. 1982. V. 241. № 1. P. 119.
167. Caronia J. P., Crowther J. B., Hartwick R. A.//J. Liquid Chromatogr. 1983. V. 6. № 9. P. 1673.
168. Darwish A. A., Prichard R. K.//Ibid. 1981. V. 4. № 9. P. 1511.
169. Polley L. S., Power S. D., Poyton R. O.//J. Chromatogr. 1983. V. 281. № 2. P. 199.
170. Gies A.//Chromatographia. 1986. V. 22. № 1—6. P. 94.
171. Simpson V. J., Johnson T. E., Hammer R. F.//Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. P. 6711.
172. Веверис А. Я., Спинце Б. А., Микстайц У. Я.//Изв. АН Латв. ССР. Сер. хим. 1983. № 1. С. 89.
173. Веверис А. Я., Спинце Б. А.//Там же. 1983. № 1. С. 94.
174. Веверис А. Я., Спинце Б. А., Смолрова Н. Т.//Журн. аналит. химии. 1981. Т. 36. № 11. С. 2231.
175. Бусея А. И., Захаранс В. Я., Микстайц У. Я.//Хим.-фармацевт. журн. 1977. № 3. С. 128.

176. Захаранс В. Я., Елкин В. В./Там же. 1981. № 5. С. 97.
177. Карклиня В. А., Янсон Э. Ю., Евтухович И. И., Веверис А. Я./Там же. 1981. № 5. С. 112.
178. Карклиня В. А., Янсон Э. Ю., Евтухович И. И. и др./Изв. АН Латв. ССР. Сер. хим. 1982. № 1. С. 71.
179. Карклиня В. А., Янсон Э. Ю., Бирска И. А., Веверис А. Я./Там же. 1983. № 1. С. 100.
180. Карклиня В. А., Лаурс Ю. Р., Микстайс У. Я. и др./Хим.-фармацевт. журн. 1980. № 8. С. 114.

Научно-исследовательский конструкторско-технологический  
институт биологически активных веществ,  
Бердск, Новосибирской обл.