

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Е. М. БРУМБЕРГ, И. Н. БЕРЕЖНАЯ, В. П. ДУТКИНСКИЙ и С. Е. МАНОЙЛОВ

ПРИМЕНЕНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ ЛУЧЕЙ
К ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ В АДСОРБЦИОННОЙ
КОЛОНКЕ

(Представлено академиком С. И. Вавиловым 25 VII 1950)

Избирательная адсорбция впервые была применена для разделения цветных органических веществ, в частности, пигментов растений, русским ботаником М. С. Цветом. Долгое время этот метод был незаслуженно забыт. Только в начале тридцатых годов он был с большим успехом использован для разделения и получения в чистом виде некоторых гормонов⁽¹⁾, каротиноидов^(2, 3) и ряда других биологически важных веществ. Сейчас этим способом широко пользуются в различных лабораториях.

Одним из недостатков этого метода является трудность разделения с его помощью бесцветных веществ. В частности, очень долго искали способ, позволяющий применить этот метод для разделения продуктов гидролиза белка. Были предложены различные приемы обнаружения аминокислот при разделении их на специальном адсорбенте — крахмале; но все они крайне громоздки и неточны.

Недавно Е. М. Брумбергом⁽⁴⁾ был предложен новый прибор „ультрахимископ“, позволяющий обнаруживать вещества, поглощающие ультрафиолетовые лучи, в хроматограммах на фильтровальных бумагах. Прибор этот основан на применении ртутной лампы низкого давления в сочетании с флуоресцирующими экранами, избирательно возбуждаемыми лучами определенных участков ультрафиолетовой области спектра. Аналогичный прием был применен нами для наблюдения за разделением веществ в адсорбционной колонке.

Как известно, ароматические и гетероциклические аминокислоты — тирозин, триптофан, фенилаланин, а также нуклеиновые кислоты и их производные поглощают ультрафиолетовые лучи с длиной волны короче 270 м.м. В настоящей работе описаны различные приемы наблюдения за процессом разделения в адсорбционной колонке веществ, поглощающих ультрафиолетовые лучи, примененные нами для контроля за разделением некоторых амино- и нуклеиновых кислот белковых гидролизатов.

Методика. Исследование производилось нами по методу анализа промыванием. Смесь веществ, разделенных в колонке на зоны, разгонялась пропусканием через колонку растворителя, и разделенные вещества, поочередно выходящие с растворителем из колонки, собирались в подставляемые под колонку сосуды. Наблюдение за прохождением через колонку отдельных веществ производилось с помощью зрительной трубы для наблюдений в ультрафиолетовых лучах, сконструированной Е. М. Брумбергом и С. А. Гершгориным⁽⁵⁾. В каче-

стве осветителя был использован ультрахимископ, являющийся удобным источником интенсивного ультрафиолетового излучения с длиной волны 254 м μ .

Схема установки, для случая пропускания растворителя под давлением, изображена на рис. 1. Стеклянная трубка 1, заполняемая адсорбентом, заканчивается в своей нижней части кварцевой трубочкой 2 с овальным сечением. Наблюдатель рассматривает изображение этой трубочки на флуоресцирующем экране зрительной трубы 3 в свете ультрахимископа 4.

Тонкий стеклянный светофильтр ультрахимископа задерживает лучи средней части видимой области спектра и пропускает только красные и фиолетовые видимые лучи и все ультрафиолетовое излучение ртутной лампы. Зеленая флуоресценция экрана в зрительной трубе возбуждается только лучами с длиной волны 270 м μ , поглощаемыми исследовавшимися нами веществами. При прохождении через кварцевую трубочку каждого из этих веществ изображение ее на экране, до этого белое (смесь красных и синих лучей источника света и зеленых лучей флуоресценции экрана), в результате

ослабления ультрафиолетовых лучей, возбуждающих зеленое свечение экрана, окрашивается в пурпурный цвет, хорошо замечаемый глазом. При появлении и исчезновении окраски изображения трубочки сменяются сосуды, собирающие жидкость, выходящую из колонки. Таким образом получаются отдельные фракции чистых веществ.

Аналогичная установка была осуществлена нами также для случая отсасывания растворителя снизу в сосуд, в котором производится разрежение воздуха. В этом случае к колонке на пицеине присоединялась переходная втулка с плоскими кварцевыми окошками на уровне кварцевой трубочки, и к ней снизу присоединялись на шлифе сменные пробирки, собирающие жидкость. В дальнейшем мы полностью перешли на устройство с давлением сверху.

В целях упрощения установки в некоторых опытах зрительная труба была заменена флуоресцирующим экраном, помещенным непосредственно за кварцевой трубочкой, как это изображено на рис. 2. Ход анализа и схема наблюдений остаются теми же, что и с зрительной трубой. Однако в этом случае — когда трубочка, через которую выходит жидкость, рассматривается без увеличения — желательно, чтобы она была не слишком узкой и форма ее сечения приближалась к прямоугольной. Преимущество этого способа, кроме упрощения установки, состоит еще в том, что наблюдения на открытом экране могут вестись в полу затемненной комнате с некоторого расстояния от прибора, освобождая работающего с ним от утомительных при длительной работе наблюдений в окуляр трубы.

Одновременно с визуальными приемами наблюдения в той же установке был испытан фотоэлектрический способ наблюдения за прохождением через колонку веществ, поглащающих ультрафиолетовые лучи. Перед кварцевой трубочкой, расположенной в нижней части колонки, ставилась диафрагма из черной бумаги с вырезом по размерам

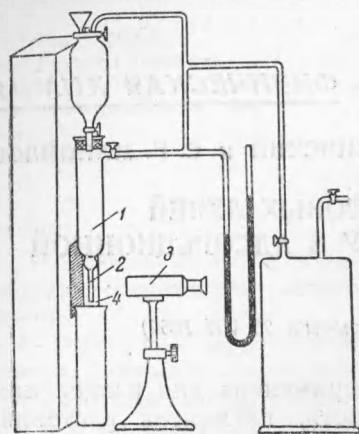


Рис. 1

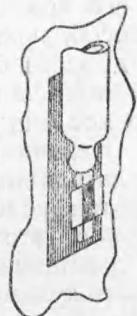


Рис. 2

трубочки, с таким расчетом, чтобы на флуоресцирующий экран попадали только лучи, прошедшие через трубочку. Для повышения яркости экрана изображение ртутной лампы проектировалось на трубочку кварцевой линзой. За экраном помещался селеновый фотоэлемент. Между фотоэлементом и экраном прокладывался зеленый светофильтр, задерживающий все излучение ртутной лампы, видимое и ультрафиолетовое, пропускаемое светофильтром ультрахимископа, но свободно пропускающий зеленое свечение экрана. Таким образом, на фотоэлемент действовал только свет флуоресценции экрана, возбуждаемый ультрафиолетовыми лучами определенных длин волн, в нашем случае лучами с длиной волны 270 м μ .

При работе с веществами, имеющими полосы поглощения в других участках спектра, для той же цели могут быть применены другие экраны. Фотоэлемент был соединен с гальванометром с чувствительностью 10^{-8} а, регистрировавшим моменты прохождения через кварцевую трубочку веществ, поглащающих ультрафиолетовые лучи указанного участка спектра. Использование фотоэлектрического устройства допускает применение дальнейшей автоматизации процесса разделения веществ адсорбционным методом *.

Применение способа наблюдений в ультрафиолетовых лучах к анализу белков и нуклеиновых кислот. Первое испытание чувствительности описанных выше приемов хроматографического анализа проводилось нами на искусственно приготовленных растворах смеси аминокислот — тирозина и триптофана с нуклеиновыми кислотами — рибо- и дезоксирибонуклеиновой. Концентрация этих веществ бралась порядка 1 мг на 1 мл. Растворителем служил слабый раствор щелочи. В качестве адсорбента при разделении указанных веществ, так же как и во всех последующих опытах, применялся крахмал. Раньше всего через колонку приходили нуклеиновые кислоты, затем тирозин и триптофан, что было установлено соответствующими химическим и спектроскопическим анализами разделенных веществ.

После этого мы приступили к разделению продуктов гидролиза некоторых нуклеопротеидов.

Одним из нас (Манойловым) был выделен из крысиной саркомы так называемый прочносвязанный нуклеопротеид (А. Н. Белозерский), в котором связь между белком и нуклеиновой кислотой, по мнению Манойлова, осуществляется через аминогруппу аденина и карбоксильную группу аминокислоты, в частности, тирозина или триптофана (⁶). Водный раствор препарата прочносвязанного нуклеопротеида (N 14,3%, P 2,01%) пропускался через крахмальную колонку под давлением сверху; как и следовало ожидать, вещество это крепко адсорбировалось на крахмале и не выходило из колонки. Объясняется это тем, что в прочносвязанном нуклеопротеиде нуклеиновая кислота соединена с белком крепкой химической связью, а не лабильной, солеобразной. Если тот же препарат прочносвязанного нуклеопротеида пропустить через адсорбционную колонку, подвергнув его предварительно щелочному или ферментативному гидролизу, то через некоторое время в кварцевой трубочке описанными выше приемами обнаруживается прохождение отщепленной от белка нуклеиновой кислоты, в то время как сам белок задерживается в колонке. Тот же результат получался при пропускании через колонку смеси растворов белка и нуклеиновой кислоты. Этот факт лишний раз подчеркивает существование прочной связи между нуклеиновой кислотой и белком.

* Эта работа выполняется в настоящее время Б. А. Орловым, принимавшим также участие в разработке описанного здесь фотоэлектрического варианта метода.

Кроме того, с помощью этого метода удалось доказать выход во внешнюю среду нуклеиновых кислот при повреждении тканей (С. Н. Александров, С. Е. Манойлов и Б. А. Орлов).

Описанные здесь приемы применения ультрафиолетовых лучей в хроматографическом анализе на адсорбционной колонке могут быть использованы также при исследовании других веществ, поглощающих ультрафиолетовые лучи.

В заключение выражаем глубокую благодарность акад. С. И. Вавилову и проф. Л. Ф. Ларионову за ценные советы и содействие в выполнении этой работы.

Поступило
26 V 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ R. Kuhn и E. Ledegger, Hoppe-Seylers Zs. f. physiol. Chem., **200**, 108 (1931).
² Е. А. Ледерер, Усп. хим., № 3 (1939). ³ С. Е. Манойлов, Диссертация, Сан-гиг. ин-т, Л., 1939. ⁴ Е. М. Брумберг, ДАН, **72**, № 5 (1950). ⁵ Е. М. Брумберг и С. А. Гершгорин, ДАН, **69**, № 6 (1949). ⁶ С. Е. Манойлов, ДАН, **67**, № 2 (1949).