

УСПЕХИ ФИЗИЧЕСКИХ НАУК

**ПРИМЕНЕНИЕ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫХ ЛУЧЕЙ
В ХРОМАТОГРАФИИ *)**

Е. М. Брумберг

В 1903 г. русским ботаником М. С. Цветом^{1,2} был описан замечательный метод разделения близких по химической природе веществ, названный им хроматографией. В течение значительного времени этот метод был незаслуженно забыт и лишь в тридцатых годах, после того как с его помощью был сделан ряд интересных биологических исследований^{3,4}, он снова привлек к себе внимание химиков. В настоящее время методом хроматографии широко пользуются в самых различных разделах органической и неорганической химии, и число работ, выполненных этим способом, непрерывно растёт. Хроматография применяется как для аналитических и исследовательских целей, так и для получения препаратов чистых веществ.

В начале 1949 г. в Ленинградской лаборатории С. И. Вавилова, по его настоянию, была начата разработка некоторых новых приёмов хроматографии, основанных на применении лучей ультрафиолетовой области спектра. С. И. Вавилов всегда проявлял большой интерес к развитию работ по хроматографии. В 1941 г. с целью популяризации метода Цвета он поручил сотруднику своей лаборатории Б. Я. Свешникову написать по этому вопросу обзорную статью в журнал «Природа»⁵. В 1946 г. Сергей Иванович организовал первое издание избранных трудов М. С. Цвета⁶. Изложенные здесь работы по «ультрафиолетовой хроматографии» проводились нами при участии лаборатории биохимии Рентгеновского института и некоторых других биохимических лабораторий под общим, всегда внимательным руководством С. И. Вавилова.

Хроматографический анализ в первом своём варианте, основные черты которого сохранились до настоящего времени, сравни-

*) Переработанный текст доклада, прочитанного на совещании по хроматографии при Химическом отделении Академии наук СССР 23 ноября 1950 г.

тельно прост и не требует для своего осуществления сложной аппаратуры. Раствор, содержащий исследуемую смесь веществ, вводится в верхнюю часть стеклянной «колонки», заполненной порошкообразным адсорбентом (рис. 1), после чего через ко-

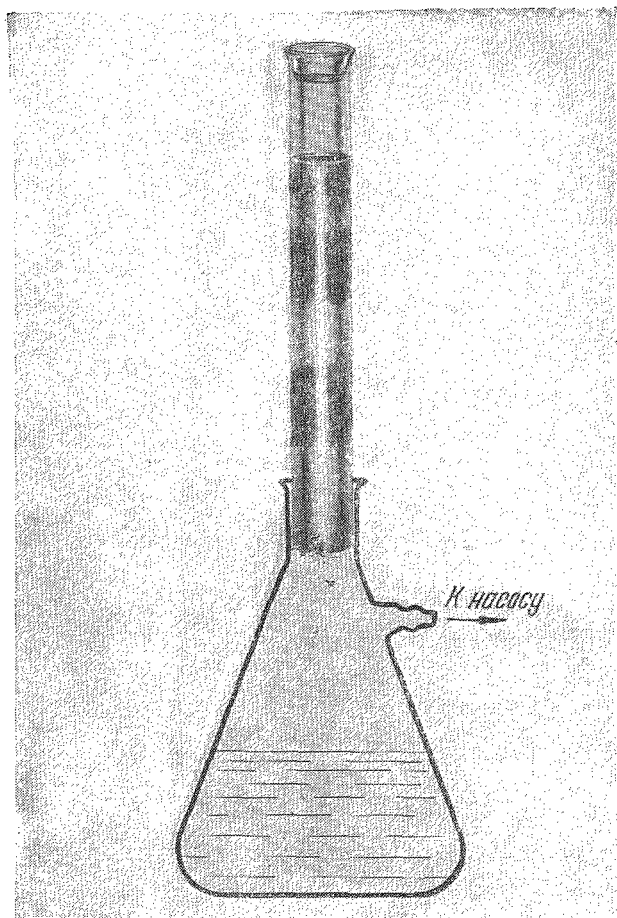


Рис. 1. Адсорбционная колонка. Из конической колбы отсасывается воздух для ускорения протекания растворителя.

лонку под давление пропускается растворитель. Различные вещества, содержащиеся во введенном в колонку растворе, вследствие различия в величине адсорбционных сил, связывающих их с адсорбентом, перемещаются по колонке вслед за растворителем

с разными скоростями; в результате в колонке образуется хроматограмма, состоящая из нескольких чётко ограниченных зон, хорошо видимых глазом в тех случаях, когда производится разделение окрашенных веществ. Получение веществ в чистом виде

осуществляется либо разрезанием столбика адсорбента на части после выталкивания его из стеклянной трубки с последующим вымыванием адсорбированных веществ растворителем в отдельных сосудах, либо путём поочерёдного вытеснения зон из колонки дальнейшим пропусканием через неё растворителя.

В последнее время, главным образом для аналитических целей, часто применяется разделение веществ на полосках фильтровальной бумаги. Образец такой бумажной хроматограммы показан на рис. 2. Одним из преимуществ бумажной хроматографии является возможность производить анализ на очень малых количествах веществ, буквально на каплях. Второе её преимущество — возможность выполнения простого качественного анализа. На бумажной ленте рядом с каплей анализируемой смеси, на линии, перпендикулярной к направлению движения растворителя в ленте, наносятся капли растворов чистых веществ, наличие которых предполагается в сме-

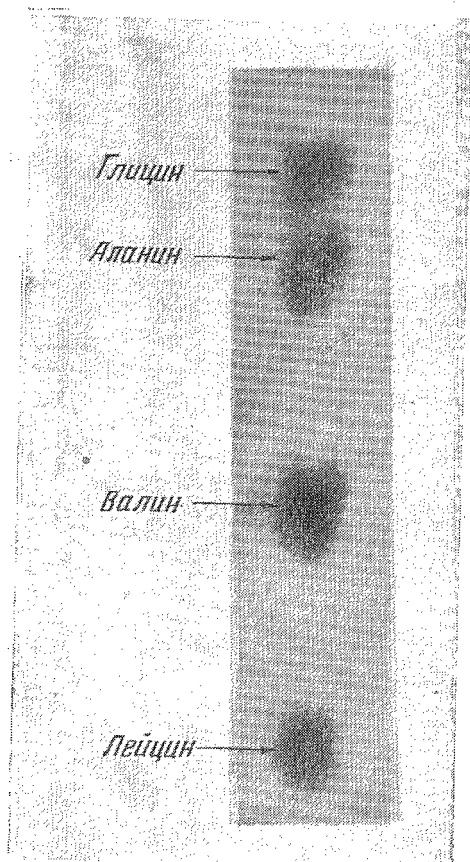


Рис. 2. Хроматограмма на фильтровальной бумаге. После разделения аминокислот хроматограмма проявлена нингидрином.

си. Одинаковые вещества в испытуемой капле и в каплях сравнения, участвуя в общем процессе движения за растворителем, перемещаются по бумаге точно на одном уровне; рассматривая полученную таким образом бумажную хроматограмму, можно сразу сказать не только из скольких компонентов состояла

смесь, но и какие вещества в неё входили. Для этого необходимо лишь, чтобы все эти вещества были видны на хроматограмме*).

Одним из главных затруднений, препятствующих широкому применению хроматографии, является сложность способов наблюдения за расположением разделённых веществ в хроматограммах или за прохождением веществ, вытесняемых растворителем из хроматографической колонки, в тех часто встречающихся случаях, когда исследуемые вещества бесцветны **).

Способы, применяемые для обнаружения зон, образованных в хроматограммах бесцветными соединениями, можно разделить на химические и физические. К химическим способам относится превращение анализируемых соединений в окрашенные до их разгонки или после разгонки (химическое проявление хроматограмм). Эти методы не всегда применимы, так как далеко не на каждое соединение можно найти удобную цветную реакцию. Регенерация исходных веществ из веществ, полученных после проведения цветных реакций, обычно очень трудна и часто вообще невозможна, так как большинство таких реакций необратимо. Присоединение к разделяемым веществам до их разделения одинаковых хромофорных групп, придающих этим веществам окраску, неудобно, так как оно обычно сильно уменьшает различие в адсорбционной способности компонентов, серьёзно затрудняя применение адсорбционного метода к данной комбинации веществ.

К физическим методам следует отнести в первую очередь методы, основанные на определении показателя преломления растворов, выходящих из колонки^{11, 12}, и некоторые другие приёмы исследования хроматограмм, о которых будет идти речь в этой статье. Заметим только, что рефрактометрические методы, основанные обычно на использовании интерферометров различных систем, требуют применения сложной и громоздкой аппаратуры и очень утомительны, так как они сводятся к наблюдениям за малыми смещениями системы интерференционных полос в течение длительного времени, необходимого для разделения веществ. Кроме того, рефракционные методы трудно применимы для обнаружения веществ на адсорбенте и, в частности, не пригодны для всей бумажной хроматографии.

Однако применение именно физических методов наблюдения за разделением веществ в хроматограммах представляет наибольший интерес для этой области, в особенности тогда, когда речь идёт о получении препаратов чистых веществ, так как химическое

*) В этой статье мы не можем описывать многие другие варианты хроматографического метода. Описание их можно найти в специальных обзорах по данному вопросу^{7, 8, 9, 10}.

**) Первые работы с применением хроматографического метода были сделаны применительно к растительным и животным пигментам.

вмешательство в конечной фазе процесса способно уничтожить одно из основных достоинств хроматографии: разделение веществ физическим методом без химического изменения их структуры.

Существенное значение в хроматографии, наряду с другими многочисленными и порой весьма остроумными приёмами изучения хроматограмм, применяемыми в настоящее время, могут иметь приёмы, основанные на применении ультрафиолетовых лучей.

Ультрафиолетовые лучи могут быть использованы при этом двояким образом:

1) для возбуждения собственной флуоресценции разделяемых веществ или флуоресценции продуктов, в которые эти вещества превращаются специально для их последующего обнаружения в хроматограммах люминесцентным способом, и

2) для обнаружения веществ в хроматограммах по поглощению ими лучей ультрафиолетовой области спектра.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ РАЗДЕЛЯЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

Флуоресценция веществ, как в бумажных хроматограммах, так и в адсорбционной колонке, возбуждается обычно длинноволновыми ультрафиолетовыми лучами с длиной волны 365 м μ , выделяемыми из излучения ртутной лампы чёрным светофильтром Вуда. Для этой цели пригодна любая переносная аналитическая лампа, применяемая в люминесцентном анализе, позволяющая направить ультрафиолетовые лучи на хроматограмму. Этот простой и весьма чувствительный приём рассматривания хроматограмм был по достоинству оценён уже в первых работах Винтерштейна и Шена¹³ и Каррера и Шоппа¹⁴, применивших его при исследовании каротиноидов. С тех пор он с успехом применяется в хроматографии.

Длина волны лучей, используемых для возбуждения флуоресценции хроматограмм, строго говоря, должна выбираться в соответствии со спектрами поглощения флуоресцирующих веществ. Это особенно существенно при работе с очень малыми концентрациями исследуемых веществ, когда поглощение ими ультрафиолетовых лучей в местах, соответствующих полосам спектрального пропускания, очень мало. Так, например, при разделении смеси некоторых жёлтых пигментов значительно выгоднее пользоваться для возбуждения флуоресценции не длинноволновыми ультрафиолетовыми лучами, а синими, рассматривая хроматограммы через жёлтый светофильтр, не пропускающий синих лучей. В других случаях выгоднее применять более коротковолновые лучи, например, с длиной волны 313 м μ .

При возбуждении флуоресценции длинноволновыми ультрафиолетовыми лучами с длиной волны 365 м μ вполне можно пользоваться колонкой в трубке из обычного стекла, которое ещё достаточно хорошо пропускает эти лучи. При работе с более

коротковолновыми ультрафиолетовыми лучами трубку колонки следует делать из специального увиолевого стекла или из кварца.

Флуоресцентные приёмы хроматографии, как и все методы люминесцентного анализа, отличаются чрезвычайно высокой чувствительностью, определяющейся в свою очередь той изумительной чувствительностью, с которой глаз, адаптированный на темноту, замечает слабое свечение на тёмном фоне. Так, например, в опытах Р. И. Плотникова по разделению флуоресцирующих красителей 3-аминофталимида и 3,6-диаминофталимида, выполненных им в лаборатории акад. С. И. Вавилова, предельная концентрация этих веществ равнялась всего лишь 10^{-7} г/см³. Эта чувствительность примерно на два порядка выше чувствительности наблюдения тех же красителей в видимом свете. Она могла бы быть ещё повышена за счёт повышения яркости источника возбуждающего света. Предел уменьшению концентраций исследуемых веществ кладётся, однако, не столько уменьшением яркости их флуоресценции при разбавлении растворов, сколько конкуренцией со стороны флуоресценции самого адсорбента. Именно поэтому, имея дело с очень малыми концентрациями флуоресцирующих веществ, очень важно применять для возбуждения их флуоресценции лучи с длинами волн, соответствующими максимумам в их спектрах возбуждения и, по возможности, минимумам в спектрах возбуждения адсорбента.

Флуоресцентный способ может применяться при хроматографическом разделении как органических, так и неорганических веществ, причём в последнем случае обычно приходится иметь дело с люминесцентным проявлением хроматограммы.

Основным недостатком флуоресцентного способа рассматривания хроматограмм, как, впрочем, и многих других приёмов, применяемых для этой цели, является его недостаточная универсальность, происходящая от того, что флуоресцирующих веществ и флуоресцентных реакций имеется не больше, а значительно меньше, чем цветных.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ РАЗДЕЛЯЕМЫХ ВЕЩЕСТВ ПОГЛОЩАТЬ УЛЬТРАФИОЛЕТОВЫЕ ЛУЧЫ

Известно, что многие вещества, совершенно прозрачные и бесцветные в видимом свете, весьма сильно поглощают лучи ультрафиолетовой области спектра. Следует иметь в виду, что веществ, поглощающих ультрафиолетовые лучи даже в ограниченном участке спектра, удобном для экспериментирования (от 400 до 250 мμ), имеется значительно больше, чем веществ цветных или способных люминесцировать. Из органических соединений сюда относятся все соединения, содержащие одно или несколько бензольных колец или цепочки конъюгированных свя-

зей *), особенно если на концах этих цепочек имеются группы, способные быть носителями заряда (NH_2 , OH , NO_2 , CO и др.), а также многие неорганические соединения и ионы.

К первым попыткам использовать ультрафиолетовое поглощение веществ для целей хроматографии можно отнести опыты Брокмана¹⁵, производившего разделение веществ в адсорбционной колонке на люминесцирующем адсорбенте. При освещении такой колонки в темноте ультрафиолетовыми лучами можно видеть на светлом фоне люминесценции адсорбента тёмные зоны в местах расположения веществ, поглощающих ультрафиолетовые лучи. Подробнее об этом способе будет сказано ниже.

Далее описываются опыты, выполненные в лаборатории акад. С. И. Вавилова. Так же как и в ранее описанных примерах, речь будет идти о способах рассматривания хроматограмм в невидимых лучах независимо от процессов, в которых эти хроматограммы были получены.

Если с помощью какого-нибудь визуального прибора с люминесцирующим экраном или электронно-оптическим преобразователем, или же с помощью фотографии получить в ультрафиолетовых лучах видимое изображение хроматограммы, то можно на этом изображении видеть зоны, образованные веществами, поглощающими ультрафиолетовые лучи так же, как мы видим их в случае окрашенных веществ, рассматривая саму хроматограмму. Такой приём позволяет весьма просто распространить обычные варианты хроматографии на многие бесцветные вещества, существенно расширив тем самым рамки применимости хроматографического метода Цвета.

Фотографический способ

Первым был испытан фотографический способ. Хроматограмма, полученная на фильтровальной бумаге, фотографировалась в ультрафиолетовых лучах фотографической камерой, снабжённой ахроматическим фотообъективом, изготовленным из плавленого кварца и каменной соли. Источником света служила кварцевая ртутная лампа, перед которой помещались светофильтры, выделяющие различные участки ультрафиолетовой части ртутного спектра. При соответствующем выборе светофильтров, зависящем от спектров поглощения исследуемых веществ, можно было получить чёткие фотографии хроматограмм, совершенно невидимых при обычном рассматривании их в видимом свете. Этот способ применим и для регистрации хроматограмм, полученных в адсорбционной колонке **).

*) Таковы, например, многие важные для биохимии вещества — ароматические аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, многие витамины и ряд других.

**) О светофильтрах для фотографирования в ультрафиолетовых лучах см. статью И. И. Брейдо и М. П. Бухман¹⁷.

Визуальный способ

Затем были разработаны различные визуальные приёмы наблюдения хроматограммы в ультрафиолетовых лучах, основанные на применении флуоресцирующих экранов, превращающих невидимые ультрафиолетовые изображения в видимые.

Е. М. Брумбергом и С. А. Гершгориным¹⁶ была сконструирована специальная зрительная труба*), схема которой приведена на рис. 3. Хроматограмма освещается светом ртутной лампы, пропущен-

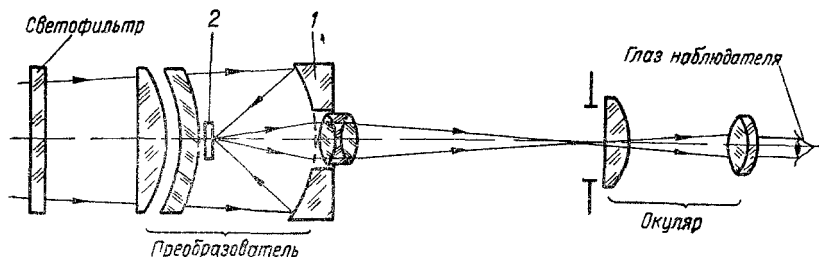


Рис. 3. Схема зрительной трубы для наблюдений в ультрафиолетовых лучах: 1 — зеркало объектива, 2 — флуоресцирующий экран.

ным через светофильтр, поглощающий видимый свет и пропускающий всё ультрафиолетовое излучение лампы в спектральном интервале от 400 до 250 м μ . Зеркально-линзовый объектив трубы даёт на флуоресцирующем экране изображение хроматограммы, рассматриваемое через небольшой микроскоп, заменяющий окуляр трубы.

Для получения чёткого изображения хроматограммы следовало бы помещать перед трубой или перед источником света светофильтры, выделяющие лучи узких участков спектра, так же как это делалось при фотографировании хроматограмм. Однако применение таких светофильтров чрезвычайно сильно снижает яркость изображения на экране, так как до настоящего времени нет ещё удовлетворительных фильтров для ультрафиолетовой области спектра. Той же цели выделения различных участков ультрафиолетового спектра мы достигали, применяя сменные флуоресцирующие экраны, изготовленные из флуоресцирующих веществ, избирательно возбуждаемых ультрафиолетовыми лучами отдельных ограниченных участков спектра. Этот приём позволяет значительно лучше, чем применение светофильтров, использовать излучение источника света в выбранном участке длин волн**).

*) В этой трубе применён зеркально-линзовый объектив с линзовым компенсатором системы Д. С. Волосова, Д. Ю. Гальперна и Ш. Я. Печатниковой¹⁸.

**) Светофильтры, применяемые для фотографирования в ультрафиолетовых лучах, сильно ослабляют также лучи пропускаемой ими области длин волн. В случае фотографии этот недостаток компенсируется увеличением экспозиций.

Наблюдения с помощью зрительной трубы применимы как для бумажной хроматографии, так и для хроматографического анализа в кварцевой адсорбционной колонке. Применение вместо трубы ультрафиолетового микроскопа с небольшими увеличениями позволило бы распространить этот приём, так же как и фотографический способ, на микрохроматографию, предназначенную для хроматографического анализа очень малых количеств веществ в капиллярных колонках. В дальнейшем был применён также и более простой способ рассматривания хроматограмм с помощью флуоресцирующих экранов, пригодный, правда, только для работы на фильтровальной бумаге. Для этой цели нами был сконструирован специальный прибор — ультрахмископ¹⁹, схема которого представлена на рис. 4, а внешний вид на рис. 5. Источ-

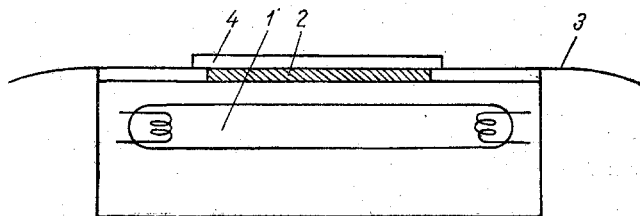


Рис. 4. Ультрахмископ. 1 — бактерицидная лампа, 2 — светофильтр, 3 — фильтровальная бумага, 4 — экран.

ником ультрафиолетовых лучей в ультрахмископе служит ртутная лампа низкого давления в оболочке из увиолевого стекла (бактерицидная). В верхней крышке ящика вделан тонкий светофильтр из тёмного пурпурного стекла марки УФС-1, поглощающий видимое излучение лампы и пропускающий ультрафиолетовые лучи с длинами волн от 410 до 250 м μ . Спектральная кривая пропускания этого светофильтра представлена на рис. 6. Исследуемая фильтровальная бумага кладётся на светофильтр и плотно прижимается к нему флуоресцирующим экраном, на котором в местах, расположенных против мест скопления в бумаге веществ, поглощающих ультрафиолетовые лучи, появляются тени. Таким образом, проявляется теневое изображение хроматограммы.

Ртутная лампа низкого давления очень слабо нагревается во время горения, что позволяет приблизить к ней хроматограмму и экран, существенно выиграв при этом в их освещённости. Основная доля энергии в излучении ртутной лампы низкого давления сосредоточена в резонансной спектральной линии ртути с длиной волны 254 м μ , благодаря чему эта лампа является очень хорошим источником коротковолновых ультрафиолетовых лучей; однако в наших условиях, когда лампа горит при несколько-

повышенном давлении, вследствие отсутствия вентиляции в кожухе в её излучении достаточно представлены и более длинноволновые линии ртутного спектра.

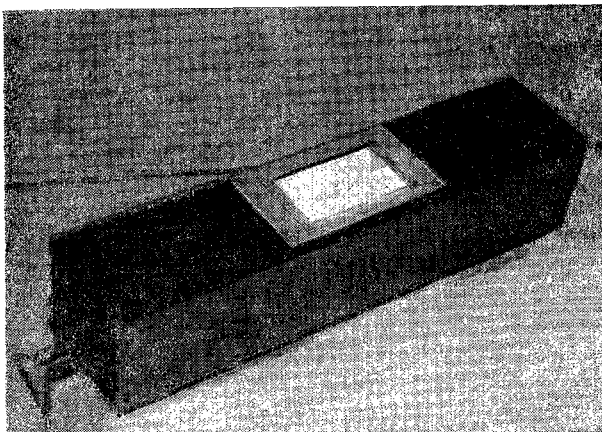


Рис. 5. Внешний вид ультрамикроскопа.

И в этом случае для получения чёткого изображения хроматограмм необходимо выделение отдельных участков ультрафиоле-

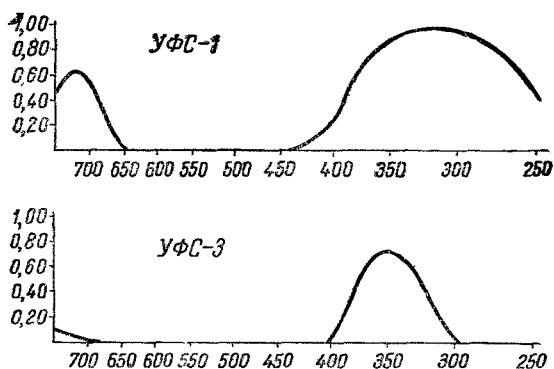


Рис. 6. Спектральные кривые пропускания светофильтров УФС-1 и УФС-3.

тового спектра; такое выделение достигается, так же как*и при работе со зрительной трубой, не применением светофильтров, которые в данном случае ввиду близости экрана к бумаге и лампе даже некуда поместить, а применением разных флуоресцирующих

экранов, флуоресценция которых возбуждается ограниченными участками спектра.

Экраны для таких наблюдений готовились нанесением на стекло тонких слоёв порошкообразных неорганических люминофоров. При работе экран обращается флуоресцирующим слоем к источнику ультрафиолетовых лучей—ультрахимическому. Спектры возбуждения большинства люминофоров, пригодных для нашей цели, резко ограничены только с длинноволновой стороны; люминофор начинает возбуждаться лучами определённой длины волны и возбуждается всеми лучами с меньшей длиной волны. Практически среди ярко светящихся люминофоров, применяемых в технике, можно найти порошки с любым спектральным положением границы возбуждения. Ограничение области возбуждения экрана с коротковолновой стороны производится при помощи светофильтра, поглощающего коротковолновые ультрафиолетовые лучи, начиная с лучей определённой длины волны. Таким светофильтром служит обычно тонкий слой лака, имеющего соответствующую границу поглощения и нанесённого на слой люминофора.

Здесь нам придётся отвлечься несколько в сторону и рассказать о методе цветовой трансформации, позволяющем получать цветные изображения в лучах ультрафиолетовой области спектра. Метод этот, первоначально развитый нами для целей ультрафиолетовой и инфракрасной микроскопии, состоит в замене в невидимом изображении, полученном в ультрафиолетовых лучах, ультрафиолетовых лучей разных длин волн видимыми лучами разных цветов²¹. Проще всего это сделать с помощью люминесценции. Представим себе трёхслойный флуоресцирующий экран, содержащий нанесённые друг на друга три слоя разных люминофоров, отличающихся спектрами возбуждения и флуоресценции. Первый слой, обращённый к источнику ультрафиолетовых лучей, возбуждается только лучами с длиной волны 270 мμ и короче; флуоресценция второго слоя может возбуждаться лучами с длиной волны 320 мμ и короче, но в наших условиях она возбуждается только лучами ограниченного участка длин волн 320—270 мμ, так как лучи с длиной волны короче 270 мμ поглощаются первым слоем, играющим по отношению ко второму слою роль светофильтра; третий слой состоит из флуоресцирующего вещества, возбуждаемого лучами всех длин волн меньше 400 мμ, но в наших условиях, по причинам, аналогичным указанным выше, он возбуждается только лучами с длиной волны от 400 до 320 мμ. Флуоресценция разных слоёв различна по цвету, например, первый слой даёт синюю флуоресценцию, второй — зелёную и третий — красную.

Цвет теней или оптического изображения, проектируемых на такой экран, зависит от спектрального распределения энергии

в падающих на экран ультрафиолетовых лучах и, следовательно, от спектров поглощения веществ, через которые эти лучи прошли на пути к экрану. Таким образом, получаются в ультрафиолетовых лучах цветные изображения хроматограмм, на которых зоны, образованные разными веществами, отличаются по цвету так же, как в видимой области спектра различаются зоны, образованные цветными пигментами. Метод цветовой трансформации применим также при фотографическом методе исследования хроматограмм²⁰.

Во многих случаях для целей хроматографии можно ограничиться получением с помощью фотографии или однослойных флуоресцирующих экранов серых или одноцветных изображений хроматограмм. Наиболее универсальными оказываются наблюдения в лучах с длиной волны 270—250 мμ, так как большинство веществ имеет высокие коэффициенты поглощения именно в этом крайнем участке ртутного спектра; здесь же достаточно сильно поглощают многие вещества, у которых поглощение начинается в более длинноволновой области спектра. Лишь в тех случаях, когда спектральная кривая поглощения хотя бы одного из исследуемых веществ имеет минимум на указанном участке длин волн, приходится, кроме коротковолновых, применять и другие светофильтры для фотографии или обращаться к экранам с другой спектральной чувствительностью. В этих случаях, когда исследуемые вещества имеют различные спектры поглощения, выгодно применять многослойные экраны, автоматически дающие возможность, подобно нашему глазу, не только одновременно отчётливо видеть в хроматограммах зоны, образованные веществами с разными спектральными кривыми поглощения, но и узнавать эти вещества по цвету. Особенно существенно это тогда, когда в хроматограмме зоны недостаточно разделены. При цветовом методе наблюдения даже в начальной фазе разделения веществ на краях зоны видны цветные каёмки, указывающие на наличие в зоне разных веществ, тогда как наблюдаемое в этом случае в сером изображении неравномерное распределение яркости можно легко принять за неравномерное распределение плотности одного вещества.

Ультрамикроскоп, являющийся удобным источником коротковолновых ультрафиолетовых лучей, нашёл применение и в других вариантах ультрафиолетовой хроматографии, описанных ниже; почти все они основаны на использовании этого источника света в сочетании с люминофорами, обладающими избирательными спектрами возбуждения и люминесценции. Одним из главных достоинств ртутной лампы низкого давления в применении к задачам хроматографий является относительно малая яркость её излучения в видимой области спектра. На рис. 7 показана относительная интенсивность спектральных линий ртутной лампы низкого давления

типа бактерицидной и линий лампы высокого давления, применяемой обычно в люминесцентном анализе. Большое содержание в излучении лампы высокого давления видимых и длинноволновых ультрафиолетовых лучей делает невозможным её

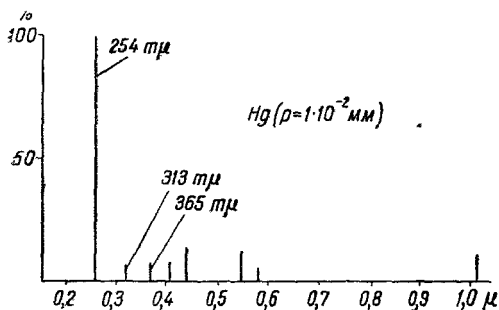
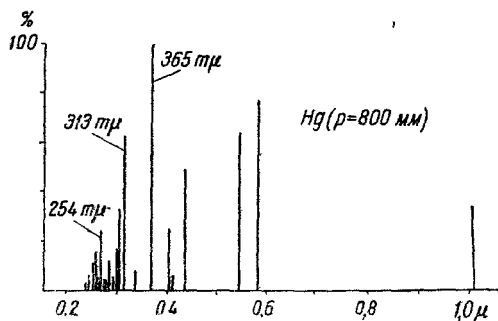


Рис. 7. Распределение энергии в спектрах ртутных ламп низкого и высокого давления. Интенсивность наиболее сильной линии в обоих спектрах принята за 100%.

Е. М. Брумбергом, И. Н. Бережной, В. П. Дуткинским и С. Е. Манойловым²¹ был описан также ряд приёмов использования ультрафиолетовых лучей при хроматографическом разделении веществ в адсорбционной колонке.

Выше мы указывали на способ наблюдения хроматограмм в колонке на флуоресцирующем адсорбенте¹⁵. Мы несколько изменили этот приём¹⁹. Разгонка веществ производилась не на специальном флуоресцирующем адсорбенте, а на обычных адсорбентах, приме-

nepосредственное использование с указанным выше тёмным светофильтром из стекла УФС-1. Частично пропускаемые им синие и красные лучи источника света и яркая флуоресценция фильтровальной бумаги, возбуждаемая интенсивным длинноволновым излучением этой лампы, мешают наблюдать флуоресценцию экранов. Это относится также ко всем другим визуальным приёмам исследования хроматограмм с помощью ультрафиолетовых лучей, описанным ниже.

Ультрахимископ позволяет также рассматривать хроматограммы, образованные флуоресцирующими веществами в свете их собственной флуоресценции, не применяя в этом случае флуоресцирующих экранов*).

*) С помощью ультрахимископа можно наблюдать яркую люминесценцию многих минералов и некоторых других неорганических веществ, возбуждаемую только коротковолновыми ультрафиолетовыми лучами. Подобный осветитель для люминесцентного анализа в коротковолновых ультрафиолетовых лучах, но с менее интенсивной лампой низкого давления был сконструирован ранее в лаборатории С. И. Вавилова З. М. Свердловым.

няемых в хроматографии—крахмале, силикагеле и др., к которым подмешивались небольшие количества порошкообразных люминофоров. И в этом случае мы воспользовались избирательностью в спектрах возбуждения люминофоров, выбирая порошки, возбуждаемые лучами нужной длины волны. В отдельных случаях в колонку вводилась смесь нескольких люминофоров, различающихся спектрами возбуждения и цветом флуоресценции. В такой колонке бесцветные вещества образовывали цветные зоны, как бы становясь цветными на время прохождения через колонку. Такое разделение функций между адсорбентом и люминофором даёт возможность свободного выбора как того, так и другого. К адсорбенту и люминофору предъявляются при этом лишь следующие дополнительные требования: адсорбент не должен поглощать ультрафиолетовые лучи в той области спектра, которая используется для возбуждения люминофора, а люминофор должен быть плохим адсорбентом. Этим требованиям удовлетворяют многие адсорбенты, применяемые в хроматографии, и многие люминофоры.

Наблюдения производились в колонке из кварца, освещаемой ультрамикроскопом.

Одновременно была осуществлена установка для работы по методу анализа промыванием. Вещества, разделённые в колонке на зоны, при дальнейшем пропускании растворителя через колонку поочерёдно выводились им из колонки и собирались в подставляемые под колонку сосуды. В нижней части колонки была сделана маленькая камера с плоскими параллельными окнами из кварца. Схема этой установки изображена на рис. 8. Позади кварцевой камеры, вплотную к ней, располагался флуоресцирующий экран, покрытый соответствующим люминофором. Лучи ультрамикроскопа, пройдя сквозь кварцевую камеру, возбуждали свечение экрана. При прохождении через камеру веществ, поглощающих ультрафиолетовые лучи, на флуоресцирующем экране появлялась тёмная или цветная тень. При каждом появлении и исчезновении тени

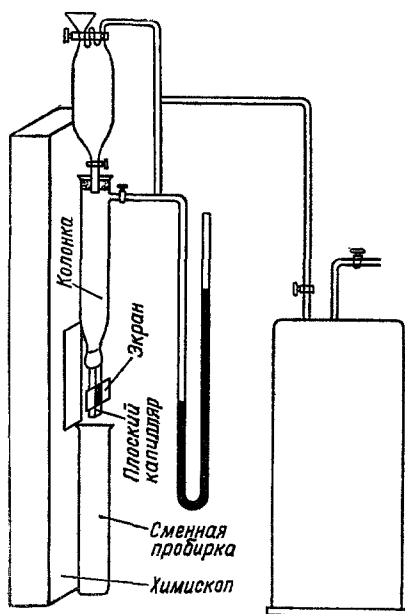


Рис. 8. Схема установки для хроматографического анализа под контролем флуоресцирующего экрана. Давление подаётся сверху.

сменялись сосуды, собирающие вытесненную из колонки жидкость. Такое устройство было осуществлено как для случая пропускания растворителя под давлением сверху (схема, изображённая на рис. 8), так и для случая отсасывания растворителя снизу колонки (схема рис. 9).

Этот способ, при котором регистрируется поглощение растворов, уже покинувших адсорбент, позволяет применять любые, также и чёрные, адсорбенты; таковы, например, почти все смолы — катиониты, применяемые для удерживания катионов в ионно-обменных способах хроматографии.

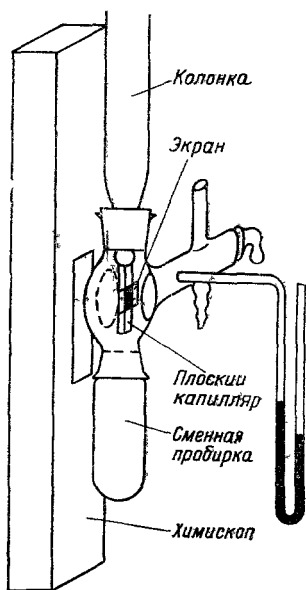


Рис. 9. То же, что на рис. 8. Давление осуществляется отсасыванием воздуха снизу колонки.

ющий свет люминесценции экрана, но задерживающий всё ультрафиолетовое и видимое излучение лампы, пропущенное тёмным светофильтром химископа. Таким образом, на фотоэлемент, через посредство люминесценции, действовали только коротковолновые лучи, возбуждающие свечение экрана. Можно было бы, разумеется, использовать в той же схеме прямое действие ультрафиолетовых лучей на соответствующий фотоэлемент, предназначенный для работы в ультрафиолетовой области спектра. Это потребовало бы, однако, применения сложных и дорогих ультрафиолетовых светофильтров.

Фотоэлектрический способ регистрации момента выхода из колонки веществ, поглощающих ультрафиолетовые лучи,

Фото электрический способ

Одновременно было осуществлено устройство, аналогичное описанному выше и отличающееся от него лишь тем, что измерение интенсивности лучей, прошедших через кварцевую камеру на конце колонки, регистрировалось не визуально, а с помощью фотоэлемента (селенового), установленного за флуоресцирующим экраном. Ввиду того, что исследовавшиеся нами вещества поглощали преимущественно ультрафиолетовые лучи коротковолновой части излучения ртутной лампы, был применён экран, покрытый люминофором (виллемитом), возбуждающимся лучами с длиной волны короче 270 мμ и люминесцирующим зелёным светом. Между фотоэлементом и экраном помещался зелёный светофильтр, пропуска-

предоставляет широкие возможности для дальнейшей электрической автоматизации процесса разделения веществ, особенно ценной при использовании хроматографии в производственных условиях.

Ультрафиолетовые колориметры

Часто за хроматографическим разделением веществ непосредственно следует определение концентраций полученных растворов. Такие определения выполняются одним из известных приёмов количественного анализа. В тех случаях, когда приходится иметь дело с бесцветными веществами, поглощающими ультрафиолетовые лучи, естественно воспользоваться для указанной цели спектрофотометрией или колориметрией в ультрафиолетовых лучах *).

Главное затруднение в общем случае применения ультрафиолетовой спектрофотометрии или колориметрии представляет отделение определяемых веществ от других веществ, поглощающих ультрафиолетовые лучи. Применяя адсорбционные методы в сочетании с хроматографией, мы имеем тот благоприятный случай, когда эти методы применяются к веществам, уже разделённым одним из самых совершенных методов.

В лаборатории С. И. Вавилова были разработаны две модели простого визуального колориметра для ультрафиолетовой области спектра, которые могут быть с успехом применены в сочетании с ультрафиолетовой хроматографией для количественного анализа смесей веществ, поглощающих ультрафиолетовые лучи.

Схема одного из таких колориметров изображена на рис. 10. Он представляет собой обычный химический колориметр типа колориметра Дюбоска, в котором произведен ряд изменений. Перед колориметром установлен осветитель, состоящий из металлического кожуха с ртутной лампой. Две кварцевые линзы и два зеркала с алюминиевым отражающим слоем направляют ультрафиолетовые лучи в колориметр. Перед колориметром установлен светофильтр, задерживающий видимые лучи. Донышки стаканов для растворов сделаны из кварца. К нижним торцам стеклянных палочек, погружаемых в растворы, приклеены плоские флуоресцирующие экраны. Вся остальная оптика колориметра остаётся стеклянной.

Поля сравнения колориметра освещаются светом флуоресценции экранов, возбуждаемой ультрафиолетовыми лучами, прошедшими через растворы, налитые в стаканы. Определение отношения концентраций веществ в испытуемом растворе и растворе

*) В отдельных случаях, главным образом для неорганических веществ, можно воспользоваться методом объемного анализа в ультрафиолетовых лучах ²².

сравнения производится по высотам поднятия сосудов в положении, соответствующем выравниванию яркости полей.

В этом случае, подобно тому как это делалось в опытах по хроматографии, выделение отдельных участков ультрафиолетового спектра, соответствующих местам наибольшего поглощения в спектрах исследуемых веществ, осуществляется не светофильтрами, а применением однослойных или многослойных флуоресцирующих экранов, избирательно

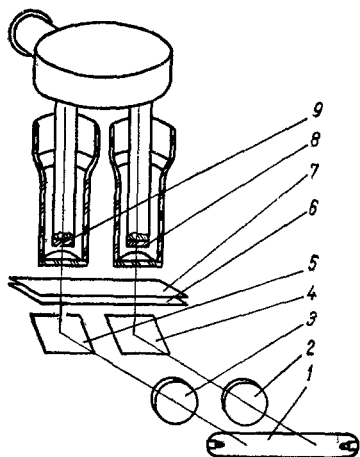


Рис. 10. Схема ультрафиолетового колориметра. 1 — ртутная лампа, 2 и 3 — кварцевые линзы, 4—5 — зеркала, 6 — светофильтр, 7 — флуоресцирующий экран для наблюдений в белом свете, 8 и 9 — сменные флуоресцирующие экраны.

возбуждаемых лучами узких участков спектра. Это позволяет существенно выиграть в яркости сравниваемых полей, что особенно важно при работе с растворами, сильно поглощающими ультрафиолетовые лучи. Однослойные экраны делаются сменными с разной спектральной чувствительностью.

При устранении экранов прибор может быть использован для определения концентрации растворов флуоресцирующих веществ и как обычный колориметр для измерения концентраций веществ цветных. В последнем из этих случаев сразу за ультрафиолетовым светофильтром (по ходу лучей) устанавливается флуоресцирующий экран, покрытый смесью люминофоров, излучающей белый свет. Это как бы превращает осветитель колориметра в люминесцентную

лампу дневного света, обеспечивающую яркое и равномерное освещение полей сравнения колориметра белым светом.

В другом типе визуального ультрафиолетового колориметра сосуды с растворами имеют постоянную длину, а выравнивание яркости полей колориметра, освещаемых светом флуоресценции поставленных за этими сосудами экранов, производится серым фотометрическим клином, ослабляющим свет одного из экранов.

Описанные выше методы хроматографии, основанные на использовании ультрафиолетового поглощения веществ, были испытаны на материале нескольких биохимических исследований.

С. Е. Манойлов исследовал этим методом нуклеопротеиды, нуклеиновые кислоты и некоторые аминокислоты (тиразин и триптафон) гидрализатов белка нормальных и опухолевых тканей.

Я. А. Эпштейн и М. П. Фомина применили ультрамикроскоп при хроматографическом изучении некоторых пуриновых и пиримидиновых оснований. С. Е. Бреслером и Е. И. Нидзян²³ ультрафиолетовая методика в комбинации с методом меченых атомов была использована для доказательства наличия ферментативной реакции переноса фосфата с аденозинтрифосфорной кислоты на рибонуклеиновую кислоту при действии ферментов печени.

Несмотря на то, что веществ, поглощающих ультрафиолетовые лучи, имеется значительно больше, чем веществ цветных, приёмы хроматографии, основанные на применении ультрафиолетовых лучей, так же как и многие другие методы, не являются универсальными. Остаётся ещё много веществ, не обладающих значительным поглощением в пределах использованного нами участка спектра от 400 до 250 м μ . Продвижение в более коротковолновую область спектра затруднено пока отсутствием пригодных для этого удобных источников света и светофильтров; кроме того, многие растворители и адсорбенты и, в частности, фильтрованная бумага в коротковолновой области теряют прозрачность.

Некоторое расширение применимости ультрафиолетовых приёмов хроматографии может быть достигнуто использованием химических реакций, приводящих к образованию веществ, сильно поглощающих ультрафиолетовые лучи в удобном для наблюдений интервале длин волн. При этом, так же как при наблюдениях в видимом свете, подобные реакции могут применяться как до, так и после разгонки веществ. Применение реакций для ультрафиолетовой области имеет ряд преимуществ по сравнению с обычными цветными реакциями. Преимущества эти определяются тем, что ультрафиолетовых реакций значительно больше, чем реакций цветных. Действительно, у большинства бесцветных соединений, поглощающих коротковолновые ультрафиолетовые лучи, значительно легче вызвать с помощью химической реакции небольшое смещение полосы поглощения в более длинноволновую область спектра, чем добиться появления новых полос поглощения в видимой области, т. е. превратить бесцветное вещество в краситель; последнее обычно сопряжено с весьма существенной и трудно обратимой перестройкой молекулы. Усиление поглощения или небольшое смещение границы области поглощения, как правило, достигается присоединением к молекуле более лёгких хромоформных групп, чем в случае перемещения поглощения в видимую область спектра. Это особенно существенно тогда, когда присоединение таких групп производится до хроматографического разделения веществ, так как присоединение к разным веществам одинаковых тяжёлых групп обычно сильно сближает их адсорбционные свойства. Последнее обстоятельство было иллюстрировано в опытах по хроматографическому разделению в бумажной хроматограмме алифатических аминокислот, выполненных нами совместно с Р. И. Плотниковым и

М. П. Фоминой. В эти аминокислоты, не поглощающие ультрафиолетовые лучи (по крайней мере лучи с длинами волн, большими 200 μ), вводились в разных опытах радикалы C_6H_5CO и 1-,3-,5- $C_6H_3(NO_2)_3CO$ путём обработки щелочного раствора аминокислот соответственно хлористым и динитрахлористым бензоилом. Подкрашенные таким образом аминокислоты можно было хорошо наблюдать с помощью ультрамикроскопа в бумажной хроматографии. При этом оказалось, что бензоильные производные аминокислот, хотя и имели меньшие коэффициенты и более коротковолновую границу поглощения, чем динитрабензоильные производные, но зато разделялись в хроматограмме значительно легче. Обработка хлористым бензоилом позволяла обнаружить в хроматограмме около 21 аминокислоты. После разделения аминокислоты могут быть переведены в раствор и кипячением его получены в чистом виде. Такое подкрашивание веществ для ультрафиолета может быть применено и к неорганическим ионам путём перевода их в соответствующую валентность или получения поглощающих комплексов. Подобные приёмы применимы и для ультрафиолетового проявления готовых хроматограмм. Например, весьма чётко можно обнаружить в хроматограмме двухвалентный цинк, превращая его в сульфид, совершенно прозрачный и поэтому незаметный на хроматограмме в видимом свете, но чрезвычайно сильно поглощающий ультрафиолетовые лучи с длинами волн короче 330 μ .

В заключение интересно оценить перспективы применения в хроматографии инфракрасных лучей. Коротковолновые инфракрасные лучи с длиной волны, меньшей 1,2 μ , в которых ещё можно получить видимое изображение хроматограммы с помощью фотографии или электронно-оптических преобразователей, мало интересны для данной задачи, так как имеется очень мало веществ, поглощающих лучи всех этих длин волн. Представляется весьма заманчивым использование более длинноволновой области спектра, в которой у многих веществ имеется сильное поглощение колебательной и ротационной природы. Здесь можно было бы применить способ, основанный на регистрации с помощью соответствующего индикатора (фото- или термоэлемента) момента прохождения вещества через камеру на конце колонки. Однако применение этого способа затруднено отсутствием растворителей, достаточно прозрачных для лучей длинноволновой инфракрасной области (если не считать CS_2 и некоторых других малодоступных растворителей). Более перспективным, пожалуй, является применение инфракрасных лучей и газовой хроматографии, где в качестве индикатора может быть с успехом применён газоанализатор системы М. Л. Вейнгера.

Описанные в настоящей статье приёмы хроматографии, основанные на перенесении наблюдений в невидимую область спектра, разработка которых была начата в лаборатории С. И. Вавилова, могут, разумеется, в дальнейшем изменяться и варьиро-

ваться различным образом, в зависимости от характера объекта и методов получения хроматограмм. Реализация возможностей, предоставляемых использованием специфического свойства многих веществ поглощать преимущественно ультрафиолетовые лучи малых длин волн, должна помочь химикам, применяющим и развивающим хроматографический метод Цвета, в их важной и интересной работе.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. М. С. Цвет, Труды Варшавского общества естествоиспытателей отд. биологии, 14, 20 (1903).
2. М. С. Цвет, Хромофилы в растительном и животном мире. Варшава, 1910.
3. R. Kühn u. E. Lederer, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 64, 1349 (1913); Zeits. f. physiol. Chem. 200, 108, 246 (1931).
4. R. Kühn u. A. Wenterstein u. E. Lederer, Zeits. f. physiol. Chem. 197, 141 (1931); Е. Леберер, Усп. химии 9, 1124 (1940).
5. Б. Я. Свешников, Природа, 6 14 (1941).
6. М. С. Цвет, Хроматографический адсорбционный анализ (избранные работы). Изд-во Акад. наук, 1946.
7. Т. Б. Гапон и Е. Н. Гапон, Журн. анал. химии, 3, 203 (1948).
8. М. М. Сенявин, Усп. химии 18, 183 (1949).
9. Н. А. Фукс, Усп. химии 18, 206 (1949).
10. Хроматография, Сборник статей под ред. акад. М. М. Дубинина, 1949.
11. A. Tiselins, Adw. Colloid Sci. 1, 81 (1942).
12. S. Claesson, Ark. Kemi., Min., Geol. 23, A (1) (1946).
13. A. Wintestein u. K. Schon, Zeits. f. physiol. Chem. 230, 139 (1934).
14. P. Karer u. R. Schöpp, Helv. Chim. Acta 17, 693 (1934).
15. Н. Брокшанн u. F. Volpers, Ber. 80, 77 (1947).
16. Е. М. Брумберг и С. А. Тершгорин, ДАН 69, 801 (1949).
17. И. И. Брейдо и М. П. Бухман, Оптико-механическая промышленность, № 7 (1946).
18. Д. С. Волосов, Методы расчёта сложных фотографических систем, 1948 г. гл. 15.
19. Е. М. Брумберг, ДАН, 72, 885 (1950).
20. Е. М. Брумберг, Изв. АН СССР, сер. физич. 6, 32 (1942).
21. Е. М. Брумберг, И. Н. Бережная, В. П. Дуткинский и С. Е. Манойлов, ДАН, 74 (1950).
22. Е. М. Брумберг, И. А. Павел и К. П. Столяров, Журн. анал. химии 5, 195 (1950).
23. С. Е. Бреслер и Е. И. Нидзян, ДАН, 75 (1950).