

РОЛЬ ХРОМАТОГРАФИИ В РАЗВИТИИ ХИМИИ И БИОЛОГИИ

Хроматография - это физико-химический метод разделения и анализа смесей газов, паров, жидкостей или растворенных веществ сорбционными методами. Метод основан на различном распределении веществ между двумя несмешивающимися фазами - подвижной и неподвижной [1]. Несколько Нобелевских премий в значительной степени обязаны хроматографическому методу: П.Каррер (1937), Р.Кун (1938), Л.С.Ружичка и А.Ф.Бутенандт (1939), а позже А.Дж.П.Мартин и Р.Л.М.Синг (1952) и Ф.Сенгер (1958 и 1980) [2].

Хроматография как общий метод разделения была разработана русским ботаником М.С.Цветом в начале XX века. С помощью этого метода ему удалось разделить хлорофилл на составляющие окрашенные вещества. При пропускании экстракта хлорофилла через колонку, заполненную порошком мела, и промывании петролейным эфиром он получил несколько окрашенных зон и назвал эти зоны хроматограммой (от греческого "хроматос" — цвет), а метод – хроматографией [3]. К сожалению тогда метод не был оценен современниками и на время забыт.

В период 1928 – 1933 годов каротин и каротиноиды были объектом углубленных исследований целого ряда химиков-органиков. Целью этих работ было окончательное выяснение химической природы и свойств каротина и сопутствующих ему родственных пигментов. Тогда-то и вспомнили о хроматографии. В лаборатории Р.Куна в Гейдельберге в 30-м году была получена «первая» хроматограмма на колонке из карбоната кальция. Практически в то же время и для тех же целей его использовали Л.Цехмейстер в Венгрии и в лаборатории Цюрихского университета, руководимой П.Каррером.

В 1928 году Цейхмейстер и его сотрудники, каталитически гидрируя каротин, установили, что его молекула содержит большую алифатическую группировку. Дальнейшие работы по выяснению строения каротина принадлежат, главным образом, Карреру, широко использовавшему хроматографический метод Цвета для разделения пигментов и их изомеров. В 1930 году структурная формула каротина была установлена. В этот же период времени были выделены и изучены некоторые изомеры каротина и ряд каротиноидов [4].

До начала 40-х годов господствовала «тетрануклеотидная» теория, согласно которой ДНК состоит из повторяющихся блоков по четыре разных азотистых основания. «Стандартный тетрануклеотидный кирпич» ($M \sim 1500$) позволял строить только однообразную последовательность. В этом случае нуклеиновые кислоты не годились на роль материальной структуры генов. Но к началу 40-х годов уже было ясно, что нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК) могут быть высоко полимерны ($M \sim 500$ тыс. – 1 млн). В конце 40-х годов Чаргафф показал, что ДНК разного видового происхождения имеют разный состав нуклеотидов, а общая их эквимольность не выполняется. Используя кислый гидролиз ДНК и новый метод хроматографии на бумаге, Чаргафф обнаружил, что между молярными концентрациями пуринов и пиримидинов имеются другие регулярные соотношения: $A=T$ и $G=C$. И хотя он не объяснил эти свойства, стало совершенно ясно, что мономеры нуклеиновых кислот – не тетрануклеотиды, а четыре стандартных нуклеотида, у которых одинаковая сахаро-фосфатная часть, участвующая в образовании стандартных фосфо-диэфирных связей, и различные основания. Их комбинаторика и допускает огромное разнообразие вариантов [5]. Правила Чаргаффа, наряду с данными рентгеноструктурного анализа, сыграли решающую роль в расшифровке структуры ДНК Дж. Уотсоном и Фрэнсисом Криком

Хроматографическое разделение гидрофильных веществ, прежде всего аминокислот, стало возможным после открытия Мартином и Сингом в 1941 г. распределительной

хроматографии. Эти ученые обнаружили, что после расщепления полипептидной цепи на составляющие ее аминокислоты, они могут отсортировать аминокислоты благодаря характерным скоростям, с которыми те продвигаются по специальной фильтровальной бумаге. В то же самое время английский химик Фредерик Сенгер стал применять метод бумажной хроматографии для выяснения вида аминокислот и их количественного соотношения в инсулине. В 1955 г. Сенгер представил законченную структуру молекулы инсулина [2]. Это была первая белковая молекула, так подробно изученная. Результаты проведенных им исследований окончательно доказали, что белки состоят из аминокислот, соединенных в цепи пептидными связями.

После II Мировой войны Станфорд Мур и Уильям Стайн изучали строение белков и работали над поиском эффективного метода разделения аминокислот, который обеспечил бы большее количество информации о каждом из соединений. Пропуская растворы аминокислот через колонны с насадкой картофельного крахмала, Мур и Стайн в 1948 г. впервые получили положительные результаты. Однако этот процесс занимал около двух недель. В начале 50-х гг. Мур и Стайн обратились к методу ионообменной хроматографии, при котором ионообменная смола отсортировывает ионы в соответствии с их электрическими зарядами и размерами. Этот метод не только позволил ускорить аналитический процесс, но и обеспечил более четкое разделение, чем метод колоночной хроматографии с использованием крахмала. Сочетая оба метода, Мур и Стайн осуществили анализ аминокислот, входящих в состав различных белков. К 1960 г. Эта группа ученых установила полную последовательность чередования аминокислот рибонуклеазы [2]. Это была вторая из установленных белковых последовательностей и первая из последовательностей ферментов. Благодаря полученным ими результатам Муру и Стайну удалось определить местоположение и состав компонентов активного центра рибонуклеазы, который катализирует расщепление РНК.

В 1946 г. Кэлвин с сотрудниками начал использовать в своих работах по изучению механизма фотосинтеза долгоживущий изотоп углерода – ^{14}C . Нарбатывались соединения с ^{14}C , участвующие в фотосинтезе. Для изучения веществ использовалась бумажная хроматография. К началу 1950-х гг. Кэлвину и его команде стало ясно, что использование классических методов выделения и определения большого количества радиоактивных органических веществ, которые они обнаруживали в процессе фотосинтеза, – очень трудоемкая работа и требует много времени для идентификации некоторых из этих веществ. Необходимость создания новой быстрой аналитической методики привела Кэлвина к разработке метода двумерных хроматографических карт для промежуточных продуктов фотосинтеза. В 1961 г. М.Кэлвину была присуждена Нобелевская премия по химии «за исследование усвоения двуокиси углерода растениями» [2].

Таким образом, хроматография дала сильный толчок развитию химии и биологии и остается важнейшим методом исследования в этих областях.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Е.Н.Дорохова, Г.В.Прохорова. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализа. - М.: Высшая школа, 1991.-256 с.
2. Лауреаты Нобелевской премии: Энциклопедия: Пер. с англ.– М.: Прогресс, 1992.
3. М.С.Цвет. "Хроматографический адсорбционный анализ" Избранные работы. Ред. А.А.Рихтер и Т.А.Красносельская, Изд. АН СССР, Москва, 1946.
4. Б.Г.Савинов. Каротин (провитамин А) и получение его препаратов. - Киев: Изд. АН УССР, 1948.
5. Шабарова З.А. и Богданов А.А. Химия нуклеиновых кислот и их полимеров.