

УДК 543.544

## ИНДУЦИРОВАННЫЕ ВОСХОДЯЩИЕ ГРАДИЕНТЫ pH В ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ СО СВОБОДНОЙ НЕПОДВИЖНОЙ ФАЗОЙ

А.В. Иванов

(кафедра аналитической химии)

**Показана возможность формирования индуцированных восходящих градиентов pH в жидкостной хроматографии со свободной неподвижной фазой. В качестве хроматографических колонок со свободной неподвижной фазой использовали тефлоновые и металлические капилляры с внутренним объемом 1 мл, в качестве подвижной фазы - водно-метанольные или водно-ацетонитрильные буферные растворы  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  переменной концентрации. Октановая и гептановая кислоты, индуцирующие градиент pH в капилляре, одновременно являлись свободной неподвижной фазой. Наиболее плавный восходящий градиент pH в диапазоне от 5,6–5,8 до 9,1 получен в системе: 5 мкл октановой кислоты, подвижная фаза 20 мМ  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  в 30%  $\text{CH}_3\text{OH}$  при скорости 0,2–0,3 мл/мин.**

Жидкостная хроматография со свободной неподвижной фазой (ЖХСНФ), основанная на сочетании хроматографической техники с принципами многократной экстракции, активно развивается в последнее десятилетие [1–3]. В качестве свободной неподвижной фазы обычно используют неполярные или малополярные жидкости с достаточно высокой плотностью, практически не смешивающиеся с подвижной фазой. Хроматографический процесс проводят в двух вариантах – внутри длинных и тонких капилляров (внутренний диаметр 0,2–1,0 мм), выступающих как аналоги традиционных хроматографических колонок [4, 5], либо внутри капилляров, помещенных в планетарную центрифугу для более быстрого достижения экстракционных равновесий [1–3, 6].

Первый вариант в зарубежной литературе принято называть жидкостной хроматографией в открытых капиллярных трубках с параллельными потоками (РС-OTLC), второй – противоточной хроматографией (ССС) [1, 7]. К настоящему времени в ЖХСНФ накоплен значительный экспериментальный материал по препаративному разделению органических и биоорганических веществ; имеются отдельные работы по препаративному разделению неорганических

ионов, например, ионов двухвалентных металлов [3, 6]. С целью дальнейшего теоретического и экспериментального развития ЖХСНФ было бы интересно подобрать системы, используемые в жидкостной колоночной хроматографии, например, в ВЭЖХ. В качестве подобных “модельных” хроматографических систем можно предложить ВЭЖХ с обращенными фазами, изократическое разделение неорганических и органических ионов на поверхностно-модифицированных ионообменниках и разделение ионов или молекул с использованием внутрикколоночного градиента pH [8]. До сих пор в ЖХСНФ для разделения молекул за счет изменения гидрофобности-гидрофильности или ионов металлов за счет изменения комплексообразующих свойств экстрагирующей подвижной фазы используют внешние ступенчатые градиенты pH, формируемые последовательной сменой подвижных фаз одной природы с отличающимися значениями pH, однако такой способ (так называемое “pH-фокусирование”) довольно трудоемок [6]. Более интересным представляется формирование восходящих или нисходящих внутренних плавных градиентов pH с использованием техники хроматофокусирования [9] или индуцирования [10–12].

Данная работа посвящена формированию индуцированных восходящих градиентов рН внутри открытых капилляров со свободной неподвижной фазой.

### Экспериментальная часть

*Реагенты и аппаратура.* В качестве реагента, индуцирующего формирование градиента рН и одновременно являющегося неподвижной фазой, использовали октановую и гептановую кислоты (препарат фирмы “Merck”, Германия) или их смесь. В качестве подвижной фазы (элюента) использовали растворы тетрабората натрия переменной концентрации (2 – 20 мМ) в смеси воды с метанолом или ацетонитрилом. Все реагенты имели квалификацию ч.д.а.

Использовали хроматографическую систему высокого давления, состоящую из изократического насоса НРР-5001 шприцевого действия (“Laboratorni pristroje”, Чехия) (1), инжектора РК-1 (Институт аналитической и прикладной химии АН Чехии) с внешней петлей 50 мкл и внутренней петлей 5 мкл для ввода индуцирующего реагента, тefлонового (внутренний радиус 0,4 мм, длина ~200 см) или металлического (внутренний радиус 0,3 мм, длина ~350 см) капилляра с внутренним объемом 1 мл, цифрового рН-метра ОР-208/1 (Radelkis, Венгрия) с проточной микроячейкой объемом 15 мкл для измерения рН эфлюента, двухканального самописца TZ-4620 (“Laboratorni pristroje”) для регистрации выходных кривых рН и разделяемых компонентов. В отдельных случаях в систему включали фотометрический детектор с переменной длиной волны UVM-6 (“Laboratorni pristroje”) для проверки базовой линии.

Кислотность растворов при приготовлении контролировали с помощью цифрового рН-метра ОР-208/1 с комбинированным электродом.

*Методика.* Через капилляр в течение 10–20 мин пропускали элюент с верхним значением интервала рН, вводили в инжектор 5 (в отдельном эксперименте – 50) мкл октановой или гептановой кислоты или их смеси с нижним значением интервала рН и регистрировали рН эфлюента [11, 12].

### Результаты и их обсуждение

*Формирование индуцированных градиентов рН.* Ранее нами было рассмотрено формирование индуцированных нисходящих градиентов рН внутри анионообменных колонок за счет кислотно-основных свойств буферной подвижной фазы и функциональных групп сорбента, обладающих буферной емкостью. Механизм формирования градиента условно можно представить как последовательное титрование полиоснования (в данном случае – функциональных групп анионообменного сорбента) поликислотой (компонентами элюента) [9, 11, 12]. В колонке, первоначально уравновешенной до высоких значений рН, происходит передача протонов от кислотных групп в составе компонентов подвижной фазы к ионизированным группам сорбента. Это и приводит к равномерному снижению рН подвижной фазы по мере продвижения ее фронта вдоль слоя сорбента в колонке. Колонку уравновешивают элюентом в кислой среде, а затем вводят в колонку индуцирующий буферный раствор с концентрацией на 2 и более порядков выше концентрации компонентов элюента; протонированные аминокислоты сорбента быстро титруются индуцирующим раство-

ром с высоким значением рН и переходят в нейтральную форму. При этом наблюдается резкое скачкообразное увеличение (на 5–6 ед.) рН эфлюента, что связано с высокой концентрацией индуцирующего раствора. Затем рН эфлюента начинает достаточно плавно снижаться, причем полученный градиент рН можно разделить на 2 участка – на первом из них формирование градиента обусловлено в основном высокой буферной емкостью индуцирующего раствора, а также частичным вкладом кислотно-основных свойств сорбента, а на втором – свойствами сорбента и элюента. Чем шире диапазон рН постоянной буферной емкости сорбента и элюента, тем протяженнее рабочий интервал рН градиента. Следовательно, при формировании индуцированных градиентов рН важен выбор и сорбента, и подвижной фазы с подходящими кислотно-основными свойствами. Аналогичную, несколько модифицированную систему можно предложить и для использования в ЖХСНФ. В этом случае неподвижная фаза – достаточно вязкий гидрофобный раствор амина или слабой карбоксикислоты – будет одновременно индуцировать образование градиента рН внутри капилляра: нисходящего – для амина и восходящего – для карбоновой кислоты.

*Выбор неподвижной фазы.* В качестве свободной неподвижной фазы, индуцирующей формирование восходящего градиента рН, мы выбрали октановую и гептановую кислоты. Это слабые кислоты с практически одинаковыми константами диссоциации ( $1,27 \cdot 10^{-5}$  и  $1,42 \cdot 10^{-5}$  соответственно), гидрофобные, ограниченно растворимые в воде (до 5,5 мМ – октановая и 18,6 мМ – гептановая) и хорошо растворимые в водно-метанольной или водно-ацетонитрильной смеси, представляющие достаточно вязкие жидкости. Вязкость гептановой кислоты при 20° составляет 3,40 сантипуаз – заметно ниже, чем октановой (5,83 сантипуаз) [13, 14]. Очевидно, что при “титровании” такой неподвижной фазы разбавленным раствором слабого основания рН эфлюента будет увеличиваться плавно, что и требуется в хроматофокусировании и родственных методах. Неподвижную фазу (5–50 мкл) периодически вводили в тefлоновый или металлический капилляр с помощью инжектора, ждали завершения градиента, т.е. совпадения рН эфлюента и рН подвижной фазы до капилляра, и вводили очередную порцию кислоты для формирования следующего градиента рН. Особенностью такого подхода является практически полный расход неподвижной фазы в ходе формирования градиента рН, что создает преимущества – из капилляра легко удалить неподвижную фазу в случае необратимой сорбции разделяемых компонентов.

*Выбор подвижной фазы.* Для того чтобы подвижная фаза обладала буферной емкостью в более широком диапазоне рН, в нее нужно включать слабые основания или амфолиты с равномерно распределенными значениями констант диссоциации в данном интервале рН. Мы выбрали в качестве подвижной фазы (элюента) боратный буферный раствор. Поскольку свободная неподвижная фаза – в данном случае кислота – гидрофобная, то для ее частичного растворения в элюент добавляли метанол (20–40 об.%) или ацетонитрил (20–30 об.%). Концентрация тетрабората натрия в водно-органической смеси составляла 2–20 мМ. Типичные восходящие градиенты рН представлены на рис. 1. Через 3–

5 мин (в зависимости от скорости элюента) после введения октановой кислоты в систему pH эфлюента регистрировалось скачкообразное снижение от 9–9,2 до 4,8–5,9, что означает, что в этот момент из колонки выходит часть кислоты, не сорбирующаяся на стенках капилляра. Остальная кислота распределяется вдоль стенок капилляра и постепенно титруется боратным буферным раствором, при этом pH эфлюента плавно увеличивается до pH исходного боратного раствора.

**Влияние концентрации элюента.** При использовании 2 мМ боратного раствора в 30%-м метаноле и скорости элюента 0,5 мл/мин время восходящего градиента pH от 4,85 до 8,20 составило около 80–85 мин, а объем элюента, пошедшего на формирование градиента, равен 22,5–24,0 внутренним объемам капилляра (рис. 1, кривая 1). Заметим, что при повышении концентрации боратного буферного раствора до 5, 10 и 20 мМ и при той же скорости подачи элюента время градиента pH сокращалось пропорционально и составило 45–48, 28–30 и 12–14 мин соответственно (рис. 1, кривые 2–4). Начальная точка восходящего градиента pH при этом сдвигается в область более высоких значений pH: от 4,85 в случае 2 мМ боратного раствора до 5,95 для 20 мМ боратного раствора (таблица). При этом форма градиента меняется от почти линейной (рис. 1, кривая 1) до экспоненциальной (кривая 4), т.е. pH более резко меняется в области от нижней точки градиента до 6,5–7,5 (в области буферной емкости кислоты). Увеличение вводимого объема октановой кислоты до 50 мкл приводит к значительному увеличению времени градиента pH: так, при использовании 20 мМ боратного буферного раствора pH эфлюента от начальной точки градиента (4,80) изменилось до 5,80 более чем за 45 мин, поэтому в дальнейшем вводили только 5 мкл кислоты, используя внутреннюю петлю инжектора. Увеличение содержания метанола в элюенте до 40% также сокращает время, требуемое для формирования градиента pH, аналогичный эффект наблюдали и при замене метанола на ацетонитрил, что связано с заметным увеличением растворимости октановой кислоты (от 5,5 и 13 мМ в воде и 30%-м метаноле и до 17–18 мМ в 30%-м ацетонитриле или 40%-м метаноле). Так, при использовании 40%-го метанола и 30%-го ацетонитрила были получены практически одинаковые градиенты pH.

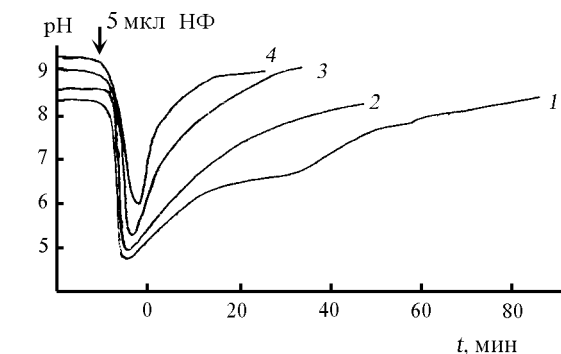


Рис. 1. Градиенты pH, полученные внутри капилляра ( $V_{\text{внутр}} = 1$  мл) в системе неподвижная фаза – 5 мкл октановой кислоты, элюент –  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  в 30%-м метаноле (концентрация, мМ): 1 – 2, 2 – 5, 3 – 10, 4 – 20 при скорости 0,5 мл/мин

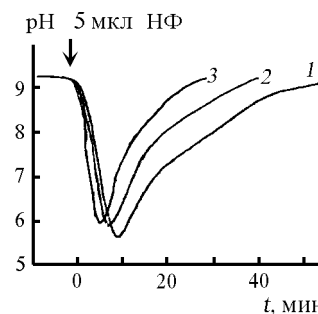


Рис. 2. Градиенты pH, полученные при использовании 20 мМ раствора  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  в 30%-м метаноле в качестве элюента при скорости подачи (мл/мин): 1 – 0,2, 2 – 0,3, 3 – 0,4 (остальные условия см. в подписи к рис. 1)

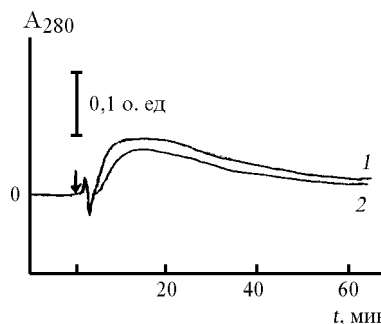


Рис. 3. Сигнал базовой линии при 280 нм для систем: 1 – 3 (рис. 1) и 2 – 1 (рис. 2)

**Влияние скорости подачи элюента.** В работе варьировали скорость подачи элюента от 0,2 до 0,5 мл/мин. При повышении скорости форма градиента так же, как и при увеличении концентрации боратного буферного раствора, становится все более экспоненциальной (рис. 2, кривые 1–3), а время достижения конечной точки градиента pH сокращается пропорционально (таблица). При этом объем подвижной фазы, пошедшей на формирование градиента pH, составляет от 7 до 7,5 внутренних объемов капилляра, что косвенно подтверждает предположение о том, что в капилляре во всех экспериментах удерживается практически постоянный объем неподвижной фазы. Начальная точка градиента при увеличении скорости потока смещается от pH 5,65 до 5,95 (таблица). На наш взгляд, наиболее интересными с практической точки зрения выглядят градиенты, полученные в системе 10 мМ  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  в 30%-м метаноле при скорости 0,5 мл/мин (рис. 1, кривая 3) и 20 мМ  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  в 30%-м метаноле при скорости 0,2–0,3 мл/мин (рис. 2, кривые 1, 2) – градиент в этом случае еще достаточно плавный, а время его формирования составляет 25–35 мин. Такие градиенты можно применять при препаративном разделении веществ, находящихся в молекулярной форме при низких значениях pH, следовательно, лучше распределяющихся в малополярной неподвижной фазе и диссоциирующих в нейтральной и слабощелочной области pH и при этом переходящих в более полярный элюент. Можно провести аналогию между распределительной обращенно-фазовой хроматографией и предлагаемым вариантом ЖХСНФ. Заметим, что сигнал базовой линии эфлюента,

**Исследованные системы со свободной неподвижной фазой для индуцирования восходящих градиентов рН**

Неподвижная фаза	Подвижная фаза (ПФ), рН	Скорость ПФ, мл/мин	Диапазон градиента рН	Время градиента рН, мин	Объем ПФ, выраженный в $V_{\text{внутр. капилляра}}$
5 мкл октановой кислоты	2 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ в 30% $\text{CH}_3\text{OH}$ , 8,30	0,5	4,85–8,20	80–85	40,0–42,5
Та же	5 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ в 30% $\text{CH}_3\text{OH}$ , 8,6	та же	4,95–8,40	45–48	22,5–24,0
Та же	10 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ в 30% $\text{CH}_3\text{OH}$ 8,95	та же	5,20–8,90	28–30	14,0–15,0
Та же	20 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ в 30% $\text{CH}_3\text{OH}$ 9,25	та же	5,95–9,10	13–14	6,5–7,0
50 мкл октановой кислоты	та же	та же	4,80–5,80	45	22,5
5 мкл октановой кислоты	20 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ в 40% $\text{CH}_3\text{OH}$ 9,10	та же	5,95–9,00	9–10	4,5–5,0
Та же	20 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ в 30% $\text{CH}_3\text{CN}$ 9,15	та же	5,95–9,05	9	4,5
Та же	20 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ в 30% $\text{CH}_3\text{OH}$ 9,25	0,2	5,65–9,05	35–37	7,0–7,4
Та же	та же	0,3	5,80–9,10	24–25	7,2–7,5
Та же	та же	0,4	5,95–9,10	18–19	7,2–7,6
Та же	5 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ в 30% $\text{CH}_3\text{OH}$ 8,60	0,3	4,75–8,30	70–75	21,0–22,5
5 мкл гептановой кислоты	та же	та же	4,60–8,40	47–48	14,1–14,5
5 мкл смеси (1:1) октановой и гептановой кислот	та же	та же	4,70–8,40	60–62	18,0–18,6

полученный при 280 нм, сначала увеличивается примерно на 0,1, что связано с существенным изменением рН в системе, но потом изменяется очень плавно на протяжении всего градиента рН, что позволяет на его фоне детектировать компоненты, поглощающие в УФ-области (рис. 3).

*Влияние природы свободной неподвижной фазы.* Как было сказано выше, октановая и гептановая кислоты практически не отличаются по константам диссоциации, зато отличаются по растворимости и вязкости в воде. Для того чтобы лучше заметить, как сказываются эти различия на формировании градиента рН, эксперимент проводили при скорости 0,3 мл/мин и использовании 5 мМ раствора тетрабората натрия и сохранении содержания метанола в элюенте. При введении в систему 5 мкл октановой кислоты получили плавный, практически линейный градиент рН в диапазоне от 4,75 до 8,30 в течение 65–70 мин (рис. 4, кривая 1). В случае гептановой кислоты время градиента рН в диапазоне 4,60–8,40 составило 48 мин, а форма градиента приобрела более экспоненциальный характер (рис. 4, кривая 2). Это связано с тем, что гептановая кислота быстрее растворяется в водно-метанольном элюенте, а следовательно, и быстрее титруется тетрабора-

том натрия, входящим в состав такого элюента. Использование смеси октановой и гептановой кислот (1:1) приводит к тому, что начальный участок градиента рН разделяется на два практически линейных участка, что объясняется

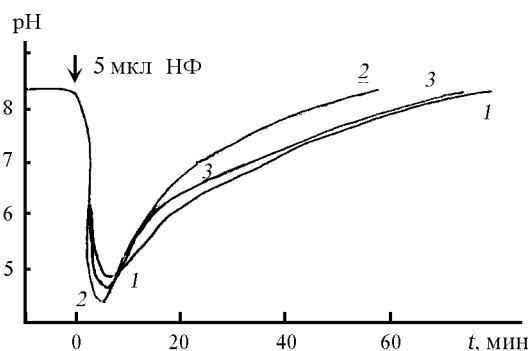


Рис. 4. Влияние природы неподвижной фазы на профиль градиента рН в системе: элюент – 5 мМ  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  в 30%-м метаноле, 0,3 мл/мин, неподвижная фаза: 1 – 5 мкл октановой кислоты, 2 – 5 мкл гептановой кислоты, 3 – 5 мкл смеси (1:1) кислот

различиями в растворимости и вязкости (рис. 4, кривая 3). Вероятно, начальный участок градиента с более резким изменением pH во всех случаях можно сгладить, добавив в подвижную фазу слабое основание или амфолит с буферной емкостью в области pH 6,5–7,5, например, гистидин, ранее использованный нами в качестве компонента подвижной фазы при индуцировании нисходящих градиентов pH в колонках, заполненных кремнеземами с привитыми олигоэтиленаминами [11, 12].

Выбранная пара “элюент – свободная неподвижная фаза” (боратный буферный раствор – октановая кислота) подходит для формирования индуцированных восходящих градиентов pH в противоточной хроматографии внутри длинных и тонких капилляров, помещенных в планетарную

центрифугу [1, 2]; в этом случае можно ожидать, что градиенты pH станут более плавными за счет многократных взаимодействий неподвижной фазы и буферной подвижной фазы. Однако объем кислоты, используемой в качестве неподвижной фазы, необходимо значительно увеличить, поскольку в противоточной хроматографии обычно используют капилляры с гораздо большим (до нескольких десятков мл) внутренним объемом.

Аналогичный подход можно применить и для формирования нисходящих градиентов pH внутри капилляров с использованием техники индуцирования, взяв в качестве свободной неподвижной фазы гидрофобный полиамин с достаточной высокой вязкостью, а в качестве элюента – раствор слабых кислот или амфолитов в водно-метанольной смеси.

Автор выражает глубокую признательность профессору К. Шлайсу (Институт аналитической и прикладной химии АН Чехии, Брно) за предоставленное оборудование и за помощь при проведении эксперимента. Работа выполнена при финансовой поддержке ИНТАС (грант № 00-00782).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Counter-Current Chromatography., *J. M. Menet, D. Thiebaut*. N. Y., 1999.
2. *Zolotov Yu.A., Spivakov B.Ya., Maryutina T.A.* // *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 1989. **35**. S. 938.
3. *Марютина Т.А., Федотов П.С., Спиваков Б.Я.* // *ЖАХ*. 1997. **52**. №12. С. 1263.
4. *Slais K., Horka M.* // *J. High Resol. Chromatogr.* 1993. **16**. P. 194.
5. *Slais K., Horka M.* // *J. Microcol. Sep.* 1993. **5**. P. 63.
6. *Kitazume E., Higashiyama T., Sato N. et al.* // *Anal. Chem.* 1999. **71**. P. 5515.
7. *Slais K., Horka M., Kleparnik K.* // *J. Chromatogr.* 1992. **605**. P. 167.
8. *Shpigun O.A., Ivanov A.V.* // *Abstr. 2-nd International Congress on Counter-Current Chromatography (CCC-2002). China, Beijing, 2002. P. 17.*
9. *Sluyterman L.A.A.E., Kooistra C.* // *J. Chromatogr.* 1989. **470**. P. 317.
10. *Janecek M., Slais K.* // *Chromatographia.* 1993. **36**. P. 246.
11. *Иванов А.В., Нестеренко П.Н.* // *Известия вузов. Химия и хим. технология.* 1999. **42**. №2. С. 122.
12. *Иванов А.В., Нестеренко П.Н.* // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* 1999. **40**. С.155.
13. *Темникова Т.И.* Курс теоретических основ органической химии. Л., 1968. С. 200.
14. *Weissberger A.* Organic Solvents. Physical Properties and Methods of Purifications. N.Y., L., Sydney, Toronto, 1970.

Поступила в редакцию 23.05.02