

УДК 543.544

НИСХОДЯЩИЕ ИНДУЦИРОВАННЫЕ ГРАДИЕНТЫ pH В ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ СО СВОБОДНОЙ НЕПОДВИЖНОЙ ФАЗОЙ

А.В. Иванов, С.С. Кубышев, П.Н. Нестеренко

(кафедра аналитической химии, e-mail: sandro@analyt.chem.msu.ru)

С применением техники индуцирования получены нисходящие градиенты pH в капиллярах со свободной неподвижной фазой. В качестве реагентов, индуцирующих градиент pH в капилляре и одновременно служащих свободной неподвижной фазой, выбрали пропиламин, 2-бутиламин и диизопропилэтиламин. В качестве компонентов подвижной фазы использовали растворы уксусной и 6-аминогексановой кислот, а также Трис переменной концентрации (0,5–10 мМ).

В последнее время активно развивается метод жидкостной хроматографии со свободной неподвижной фазой (ЖХСНФ), основанный на сочетании хроматографической техники с многократными экстракционными равновесиями [1, 2]. В роли хроматографических колонок выступают длинные (до нескольких десятков метров) и тонкие (внутренний диаметр 1,0–5,0 мм) капилляры, свернутые в спираль и помещенные в планетарную центрифугу для быстрого установления экстракционного равновесия [2–4]. Этот вариант ЖХСНФ также называют противоточной хроматографией (ССС, *counter-current chromatography*) [1]. Существует также упрощенный (с точки зрения аппаратного оформления) вариант ЖХСНФ в более тонких капиллярах (0,2–0,5 мм) с параллельными потоками без центрифугирования (*parallel-current open tubes liquid chromatography*, PC-OTLC) [5, 6]. Этот вариант скорее пригоден не для препаративного или аналитического разделения, а для выбора хроматографической системы и предварительных испытаний [7]. В качестве свободной неподвижной фазы обычно используют неполярные или малополярные жидкости с достаточно высокой плотностью, практически несмешивающиеся с водной подвижной фазой. В ЖХСНФ накоплен значительный экспериментальный материал по препаративному разделению органических и биоорганических веществ по их гидрофобности/гидрофильности или ионов двухвалентных металлов за счет изменения комплексообразующих свойств [1, 3, 4]. Сейчас для дальнейшего теоретического и экспериментального развития метода ЖХСНФ подбирают системы, аналогичные широко используемым в жидкостной колонной хроматографии [7, 8]. Одной из таких систем является анионо- или катионообменная хроматогра-

фия с формированием градиента pH внутри колонки. Для создания градиента pH внутри ионообменной колонки предложено применять технику хроматофокусирования [9, 10] или индуцирования [11, 12]. Так, в капиллярах со свободной неподвижной фазой получены индуцированные восходящие градиенты (протяженностью около 5 ед. pH) при использовании в качестве индуцирующего реагента гептановой и октановой кислот, а в качестве подвижной фазы – буферных растворов $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ в водно-органических смесях [7, 8]. Однако с практической точки зрения больший интерес представляют нисходящие градиенты pH.

Данная работа посвящена индуцированию нисходящих градиентов pH внутри открытых тонких капилляров со свободной неподвижной фазой.

Экспериментальная часть

Реагенты. В качестве реагента, который индуцирует градиент pH в системе и одновременно служит свободной неподвижной фазой, использовали амины: пропиламин (*Fluka*, Швейцария), 2-бутиламин (*Merck*, Германия), диизопропилэтиламин (*Fluka*, Швейцария), ундециламин (*Sigma-Aldrich*, Германия); в качестве подвижной фазы применяли водные растворы уксусной (*Реахим*, Россия), 6-аминогексановой (аминокапроновой) кислот (*Merck*, Германия) и Трис (*Merck*, Германия) в интервале концентраций 0,5–10 мМ. Для повышения вязкости неподвижной фазы в отдельных случаях амины смешивали с полиэтиленгликолем (ПЭГ) (*Merck*, Германия) в соотношении 3:1, 2:1, 1:1, 1:2 или 1:3. Все реагенты имели квалификацию “ч.д.а.”

Аппаратура. Использовали хроматографическую систему высокого давления, состоящую из: насоса высокого давления ХПЖ-1 (СССР, Дзержинский ОКБ) или *Beckman-114 M* (США), инжектора

“*Rheodyne 7125*” (США) с объемом петли 50 мкл для ввода индуцирующего реагента, тefлонового капилляра с внутренним объемом 1 мл (внутренний радиус 0,4 мм, длина ~200 см), цифрового рН-метра “*HM-20S*” (*TOA Electronics*, Япония) с комбинированным электродом *GST-5211C* и проточной ячейкой для непрерывного контроля рН эфлюента. Сигнал рН-метра регистрировали через АЦП на персональном компьютере P-100 с помощью DOS-приложения “*Экохром*” (Россия, *ИОХ РАН*).

Методика. Через капилляр в течение 10–20 мин пропускали элюент с нижним значением интервала рН, вводили в инжектор 50 мкл индуцирующего реагента (чистый амин или смесь амина с ПЭГ) с верхним значением интервала рН и регистрировали рН эфлюента [8].

Результаты и их обсуждение

Механизм формирования нисходящего градиента рН. В литературе [9, 10, 12] высказано предположение, что процесс формирования нисходящего градиента рН внутри анионообменных колонок, заполненных слабоосновными аминокислотами сорбентами, можно представить как последовательное титрование полиоснования (в данном случае – аминокрупп свободной неподвижной фазы) поликислотой (компонентами элюента). Сорбент в колонке уравнивается элюентом в кислой среде, а затем вводят в колонку индуцирующий буферный раствор с концентрацией на два и более порядков выше концентрации компонентов элюента; протонированные аминокруппы сорбента быстро титруются индуцирующим раствором с высоким значением рН и становятся нейтральными. В результате наблюдается скачкообразное увеличение (на 5–6 ед.) рН эфлюента, что связано с высокой концентрацией индуцирующего раствора. Затем рН эфлюента начинает достаточно плавно снижаться – аминокруппы на поверхности сорбента вновь титруются разбавленным кислым элюентом. Чем шире диапазон рН постоянной буферной емкости ионообменного сорбента и элюента, тем протяженнее рабочий интервал рН градиента. Подобным образом происходит индуцирование градиентов в капиллярах со свободной неподвижной фазой [8]. Индуцирующий реагент представляет собой достаточно вязкое вещество, он распространяется по внутренним стенкам капилляра, создавая слой неподвижной фазы. Через несколько минут после введения амина в систему скачкообразно увеличивается рН эфлюента. Это означает, что в данный момент из капилляра выходит часть амина, не удерживаемая на внутренней

поверхности капилляра. Остальная неподвижная фаза распределяется вдоль стенок капилляра и постепенно титруется кислотным буферным раствором, при этом рН эфлюента плавно снижается до рН исходного кислотного буферного раствора. Вид профиля полученного градиента рН зависит от кислотно-основных и буферных свойств подвижной и неподвижной фаз, а также от вязкости неподвижной фазы; рабочий интервал градиента обуславливается соотношением между кислотностью элюента и основностью индуцирующего реагента. Следовательно, при формировании индуцированных градиентов рН важен выбор и индуцирующего реагента, и подвижной фазы с подходящими кислотно-основными свойствами.

Выбор неподвижной фазы. В качестве свободной неподвижной фазы, индуцирующей формирование нисходящего градиента рН, мы выбрали разветвленные и неразветвленные алифатические амины (пропиламин, 2-бутиламин, диизопропилэтиламин, в отдельных случаях ундециламин). Это слабые основания с достаточно близкими константами протонирования [13–15]: значения $\lg K_p$ составляют 10,70 (пропиламин), 10,77 (2-бутиламин) и 10,39 (диизопропилэтиламин); для ундециламина данные отсутствуют. Однако многие низшие амины хорошо растворимы в воде и не обладают достаточной вязкостью, что может ограничить их применение в качестве неподвижной фазы. Ундециламин более вязкий, однако при его использовании не удалось получить удовлетворительные градиенты рН протяженностью более 2 ед. рН (вероятно, из-за его меньшей растворимости в водной подвижной фазе), поэтому в ряде дальнейших экспериментов для повышения вязкости неподвижной фазы низшие амины смешивали с полиэтиленгликолем. При постепенном титровании такой неподвижной фазы разбавленным раствором слабой кислоты, рН эфлюента, как и требуется, будет уменьшаться плавно, а ПЭГ будет способствовать удерживанию амина на внутренних стенках капилляра. Неподвижную фазу периодически вводили в тefлоновый капилляр с помощью инжектора и ждали завершения градиента, т.е. совпадения значений рН элюента и эфлюента, а затем вводили очередную порцию амина для формирования следующего градиента рН. Особенностью такого подхода является практически полный расход неподвижной фазы в ходе формирования градиента рН, что создает преимущества – из капилляра может быть легко удалена неподвижная фаза в случае необратимой сорбции разделяемых компонентов.

Изучено влияние природы неподвижной фазы на профиль градиента рН. С одной стороны, увеличение основности амина позволяет расширить рабочий диапазон градиента рН; с другой стороны, даже незначительное увеличение вязкости амина приводит к более плавному снижению рН эффлюента (таблица, рис. 1). В протонных средах основность аминов незначительно увеличивается в ряду диизопропилэтиламин < пропиламин ~ 2-бутиламин [14, 15]. Однако рабочий интервал градиента, полученного при использовании диизопропилэтиламина, был несколько шире, чем в случае 2-бутиламина и пропиламина, а время выхода градиента увеличивалось в ряду: пропиламин < 2-бутиламин < диизопропилэтиламин, что, вероятно, объясняется большей вязкостью диизопропилэтиламина [16] и его более прочным удерживанием в капилляре. Градиенты рН, полученные для пропиламина, имели экспоненциальную форму, рН эффлюента достаточно быстро (в течение 10–12 мин) снижалось до 5,2–5,5, а затем около 30–40 мин полностью возвращалось до значения элюента (таблица). Профиль градиента рН для диизопропилэтиламина был при этом более линейным и плавным. В то же время добавление ПЭГ, например, к пропиламину, увеличивает плавность градиента рН (таблица, рис. 1).

Для растворов алифатических аминов в ПЭГ изучено влияние их концентрации на формирование градиента. Рабочий интервал градиентов рН, полученных при использовании раствора пропиламина в ПЭГ, меньше, чем в случае применения индивидуальных аминов, что связано с уменьшением относительного содержания амина при неизменном объеме вводимого индуцирующего раствора. Вместе с тем

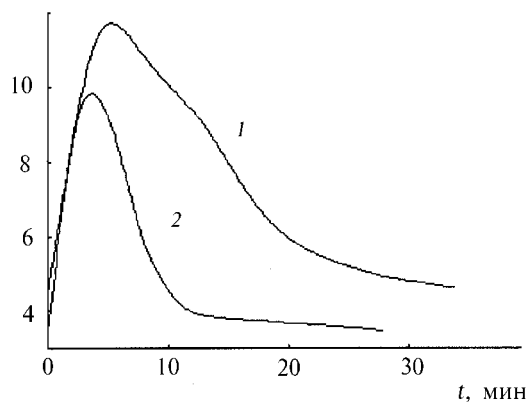


Рис. 1. Индуцирование нисходящих градиентов рН. Элюент – 2 мМ уксусная кислота; неподвижная фаза: 1 – диизопропилэтиламин, 2 – пропиламин в ПЭГ (1:1); скорость подачи элюента 0,8 мл/мин

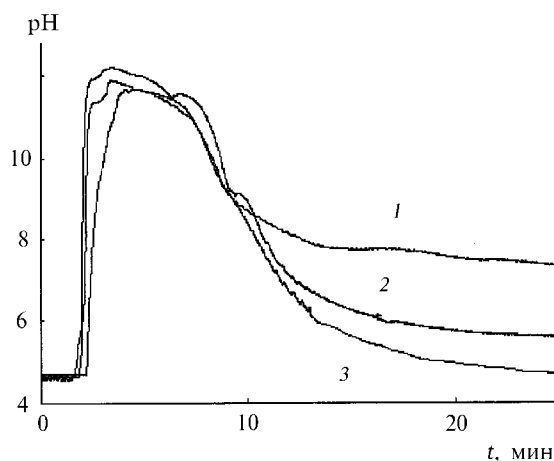


Рис. 2. Влияние состава свободной неподвижной фазы на профиль градиента рН. Элюент – 1 мМ уксусная кислота, 1 мМ 6-аминогексановая кислота, 0,5 мМ Трис; неподвижная фаза: 1 – пропиламин в ПЭГ (3:1), 2 – пропиламин в ПЭГ (2:1), 3 – пропиламин (1:1); скорость элюента 0,6 мл/мин

профиль градиента становится более плавным, практически линейным, а время выхода градиента растет за счет увеличения вязкости (рис. 2). При уменьшении содержания пропиламина в смеси с ПЭГ от 3:1 до 1:3 данные зависимости проявляются еще сильнее. Оптимальной представляется смесь пропиламина с ПЭГ в отношении 2:1 или 1:1. Видимо, использование растворов амина в полиэтиленгликоле вместо чистого реагента целесообразно лишь в случае пропиламина. Для растворов 2-бутиламина и особенно диизопропиламина в ПЭГ время выхода градиента рН, т.е. до момента совпадения значений рН элюента и эффлюента, слишком велико (около 80–100 мин).

Выбор подвижной фазы. Для того чтобы элюент обладал буферной емкостью в более широком диапазоне рН, он должен содержать слабые основания или амфолиты с равномерно распределенными значениями констант диссоциации в данном интервале рН. В качестве компонентов элюента выбрали уксусную и 6-аминогексановую кислоты и Трис, которые ранее успешно применяли для индуцирования нисходящих градиентов внутри анионообменных колонок [12]. Изучено индуцирование градиентов рН при использовании одно-, двух- и трехкомпонентных элюентов; концентрации компонентов при этом варьировали от 0,5 до 10 мМ. При переходе от элюентов, содержащих только уксусную кислоту, к двухкомпонентным элюентам на основе уксусной и аминоксесановой кислот рабочий интервал градиента закономерно расширяется (за счет сдвига начальной точки градиента в область высоких значений рН), а время выхода гра-

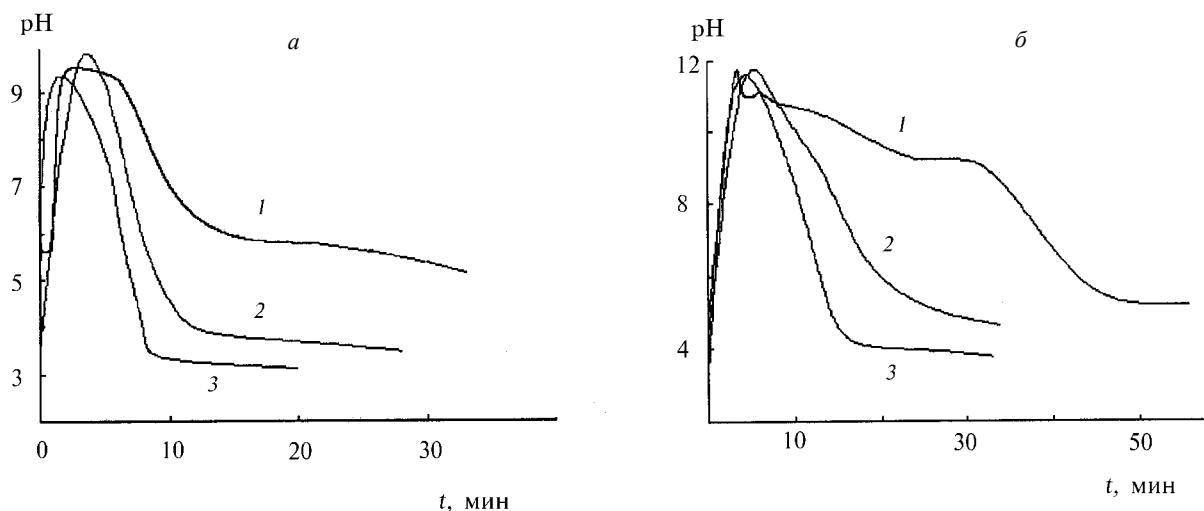


Рис. 3. Влияние на профиль градиента pH состава элюента (*а*: 1 – 1 мМ уксусная кислота, 1 мМ 6-аминогексановая кислота, 0,5 мМ Трис; 2 – 2 мМ уксусная кислота; 3 – 10 мМ уксусная кислота; НФ – пропиламин в ПЭГ (1:1); *б*: 1 – 1 мМ уксусная кислота, 1 мМ 6-аминогексановая кислота, 0,5 мМ Трис; 2 – 1 мМ уксусная кислота, 1 мМ 6-аминогексановая кислота; 3 – 2 мМ уксусная кислота; НФ – диизопропилэтиламин). Скорость элюента 0,8 мл/мин

диента несколько увеличивается (таблица, рис. 3, *а*, *б*). При дальнейшем переходе к трехкомпонентному элюенту, содержащему кроме кислот Трис, эти зависимости сохраняются, а профиль градиента становится еще более плавным. Видимо, для получения линейного градиента pH при использовании пропиламина в качестве неподвижной фазы оптимальные концентрации уксусной и аминоксесановой кислот в элюенте составляют 1–2 мМ, а Трис – 0,5 мМ (рис. 3, *а*). При использовании более основной неподвижной фазы (диизопропилэтиламина) на профиле градиента pH начинают появляться ступени, связанные с раститровыванием компонентов элюента за счет взаимодействия с неподвижной фазой (рис. 3, *б*). Ступень находится в области буферного действия Трис (pH > 9).

При использовании однокомпонентного элюента увеличение его концентрации (например, уксусной кислоты до 10 мМ) вызывает уменьшение времени выхода градиента (рис. 3, *а*).

Влияние скорости подачи элюента. В работе варьировали скорость подачи элюента от 0,4 до 0,8 мл/мин. Снижение скорости подачи элюента до 0,6 мл/мин практически не смещает начальную точку градиента и делает его профиль более плавным, линейным, нивелируются флуктуации pH, сглаживаются ступени (при этом незначительно увеличивается время выхода градиента pH) (рис. 4). Линейность градиента влияет на разрешение пиков разделяемых веществ, поэтому при уменьшении скорости подачи подвижной фазы возможно более глубокое разделение, хотя и сопряженное с увеличением длительности

анализа. При скорости подачи элюента 0,4 мл/мин начальная точка градиента (или максимальное значение pH на профиле градиента) несколько смещается, общее время выхода градиента значительно увеличивается, что затрудняет практическое применение таких условий.

На наш взгляд, наиболее интересными для практического применения представляются градиенты, полученные в следующих системах (таблица):

а) неподвижная фаза – пропиламин в ПЭГ (1:1), элюент – 2 мМ уксусная кислота (или 1 мМ уксусная кислота) + 1 мМ аминоксесановая кислота + 0,5 мМ Трис; скорость подачи элюента 0,6–0,8 мл/мин;

б) неподвижная фаза – диизопропилэтиламин, элюент – 2 мМ (или 1 мМ) уксусная кислота + 1 мМ

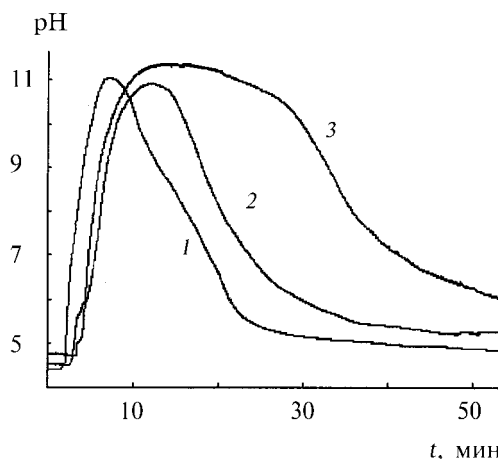


Рис. 4. Влияние скорости подачи элюента на профиль градиента pH. Элюент: 2 мМ уксусная кислота, 1 мМ 6-аминогексановая кислота, 0,5 мМ Трис; НФ: диизопропилэтиламин. Скорость подачи элюента: 1 – 0,8 мл/мин, 2 – 0,6 мл/мин, 3 – 0,4 мл/мин

Примеры систем для индуцирования нисходящих градиентов рН в капиллярах со свободной неподвижной фазой

Свободная неподвижная фаза	Подвижная фаза	Скорость подвижной фазы, мл/мин	Рабочий диапазон рН	Время выхода градиента рН, мин
Диизопропилэтиламин	2 мМ уксусная к-та, 1 мМ аминокaproновая к-та, 0,5 мМ Трис	0,8	4,50–11,05	32–35
То же	то же	0,6	4,55–10,90	47–50
То же	то же	0,4	4,55–11,35	более 60
2-Бутиламин	то же	0,8	4,55–10,70	30–32
То же	то же	0,6	4,48–11,37	22–23
Пропиламин	то же	0,8	4,55–11,70	35–36
То же	то же	0,6	4,55–11,35	47–50
То же	то же	0,4	4,55–11,85	более 70
Диизопропилэтиламин	1 мМ уксусная к-та, 1 мМ аминокaproновая к-та, 0,5 мМ Трис	0,4	4,62–11,45	75–77
Пропиламин	то же	0,6	4,62–12,20	более 50
Пропиламин в ПЭГ(2:1)	то же	0,6	4,65–11,70	12–15
Пропиламин в ПЭГ(1:1)	то же	0,6	4,65–11,90	15–16

аминокaproновая кислота + 0,5 мМ Трис; скорость подачи элюента 0,6–0,8 мл/мин. Полученные градиенты хорошо воспроизводимы (до 0,05 ед. рН) при проведении параллельных экспериментов и отличаются широким рабочим интервалом (до 7–7,2 ед. рН). Такие градиенты можно применять при препаративном разделении веществ, находящихся в молекулярной форме при высоких значениях рН, следовательно, лучше распределяющихся в менее полярной неподвижной фазе, диссоциирующих в нейтральной и слабокислой области рН и при этом переходящих в элюент.

Представляется возможным несколько модифицировать хроматографическую систему для получения нисходящего линейного градиента рН, выбрав в качестве индуцирующего реагента достаточно гидрофобный полиамин с высокой вязкостью, обладающий набором констант протонирования в широком диапазоне. Свободной неподвижной фазой в этом случае может являться как сам амин (например, полиэтиленмин или тетраэтиленпентамин), так и его растворы переменной концентрации. Такие системы будут предметом дальнейшего исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Counter-Current Chromatography. Editors: J.M.Menet, D.Thiebaut. New York-Basel: Marcel Dekker, 1999.
2. Zolotov Yu.A., Spivakov B.Ya., Maryutina T.A. // Fresenius' Z. Anal. Chem. 1989. 35. S. 938.

3. Спиваков Б.Я., Марютина Т.А., Федотов П.С. и др. // ЖАХ. 2002. **57**. №10. С. 1096.
4. Kitazume E., Higashiyama T., Sato N. et al. // Anal. Chem. 1999. **71**. P. 5515.
5. Slais K., Horka M., Klerarnik K. // J.Chromatogr. 1992. **605**. P.167.
6. Slais K., Horka M. // J. High Resol. Chromatogr. 1993. **16**. P.194.
7. Шпигун О.А., Пирогов А.В., Иванов А.В. и др. // ЖФХ. 2004. **78**. №6 (в печати).
8. Иванов А.В., Тессман А.Б., Пирогов А.В. // ЖФХ. 2003. **77**. №5. С. 936.
9. Nesterenko P.N., Ivanov A.V. // J.Chromatogr. 1994. **671**. P. 95.
10. Иванов А.В., Вакутейн М.С., Нестеренко П.Н. и др. // ЖФХ. 2003. **77**. №12. С. 2241.
11. Janesek M., Slais K. // Chromatographia. 1993. **36**. P. 246.
12. Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // Изв. вузов. Химия и химтехнология. 1999. **42**. №2. С. 122.
13. Кудрявцев Г.В., Лисичкин Г.В. // ЖФХ. 1981. **55**. №5. С. 1352.
14. Sillen L.G., Martell A.E. Stability Constants. L., The Chemical Society. 1964. Spec. Publ. N 17.
15. Sillen L.G., Martell A.E. Stability Constants. Supplement. Issue. L., The Chemical Society, 1971. Spec. Publ. N 25.
16. Темникова Т.И. Курс теоретических основ органической химии. Л., 1968.

Поступила в редакцию 11.03.04

THE DECREASING INDUCED pH GRADIENTS IN LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLOWING RETENTIVE STATIONARY PHASE

A.V. Ivanov, S.S. Kubyshev, P.N. Nesterenko

(Division of Analytical Chemistry)

The decreasing pH gradients in capillars with flowing retentive stationary phase were formed by inducing technique. Propylamine, 2-buthylamine and diisopropylethylamine were choosen as reagents for inducing pH-gradient in a capillar, and for sing as flowing retentive stationary phase. The solutions of acetic and aminohexanoic acids and Tris at different concentrations (0,5 - 10 mM) were used as components of eluent.