

УДК 541.544:681.3

МОДЕЛЬ ИНДУЦИРОВАНИЯ ВОСХОДЯЩИХ ГРАДИЕНТОВ pH В КАПИЛЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.Б. Тессман, А.В. Иванов

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

Предложены физико-химическая и математическая модели индуцирования градиентов pH внутри капилляров со свободной неподвижной фазой. На основе предложенных моделей разработана программа "pH-gradient-calculator" для расчета профиля восходящего градиента pH в системе, содержащей вязкую органическую кислоту в качестве свободной неподвижной фазы и буферный элюент, представляющий собой смесь водного раствора слабого основания и органического растворителя.

Элюирование с градиентом pH эффективно улучшает разрешающую способность хроматографической системы, а также позволяет повысить нагрузочную емкость ионообменной колонки. Градиенты pH в жидкостной хроматографии формируют либо до колонки, смешивая несколько растворов с разными значениями pH по заданной программе, либо непосредственно внутри колонки. Доколоночные линейные градиенты обычно формируют в интервале не более 2–2,5 ед. pH; их физико-химическое и математическое описание хорошо разработано, так как оно не требует рассмотрения гетерогенных равновесий в динамической системе [1–3].

Гораздо больший интерес исследователей вызывает внутриколоночное формирование градиентов pH, основанное на кислотно-основных и ионообменных взаимодействиях сорбента и буферных подвижных фаз [2, 3]. Слабоосновную анионообменную или слабокислотную катионообменную колонку уравнивают стартовым буферным раствором до начального значения pH, а затем пропускают буферный элюент (раствор полиамфолита или смесь нескольких низкомолекулярных амфолитов или протолитов) при значении pH, соответствующем конечной точке градиента. Формирование линейного нисходящего градиента pH, например, в анионообменной системе можно представить в первом приближении как постепенное титрование полиоснования (т.е. групп сорбента) поликислотой (компонентами элюента) в гетерогенной системе. Данный подход используют при градиентном элюировании в хроматофокусировании – методе разделения цвиттер-ионных соединений [4]. При правильном выборе сорбента и подвижных фаз удается сформировать внутренний линейный градиент pH протяженностью до 3–5, а иногда и до 6 ед. pH [5–7]. Метод отличается простотой аппаратного оформ-

ления и высокой воспроизводимостью градиентов pH [3, 4]. Однако до недавнего времени вследствие сложности математического описания гетерогенных равновесий в динамических условиях выбор хроматографической системы для формирования внутренних градиентов pH был основан на эмпирическом подходе [3, 8, 9]. Физико-химическое моделирование процесса не только позволяет исследователю сэкономить время и реактивы при поиске оптимальных условий, но и лучше понять сами процессы. Нами предложена физико-химическая модель формирования внутренних градиентов в хроматофокусировании, учитывающая в явном виде гомогенные и гетерогенные равновесия в динамической ионообменной системе [8]. Использование модели позволяет объяснить известные из литературы и экспериментальных данных особенности профиля градиента pH и предсказать не известные ранее эффекты, например, влияние ионной силы подвижных фаз [10].

Техника индуцирования внутренних градиентов pH [7, 11] основана на постоянном пропускании через ионообменную колонку буферного элюента при определенном значении pH и периодическом вводе в поток элюента ограниченных объемов концентрированного индуцирующего раствора при резко отличающемся pH, что приводит к быстрому переуравновешиванию хроматографической колонки. Этот метод позволяет существенно (в 3–4 раза) сократить время формирования градиентов pH по сравнению с техникой хроматофокусирования. Показана перспективность использования техники индуцирования в варианте капиллярной жидкостной хроматографии со свободной неподвижной фазой [12] для создания восходящих градиентов pH [13]. Выбор оптимальных условий экспериментов основан исключительно на эмпирическом подходе [13]. Представляется интересным

предложить физико-химическую и математическую модели индуцирования градиента рН внутри капилляров со свободной неподвижной фазой и на основе этого разработать соответствующее программное обеспечение. В результате компьютерных экспериментов можно найти закономерности, связывающие входные параметры модели с полученными градиентами рН, что поможет логически подойти к выбору подвижной и неподвижной фаз. Завершающим этапом работы может быть проверка адекватности предложенной модели.

Экспериментальная часть

Методика получения градиентов рН. Для индуцирования градиентов рН в капиллярах (внутренний объем до 1 мл) применили методику, предложенную в [13]. В качестве реагента для индуцирования градиента рН, одновременно являющегося неподвижной фазой, выбраны октановая и гептановая кислоты. В качестве элюента использовали 2–20 мМ растворы тетрабората натрия в водно-метанольной или водно-ацетонитрильной смеси (содержание органического растворителя 10–40%). В работе 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, тефлонового или металлического капилляра, цифрового рН-метра ОР-208/1 (*Radelkis*, Венгрия) с проточной микроячейкой объемом 15 мкл для измерения рН эфлюента, самописца TZ-4620 (*Laboratorni pristroje*) для регистрации выходных кривых рН. Хроматографическое оборудование было любезно предоставлено профессором Карелом Шлайсом (Институт аналитической и прикладной химии АН Чехии, г. Брно).

Через капилляр в течение 10–20 мин пропускали элюент с верхним значением интервала рН, вводили в инжектор 5 мкл октановой или гептановой кислоты* с нижним значением интервала рН и регистрировали рН эфлюента.

Компьютер. Программа “*pH-gradient-calculator*” написана на языке *Visual Basic* в виде *Excel*-приложения [14]. Размер *exe*-файла составляет 366 кБ. Расчет градиентов рН проводили на персональном ком-

пьютере Р-III (тактовая частота 800 МГц, 256 Мб RAM, жесткий диск 20 Гб, операционная система *Windows 98 SE*). Программа устойчиво и комфортно работает на персональных компьютерах с процессором Pentium с тактовой частотой 200 МГц и 64 Мб оперативной памяти.

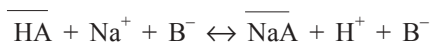
Обсуждение результатов

Физико-химическая модель. В качестве свободной неподвижной фазы в капиллярной жидкостной хроматографии предложено использовать жидкости, не смешивающиеся с водой и обладающие достаточно высокой вязкостью и плотностью [12, 13]. Фазы называются “свободными”, поскольку постепенно вымываются из капиллярной колонки, хотя и с гораздо меньшей скоростью, чем через колонку проходит подвижная водная или водно-органическая фаза. В случае необратимой сорбции или распределения анализируемых веществ колонку можно легко освободить от отработанных неподвижных фаз и заполнить новой порцией неподвижной фазы [12]. Если в капилляр вводят вязкую гидрофобную кислоту (например, октановую или гептановую), а в качестве элюента используют раствор слабого основания, то мы получаем некий аналог катионообменной хроматографии с восходящим градиентом рН. Рассмотрим индуцирование градиента рН поэтапно на уровне модельных представлений о системе. После ввода кислоты НА можно наглядно представить следующие процессы (рис. 1): внутренние стенки тефлонового капилляра

Рис. 1. Модельные процессы внутри капилляра со свободной неподвижной фазой

*В отдельных экспериментах в инжектор вводили 50 мкл октановой (гептановой) или смесь кислот (1:1).

модифицируются вязкой кислотой, но толщина слоя кислоты по длине капилляра неравномерна. Часть кислоты, не сорбированная на стенках, выходит из капилляра, что приводит к резкому снижению рН эффлюента. Элюент, содержащий слабое основание NaB, постепенно титрует кислоту HA, и на поверхности слоя кислоты образуются участки сопряженного основания NaA:



(черта показывает, что слабая гидрофобная кислота, удерживаемая на стенках капилляра, выступает в роли неподвижной фазы).

Константу этого процесса можно записать в следующем виде:

$$K = \frac{[\overline{\text{NaA}}][\text{H}^+][\text{B}^-]}{[\overline{\text{HA}}][\text{Na}^+][\text{B}^-]}$$

или сокращенно как константу ионного обмена H^+ на Na^+ :

$$\tilde{K}(\text{H}^+, \text{Na}^+) = \frac{[\overline{\text{Na}^+}][\text{H}^+]}{[\text{H}^+][\overline{\text{Na}^+}]}$$

Сопряженное основание NaA содержит гидрофобный кислотный остаток и благодаря этому некоторое время удерживается на внутренних стенках капилляра (рис. 1). При дальнейшем титровании кислоты выходят компоненты NaB (первоначально содержащийся в подвижной фазе) и NaA (постепенно смываемый со стенок капилляра в результате экстрагирования водно-органической смесью). В результате на выходе капилляра рН плавно возрастает, пока не достигнет значения рН элюента на входе в капилляр. По мере оттитровывания кислоты HA и элюирования сопряженного основания NaA на стенках капиллярной колонки остаются только отдельные участки с этими компонентами, которые к моменту совпадения значений рН на входе и выходе колонки также удаляются (рис. 1). Таким образом, стенки капилляра снова становятся немодифицированными, и можно вводить в систему новую порцию индуцирующей кислоты HA.

В соответствии с предложенными модельными представлениями о формировании градиента рН разрабатывали блок-схему программы с последовательными итерациями [15].

Блок-схема программы “*pH-gradient-calculator*” представлена на рис. 2. Для расчета восходящих гра-

диентов рН внутри капилляров со свободной неподвижной фазой необходимо ввести параметры капилляра (его внутренний диаметр и длину), скорость подачи элюента, состав элюента (природу и концентрацию слабого основания, значения *pK* этого основания или сопряженной с ним кислоты), содержание органического растворителя в элюенте; природу и количество введенной неподвижной фазы, ее протолитические характеристики, динамическую вязкость, предельную растворимость в водно-органических смесях и т.п. Капиллярная колонка условно разбивается на *N* секций, для каждой из которых последовательно рассчитывают входящий и выходящий параметры – состав элюента и неподвижной фазы до и после их взаимодействия соответственно. Таким образом, выходящие параметры фаз для *n*-1-й секции являются входящими для *n*-й секции. В результате мы получаем значения рН подвижной фазы в каждой секции колонки, общее время формирования градиента рН и, наконец, общую зависимость рН эффлюента от времени или от объема пропущенной подвижной фазы.

Параметры, используемые в физико-химической модели, можно разделить на три группы: 1) априорно известные из литературных данных; 2) неизвестные априорно, но количественно определяемые или оцениваемые экспериментально; 3) неизвестные и не поддающиеся непосредственному экспериментальному определению, т.е. подбираемые эмпирически. Так, вязкость и гидрофобность кислот, используемых в качестве неподвижной фазы, известна из литературных данных [13], а для нахождения протолитических свойств кислот и тетраборат-иона в водно-органических смесях с переменным содержанием метанола или ацетонитрила было предпринято отдельное исследование [16]. Предельную растворимость активных компонентов в водно-органических смесях также оценивали экспериментально.

Интерфейс программы. Программа “*pH-gradient-calculator*” написана в виде *Excel*-приложения с удобным и интуитивно понятным пользовательским интерфейсом (рис. 3).

Параметры системы разбиты на блоки: “Колонка”, “Условия эксперимента”, “Подвижная фаза”, “Кислота” (т.е. кислота, используемая в качестве неподвижной фазы). Блок “Подвижная фаза” для удобства разделен еще и на секции: “Активный компонент (основание)” (указана брутто-формула, в данном случае $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), “Органический растворитель”, “Неорганический растворитель”.

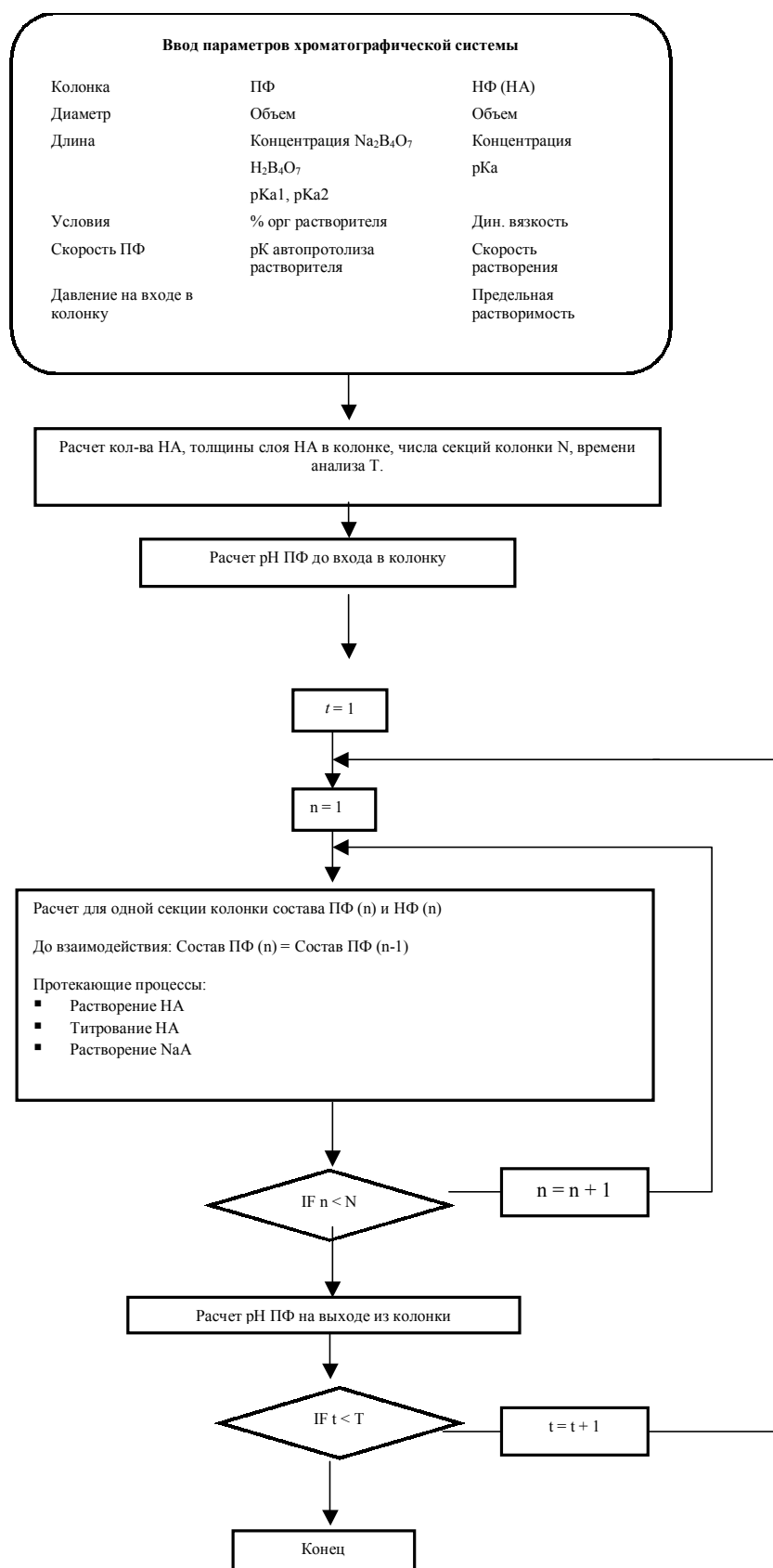


Рис. 2. Блок-схема программы “pH-gradient-calculator”. Пояснения даны в тексте

Белым цветом выделены задаваемые пользователем или варьируемые параметры. Так, например, пользователь может варьировать длину и внутренний диаметр капиллярной колонки, содержание $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ и органического растворителя в элюенте, температуру проведения эксперимента и т.п. При этом следует помнить, что при варьировании температуры надо задать соответствующее значение pK автопротолиза воды (или другого растворителя), а при варьировании природы и содержания метанола или ацетонитрила в элюенте – задать соответствующие значения pK_a борной кислоты в водно-органических смесях, определенные экспериментально по данным потенциометрического титрования [16]. Среди варьируемых параметров можно видеть значение “g” ($9,8 \text{ м/с}^2$). Этот параметр следует варьировать при переходе от неподвижно вращающихся капилляров к капиллярам, помещенным в планетарную центрифугу – к так называемой “противоточной хроматографии” [12].

Серым цветом выделены неварьируемые, зависящие или рассчитываемые параметры. Так, при изменении длины капилляра или его диаметра автоматически обновляется связь с параметром “объем колонки”, и в этой ячейке появляется новое, рассчитанное значение внутреннего объема капилляра. Остальные зависимые параметры – например, количество секций в колонке, средняя толщина слоя неподвижной фазы, максимальное и минимальное значение pH на профиле градиента и др. – рассчитываются после задания варьируемых входящих параметров и нажатия кнопки “Расчет pH-градиента”.

В дальнейшем предполагается перевести кислотно-основные характеристики растворителей и активных компонентов элюента в разряд зависимых параметров, которые будут автоматически изменяться при вводе температуры проведения эксперимента или при вводе содержания и природы растворителя в элюенте. Диалоговое окно программы представлено для системы: элюент – раствор $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ в водно-органической смеси, свободная неподвижная фаза – гептановая или октановая кислота, но при желании пользователь может задать и другие, подобные системы.

Расчетные градиенты pH. После нажатия кнопки “Расчет градиента” пользователь автоматически переходит к диалоговому окну, отображающему профиль градиента pH для заданной системы (рис. 4). Время, затрачиваемое на расчет, составляет в зависимости от

сложности заданной системы от 10 с до 1 мин (на компьютере P-III, 128 Мб RAM). Можно перейти к диалоговому окну в виде таблицы, детально показывающей состав фаз, толщину слоя и pH в каждой секции колонки и точные значения pH эффлюента на выходе из колонки в зависимости от времени. Эту информацию при необходимости можно скопировать в буфер обмена и перенести в другие графические программы, например в “Sigma Plot” или “Origin”, или вывести на печать.

Для того чтобы узнать точно минимальное и максимальное значения pH на профиле градиента, среднюю толщину слоя неподвижной фазы в колонке, количество секций колонки и другие зависимые параметры, следует вернуться к главному диалоговому окну программы (рис. 3).

Представленный на рис. 4 расчетный градиент pH воспроизводит все основные особенности индуцированных восходящих градиентов, полученных нами экспериментально в системах со свободной неподвижной фазой [13]. После введения индуцирующей вязкой кислоты наблюдается резкое снижение pH эффлюента (в течение 2–4 мин). Затем идет участок градиента с достаточно плавным, практически линейным увеличением pH до 7,0–7,5, после которого pH меняется экспоненциально, пока не достигает начального значения, соответствующего pH подвижной фазы до ввода индуцирующего агента. Расчетные и экспериментальные градиенты, полученные при одинаковых условиях: содержании органического растворителя, концентрации $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, скорости подачи элюента, для одинаковых кислот хорошо согласуются на качественном уровне.

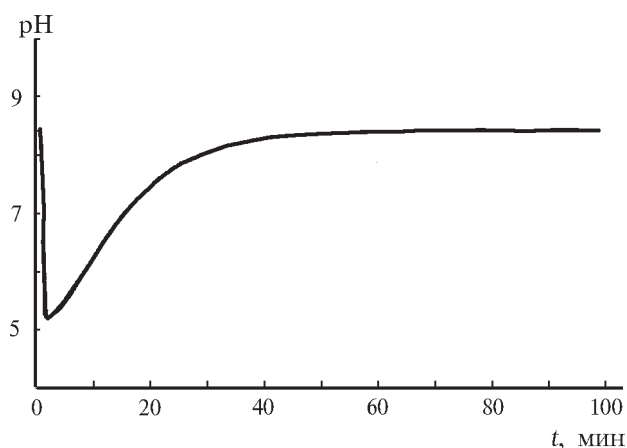


Рис. 4. Диалоговое окно приложения с изображением расчетного градиента pH

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жидкостная колоночная хроматография / Под ред. З. Дейла и др. Т.1. М., 1978.
2. Jandera P., Churacek J. Gradient elution in column liquid chromatography: theory and practice. Amsterdam-Oxford-N.Y.-Tokio, 1985.
3. Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // ЖАХ. 1999. **54**. С. 566.
4. Amersham Biosciences BioDirectory (Catalogue). Uppsala, 2003. P. 521-522, 667-668.
5. Иванов А.В., Тессман А.Б., Нестеренко П.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия. 2001. **42**. С. 109.
6. Иванов А.В., Вахитейн М.С., Хасанова Е.М. // Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия. 2003. **44**. С. 318.
7. Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // Изв. вузов. Химия и химтехнология. 1999. **42**. С. 122.
8. Гармаш А.В., Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // ЖФХ. 1997. **71**. С. 1683.
9. Bates R., Frey D.D. // J. Chromatogr. 1998. **814**. P. 43.
10. Гармаш А.В., Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // ЖФХ. 1997. **71**. С. 2054.
11. Janacek M., Slais K. // Chromatographia. 1993. **36**. P. 246.
12. Counter-current chromatography. Editors: J.M.Menet, D.Thiebaut. N.Y., 1999.
13. Иванов А.В., Тессман А.Б., Пирогов А.В. // ЖФХ. 2003. **77**. С. 934.
14. Бойс Дж. Использование Microsoft Office 97. Профессиональный выпуск. К.;М.;СПб, 1998.
15. Банди Б. Методы оптимизации: вводный курс. М., 1988.
16. Тессман А.Б., Иванов А.В., Кубышев С.С. // Хроматография и хроматографические приборы. Тез. докл. Всеросс. симп. М., 2004. С. 162.

Поступила в редакцию 19.04.04

A MODEL OF INDUCED INCREASING PH GRADIENTS IN CAPILLARY LIQUID CHROMATOGRAPHY

A.B. Tessman, A.V. Ivanov

(Analytical Chemistry Division)

The physico-chemical and mathematic model of inducing pH gradients within capillars with flowing retentive stationary phase were suggested. The program "pH-gradient-calculator" for simulation of increasing pH gradient profile within system, including viscous organic acid as flowing retentive stationary phase and a mixture of weak-base water solution with organic solvent as buffer eluent, was worked out with usage of suggested models.