

УДК 543.544

РОЛЬ ИНЕРТНОГО КОМПОНЕНТА ЭЛЮЕНТА ПРИ ИНДУЦИРОВАНИИ ГРАДИЕНТОВ pH В КАПИЛЛЯРАХ СО СВОБОДНОЙ НЕПОДВИЖНОЙ ФАЗОЙ

С.С. Кубышев, А.В. Иванов

(кафедра аналитической химии)

Исследовано влияние инертного компонента – сильного электролита (NaCl) в элюенте на профиль нисходящих и восходящих градиентов pH, полученных внутри капилляров со свободной неподвижной фазой с применением техники индуцирования. При создании ионной силы в однокомпонентном элюенте удается получить более плавные линейные градиенты pH.

Техника индуцирования градиентов pH в ионообменных колонках, предложенная в [1–3], основана на введении ограниченного объема концентрированного индуцирующего раствора (при одном значении pH, соответствующем началу градиента) в поток буферного элюента (при резко отличающемся значении pH). За счет высокой концентрации индуцирующего раствора происходит быстрое уравнивание ионных групп сорбента до начального значения градиента pH, а затем – постепенное титрование ионообменника разбавленным элюентом, что приводит к практически линейному изменению pH на выходе из колонки до полного совпадения со значением pH элюента, т.е. к градиенту. Как правило, в катионообменных колонках (при использовании кислотного индуцирующего раствора) получают восходящий градиент pH, в анионообменных (при использовании основного индуцирующего раствора) – нисходящий [2]. По сравнению с техникой хроматофокусирования, техника индуцирования позволяет сократить время эксперимента в 3–5 раз, поскольку не требует дополнительного уравнивания колонки стартовым раствором после завершения градиента [4]. При создании определенной концентрации инертного компонента – сильного электролита (например, NaCl) в обеих подвижных фазах удается сформировать внутри ионообменной колонки квазилинейный градиент в широком диапазоне pH, используя элюент на основе только одного активного компонента (например, уксусной кислоты [5]). Помимо этого, техника индуцирования представляется перспективной для формирования градиентов в варианте хроматографии со свободной неподвижной фазой [6–8], поскольку не требует последовательной замены элюентов со ступенчатым изменением pH [9]. В настоящей

работе исследовано влияние инертных компонентов на индуцирование градиентов pH внутри капилляров со свободной неподвижной фазой.

Экспериментальная часть

Аппаратура. Хроматографическая система состояла из насоса высокого давления “Beckman-114 M” (США), инжектора “Rheodyne-7125” (США) с объемом петли 1 мл, тefлонового капилляра с внутренним объемом 1 мл (внутренний радиус 0,4 мм, длина ~200 см), цифрового pH-метра “HM-20S” (“TOA-Electronics”, Япония) с комбинированным электродом GST-5211С и проточной ячейкой. Сигнал pH-метра регистрировали на самописце “Line Recorder 2210” (“LKB”, Швеция).

Реагенты. В качестве элюента для получения нисходящих градиентов pH использовали 1-5 мМ растворы CH_3COOH , приготовленные из препарата квалификации “для ВЭЖХ” (“J.T.Baker”, США); в качестве индуцирующего реагента – раствор пропиламина в полиэтиленгликоле (ПЭГ) (1:1) или раствор полиэтиленимина в воде (1:3 по объему), приготовленные из препаратов фирмы “Merck” (Германия). Для восходящих градиентов использовали элюент на основе 10 мМ раствора $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ в 20%-м CH_3CN , градиент индуцировали октановой кислотой (“Merck”, Германия). Ионную силу в элюенте создавали добавлением рассчитанного объема 2 М раствора NaCl, приготовленного из фиксанала (“Germed”, Германия).

Методика эксперимента. Через капилляр пропускали элюент в течение 10–15 мин до установления базовой линии, вводили через инжектор 200 мкл индуцирующего раствора и непрерывно регистрировали pH эфлюента.

Обсуждение результатов

Особенность индуцирования градиентов рН внутри капилляров со свободной неподвижной фазой состоит в том, что индуцирующий реагент, распространяясь по стенкам капилляра, одновременно служит и свободной неподвижной фазой [6], поэтому в качестве индуцирующих реагентов предпочтительно использовать более вязкие и по возможности более гидрофобные вещества — такие, как октановая кислота [6], растворы аминов в ПЭГ [7] или растворы полиэтиленимина [8]. Кроме природы и вязкости индуцирующего раствора на профиль градиента наиболее существенно влияет состав элюента. Роль кислотно-основных свойств и концентрации активных (рН-определяющих) компонентов элюента мы уже подробно рассмотрели в предыдущих публикациях [6–8]. Однако инертные компоненты элюента (сильные электролиты), не определяющие рН явным образом, также могут существенно влиять на профиль градиента, способствуя увеличению его плавности. Заметим, что в варианте капиллярной жидкостной хроматографии со свободной неподвижной фазой сильный электролит не может быть добавлен непосредственно в индуцирующий раствор, в отличие от формирования градиентов внутри ионообменных колонок.

На основании предыдущих исследований в качестве оптимизируемых хроматографических систем были выбраны такие, в которых получены достаточно линейные градиенты рН. Для упрощения систем работали с элюентами, содержащими только один активный компонент — уксусную кислоту.

Нисходящие градиенты рН. В качестве модельной выбрали систему: пропиламин в ПЭГ (1:1) (индуцирующий раствор)—2,5 мМ уксусная кислота (элюент). Градиент, полученный для данной системы, можно назвать квази-линейным — он состоит из трех линейных участков с разным наклоном (рис. 1, кривая 1), достаточно плавно переходящих друг в друга. Однако наиболее плавный участок градиента лежит в области рН от 12,7 до 10,5, которая редко используется для разделения, а на следующем участке рН резко снижается до 5,8. С точки зрения практического применения надо добиться большей плавности градиента в области рН от 9,5 до 5, а первый участок по возможности сократить. При добавлении NaCl в элюент до концентрации 0,05 М участки градиента заметно сглаживаются, а наклон градиента становится практически постоянным на всем рабочем диапазоне рН (рис. 1, табли-

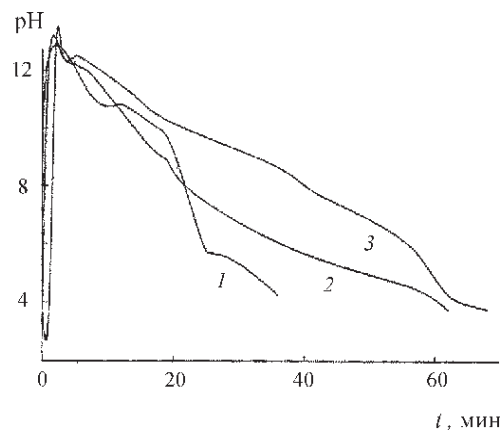


Рис. 1. Оптимизация профиля нисходящего градиента рН при $c(\text{NaCl})$, М: 1 — 0, 2 — 0,05, 3 — 0,1 (элюент — 2,5 мМ CH_3COOH ; свободная неподвижная фаза — пропиламин в ПЭГ (1:1) (50 мкл); остальные условия приведены в таблице)

ца). Естественно, это сопровождается увеличением выхода градиента. Повышение концентрации NaCl в элюенте до 0,1 М уже не приводит к принципиальным изменениям формы градиента рН, только увеличивается время выхода градиента (на 10–12 мин), что, на наш взгляд, неоправданно при практическом использовании градиента. Введение сильного электролита (NaCl) в элюент вызывает в первую очередь изменение условных констант протонирования аминогрупп в составе свободной неподвижной фазы. В присутствии сильного электролита меняется также соотношение протонированных и непротонированных форм пропиламина в ПЭГ, что расширяет диапазон буферной емкости неподвижной фазы. Изменение условной константы кислотности для активного компонента элюента в присутствии NaCl, по-видимому, мало сказывается на профиле градиента рН. Оптимальным элюентом для данной системы можно считать 2,5 мМ уксусную кислоту при содержании NaCl на уровне 0,05 М (таблица). В случае использования водного раствора (1:3) полиэтиленимина в качестве индуцирующего повышение ионной силы в элюенте до 0,05 М привело, с одной стороны, к увеличению времени выхода градиента, с другой стороны — на плавных участках градиента стали возникать кратковременные подъемы рН. Вероятно, это связано с тем, что полимерные молекулы полиэтиленимина в присутствии сильного электролита переходят в свернутые конформации или глобулы [10], что способствует периодическому отрыву полиэтиленимина с внутренних стенок тефлонового капилляра и переносу неоттитрованных молекул полиэтиленимина вместе с потоком элюента. Подобное

Характеристики индуцированных градиентов рН

| Неподвижная фаза, мкл | Состав элюента (рН); скорость расхода элюента, мл/мин | Интервал градиента рН | Время выхода градиента, мин* |
|--------------------------------|---|-----------------------|------------------------------|
| нисходящие градиенты | | | |
| Пропиламин в ПЭГ (1:1), 50 мкл | 2,5 мМ уксусная кислота (рН 3,70); 0,6 мл/мин | 12,70–3,80 | 34–37 |
| Та же | 2,5 мМ уксусная кислота + 0,05 М NaCl (рН 3,68); 0,6 мл/мин | 12,70–3,75 | 60–64 |
| Та же | 2,5 мМ уксусная кислота + 0,1 М NaCl (рН 3,64); 0,6 мл/мин | 12,65–3,75 | 72–75 |
| восходящие градиенты | | | |
| Октановая кислота, 200 мкл | 10 мМ Na ₂ B ₄ O ₇ в 20 %-м CH ₃ CN (рН 9,10); 1,0 мл/мин | 5,55–8,90 | >70 |
| Та же | 10 мМ Na ₂ B ₄ O ₇ в 20 %-м CH ₃ CN + 0,05 М NaCl (рН 9,15); 1,0 мл/мин | 5,40–9,05 | 18–21 |
| Та же | 10 мМ Na ₂ B ₄ O ₇ в 20 %-м CH ₃ CN + 0,5 М NaCl (рН 9,25); 1,0 мл/мин | 5,25–9,20 | 10–13 |

*Время снижения рН от максимального до значения рН элюента.

смывание полиэтиленимина с поверхности капилляра отмечалось и ранее — при повышении объемной скорости элюента [8].

Таким образом, для неподвижных фаз на основе растворов полиэтиленимина оптимизировать профиль градиента рН лучше за счет варьирования концентрации активных компонентов элюента, не добавляя сильный электролит.

Восходящие градиенты рН. Изучено влияние ионной силы на формирование восходящих градиентов рН в системе: октановая кислота (индуцирующий раствор)—10 мМ Na₂B₄O₇ в 20%-м растворе ацетонитрила (элюент) (таблица). Октановая кислота обладает достаточно высокой вязкостью (5,83 сантипуаз при 20°C) [11] и гидрофобностью, поэтому она хорошо удерживается на стенках капилляра, что способствует формированию более протяженного по времени градиента. В отсутствие инертного компонента время выхода градиента от начального рН до значения рН элюента составляет >70 мин. Однако повышение рН до 8 происходит менее чем за 15 мин, и градиент имеет форму, близкую к экспоненциальной (рис. 2, кривая 1). При добавлении NaCl до 0,05 М в элюент время выхода градиента заметно снижается главным образом за счет сокращения участка в области рН 8–9,

а форма градиента становится более линейной (рис. 2, таблица).

Дальнейшее увеличение концентрации NaCl (до 0,1–0,5 М) привело к резкому искажению формы градиента — снова до экспоненциальной (рис. 2), что делает эту систему непригодной. При высокой концентрации сильного электролита в подвижной фазе сдвигается равновесие катионного обмена Н⁺

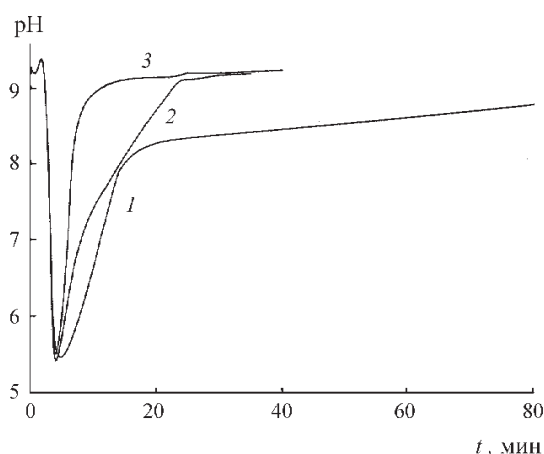


Рис. 2. Влияние ионной силы элюента на профиль восходящего градиента рН при $c(\text{NaCl}), \text{M}$: 1 — 0, 2 — 0,05, 3 — 0,1 (элюент — 10 мМ Na₂B₄O₇ в 20 %-м CH₃CN; свободная неподвижная фаза — октановая кислота (200 мкл); остальные условия в таблице)

на Na^+ на модифицированных стенках капилляра, и выход соли октановой кислоты с потоком элюента, видимо, приводит к быстрому повышению pH. Итак, для оптимизации профиля нисходящих гради-

ентов pH, индуцированных в капиллярах со свободной неподвижной фазой, целесообразно создавать ионную силу в элюенте до 0,05 М. Для восходящих градиентов создавать ионную силу не следует.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №05-03-33096).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Slais K.* // J. Microcol. Sep. 1991. **3**. P. 191.
2. *Janecek M., Slais K.* // Chromatographia. 1993. **36**. P. 246.
3. *Rejtar T., Slais K.* // J. Chromatogr. A. 1999. **838**. P. 71.
4. Amersham Biosciences Biodirectory (Catalogue). Uppsala, 2003.
5. *Иванов А.В., Вахштейн М.С., Хасанова Е.М., Нестеренко П.Н.* // ЖФХ. 2005. **79**. № 5. С. 940.
6. *Иванов А.В.* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2002. **43**. № 5. С. 296.
7. *Иванов А.В., Кубышев С.С., Нестеренко П.Н.* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2004. **45**. № 4. С. 240.
8. *Иванов А.В., Кубышев С.С., Нестеренко П.Н., Тесман А.Б.* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2005. **46**. № 1. С. 55.
9. *Kitazume E., Higashiyama T., Sato N. et al* // Anal. Chem. 1999. **71**. P. 5515.
10. *Гембицкий П.А., Жук Д.С., Каргин В.А.* Полиэтиленмин. М., 1971.
11. *Weissberger A.* Organic Solvents. Physical Properties and Methods of Purifications. N.Y., L., Sydney, Toronto, 1970.

Поступила в редакцию 01.05.05

THE INFLUENCE OF INERT COMPONENT OF THE ELUENT UPON INDUCING pH GRADIENT WITHIN THE CAPILLARS WITH FLOWING RETENTIVE STATIONARY PHASE

S.S. Kubyshev, A.V. Ivanov

(Division of Analytical Chemistry)

The influence of inert component (the strong electrolyte such as NaCl) in the eluent on decreasing and increasing pH gradients, induced within the capillars with flowing retentive stationary phase, has been investigated. The adjustment of ionic strength in the single-component eluent allows to form the smoother, more linear pH gradients.