

УДК 543.544:543.25

НЕПРЕРЫВНЫЙ КОНТРОЛЬ pH ЭФФЛЮЕНТА В ХРОМАТОГРАФИИ С ГРАДИЕНТОМ pH

А. В. Иванов, А. Б. Тессман

(кафедра аналитической химии)

Предложена проточная ячейка простой конструкции для непрерывного контроля pH в потоке эффлюента. Ее можно использовать как в варианте хроматографии в системе низкого давления на препаративных колонках, так и в варианте ВЭЖХ. Градиенты pH, полученные при непрерывном контроле и при измерении в собранных фракциях эффлюента, совпадают. На профиле градиентов pH наблюдали все известные из литературы эффекты.

Среди основных параметров подвижной фазы в жидкостной хроматографии, влияющих на процесс разделения, следует выделить pH подвижной фазы. При условии постоянства pH при изократическом элюировании не всегда удается достичь полного разделения компонентов анализируемой пробы за приемлемое время. В таком случае используют изменение pH подвижной фазы в процессе хроматографического разделения по определенному правилу, т.е. элюирование с градиентом pH [1, 2]. Градиенты pH вызывают все больший интерес как в аналитической, так и в препаративной жидкостной хроматографии, поскольку наряду с улучшением разрешающей способности системы позволяют повысить нагрузочные характеристики хроматографической колонки [1–3]. В настоящее время градиенты pH используют для разделения высокомолекулярных белков или лекарственных (биоактивных) препаратов, низкомолекулярных аминокислот, некоторых азокрасителей, органических многоосновных анионов и гуминовых кислот на ионообменных сорбентах, а переходных металлов – на хелатообразующих сорбентах [2–5].

С одной стороны, градиенты pH можно отнести к концентрационным, поскольку в основе их лежит изменение концентрации протонов (или гидроксония) в подвижной фазе; с другой стороны, в отличие от обычных концентрационных градиентов концентрация протонов изменяется в пределах двух и более порядков [3, 4]. Градиент концентрации кислоты/основания и градиент pH не обязательно симбатны [3], особенно в том случае, когда функциональные группы ионообменного сорбента обладают буферной емкостью и влияют на pH эффлюента [2, 3]. Таким образом, необходим контроль pH эффлюента на выходе из колонки, особенно при оптимизации условий элюирования и разделения. В препаративной ионообменной хроматографии обычно собирают фракции эффлюента через равные промежутки времени и измеряют pH в собранных фракциях [5–7]. Этот способ контроля pH трудоемок, а для аналитической высокоэффективной хроматографии практически неприемлем. В ВЭЖХ для непре-

рывного контроля pH эффлюента применяют pH-метры, оборудованные проточными ячейками с комбинированными электродами [8]. Однако такие устройства достаточно дороги, что заставляет исследователей разрабатывать свои конструкции ячеек и электродов [9, 10].

Цель данной работы состояла в создании проточной ячейки для измерения pH эффлюента, пригодной как в препаративной, так и аналитической хроматографии.

Экспериментальная часть

Аппаратура. Работу выполняли в хроматографической системе низкого давления, состоящей из сосуда с краном для элюента (*LKB-Bromma*, Швеция), четырехходового крана-дозатора, стеклянной хроматографической колонки 300×9 мм, заполненной сорбентом Dien-SiO_2 на основе Силохрома С-120 (100–160 мкм) с привитыми группами диэтилентриамин, перистальтического насоса «Multiperex-2115» (*LKB-Bromma*) или в системе ВЭЖХ, состоящей из насоса высокого давления «Beckman-114М» (США), петлевого дозатора «*Rheodyne-7125*» (США) с объемом петли 100 мкл, стальной колонки 250×4.6 мм, заполненной сорбентом Tetren- SiO_2 на основе Силасорба Si-600 (7.5 мкм) с привитыми группами тетраэтиленпентамина. К выходу колонки присоединяли проточную ячейку с рабочим объемом 3–4 мл, соединенную с перистальтическим насосом «*Varioprepex 2120*» (*LKB-Bromma*). Для измерения pH использовали pH-метр «pH-340» (ЗИП, СССР). Выходной сигнал регистрировали на самописце (*LKB-Bromma*).

Реагенты. Использовали растворы Трис- HCl , уксусной и щавелевой кислот, приготовленные из препаратов квалификации «ч.д.а.» (*Merck*, Германия); буферный элюент «*Polybuffer-74*», приготовленный разбавлением препарата фирмы *Pharmacia* (Швеция).

Методика эксперимента. Для формирования градиента pH внутри хроматографической колонки использовали технику хроматофокусирования [2, 3]: колонку уравнивали стартовым буферным раствором при pH, соот-

ветствующем начальной точке градиента (рН 7.5), а затем пропускали элюент при рН, соответствующем конечной точке градиента (рН 2.3–3.5). Ионную силу создавали добавлением NaCl в подвижные фазы.

Обсуждение результатов

Конструкция ячейки. Для более точного измерения рН в потоке объем ячейки должен быть минимальным, вместе с тем измерительная часть электродов должна покрываться измеряемым раствором. Электроды, прилагаемые к рН-метру «рН 340», непригодны для этой цели из-за достаточно большого размера. Поэтому мы использовали электроды от полевых иономеров (индикаторный стеклянный электрод ЭСЛ-15-11 и хлоридсеребряный электрод сравнения ЭВЛ-1М4), имеющие меньшие геометрические размеры, что позволило сократить рабочий объем ячейки до 3–4 мл. Электроды подключали к рН-метру через картридж. Для лучшего омывания электродов раствором подавали восходящий поток эффлюента в ячейку, откачивая избыток эффлюента с помощью перистальтического насоса (рис. 1). Электроды имеют малое время отклика, что особенно важно при измерении в потоке. Следующим этапом была проверка соответствия измерений рН эффлюента, проведенных в потоке и в собранных фракциях.

Соответствие градиентов рН. С этой целью сравнивали градиенты рН, полученные в одинаковых условиях (таблица) при пропускании полиамфолитного буферного элюента через колонку, заполненную анионообменником Dien-SiO₂. Градиент рН, полученный на ленте самописца (рис. 2, кривая 1), практически идентичен ранее построенному по точкам при измерении рН в собранных фракциях эффлюента [7]. «Аномальное» начальное увеличение рН (выше рН стартового раствора) при высокой ионной силе элюента объясняется дополнительным протонирова-

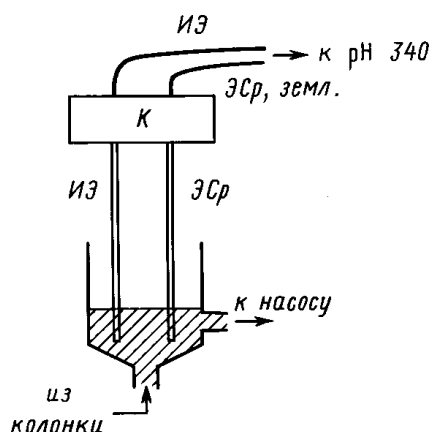


Рис. 1. Схема проточной ячейки для измерения рН. ИЭ – измерительный электрод, ЭСр – электрод сравнения, К – картридж, земл. – заземление.

Сорбенты и подвижные фазы, использованные для формирования градиента рН внутри колонки

Система	Колонка	Сорбент	Стартовый раствор	Элюент
I	Стеклоанная, 300×9 мм	Dien-SiO ₂ , 100–160 мкм	0.0125 М Трис-НСl, рН 7.5; μ = 0	1:16 Polybuffer-74, рН 3.5; μ = 0.2
II	Стальная (ВЭЖХ), 250×4.6 мм	Tetren-SiO ₂ , 7.5 мкм	0.0125М Трис-НСl, рН 7.5; μ = 0	1:16 Polybuffer-74, рН 3.5; μ = 0.2
III	Стеклоанная, 300×9 мм	Dien-SiO ₂ , 100-160 мкм	0.025М Трис-НСl, рН 7.5; μ = 0,002	0.0125 М СН ₃ СООН, рН 3.35; μ = 0.005
IV	Стальная (ВЭЖХ), 250×4.6 мм	Tetren-SiO ₂ , 7.5 мкм	0.025М Трис-НСl, рН 7.5; μ = 0.002	0.0125 М СН ₃ СООН, рН 3.35; μ = 0.005
V	Стальная (ВЭЖХ), 250×4.6 мм	Tetren-SiO ₂ , 7.5 мкм	0.025М Трис-НСl, рН 7.5; μ = 0.002	0.005 М Н ₂ С ₂ О ₄ , рН 2.35; μ = 0.005
VI	Стальная (ВЭЖХ), 250×4.6 мм	Tetren-SiO ₂ , 7.5 мкм	0.025М Трис-НСl, рН 7.5; μ = 0.002	0.002 М Н ₂ С ₂ О ₄ , рН 2.70; μ = 0.1
VII	Стальная (ВЭЖХ), 250×4.6 мм	Tetren-SiO ₂ , 7.5 мкм	0.025М Трис-НСl, рН 7.5; μ = 0.002	0.002М Н ₂ С ₂ О ₄ , рН 2.70; μ = 0

нием сорбента за счет сорбции протонов подвижных фаз, поскольку при этом изменяются константы протонирования аминогрупп сорбента, и согласуется с теоретическими расчетами в рамках модели [11–13]. Автоматизация контроля рН позволила сократить время эксперимента на 45–60 мин, затрачиваемое на измерение рН в собранных фракциях эффлюента. Аналогичный вид градиента рН получили в системе ВЭЖХ (рис. 2, кривая 2) при пропускании полибуферного элюента через колонку с сорбентом Tetren-SiO₂, который по кислотно-основным и ионообменным свойствам близок к Dien-SiO₂. Таким образом, рН, измеренное в потоке эффлюента, совпадает с рН в собранных фракциях. При измерении рН во фракциях эффлюента некоторые точки могут выпасть из массива значений, что приводит к потере достаточно тонких эффектов при формировании внутреннего градиента рН в системе ВЭЖХ, таких, как образование ступеней на профиле градиента.

С этой целью получили градиенты рН при использовании растворов уксусной кислоты в качестве элюента (таб-

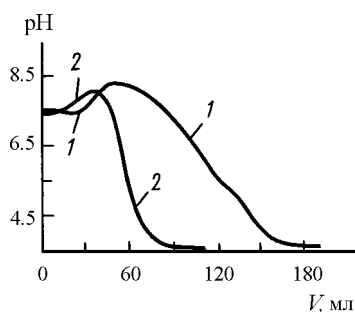


Рис. 2. Градиенты pH при пропускании полиамфолитного буферного элюента «Polybuffer-74»: 1 – система I, 2 – система II (таблица)

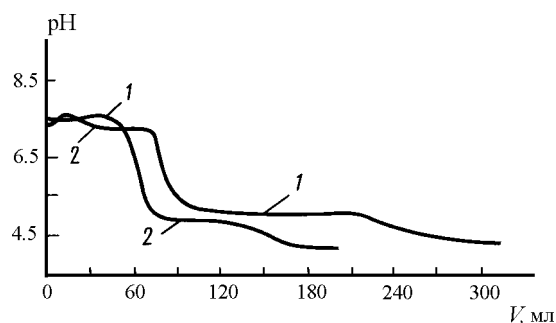


Рис. 3. Градиенты pH при пропускании раствора уксусной кислоты: 1 – система III, 2 – система IV (таблица)

лица). В хроматографической системе низкого давления на профиле градиента pH наблюдали две ступени (рис. 3, кривая 1). Первая слабо выраженная ступень при незначительном начальном увеличении pH связана с различием в ионной силе стартового буферного раствора и элюента и дополнительным протонированием сорбента за счет протонов подвижной фазы, вторая – с сорбцией анионов элюента при увеличении степени протонирования аминогрупп сорбента. Эти эффекты наблюдали также при измерении pH в собранных фракциях. Однако при переходе к варианту ВЭЖХ объем подвижной фазы, необходимый для формирования градиента, значительно сокращается, и при контроле pH в собранных фракциях (по 2 мл) начальное увеличение pH не было получено, вероятно, из-за потери точек. Измерения в потоке эффлюента позволили получить эффект «аномального» увеличения pH на начальной стадии градиента, связанный с различием в ионной силе подвижных фаз (рис. 3, кривая 2).

При использовании двухосновных кислот в качестве элюентов для формирования градиента pH профиль градиента должен быть более сглаженным, и вместе с тем на нем должна наблюдаться ступень, связанная с дополнительным протонированием сорбента при разнице ионной силы стартового раствора и элюента, и две ступени, обусловленные сорбцией анионов A^{2-} и HA^- двухоснов-

ной кислоты [12, 13]. Чем больше различие между pK_{a1} и pK_{a2} и ниже концентрация кислоты, тем более явно на профиле градиента pH проявляются две ступени, связанные с сорбцией анионов. Использование более концентрированных растворов кислот (0.005–0.02 М) не позволяет в большинстве случаев обнаружить эти ступени. Присутствие сильного электролита в элюенте приводит к растягиванию начального участка на профиле градиента в области pH 7.5–6.5 и к более резкому последующему падению pH [11–13]. Для проверки предсказанных на основе модели [11–13] эффектов изучили влияние концентрации щавелевой кислоты и ионной силы элюента на профиль градиента pH. Градиенты pH формировали в системе ВЭЖХ внутри колонки, заполненной анионообменником Tetren-SiO₂. При этом наблюдали все перечисленные эффекты (рис. 4). Так, при использовании в качестве элюента 0.005 М щавелевой кислоты ($\mu = 0.005$) на начальном участке градиента наблюдали слабо выраженный подъем pH до 7.6–7.7, связанный с незначительным различием в ионной силе стартового раствора (0.025 М Трис-НСl, $\mu = 0.002$) и элюента, и последующее резкое снижение pH от 7.4 до 2.7 в течение 12–15 мин (рис. 4, кривая 1). На профиле градиента pH, полученного при пропускании 0.002 М раствора щавелевой кислоты ($\mu = 0.1$), получили существенное увеличение pH до 8.1–8.2 на начальном участке градиента, что связано с 50-кратным увеличением ионной силы элюента по отношению к стартовому раствору (рис. 4, кривая 2). В этом случае при смене стартового раствора на элюент меняется не только pH подвижной фазы, но и значения pK'_a групп сорбента за счет увеличения ионной силы. Следовательно, начинается дополнительное протонирование аминогрупп сорбента протонами щавелевой кислоты, и pH подвижной фазы увеличивается за счет снижения концентрации протонов. Затем pH плавно снижается от 7.5 до 6.6, после чего на профиле градиента наблюдается достаточно резкий скачок до pH 4.6–4.5, близкий к pK'_{a2} щавелевой кислоты. Вблизи pK'_{a2} кислоты получили ступень на профиле градиента, а

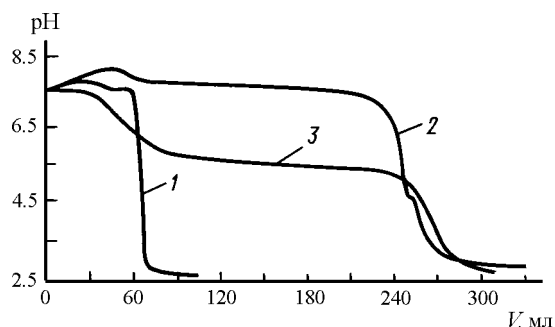


Рис. 4. Градиенты pH при пропускании раствора щавелевой кислоты для систем: 1 – V, 2 – VI, 3 – VII (таблица)

затем снижение рН до 3.2. Очевидно, что ионная сила элюента влияет и на ступени, связанные с сорбцией анионов кислоты протонированными аминогруппами сорбента, поскольку в этом случае идет ионный обмен Cl^- и HA^- и дополнительная сорбция Cl^- при увеличении степени протонирования анионообменника [11]. Так, при пропускании щавелевой кислоты той же концентрации, но в отсутствие посторонних электролитов, получили градиент рН с двумя явно выраженными ступенями, а на-

чального «аномального» увеличения рН не наблюдали (рис. 4, кривая 3). В областях рН 7.4–5.6 и 5.3–3.2 величина рН на колонке снижается линейно в течение 40 и 30 мин соответственно, а в области рН 5.6–5.3 практически выходит на плато. Такой градиент рН наиболее пригоден для группового разделения, например комплексов переходных металлов [4, 5] или цвиттер-ионных молекул типа белков [8, 9] с сильно различающимися константами устойчивости или изоэлектрическими точками соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Схунмакерс П. Оптимизация селективности в хроматографии. М., 1989. 400 с.
2. Хроматофокусирование полибуфером на ПБИ (russian translation). Stockholm–Uppsala, 1981.
3. Jandera P., Churaček J. Gradient elution in column liquid chromatography: theory and practice. Amsterdam–Oxford–New York–Tokyo, 1985.
4. Jones P., Nesterenko P.N. // J. Chromatogr. A. 1997. **789**. P. 413.
5. Нестеренко П.Н., Иванов А.В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер.2. Химия. 1992. **33**. С. 574.
6. Hutchens T.W., Li C.M., Besch P.K. // J.Chromatogr. 1986. **359**. P. 169.
7. Иванов А.В., Курочкина Е.В., Нестеренко П.Н. // ЖФХ. 1998. **72**. №6. С. 1129.
8. Perkins R.V., Nau V.J., MacParthland A. // Chromatogr. Review. 1987. **14**. P. 13.
9. Murel A., Vilde S., Pank M. et al. // J.Chromatogr. 1986. **362**. P. 101.
10. Šlais K. // J. Chromatogr. 1991. **540**. P. 41.
11. Гармаш А.В., Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // ЖФХ. 1997. **71**. №10. С. 1872.
12. Гармаш А.В., Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // ЖФХ. 1997. **71**. №11. С. 2054.
13. Тессман А.Б., Иванов А.В., Курочкина Е.В. и др. // Теория и практика сорбционных процессов. Воронеж, 1998. **23**. С. 347.

Поступила в редакцию 28.05.98