

Том 68, Номер 10

Октябрь 1994

ISSN 0044-4537

*РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК*

# ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Главный редактор  
В.М. Грязнов



МАИК НАУКА

*Российская академия наук*

# ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

том 68 № 10 1994 Октябрь

Основан в 1930 г.  
Выходит 12 раз в год  
ISSN: 0044-4537

*Главный редактор*  
В.М. Грязнов

*Заместители главного редактора*  
И.А. Мясников, Ю.А. Пентин

*Ответственный секретарь*  
В.В. Громов

Международный консультативный совет:

А.Т. Бэлл (США), Ф. Вейнхольд (США), Ж.-Л. Калэ (Швеция),  
Е. Ковач (Швейцария), У.А. Стилл (США),  
Дж.М. Томас (Великобритания), Д.В. Шусмит (Канада)

Редакционная коллегия:

В.В. Болдырев, В.В. Громов, В.М. Грязнов, Л.В. Гурвич,  
В.А. Даванков, В.М. Жулин, Я.С. Лебедев, А.А. Лопаткин,  
В.В. Лунин, И.А. Мясников, Ю.А. Пентин, О.М. Полтораки,  
А.Я. Розовский, А.П. Симонов, Н.А. Смирнова, Н.Ф. Степанов,  
С.Ф. Тимашев, В.П. Чижков, Н.А. Чумаевский, В.И. Шимулис

*Зав. редакцией* Н.М. Беленкина

*Адрес редакции:* 103064, Москва, ул. Обуха, 10, НИФХИ им. Л.Я. Карпова,  
тел. 916-61-37

Москва  
Международная академическая  
издательская компания "Наука"

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 68, номер 10, 1994

Simultaneous English language translation of the journal is available from МАИК Наука/Interperiodica Publishing (Russia).  
*Russian Journal of Physical Chemistry* ISSN 0036-0244

## МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Режимы движения хроматографической зоны для случая  
внутридиффузионной кинетики межфазного массообмена

*Ю. Я. Лебедев* 1733

Сорбционно-структурные корреляции в хроматографии ароматических соединений

*В. А. Герасименко, В. М. Набивач* 1740

Высокотемпературная жидкостная хроматография

*А. Н. Агеев, Я. И. Яшин* 1749

Количественные оценки степени подобия хроматограмм и фореграмм

*И. Г. Шарина, А. В. Черкасов, А. А. Недоспасов* 1752

Молекулярные аспекты разделения бинарных жидких смесей

*Р. Н. Куклин, Л. Т. Крецишина* 1758

Использование корреляционных зависимостей между параметрами удерживания  
в тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии  
для идентификации анализируемых соединений

*В. Д. Чмиль, Л. П. Новицкая, М. Н. Герцюг* 1763

Хроматографические свойства кремнеземов,  
модифицированных политрифторстиролсодержащим сополимером

*А. Д. Катаев, В. В. Сабуров, И. Б. Машинистова,  
О. А. Резникова, М. Р. Муйдинов, В. П. Зубов* 1770

Иммобилизация ферментного препарата дрожжелатина

*Л. Я. Царик, В. И. Кузнецов, С. В. Кондратьев, З. И. Васильева, А. И. Кузаев* 1775

Сорбция инсулина на катионитах "Биохром"

*Ю. Я. Лебедев, Л. П. Гаврюченкова, К. Э. Саратов, Н. Н. Момот,  
О. А. Громова, В. В. Константинов, Л. Н. Давидюк* 1778

Модификация свойств поверхности макропористых сополимеров  
путем адсорбции поверхностно-активных веществ

*Г. Э. Елькин, Н. В. Глазова, Л. В. Курдявка* 1782

Хроматография функциональных олигобутADIЕНОВ в критических условиях на силикагеле

*Я. И. Эстрин, Л. Т. Касумова* 1784

Анализ структуры олигомеров методом жидкостной хроматографии в критической области

*С. И. Соломко, А. И. Кузаев* 1789

- Применение жидкостной хроматографии в критической области для разделения по типам функциональности олигоэпихлоргидринов  
*А. И. Кузаев, О. М. Ольхова, С. И. Соломко, С. М. Батулин* 1794
- Природа фоточувствительности вулканизатов, полученных на основе диеновых каучуков и хинолового эфира  
*И. Б. Цветковский* 1799
- Применение гель-хроматографического метода для количественного анализа пирогенных примесей в лекарственных препаратах  
*Н. В. Глазова, Т. Б. Ефимова, Л. В. Дмитренко* 1803
- Сравнительный анализ энантиомеров пропранолола в сыворотке крови с использованием твердофазной экстракции  
*Т. В. Иванова, Е. В. Швачко, Д. О. Румянцев, В. Г. Белолипецкая* 1806
- Применение тиофильно-адсорбционной хроматографии для выделения моноклональных антител к группоспецифическому антигену Н (тип I)  
*Е. М. Рапопорт, Л. С. Жигис, Е. В. Власова, В. Е. Пискарев, Л. С. Хральцова, М. М. Ворожайкина, В. П. Зубов* 1809
- Исследование экстрактов прополиса и почек тополя бальзамического методом высокоэффективной жидкостной хроматографии  
*В. А. Куркин, В. Б. Браславский, Г. Г. Запесочная* 1816
- Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография аналогов энкефалина с ограниченной конформационной подвижностью  
*О. С. Веселкина, В. И. Корольков, Г. П. Власов* 1819
- Хроматографическое разделение алкалоидов группы тропана  
*Е. В. Серегина, А. Х. Лайпанов, В. Э. Сланский, И. А. Воронин* 1823
- Быстрый способ определения жирорастворимых витаминов в сыворотке крови человека  
*Л. М. Якушина, А. Г. Таранова* 1826
- Определение изомеров ретинилацетата при многоволновом режиме детектирования  
*Е. И. Финкельштейн, С. Н. Морев, М. Н. Ефремова, И. С. Краснокутская* 1829
- Разделение синтетических витаминов группы В методом ион-парной высокоэффективной жидкостной хроматографии  
*И. Ф. Колосова, В. Н. Филимонов, Л. Н. Балятинская* 1832
- Разделение синтетических жирорастворимых витаминов с помощью многоколоночной нормально-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии  
*В. Н. Филимонов, И. Ф. Колосова, Л. Н. Балятинская* 1835
- Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии для аналитического контроля продуктов микробиологического синтеза лимонной кислоты и витаминов группы В  
*Л. Н. Балятинская, Н. В. Ключникова, С. В. Свергузова, В. Н. Филимонов, И. Ф. Колосова* 1839
- Разделение белков методами жидкостной хроматографии и нестационарного капиллярного электрофореза  
*Д. М. Кулиш, В. Е. Ключниченко, А. Н. Вульфсон* 1841

Применение сорбционно-хроматографических методов для очистки и анализа ферментных препаратов <i>Н. В. Рудометова, Н. В. Глазова, Л. В. Дмитренко</i>	1848
Градиентный насос для микроколоночной жидкостной хроматографии <i>Ю. А. Болванов, С. В. Власов, А. В. Гельфанд, Л. А. Кожанова, Г. Г. Шамовский</i>	1851
Двухволновая фотометрическая термохромометрия <i>Л. А. Кожанова, Г. Г. Шамовский</i>	1854
Влияние ширины щели монохроматора спектрофотометрического детектора на параметры спектра поглощающих веществ <i>Л. А. Кожанова, Г. Г. Шамовский</i>	1859
Флуориметрический детектор хроматографа "Миличром-4М-F" <i>Ю. А. Болванов, Л. А. Кожанова, С. В. Кузьмин, Г. Г. Шамовский</i>	1866
Определение полиароматических углеводов с помощью жидкостного хроматографа "Цвет-3110" с лазерным флуориметрическим детектором <i>Г. Б. Владыкин, А. Ю. Радченко, И. И. Фролов, Я. И. Яшин</i>	1868
Программирование температуры в жидкостной адсорбционной хроматографии <i>А. Н. Агеев, В. И. Орлов, Я. И. Яшин</i>	1873
Жидкостная хроматография производных фенола с электрохимическим детектированием <i>Т. Т. Белямова, Я. И. Коренман, В. Н. Фокин, Я. И. Яшин</i>	1877
Определение переходных металлов на динамически модифицированных катионообменниках <i>О. Н. Обрезков, О. В. Крохин, А. В. Пирогов, С. Н. Семенова, О. А. Шпигун</i>	1880
Ионохроматографическое определение хлорид-иона при избытке борной кислоты <i>А. Д. Карпюк, М. В. Вахрушева, Н. К. Сажина</i>	1884
Применение двухколоночной анионной хроматографии с разделительной колонкой переменной длины для контроля содержания анионов в водном теплоносителе <i>И. Л. Полетаева, З. Н. Игнатова, А. Д. Карпюк</i>	1886
Влияние замещенных фенолов на хроматографическое определение сильно- и слабоудерживаемых анионов методом двухколоночной ионной хроматографии <i>А. Д. Карпюк, З. Н. Игнатова, И. Л. Полетаева</i>	1889
Очистка моноклональных антител с помощью высокоэффективной жидкостной ионообменной хроматографии <i>А. В. Стоянов</i>	1893

---

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Расчет термодинамических функций четверных металлических систем на основании данных о граничных тройных системах <i>А. Н. Мамедов, И. Г. Мехдиев</i>	1897
Закономерности в изменении термодинамических свойств дихлоридов лантанидов <i>В. Ф. Горюшкин</i>	1900
Связь коэффициентов активности веществ с активностью растворителя в многокомпонентных неводных растворах <i>А. В. Очкин</i>	1903

Термостабильность N-замещенных фенотиразионов и их катион-радикалов <i>О. Б. Томилин, А. В. Явкина, Е. П. Коновалова, Э. П. Санаева</i>	1905
Стандартные химические потенциалы галоген-анионов в неводных растворах <i>А. И. Мишустин</i>	1908
Адсорбция карбоновых кислот из бинарных растворов в <i>n</i> -декане на силикагеле КСК-2 <i>Н. А. Окишева, М. Н. Рахлевская, И. С. Родзивилова</i>	1912
Пьезометрическое исследование 1,2-аминопропанола в широком интервале температур <i>В. Н. Карцев, М. Н. Родникова, В. В. Цепулин, А. Б. Разумова</i>	1915

---

### **МЕТОДЫ И ТЕХНИКА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Усовершенствованный фотогальванометрический усилитель и стабилизатор тока для мостовых измерений температуры в калориметрии <i>Э. Г. Лавут, Н. В. Человская</i>	1917
---	------

---

### **ХРОНИКА**

Марк Соломонович Вигдергауз (1934 - 1994)	1920
---	------

---



---

Сдано в набор 27.04.94 г.	Подписано к печати 29.07.94 г.	Формат бумаги 60 × 88 <sup>1</sup> / <sub>8</sub>
Офсетная печать	Усл. печ. л. 24.0	Усл. кр.-отг. 191 тыс.
	Тираж 787 экз.	Уч.-изд. л. 25.1
		Бум. л. 12.0
		Зак. 1494

---

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ\*

УДК 543.544

РЕЖИМЫ ДВИЖЕНИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ЗОНЫ  
ДЛЯ СЛУЧАЯ ВНУТРИДИФфуЗИОННОЙ КИНЕТИКИ  
МЕЖФАЗНОГО МАССОБМЕНА

© 1994 г. Ю. Я. Лебедев

Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург

Сформулированы определения квазиравновесного, неравновесного и переходного режимов движения зоны для случая линейной изотермы и внутридиффузионного механизма кинетики межфазного массообмена. В основу положены новые понятия, такие как информативная область зоны и степень неравновесности межфазного массораспределения. Установлены критерии реализации режимов. Обобщены экспериментальные и теоретические данные о свойствах зоны, движущейся в конкретном режиме. Обоснованы новые возможности в жидкостной аналитической и препаративной хроматографии (низкого и среднего давления) медленно диффундирующих веществ.

В основе классической хроматографии с гауссовыми зонами лежит идея малого отклонения межфазного массораспределения от равновесия, т.е. идея квазиравновесности. С момента построения теории классической хроматографии условным критерием реализации квазиравновесного режима считалось неравенство [1]

$$t > t_{\text{зап}}, \quad (1)$$

где  $t$  – время эксперимента,  $t_{\text{зап}}$  – время запаздывания равновесия ( $t_{\text{зап}} = \bar{t}_R, \bar{t}_R$  – среднее время межфазного массообмена [2]). Множество новых закономерностей в движении зоны, обнаруженное для медленно диффундирующих веществ [3 - 8], не только уточняет, но и расширяет классические представления о хроматографии. Такие факты, как смещение пиков в зависимости от скорости элюции и размера зерен пористого материала [3, 4], асимметричность зон [3, 4], обнаружение систем с экстремальными характеристиками [4, 5], отсутствие в пределах максимума пика концентрационных точек с равновесным массораспределением между фазами [6], а также успешные попытки хроматографии веществ с близкими молекулярно-равновесными свойствами на основе различия молекулярно-кинетических свойств [7, 8] позволяют сделать вывод о существовании режимов хроматографии с неравновесным массораспределением между неподвижной и подвижной фазами в колонке. Первые три особенности характеристик зоны – асимметричность, смещение и экстремальность – ярко прослеживаются на рис. 1, причем как для системы с сильным взаимодействием, так и для системы без взаимодействия

движущегося компонента с матрицей пористого материала.

Одним из направлений в оптимизации жидкостной препаративной и аналитической хроматографии (низкого и среднего давления) медленно диффундирующих веществ стало установление надежных критериев реализации режимов движения зоны. Решение этой актуальной задачи возможно лишь после формулирования строгих понятий о режимах движения зоны. Первые определения режимов с позиций отклонения межфазного массораспределения от равновесия были основаны на перечислении всех характерных признаков каждого из них [9]. Поскольку некоторые признаки могут повторяться в любом режиме, то четкого разграничения режимов по этому принципу провести не удалось, а потому критерии, указанные в [9], еще весьма условны. Конкретность критериев достигнута в [10] построением их не по главному признаку – степени неравновесности межфазного массораспределения, а по второстепенному – уточненному неравенству (1), что снижает общность подхода. Несмотря на это, в [10] впервые обосновано существование переходного режима (промежуточного между квазиравновесным и неравновесным) и проведено сопоставление двух различных формулировок режимов, построенных на принципе отклонения межфазного массообмена от регулярного и равновесного состояний.

Цель работы – формулирование строгих определений режимов движения хроматографической зоны на основе новых понятий, установление критериев реализации режимов и обобщение данных о свойствах зоны.

\*г. Москва, 3 - 8 октября 1993 г.

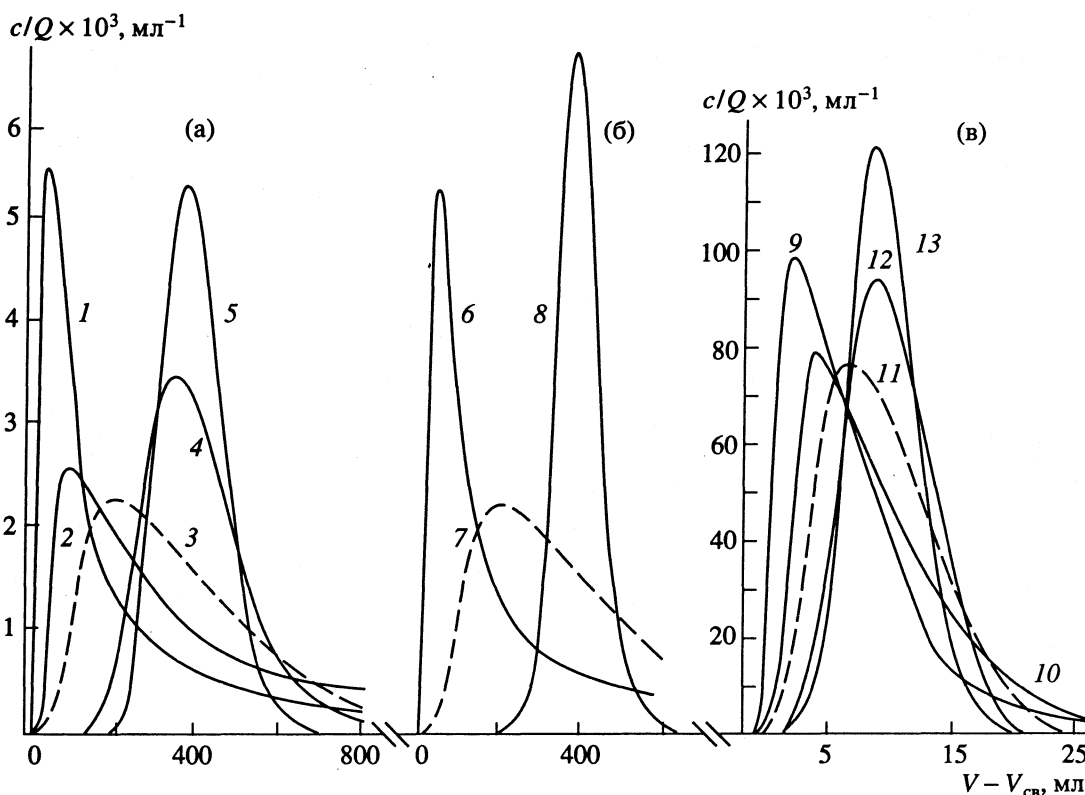


Рис. 1. Выходные элюционные кривые для органического иона окситетрациклина (а, б) и белка сывороточного альбумина (в) [4]; а, б – катионит – Дауэкс 50 × 4, элюент – 1 н. водный раствор NaCl, pH 1.6,  $\Gamma = 111$ ,  $D = 1.6 \times 10^{-9}$  см<sup>2</sup>/с,  $h = 15.3$  см,  $S = 0.35$  см<sup>2</sup>,  $\alpha = 0.36$ ,  $Q = 1 - 5$  мг,  $c_{исх} = 10$  мг/мл; а – при  $R = 185 \pm 20$  мкм и различных значениях  $u$  (1 – 13.9, 2 – 5.3, 3 – 2.3, 4 – 0.67, 5 – 0.27 см/мин); б – при  $u = 2.3$  см/мин и различных значениях  $R$  (6 –  $455 \pm 16$ , 7 –  $185 \pm 20$ , 8 –  $49 \pm 3$  мкм); в – пористое стекло СМП 1М-1000, элюент – физиологический раствор: 0.15 н. NaCl, pH 7.4,  $\Gamma = 0.42$ ,  $D = 4.3 \times 10^{-8}$  см<sup>2</sup>/с,  $h = 26$  см,  $S = 0.95$  см<sup>2</sup>,  $\alpha = 0.39$ ,  $R = 50$  мкм,  $Q = 0.75$  мг,  $c_{исх} = 2.5$  мг/мл, и: 9 – 8.9, 10 – 6.6, 11 – 2.6, 12 – 0.5, 13 – 0.18 см/мин.

Будем рассматривать хроматографическую систему с линейной изотермой межфазного массораспределения и внутридиффузионным механизмом кинетики. Такая простейшая система характеризуется независимыми параметрами:

$$h, S, R, \alpha, u, \Gamma, D \text{ или } V_{св}, V_{ст}, R, v, \Gamma, D. \quad (2)$$

Концентрационные точки зоны  $c(x, t)$ ,  $a_r(r, x, t)$ ,  $\bar{a}_R(x, t)$  соответственно в подвижной и неподвижной (локальная и средняя) фазах системы описываются уравнениями вида [1, 11]:

$$\alpha \frac{\partial c}{\partial t} + (1 - \alpha) \frac{\partial a_R}{\partial t} = -\alpha u \frac{\partial c}{\partial x},$$

$$a_R = 3R^{-3} \int_0^R a r^2 dr; \quad (3)$$

$$\frac{\partial a_r}{\partial t} = \frac{D}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial a_r}{\partial r} \right), \quad \left. \frac{\partial a_r}{\partial r} \right|_{r=0} = 0, \quad (4)$$

$$a_r|_{r=R} = \Gamma c$$

и отвечают начальным и краевым условиям импульсного типа [3, 12]

$$a_r = c = 0, \quad (t = 0), \quad c = Q \delta(t) / \alpha u S, \quad (x = 0). \quad (5)$$

Подразумевается, что  $h$  и  $S$  – высота и площадь сечения колонки;  $V_{св}$  и  $V_{ст}$  – объемы подвижной и неподвижной частей в колонке;  $\alpha$  – порозность;  $R$  – средний радиус зерен пористого материала;  $\Gamma$  и  $D$  – эффективные коэффициенты равновесного массораспределения и внутренней диффузии вещества в порах зерна;  $u(v)$  – линейная (объемная) скорость элюции;  $V$  – объем элюента ( $V = \alpha u S t = vt$ );  $x$  – координата длины вдоль колонки;  $r$  – радиальная координата от центра зерна;  $Q$  – масса вещества, введенного в колонку методом “поршня”.

Решения уравнений (3), (4) с учетом (5) целесообразно записать с помощью трех дифференциальных функций распределения  $\Psi_r$ ,  $\Psi_R$ ,  $L$  [12]:

$$c = (QD / \alpha u S R^2) L(\lambda, \tau_x); \quad (6)$$

$$a_j = (QD\Gamma / \alpha u S R^2) \int_0^{\tau_x} L(\lambda, \tau_x - \xi) \Psi_j(\rho, \xi) d\xi, \quad (7)$$

$$j = r, R;$$

где  $\Psi_r(\rho, \tau_x)$ ,  $\Psi_R(\tau_x)$ ,  $L(\lambda, \tau_x)$  – кинетические (локальная и средняя) и динамическая функции сис-



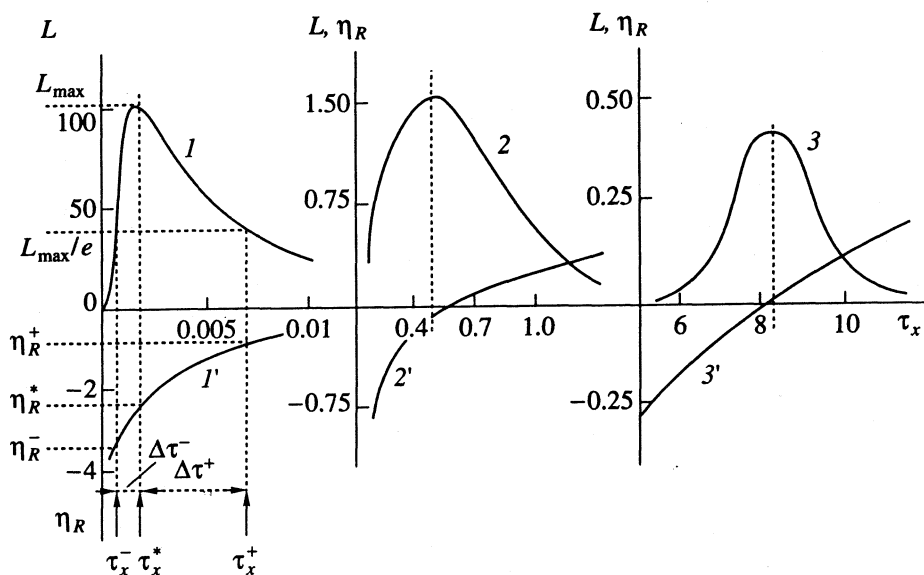


Рис. 2. Элюиционные кривые (1 - 3) в относительных координатах и кривые распределения степени неравновесности (1' - 3') вдоль зон:  $\lambda = 0.1$  (1, 1'), 2 (2, 2') и 25 (3, 3') - НР-, ПР- и КВ-режим соответственно.

темы соответственно [12];  $\rho, \lambda, \tau_x$  - безразмерные координаты

$$\rho = r/R, \quad \lambda = 3(1 - \alpha)\Gamma D x / \alpha u R^2, \quad (8)$$

$$\tau_x = DR^{-2}(t - x/u).$$

Явная структура и наглядный смысл функций  $\Psi_j$  и  $L$  раскрыты в [12], а их графики приведены в [13].

Для формулирования строгих определений режимов движения зоны воспользуемся понятиями об информативной области зоны (ИОЗ) [10] и степени неравновесности межфазного массораспределения [6]. ИОЗ - множество концентрационных точек зоны с концентрациями  $c_{max}/e - c_{max}$ , т.е. концентрационных точек, находящихся в пределах ширины зоны  $\Delta t = \Delta t^- + \Delta t^+$  (рис. 2). Мера неравновесности (степень неравновесности)

$$\eta_j \equiv \ln(a_j / \Gamma c), \quad j = r, R \quad (9)$$

характеризует с количественной стороны степень отклонения от равновесия межфазного массораспределения в гетерогенной системе и, по существу, имеет смысл изменения безразмерной свободной энергии при обратимом изотермическом переносе одного моля вещества из внешнего раствора во внутренний раствор в порах зерна [6]. Введенная функция  $\eta_j(r, x, t)$  может принимать численные значения в пределах:  $-\infty < \eta_j < \infty$ , причем  $\eta_j = 0$  соответствует равновесию между фазами ( $a_r = a_R = \Gamma c$ ), а  $\eta_j < 0$  и  $\eta_j > 0$  - неравновесным распределениям компонента для случаев  $a_j < \Gamma c$  и  $a_j > \Gamma c$  соответственно. С учетом (6), (7), (9) конечное выражение для степени неравновесности

в любой точке элютивной зоны примет следующий вид [6]:

$$\eta_j = \ln \left[ L^{-1}(\lambda, \tau_x) \int_0^{\tau_x} L(\lambda, \tau_x - \xi) \Psi_j(\xi) d\xi \right], \quad (10)$$

$$j = r, R.$$

Детальный анализ степени неравновесности в пределах хроматографической зоны проведен в [6]. С учетом его результатов рационально принять: вещество зоны движется в квазиравновесном (КВ) режиме, когда любая концентрационная точка ИОЗ удовлетворяет критерию

$$|\eta_R| \leq 0.3; \quad (11)$$

вещество зоны движется в неравновесном (НР) режиме, когда любая концентрационная точка ИОЗ удовлетворяет критерию

$$|\eta_R| > 0.3. \quad (12)$$

Переходным (ПР) будем считать режим, в котором часть точек ИОЗ удовлетворяет критерию (11), а другая часть точек - критерию (12).

Воспользуемся определениями режимов и характеристик зоны  $\eta_R^-, \eta_R^+$  (рис. 2) для записи критериев в форме, более удобной для применения:

$$|\eta_R^-| \leq 0.3(\text{КВ}), |\eta_R^+| > 0.3(\text{НР}), |\eta_R^+| < 0.3$$

$$\text{и } |\eta_R^-| > 0.3(\text{ПР}), \quad (13)$$

где  $\eta_R^-, \eta_R^+$  - как видно из рис. 1, имеют смысл степеней неравновесности в крайних точках ИОЗ - в точке  $r(V^-)$  и точке  $r^+(V^+)$ .

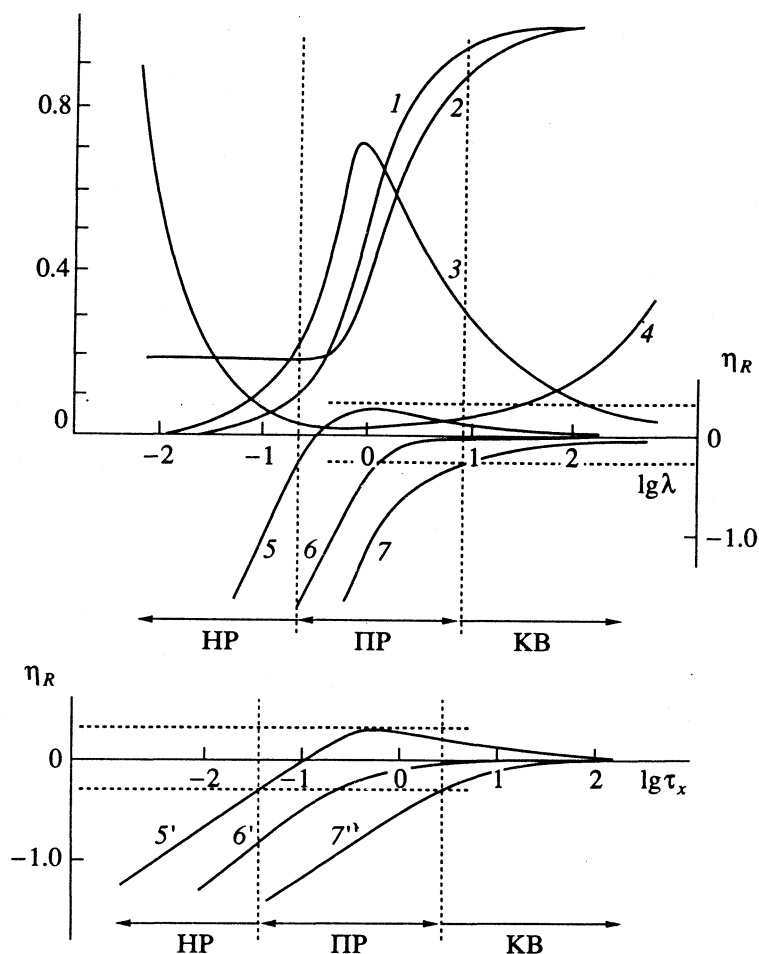


Рис. 3. Универсальные кривые для некоторых характеристик движения зоны: 1 – относительный объем (время) задержки  $\theta_{i,V} = (V^* - V_{CB})/(\bar{V} - V_{CB})$ ; 2 – коэффициент симметрии  $\xi = \Delta V/\Delta V^+$ ; 3 – относительная ширина:  $\Delta V/(\bar{V} - V_{CB})$ ; 4 – относительная высота  $\frac{c_{\max}}{50Q/(\bar{V} - V_{CB})}$ ; 5, 5', 6, 6' и 7, 7' – степени неравновесности  $\eta_R^+$ ,  $\eta_R^*$  и  $\eta_R^-$  в точках зоны  $t^+$ ,  $t^*$  и  $t^-$  соответственно; HP, PR, KB – типы режимов.

В существовании режимов движения зоны, отвечающих требованиям (11) - (13), легко убедиться по данным рис. 2, на котором приведены типичные для каждого из режимов концентрационные кривые зон и кривые распределения функции  $\eta_R$  в пределах зон. Кривые построены по соотношениям (6) - (10).

Для установления режимов движения зоны по заданным параметрам системы (2) удобны критерии по обобщенным координатам  $\lambda$  или  $\tau_x$  (так называемые “дополняющие критерии” в отличие от “определяющих критериев” (13)). Воспользуемся теоретическими зависимостями характеристик зоны  $\eta_R^-$ ,  $\eta_R^*$ ,  $\eta_R^+$  от координат  $\lambda$  и  $\tau_x$  (рис. 3). Отбор допустимых значений  $\lambda$ ,  $\tau_x$  для каждого режима проведем с учетом хода кривых на рис. 3 и кри-

териев (13). В результате придем к следующим критериям:

$$\tau_x \geq 1.8 \text{ или } \tau_x^* \geq 2.5 \text{ или } \lambda \geq 8 \text{ (KB);} \quad (14)$$

$$\tau_x \leq 0.03 \text{ или } \tau_x^* < 0.008 \text{ или } \lambda \leq 0.22 \text{ (HP);} \quad (15)$$

$$0.03 < \tau_x < 1.8 \text{ или } 0.008 < \tau_x < 2.5 \\ \text{или } 0.22 < \lambda < 8 \text{ (PR).} \quad (16)$$

Критерии (14) - (16) несколько отличаются от критериев [10], полученных из менее строгих исходных предпосылок. Отличие же критериев (14) - (16) от критериев [14] более существенное (прежде всего из-за отсутствия в [14] понятия о PR-режиме). Наконец, из сопоставления (14) - (16) с критериями [10], построенными “по принципу регулярности”, следует, что движение зоны в регулярном режиме ( $\tau_x \geq 1.5/\pi^2$  или  $\lambda > 1.5$  [10])

одновременно отвечает требованиям квазиравновесного (когда  $\tau_x \geq 1.8$  или  $\lambda \geq 8$ ) либо переходного (когда  $1.5/\pi^2 < \tau_x < 1.8$  или  $1.5 < \lambda < 8$ ) состояний.

Приведем основные количественные соотношения, характеризующие движение зоны в конкретном режиме, и подчеркнем некоторые особенности каждого режима.

Характеристики движения зоны в НР-режиме описываются с высокой точностью следующими выражениями [3, 6, 7, 9, 10]:

$$\Psi_R = 3(\pi\tau_x)^{-1/2} - 3, \quad (17)$$

$$L = (\lambda/2\pi^{1/2}\tau_x^{3/2}) \exp(\lambda - \lambda^2/4\tau_x);$$

$$Z_R = 3 [ (\pi\tau_x)^{-1/2} \exp(-\lambda^2/4\tau_x) - \operatorname{erfc}(\lambda/2\tau_x^{1/2}) ] \exp \lambda; \quad (18)$$

$$c_{\max} = (0.925 QD/\alpha u S R^2 \lambda^2) \exp \lambda,$$

$$a_{R, \max} = (QD\Gamma/\alpha u S R^2) [1.4518(1 + \lambda)^{1/2} \lambda^{-1} \exp(\lambda/2) - 3 \operatorname{erfc}((1 + \lambda)^{1/2}/2) \exp \lambda]; \quad (19)$$

$$V^* = V_{cb} + \Gamma V_{st} \lambda/2, \quad (20)$$

$$V_R^* = V_{cb} + 3\Gamma V_{st} \lambda/2 (1 + \lambda);$$

$$\Delta V^- = V^* - V^- = 0.31\Gamma V_{st} \lambda, \quad (21)$$

$$\Delta V^+ = V^+ - V^* = 1.59\Gamma V_{st} \lambda;$$

$$\eta_R = \ln [6\tau_x/\lambda - 6\tau_x \lambda^{-1} (\pi\tau_x)^{1/2} \times \exp(\lambda^2/4\tau_x) \operatorname{erfc}(\lambda/2\tau_x^{1/2})]; \quad (22)$$

$$\eta_R^* = \ln(\lambda - 0.274\lambda^2) < 0, \quad (23)$$

$$\eta_R^- = \ln(0.379\lambda - 0.043\lambda^2) < 0,$$

$$\eta_R^+ = \ln(4.17\lambda - 3.5\lambda^2) < 0; \quad (24)$$

где  $Z_j = a_j/(QD\Gamma/\alpha u S R^2)$ ;  $c_{\max}$  и  $a_{R, \max}$  – высоты зоны в подвижной и неподвижной фазах;  $V^*$  и  $V_R^*$  – объемы удерживания, соответствующие появлению в нижнем сечении колонки максимальных концентраций в подвижной и неподвижной фазах;  $\operatorname{erfc}(y) = 1 - \Phi(y)$ ,  $\Phi(y)$  – интеграл ошибок [15]. Из (15) следует, что НР-режим реализуется при условии, что среднее время  $\bar{t}_x$  задержки зоны ( $\bar{t}_x = \bar{t} - h/u$ ) меньше среднего времени  $\bar{t}_R$  диффузии компонента ( $\bar{t}_R = R^2/15D$ ), а реальное время  $t_x^*$  задержки зоны ( $t_x^* = \bar{t}_x - h/u$ ) меньше  $\bar{t}_R$  в 10 раз, т.е.  $\bar{t}_x < \bar{t}_R$  или  $t_x^* < 0.1\bar{t}_R$ . Степень неравновесности в пределах ИОЗ всегда отрицательна, не только в переднем, но и в заднем фронтах, что свидетельствует об отсутствии равновесной точки в преде-

лах ИОЗ. Степень смещения точки  $c_{\max}$  относительно точки  $c_{ц.т}$  (концентрация компонента в центре тяжести зоны) составляет 89 - 100%, что

легко проверить по соотношению  $(\bar{t}_x - t_x^*)/\bar{t}_x = 1 - 0.5\lambda$ . Асимметричность зоны максимальна. Особенности неравновесного движения зоны усугубляются при уменьшении параметров  $\Gamma$ ,  $D$ ,  $h$  и увеличении  $u$ ,  $R$ .

Характеристики движения зоны в КВ-режиме описываются следующими соотношениями [3, 6, 9, 10]:

$$\Psi_j = \bar{\tau}_j \pi^4 \exp(-\pi^2 \tau_x), \quad j = r, R; \quad (25)$$

$$L = \pi^{3/2} (2\lambda)^{1/4} / 2\omega^{3/4} \exp [(\omega^{1/2} - (2\lambda)^{1/2})^2]; \quad (26)$$

$$Z_j = (\omega/2\lambda)^{1/2} [\pi^2 \bar{\tau}_j + (1 - \pi^2 \bar{\tau}_j) (2\lambda/\omega)^{1/2}] L; \quad (27)$$

$$c_{\max} = (\pi/2)^{3/2} (QD/\alpha u S R^2) \exp(9/32\lambda) / \lambda^{1/2} (1 - 9/16\lambda), \quad (28)$$

$$c_{ц.т} = (\pi/2)^{3/2} (QD/\alpha u S R^2) \lambda^{-1/2};$$

$$V^* = V_{cb} + \Gamma V_{st} - 0.152R^2 v/D; \quad (29)$$

$$\eta_j = \ln [(1 - \pi^2 \bar{\tau}_j) + \pi^2 \bar{\tau}_j (\omega/2\lambda)^{1/2}]; \quad (30)$$

$$\eta_j^* = \ln(1 - 3.7\bar{\tau}_j/\lambda) \leq 0;$$

$$\eta_j^- = \ln(1 - 7.2\bar{\tau}_j/\lambda) < 0, \quad (31)$$

$$\eta_j^+ = \ln(1 + 7.2\bar{\tau}_j/\lambda) > 0, \quad \lambda > 25;$$

где

$$\omega = \pi^2 (\tau_x - 0.13\lambda), \quad \omega^* = \pi^2 (\tau_x^* - 0.13\lambda); \quad (32)$$

$\bar{\tau}_j$  – математические ожидания точной  $\Psi_j$ -функции [12]:

$$\bar{\tau}_r = \int_0^{\infty} \Psi_r \tau_x d\tau_x = 2 \sin(\pi\rho) / \pi^3 \rho, \quad (33)$$

$$\bar{\tau}_R = \int_0^{\infty} \Psi_R \tau_x d\tau_x = 6/\pi^4.$$

Согласно (14), КВ-режим реализуется, когда среднее или реальное время задержки зоны превышает среднее время диффузии компонента как минимум в 40 или 35 раз соответственно (т.е.

$\bar{t}_x > 40\bar{t}_R$ ,  $t_x^* > 35\bar{t}_R$ ). Асимметричность зоны уже невысокая (рис. 2), а потому степень смещения точек  $c_{\max}$  и  $c_{ц.т}$  относительно друг друга составляет менее 6%. Величина  $\eta_R$  в пределах ИОЗ отрицательна в переднем фронте и положительна – в заднем. Однако, даже в случае симметричных зон ( $\lambda \geq 25$ , установившееся движение) степень

неравновесности может быть очень значительной по абсолютной величине для точек, находящихся за пределами ИОЗ. Вблизи равновесной точки величина и знак  $\eta_j$  прямо связаны с величиной и знаком скорости изменения химического потенциала вещества на поверхности сорбента:

$$\eta_j = (\dot{i}_j/R_r T) \left( \frac{\partial \mu_r}{\partial t} \right) \Big|_{\rho=1}, \quad (34)$$

где  $R_r$  – универсальная газовая постоянная,  $T$  – абсолютная температура,  $\mu_r$  – химический потенциал распределяемого компонента в фазе сорбента с координатой  $r$ . Формула (34) – частный случай более общей [6] в предположении  $\mu_r|_{\rho=1} = \mu_c$ . Формулой (34) дается еще один термодинамический смысл функции  $\eta_j$  вблизи равновесия гетерогенной системы.

Движение зоны в ПР-режиме характеризуется уже приведенными соотношениями (17), (18), (22) – для случая  $\tau_x < 1.5/\pi^2$ , (19) – (21), (23), (24)<sup>1</sup> – для случая  $\lambda < 0.95$  и (25) – для случая  $\tau_x > 1.5/\pi^2$  и дополнительными соотношениями [3, 6, 9, 10]

$$L = \pi^2(2\lambda/\omega)^{1/2} \exp(-2\lambda - \omega) I_1(2(2\lambda\omega)^{1/2}), \quad (35)$$

$$Z_j = \pi^2 [\pi^2 \bar{\tau}_j I_0(2(2\lambda\omega)^{1/2}) + (1 - \pi^2 \bar{\tau}_j)(2\lambda/\omega)^{1/2} I_1(2(2\lambda\omega)^{1/2})] \exp(-2\lambda - \omega), \quad (36)$$

$j = r, R,$

$$\eta_j = \ln [\pi^2 \bar{\tau}_j (\omega/2\lambda)^{1/2} I_0(2(2\lambda\omega)^{1/2}) / I_1(2(2\lambda\omega)^{1/2}) + (1 - \pi^2 \bar{\tau}_j)], \quad j = r, R \quad (37)$$

– для случаев  $\tau_x \geq 1.5/\pi^2$  ( $\lambda < 1.17$ ) и  $\tau_x > 0.13\lambda$  ( $\lambda > 1.17$ );

$$c_{ц.т} = (QD/\alpha u S R^2) \pi^2 I_1(4\lambda) \exp(-4\lambda), \quad (38)$$

$$(2\lambda\omega^*)^{1/2} I_0(2(2\lambda\omega^*)^{1/2}) = (1 + \omega^*) I_1(2(2\lambda\omega^*)^{1/2}) \quad (39)$$

– для случая  $\lambda > 1.17$ ;

$$V^* = V_{св} + \Gamma V_{ст} [0.7 + 0.3(1 - 3/2\lambda)^{1/2} - 9/4\pi^2 \lambda] \quad (40)$$

– для случая  $\lambda > 3$ . Здесь  $\omega$ ,  $\omega^*$ ,  $\bar{\tau}_x$  – прежние соотношения (32) – (33);  $I_0$ ,  $I_1$  – функции Бесселя [15]; (39) – трансцендентное уравнение для времени удерживания  $t^*$  (из него как частный случай вытекают формулы (29), (40)). Наглядными критериями реализации ПР-режима можно считать

<sup>1</sup> Выражения для  $V^*$ ,  $\Delta V^*$ ,  $\eta_R^+$  в формулах (20), (21), (23) и (24) пригодны для описания ПР режима лишь в узком интервале:  $0.22 < \lambda < 0.3$ .

неравенства  $\dot{i}_R < \dot{i}_x < 40\dot{i}_R$  или  $0.1\dot{i}_R < \dot{i}_x^* < 35\dot{i}_R$  (следуют из (17)). Степень смещения точек зоны  $c_{max}$  и  $c_{ц.т}$  относительно друг друга находится в пределах:  $6\% < 100(\dot{i}_x - \dot{i}_x^*)/\dot{i}_x < 89\%$ .

Свойства зоны в ПР-режиме противоречивы вследствие того, что движение зоны характеризуется свойствами как НР-, так и КВ-режимов. Критические свойства обнаруживаются у хроматографической системы с  $\lambda = 0.95$  [5, 13]. В связи с этим движение зоны в системах с  $0.22 < \lambda < 0.95$  качественно отличается от движения в системах с  $0.95 < \lambda < 8$ : в первом случае свойства зоны ближе к свойствам НР-, а во втором – к свойствам КВ-режимов. Данная особенность ярко проявляется в наличии на универсальных кривых (рис. 3) экстремума (максимума, минимума, точки перегиба), соответствующего координате  $\lambda_{э} = 0.95$ . Считая неравновесность межфазного массообмена главной причиной экстремального поведения характеристик зоны, можно заключить: в системах с  $0.22 < \lambda < 0.95$  вследствие существенной неравновесности ( $0.36 < -\eta_R < 1.7$ ), наблюдается “проскок” части вещества из колонки с образованием резкого переднего фронта зоны, при этом основная масса вещества по всей длине колонки находится в поверхностных слоях зерен, затем медленно уходит из них, образуя в выходной зоне длинный задний фронт; в системах с  $0.95 < \lambda < 8$  неравновесность ( $0.05 < -\eta_R < 0.36$ ) все меньше влияет на формирование массы вещества в каждой из фаз около одного центра тяжести, при этом вещество успевает распределиться по всей глубине зерна. Экстремальные же свойства зоны обнаруживаются в системе со степенью неравновесности  $\eta_{R,э}^- = -1.1$ ,  $\eta_{R,э}^* = -0.36$ ,  $\eta_{R,э}^+ = 0.29$ , когда достигается наибольшее смещение во времени обнаружения концентраций  $c_{max}$  и  $a_{R,max}$  относительно друг друга. Численное значение любого параметра (при фиксированных остальных) или характеристики зоны, отвечающих системе с экстремальными свойствами, можно рассчитать по следующим соотношениям [5]:

$$\Gamma D V_{ст} / \nu R^2 = 0.317; \quad (41)$$

$$c_{max}^3 / Q = 0.84 / \Gamma V_{ст} = 2.6 D / \nu R^2,$$

$$\Delta V_{э} = 1.4 \Gamma V_{ст} = 0.44 \nu R^2 / D, \quad (42)$$

$$V_{э}^* - V_{св} = 0.47 \Gamma V_{ст} = 0.15 \nu R^2 / D, \quad \xi_{э} = 0.3.$$

Полная картина того, как меняются свойства хроматографической системы при последовательном переходе от НР- к ПР- и далее к КВ-режимам, видна из рис. 3. Теоретические кривые построены по соотношениям, вытекающим из уравнений (3), (4). Отчетливо прослеживаются перечисленные ранее особенности (неравновесное распределение компонента, смещение пика

относительно равновесного положения, асимметрия зоны, прохождение высоты зоны через минимум, а ширины зоны через максимум и степень их проявления в каждом из режимов движения зоны). По пересечению кривых с вертикальными пунктирными линиями на рис. 3 находим "практические критерии", которые удобны для оценки типа режима по экспериментальным кривым элюции:

Режим	НР	ПР	КВ
$\xi$	0.19	0.19 - 0.86	$\geq 0.86$
$\theta, \nu$	$\leq 0.11$	0.11 - 0.94	$\geq 0.94$

Использование в хроматографии полной гаммы закономерностей в движении зоны, представленных на рис. 3, открывает новые возможности в препаративной и аналитической хроматографии (низкого и среднего давления) медленно диффундирующих веществ, к которым, как правило, относятся биологически активные вещества.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бреслер С.Е., Уфлянд Я.С. // Журн. техн. физики. 1953. Т. 23. № 8. С. 1443.
2. Сигодина А.Б., Николаев Р.И., Туницкий Н.Н. // Успехи химии. 1964. Т. 33. С. 439.
3. Лебедев Ю.Я., Самсонов Г.В. // Коллоид. журн. 1975. Т. 37. № 6. С. 1109.
4. Лебедев Ю.Я. // Журн. физ. химии. 1989. Т. 63. № 4. С. 1128.
5. Лебедев Ю.Я. // Там же. 1991. Т. 65. № 10. С. 2607.
6. Лебедев Ю.Я. // Там же. 1993. Т. 67. № 4. С. 765.
7. Коликов В.М., Мчедlishvili Б.В., Лебедев Ю.Я., Красильников И.В. // Коллоид. журн. 1977. Т. 39. № 3. С. 562.
8. Лебедев Ю.Я. // Журн. физ. химии. 1988. Т. 62. № 9. С. 2387.
9. Елькин Г.Э., Лебедев Ю.Я., Самсонов Г.В. // Высокомолекуляр. соединения. А. 1975. Т. 17. № 8. С. 1870.
10. Лебедев Ю.Я. // Журн. физ. химии. 1990. Т. 64. № 3. С. 755, 761.
11. Мясников И.А., Гольберт К.А. // Там же. 1953. Т. 27. С. 1311.
12. Лебедев Ю.Я. // Коллоид. журн. 1979. Т. 41. № 6. С. 1087.
13. Лебедев Ю.Я. // Журн. физ. химии. 1991. Т. 65. № 10. С. 2607.
14. Шатаева Л.К., Кузнецова Н.Н., Елькин Г.Э. // Карбоксильные катиониты в биологии. Л.: Наука, 1979. С. 171.
15. Янке Е., Эмде Ф., Леш Ф. // Специальные функции. М.: Наука, 1964. С. 70, 247.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК (543.544+541.6):547.52/59

СОРБЦИОННО-СТРУКТУРНЫЕ КОРРЕЛЯЦИИ  
В ХРОМАТОГРАФИИ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

© 1994 г. В. А. Герасименко, В. М. Набивач

Украинский химико-технологический университет, Днепрпетровск

Изучены закономерности зависимости параметров удерживания от структуры ароматических соединений в условиях газожидкостной и обращенно-фазовой жидкостной хроматографии. Эти зависимости представлены математическими моделями, которые включают индуктивные, стерические и топологические константы сорбатов. Показано, что предложенные модели имеют высокий уровень корреляции ( $r = 0.995 - 0.999$ ) и позволяют проводить прогнозирующий расчет хроматографических параметров удерживания.

Корреляции, описывающие зависимость между строением веществ и их хроматографическими параметрами, чаще всего выражают с помощью линейных уравнений, хотя известны и другие типы функций: дробно-линейная зависимость, уравнения третьего порядка и др. [1, 2]. Хроматографические свойства соединения в данной разделяющей системе являются результатом его фундаментальных термодинамических характеристик. Используемые в корреляционных уравнениях параметры удерживания пропорциональны изменению свободной энергии, связанному с процессом хроматографического распределения. Наблюдаемые в этом случае соотношения между структурой разделяемых веществ и их хроматографическими параметрами можно рассматривать как пример линейного соотношения свободной энергии (ЛССЭ) [3, 4].

Впервые обоснование зависимости между структурой молекул и их хроматографическими свойствами представлено в работах [5, 6], в них была предложена теоретическая зависимость между химическим потенциалом и коэффициентом распределения вещества. Именно тогда автор [6] в своей основополагающей работе высказал предположение, что заместитель изменяет коэффициент распределения растворенного вещества на величину, которая зависит от природы заместителя и использованных подвижной и неподвижной фаз, а не от природы оставшейся части молекулы.

К наиболее важным параметрам сорбата, связанным с его хроматографическими свойствами, относятся молярная рефракция, молярная теплота испарения, температура кипения, логарифм давления пара чистого сорбата, дипольный момент. Перечисленные характеристики определены для сравнительно ограниченного числа соединений, что существенно снижает предсказательную

способность соответствующих корреляционных уравнений.

В этой связи более перспективными являются сорбционно-структурные корреляции, базирующиеся на количественных соотношениях между хроматографическим удерживанием и структурными характеристиками соединений, принимающими во внимание характер и порядок связи атомов в молекуле, а также размер и форму этой молекулы, т.е. геометрию и топологию молекулы [4, 7]. Существенным преимуществом структурных дескрипторов по сравнению с многочисленными экспериментальными характеристиками является то, что они определяются непосредственно из химической формулы (структуры) вещества.

При рассмотрении корреляций в системе структура-удерживание ароматических соединений для характеристики особенностей их структуры наиболее часто используют ван-дер-ваальсов объем, индуктивные и стерические константы, топологические индексы.

Расчет ван-дер-ваальсова объема соединений [8] включает использование длин связей, валентных углов, внутримолекулярных ван-дер-ваальсовых радиусов (т.е. контактных расстояний), а также форм, характерных для атомов в различных молекулярных конфигурациях. Ван-дер-ваальсов объем определяют из структурной формулы путем суммирования вкладов групп атомов (групповых инкрементов), образующих молекулу данного соединения.

Вклады различных функциональных групп составляют, мл/моль:  $-\text{CH}_3 - 13.67$ ;  $>\text{CH}_2 - 10.23$ ;  $-\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}\text{H} - 6.78$ ;  $-\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}} - 3.33$ ;  $=\text{CH}_2 - 11.94$ ;  $=\overset{|}{\underset{|}{\text{C}}}\text{H} - 8.47$ ;  $=\text{C} = - 6.96$ ;  $\equiv\text{CH} - 11.55$ ;  $\equiv\text{CH} - 8.05$ ;  $-\text{NH}_2 - 10.54$ ;  $-\overset{|}{\underset{|}{\text{N}}}\text{H} - 8.08$ ;  $>\text{N} - 4.33$ ;  $-\text{NO}_2 - 16.80$ ;  $-\text{C}\equiv\text{N} - 14.70$ ;

—ОН — 8.04; >C=O — 11.70; —O— — 3.20 (полифениловые эфиры); —O— — 3.70 (полиалкиловые эфиры); бензол — 48.36; фенил — 45.84; фенилен — 43.32; нафталин — 73.97; нафтил — 71.45; пиридин — 46.95; декременты ван-дер-ваальсовых объемов: на метиленовый цикл, конденсированный с бензолом — 1.66; на диоксановый цикл — 1.70; на одинарную связь между сопряженными двойными связями — 0.25. Так, ван-дер-ваальсов объем 1-метил-2-этилбензола равен

$$V_w = V_w(-C_6H_4) + V_w(-CH_3) + V_w(-C_2H_5) = 43.32 + 13.67 + 23.90 = 80.89 \text{ мл/моль.}$$

Следует отметить, что использование ван-дер-ваальсова объема не может объяснить тонкоструктурных особенностей соединений со скелетной изомерией. В качестве структурных параметров, более точно отображающих форму молекулы сорбата и ее фрагментов, в работе [9] предложены угол  $\theta_C$  и степень  $\lambda_C$  экранирования. Угол экранирования  $\theta_C$  — это плоский угол при вершине круглого конуса, вершина которого находится в центре углеродного атома, связанного с заместителем, а поверхность конуса заключает в себе заместитель. Расчет угла экранирования производится по следующей формуле:

$$\theta_C = 2 \arcsin \frac{R_B}{(a^2 + b^2)^{1/2}} + 2 \arctg \frac{b}{a},$$

где  $a = r_C + r_A + 0.33(r_A + r_B)$ ,  $b = 0.94(r_A + r_B)$ ,  $\theta_C$  — конический угол заместителя  $AB_3$  во фрагменте  $C-AB_3$ ,  $r_A$ ,  $r_B$ ,  $r_C$  — ковалентные радиусы атомов А, В и углерода С,  $R_B$  — ван-дер-ваальсов радиус фрагмента В. Если в качестве фрагмента В выступают многоатомные группировки, то применяются их эффективные радиусы. Для несимметричных заместителей  $AB, B_2, B_3$  угол экранирования определяется из следующего соотношения:

$$\theta_C = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 \theta_i.$$

Степень экранирования  $\lambda_C$  — это занимаемая заместителем часть сферы у атома углерода, связанного с заместителем. Она рассчитывается для того, чтобы оперировать с показателем заполнения пространства

$$\lambda_C = \sin^2 \frac{\theta_C}{4}.$$

Значения углов  $\theta_C$  и степени  $\lambda_C$  экранирования для широкого круга заместителей различной природы и строения приведены в работе [9].

Однако заместитель служит не только экранирующим элементом в молекуле сорбата. Он воздействует на электронную систему основного структурного фрагмента молекулы. Степень это-

го воздействия может быть охарактеризована индуктивной константой Тафта  $\sigma^*$ . В справочной литературе [10] имеются данные по значениям индуктивных констант  $\sigma^*$  важнейших заместителей. Кроме того, показано [11], что эти константы для алкильных заместителей сложного строения могут быть рассчитаны путем суммирования инкрементов, отвечающих простейшим фрагментам заместителя:

$$\sigma_R^* = \sigma_{Et}^* + (\sigma_{CH_2}^* + \sigma_{CH_3, \alpha}^* + \sigma_{CH_3, \beta}^*),$$

где  $\sigma_{Et}^*$  — табличное значение индуктивной константы этильного радикала; вклад метиленового звена  $\sigma_{CH_2}^* = -0.014$ , вклад метильной группы в  $\alpha$ -положении  $\sigma_{CH_3, \alpha}^* = -0.094$  и вклад в  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\omega$ - и других положениях  $\sigma_{CH_3, \beta}^* = -0.008$ .

Возможность теоретического расчета значений индуктивных констант Тафта  $\sigma^*$ , угла  $\theta_C$  и степени  $\lambda_C$  экранирования заместителей, исходя из их структуры, дает неоспоримые преимущества этим параметрам по сравнению с другими индуктивными и пространственными параметрами.

Среди топологических индексов наибольшую популярность приобрели индексы молекулярной связности  $\chi$  [12, 13], расчет которых основан на математической обработке параметров группировок атомов скелета молекулы, проводимой с учетом степени его разветвления, циклизации, ненасыщенности и содержания гетероатомов. Таким образом, индексы связности представляют собой численное описание структуры. Структурную формулу органического соединения, в топологическом понимании составляет граф (углеродный скелет без атомов водорода), вершины которого соответствуют атомам, а ребра — связям между атомами.

Для молекул, содержащих гетероатомы, введено понятие о валентной молекулярной связности [13, 14], порядок расчета которой рассмотрен в работе [15]. Методика расчета индексов связности цепи и разветвления различных порядков детально рассмотрена в работах [13 - 15].

Индекс связности первого порядка учитывает парные взаимодействия соседних атомов в молекуле. Существенным недостатком индекса  ${}^1\chi$  является то, что он не различает *мета*- и *пара*-изомеры ароматических соединений. Индексы связности высоких порядков, учитывающие не только ближайшие парные, но и отдаленные взаимодействия атомов в молекуле, обеспечивают более

полное описание структурных особенностей изучаемых соединений.

Рассчитанные значения  $V_w$  и индексов связности применяли для построения структурных моделей ароматических соединений и определения их корреляционной связи с параметрами удерживания в газовой и жидкостной хроматографии путем решения всех возможных линейно-регрессионных уравнений вида

$$R = f(V_w, {}^1\chi \dots {}^n\chi_m), \quad (1)$$

где  $n$  – порядок индекса связности,  $m$  – обозначение индекса цепи или разветвления. Физический смысл параметров уравнения (1) трактуется следующим образом: ван-дер-ваальсов объем описывает размер хроматографируемого вещества, а индексы связности  $\chi$  характеризуют тонкоструктурные особенности его формы. Следует отметить, что физический смысл индексов связности, по-видимому, значительно шире. Недавно появившиеся сведения [16] указывают на тесную корреляцию индексов связности с термодинамическими функциями растворения. Показано также, что величины  $\chi$  могут быть интерпретированы как энергетические характеристики  $\pi$ -электронных систем [17].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования явились алкилбензолы состава  $C_6-C_{11}$ , параметры удерживания которых определены в условиях газожидкостной хроматографии на капиллярных колонках с метилсилоксаном OV-101 при 100°C [18] и гептафениловым эфиром при 120°C [19], а также параметры удерживания ароматических соединений в газовой и жидкостной хроматографии, опубликованные в литературе [20 - 26].

Для установления зависимости между строением молекул сорбатов и их удерживанием были разработаны и исследованы различные структурные модели, определяющие особенности хроматографического поведения ароматических соединений в газовой и жидкостной хроматографии в соответствии с уравнением

$$R = \sum_{i=1}^n a_i x_i + b, \quad (2)$$

где  $R$  – параметр удерживания (индекс удерживания или логарифм коэффициента емкости);  $x_i$  – дескриптор, характеризующий особенности структуры сорбата;  $a_i, b$  – коэффициенты. Определение коэффициентов уравнений вида (2) проводили методом наименьших квадратов.

**Таблица 1.** Результаты статистической обработки уравнений (4) - (6) для расчета логарифмов коэффициентов емкости ароматических соединений в условиях ОФЖХ

Неподвижная и подвижная фазы	A	B	C	D	r	$\Delta$
<i>n</i> -алкилбензолы						
Сферисорб ODS-2, 40% MeOH	1.066	0.387			0.9986	0.019
	1.140	0.312	0.015		0.9998	0.007
	1.069	0.402	-0.342	-0.001	1.0000	0.001
Гиперсил SAS, 50% MeOH	-0.040	0.244			0.9969	0.017
	0.035	0.169	0.015		0.9999	0.002
	-0.048	0.267	-0.465	0.001	1.0000	0.001
Магнусил C-22, 50% MeOH	-0.020	0.245			0.9929	0.027
	0.092	0.132	0.022		0.9996	0.006
	-0.026	0.275	-0.633	0.001	1.0000	0.001
<i>o</i> -полиметилбензолы						
Силикагель, гексан	0.077	0.103			0.9962	0.019
	0.064	0.109	-0.104	0.004	0.9983	0.014
N-алкилбензамиды						
Партисил ODS, 40% MeOH	0.203	0.145			0.9597	0.038
	0.368	-0.020	0.033		0.9996	0.004
	0.180	0.199	-1.075	0.004	1.0000	0.001
Партисил ODS-2, 35% MeOH	0.486	0.277			0.9818	0.049
	0.697	0.066	0.042		1.0000	0.001
	0.442	0.356	-1.529	0.008	1.0000	0.001



Таблица 2. Результаты статистической обработки многофакторных уравнений (2) для различных групп ароматических углеводородов в газовой (ГХ) и жидкостной хроматографии (ЖХ)

Уравнение	Структурная модель и неподвижная фаза	Параметр	Коэффициенты уравнения					r	Δ
			a <sub>1</sub>	a <sub>2</sub>	a <sub>3</sub>	a <sub>4</sub>	b		
алкилбензолы C <sub>6</sub> - C <sub>11</sub>									
I	V <sub>w</sub> , <sup>5</sup> χ <sub>рс</sub> , <sup>6</sup> χ <sub>р</sub> Силикагель КСС-4 (ЖХ)	lg k'	0.009	-0.103	0.243	-	-0.013	0.998	0.007
II	OV-101 (ГХ)	lg k'	0.032	0.121	-1.083	-	-2.523	0.998	0.023
III	OV-101 (ГХ)	I	11.48	44.52	-392.0	-	99.1	0.998	8.6
IV	Сквалан (ГХ)	I	10.85	60.01	-332.6	-	122.6	0.999	7.6
алкилбензолы C <sub>6</sub> - C <sub>10</sub>									
V	V <sub>w</sub> , <sup>5</sup> χ <sub>рс</sub> , <sup>6</sup> χ <sub>р</sub> Гипресил SAS (ЖХ)	lg k'	0.019	-0.171	0.717	-	-0.948	0.999	0.012
VI	Гипресил ODS (ЖХ)	lg k'	0.021	-0.100	0.724	-	-0.850	0.999	0.013
VII	Магнусил С-22 (ЖХ)	lg k'	0.020	-0.096	0.632	-	-0.989	0.999	0.014
VIII	OV-101 (ГХ)	lg k'	0.031	0.100	-0.948	-	-2.477	0.998	0.021
IX	OV-101 (ГХ)	I	11.18	36.51	-341.8	-	116.5	0.998	7.7
X	Сквалан (ГХ)	I	10.81	51.71	-307.4	-	125.6	0.999	6.1
алкилбензолы C <sub>9</sub> - C <sub>11</sub>									
XI	V <sub>w</sub> , <sup>1</sup> χ, <sup>2</sup> χ, <sup>5</sup> χ <sub>рс</sub> Файнсил С-2 (ЖХ)	lg k'	0.011	-0.014	0.024	-0.101	-0.639	0.988	0.009
XII	Файнсил С-8 (ЖХ)	lg k'	0.10	-0.020	0.013	-0.073	-0.562	0.990	0.009
XIII	Файнсил С-18 (ЖХ)	lg k'	0.002	0.100	0.020	0.043	-0.363	0.930	0.020
XIV	OV-101 (ГХ)	lg k'	0.059	-0.535	-0.315	0.090	-2.373	0.992	0.021
XV	OV-101 (ГХ)	I	21.14	-191.6	-119.3	44.47	152.8	0.991	8.5
XVI	Сквалан (ГХ)	I	24.15	-249.4	-128.7	35.17	123.3	0.994	6.9
Полициклические ароматические углеводороды									
XVII	V <sub>w</sub> , <sup>1</sup> χ, <sup>2</sup> χ, <sup>3</sup> χ <sub>р</sub> Бондапак С-18 (ЖХ)	lg k'	0.013	-0.407	0.801	-0.238	-0.593	0.995	0.023
XVIII	OV-101 (ГХ)	I	-2.93	984.7	-407.4	-178.5	-623.5	0.998	22.6
XIX	OV-101 (ГХ)	I'	-5.00	1202.0	-539.2	-184.5	-647.2	0.997	28.5
XX	SE-52 (ГХ)	I*	-0.450	125.8	-21.2	-34.8	-83.2	0.997	4.2

\* Индексы Ли.

Таблица 3. Структурные параметры, экспериментальные и рассчитанные значения параметров удерживания ароматических углеводородов по уравнениям V (lg k') и X (I)

Углеводороды	V <sub>w</sub> , мл/моль	Индекс связанности		Гиперсил ODS (ЖХ)		Сквалан (ГХ)	
		<sup>5</sup> χ <sub>рс</sub>	<sup>6</sup> χ <sub>р</sub>	опыт	расчет	опыт	расчет
Бензол	48.36	0.000	0.000	0.150	0.157	650.6	648.6
Толуол	59.51	0.167	0.064	0.420	0.420	760.1	758.1
Этилбензол	69.74	0.254	0.124	0.650	0.667	850.0	854.8
n-Ксилол	70.66	0.304	0.111	0.700	0.672	864.6	871.3
m-Ксилол	70.66	0.470	0.159	0.700	0.690	864.8	865.2
o-Ксилол	70.66	0.455	0.111	0.650	0.657	886.0	879.2
n-Пропилбензол	79.97	0.297	0.197	0.930	0.929	938.0	945.2
1,3,5-Триметилбензол	81.81	0.914	0.269	0.970	0.958	969.0	974.9
1,2,4-Триметилбензол	81.81	0.712	0.186	0.930	0.918	987.0	989.9
1,2,3-Триметилбензол	81.81	0.968	0.193	0.880	0.897	1012.9	1001.1
n-Бутилбензол	90.20	0.273	0.287	1.200	1.210	1036.8	1027.0
1,2,4,5-Тетраметилбензол	92.96	1.055	0.239	1.160	1.154	1107.1	1112.0
1,2,3,5-Тетраметилбензол	92.96	1.316	0.281	1.150	1.159	1113.1	1112.6

Таблица 4. Результаты статистической обработки уравнения вида  $\lg k' = f(\chi, \chi_{pc}, \chi_p, \lambda_c)$  для N-алкилбензаминов

Подвижная фаза	$a_1$	$a_2$	$a_3$	$a_4$	$b$	$r$	$\Delta$
Ультрасфер ODS							
20% MeCN	-0.121	0.345	8.457	-0.898	-0.353	0.994	0.043
35% MeCN	-0.298	0.310	9.679	-1.089	0.441	0.991	0.051
Партисил ODS							
40% MeOH	-0.208	0.163	5.611	-0.818	0.583	0.984	0.034
Партисил ODS-2							
20% MeCN	-0.090	0.313	7.720	-1.038	0.014	0.994	0.040
40% MeCN	-0.057	0.227	4.817	-0.491	-0.340	0.993	0.029
35% MeOH	-0.243	0.285	8.804	-1.107	0.649	0.989	0.050
55% MeOH	-1.161	0.212	5.862	-0.718	0.128	0.990	0.034

Результаты статистической обработки уравнений для некоторых групп ароматических соединений (см. ниже) приведены в табл. 1 - 4.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Особенности структуры молекул различных соединений отображаются их физико-химическими свойствами. Для ароматических углеводородов, молекулы которых имеют небольшие дипольные моменты, основной вклад в межмолекулярное взаимодействие вносят дисперсионные силы. Эти же силы являются определяющими в процессе разделения ароматических углеводородов в условиях газожидкостной (ГЖХ) и обращенно-фазовой хроматографии (ОФЖХ). Поэтому естественно ожидать наличия взаимосвязи

между индексами удерживания алкилбензолов и их физико-химическими свойствами.

Действительно, для этих соединений наблюдается линейная зависимость индексов удерживания от молярной рефракции  $R_m$ , температуры кипения  $t_{кип}$  и логарифма давления их насыщенных паров  $\lg p_{нас}$  (рис. 1). Уровень корреляции этих зависимостей в условиях обращенно-фазовой хроматографии ( $r = 0.992 - 0.994$ ) несколько ниже, чем для аналогичных соотношений, полученных в условиях газожидкостной хроматографии ( $r = 0.999 - 0.9999$ ). Такое различие обусловлено тем, что при жидкостной хроматографии молекулы производных бензола, находящиеся в конденсированной фазе, более поляризованы. В процессе их взаимодействия с подвижной и неподвижной фазами роль дисперсионных сил снижается, а индукционных и ориентационных сил — возрастает.

Использование линейной зависимости удерживания от физико-химических свойств алкилбензолов позволяет проводить прогнозирующий расчет их индексов удерживания в условиях обращенно-фазовой жидкостной хроматографии с погрешностью в 15 - 20 е. и. Существенным недостатком таких схем расчета индексов удерживания является ограниченность данных по физико-химическим константам сорбатов. На практике чаще возникают ситуации, когда банк физико-химических параметров исследуемых веществ неполон или отсутствует вовсе. В этом случае приходится опираться только на сведения о структуре сорбата и ее влиянии на удерживание. Наиболее простая и логичная связь между удерживанием и экстенсивными параметрами молекулы: молекулярной массой, молярным объемом, числом атомов углерода, составляющих молекулу. В узких гомологических рядах эти параметры эквивалентны и могут быть заменены порядковым номером гомолога  $Z$ .

Для монозамещенных  $n$ -алкилбензолов в условиях обращенно-фазовой хроматографии наблюдается линейная зависимость индекса удерживания

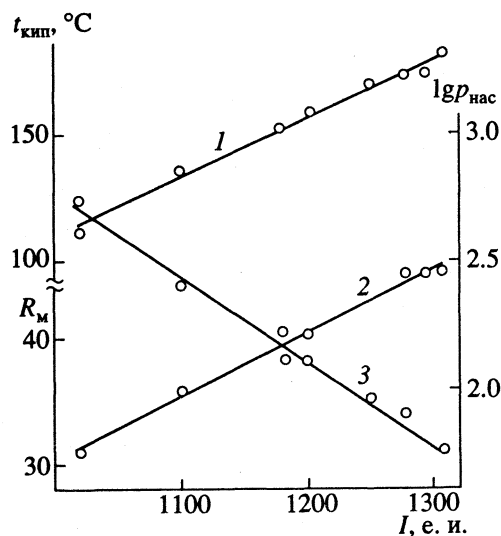


Рис. 1. Взаимосвязь индексов удерживания  $I$  алкилбензолов в условиях ОФЖХ (Сферисорб ODS-2, 50% MeOH) с их температурами кипения  $t_{кип}$  (1), молярными рефракциями  $R_m$  (2), логарифмами давления насыщенных паров  $\lg p_{нас}$  (3).

от порядкового номера гомолога (рис. 2). Это отношение представляет собой частный случай аддитивной схемы расчета параметров удерживания соединений, различающихся количеством одного и того же структурного фрагмента молекулы. В узких гомологических рядах таким фрагментом является метиленовая группа.

Для широких гомологических рядов, включающих гомологи со скелетной изомерией, выполнение аддитивной схемы будет соблюдаться только в том случае, если вклад каждого структурного фрагмента в удерживание будет соотнесен с особенностями его структуры. Очевидно, что вклад алкильной группы в хроматографическое удерживание не может быть объяснен ее экстенсивными параметрами (числом углеродных атомов, молярным объемом и т.п.), поскольку изомерные соединения имеют одинаковые значения этих параметров. Поэтому величину вклада в удерживание характеризовали с помощью пространственных параметров – угла  $\theta_C$  и степени  $\lambda_C$  экранирования, создаваемых алкильным радикалом по отношению к основному структурному фрагменту молекулы (бензольному кольцу).

В условиях газожидкостной хроматографии установлена [27] линейная зависимость величины вклада в удерживание, обусловленная алкильным радикалом, от создаваемого им угла  $\theta_C$  экранирования. При этом вклад в удерживание предложено характеризовать с помощью приведенного инкремента индекса удерживания  $i_R$  [27]. Линейность зависимости приведенного инкремента  $i_R$  от угла  $\theta_C$  и степени  $\lambda_C$  экранирования наблюдается также в условиях обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (рис. 3, 4).

Использование пространственных характеристик алкильных заместителей не отражает их влияния на электростатические параметры молекул сорбатов, роль которых существенна в условиях конденсированного состояния вещества. Степень этого влияния может характеризоваться индуктивной константой Тафта  $\sigma^*$ . Изменение электронной плотности фенильного кольца под влиянием алкильной группы вызывает изменение энергии взаимодействия молекулы алкилбензола с неподвижной фазой, что сопровождается соответствующим изменением значения параметра удерживания. Таким образом, вклад алкильной группы в удерживание должен коррелировать с величиной ее индуктивной константы  $\sigma^*$ . Линейная форма этой зависимости установлена как для газожидкостной [27], так и для обращенно-фазовой хроматографии алкилбензолов (рис. 5).

Высокий уровень корреляции найденных зависимостей (рис. 3 - 5) указывает на возможность их использования для прогнозирующего расчета индексов удерживания алкилбензолов как в условиях газожидкостной [28], так и в обращенно-фазовой

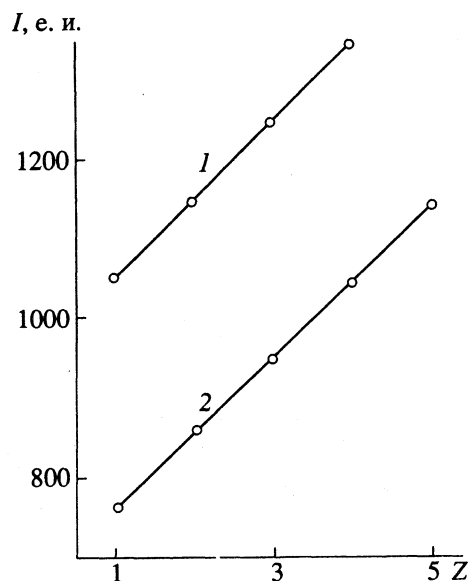


Рис. 2. Зависимости индексов удерживания  $I$   $n$ -алкилбензолов от порядкового номера гомолога  $Z$  в различных условиях: 1 – ОФЖХ (Сферисорб ОДС-2, 70% MeCN), 2 – ГЖХ (OV-101,  $N_2$ , 100°C).

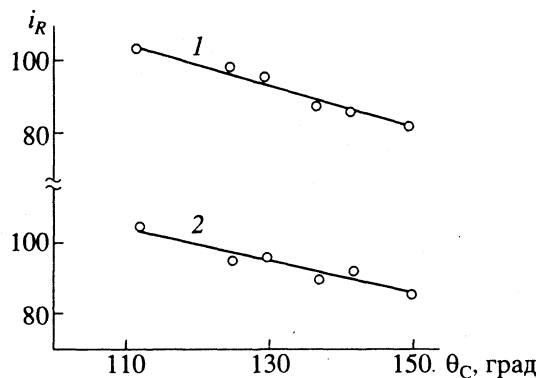


Рис. 3. Зависимости приведенного инкремента  $i_R$  алкильной группы от угла экранирования  $\theta_C$  в различных условиях: 1 – ГЖХ (OV-101,  $N_2$ , 100°C), 2 – ОФЖХ (Сферисорб ОДС-2, 50% MeOH).

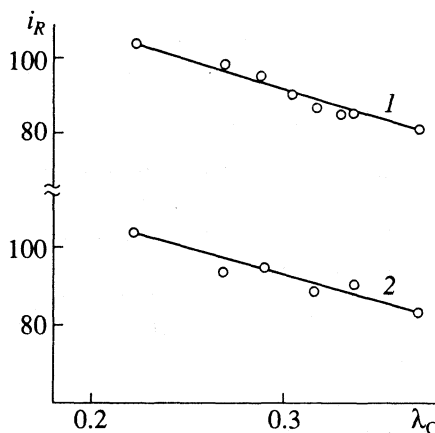


Рис. 4. Зависимости приведенного инкремента  $i_R$  алкильной группы от степени экранирования  $\lambda_C$  в различных условиях: 1 – ГЖХ (ПФЭ,  $N_2$ , 120°C), 2 – ОФЖХ (Сферисорб ОДС-2, 80% MeCN).

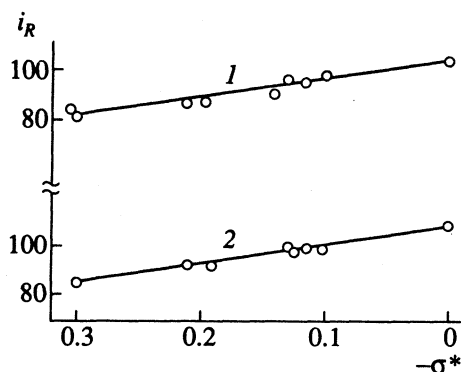


Рис. 5. Зависимости приведенного инкремента  $i_R$  алкильной группы от ее индуктивной константы  $\sigma^*$  в различных условиях: 1 – ГЖХ (OV-101,  $N_2$ ,  $100^\circ C$ ), 2 – ОФЖХ (Сферисорб ОДС-2, 70% MeOH).

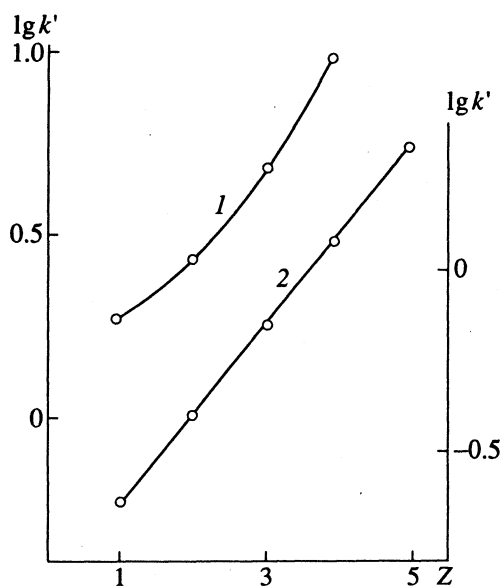


Рис. 6. Зависимости логарифма коэффициента емкости  $lg k'$   $n$ -алкилбензола от порядкового номера гомолога  $Z$  в различных условиях: 1 – ОФЖХ (Магнусил С-22, 50% MeOH), 2 – ГЖХ (OV-101,  $N_2$ ,  $120^\circ C$ ).

хроматографии по корреляционно-аддитивной схеме

$$I_{AB} = I_B + n_C i_R = I_B + n_C(A + BX), \quad (3)$$

где  $I_A$ ,  $I_{AB}$  – индексы удерживания бензола и его алкилпроизводного,  $n_C$  – число углеродных атомов в алкильной группе,  $i_R$  – приведенный инкремент индекса удерживания,  $X$  – параметр, отображающий структуру алкильной группы (индуктивная константа  $\sigma^*$ , угол  $\theta_C$  или степень  $\lambda_C$  экранирования).

Несмотря на существенные преимущества системы индексов удерживания, в жидкостной хроматографии для представления данных по удерживанию чаще используются коэффициент емкости  $k'$  или его логарифм  $lg k'$ , как более просто вычисляемые параметры.

Зависимость логарифма коэффициента емкости  $lg k'$  от порядкового номера  $Z$  гомолога в ряду  $n$ -алкилбензолов линейна в условиях газофазной хроматографии. В то же время при обращенно-фазовой хроматографии эта зависимость имеет нелинейный характер (рис. 6). Нами выполнена оценка применимости различных форм уравнений, описывающих взаимосвязь логарифмов коэффициентов емкости  $lg k'$  ароматических соединений с порядковым номером гомолога: линейная (4), квадратичная (5), универсальное уравнение (6), которое предложили авторы работы [2]:

$$lg k' = A + BZ, \quad (4)$$

$$lg k' = A + BZ + CZ^2, \quad (5)$$

$$lg k' = A + BZ + C \frac{lg Z}{Z} + \frac{D}{(Z-2)^2 + 0.1}. \quad (6)$$

Для выбора вида зависимости, наиболее точно описывающей корреляцию между величиной  $lg k'$  и порядковым номером гомолога  $Z$ , были определены коэффициенты уравнений (4) – (6) и сопоставлены погрешности расчета  $lg k'$  для первых четырех членов гомологических рядов  $n$ -алкилбензолов,  $o$ -полиметилбензолов и  $N$ -алкилбензамидов.

Анализ полученных данных (табл. 1) показал, что квадратичное (5) и универсальное (6) уравнения наиболее точно описывают эту зависимость. Для них получены наименьшие значения стандартных отклонений ( $\Delta$ ) расчетных значений  $lg k'$  от экспериментальных для всех исследованных гомологических рядов (табл. 1).

Проверка экстраполяционных возможностей этих уравнений выполнена для гомологического ряда  $N$ -алкилбензамидов. Удерживание ближайшего гомолога  $N$ -пентилбензамида определяется по уравнениям (5), (6) с одинаковой погрешностью в 1.3 – 3.2%. В то же время ошибка расчета по линейному уравнению (4) существенно выше (8 – 12%).

Ранее было показано [29], что закономерности взаимосвязи газохроматографических индексов удерживания с порядковым номером гомолога полизамещенных бензолов имеют свои особенности, связанные со строением полностью замещенных по фенильному кольцу молекул. Аналогичное явление наблюдается также в обращенно-фазовой хроматографии при элюировании *орто*-полиметилбензолов на силанизированном силикагеле [20], параметры удерживания которых представлены в виде  $lg k'$ . Для учета особенности структуры гексазамещенных гомологов бензола уравнение (6) целесообразно дополнить составляющей с экстремумом при  $Z = 6$ :

$$lg k' = A + BZ + C \frac{lg Z}{Z} + \frac{D}{(Z-2)^2 + 0.1} + \frac{E}{(6-Z)^2 + 0.1}. \quad (7)$$

Сравнение различных форм уравнений (4) - (7) показало, что в гомологическом ряду вицинально замещенных полиметилбензолов зависимость  $\lg k'$  от порядкового номера гомолога наилучшим образом аппроксимируется модифицированным уравнением (7). Это уравнение имеет более высокий уровень корреляции ( $r = 1.000$ ), чем исходное уравнение (6).

Применение уравнений (4) - (7) ограничивается узкими гомологическими рядами соединений, поскольку для смесей ароматических соединений, содержащих многочисленные изомеры, использование порядкового номера гомолога в качестве независимой переменной является неэффективным, так как значение  $Z$  не различает изомеры. Поэтому интерпретацию корреляционных соотношений указанных смесей более целесообразно осуществлять на основе ван-дер-ваальсова объема и индексов молекулярной связности различных порядков, обладающих высокими дискриминирующими свойствами [4, 7, 15].

Действительно, сочетание величин  $V_w$  и индексов связности цепи и разветвления позволяет создать структурные модели различных ароматических углеводородов и определить их корреляционную связь с хроматографическими параметрами удерживания как в газовой, так и в жидкостной хроматографии (табл. 2).

Сравнение уравнений, описывающих удерживание ароматических углеводородов в газовой хроматографии (уравнения II, VIII, XIV) и обращенно-фазовом варианте жидкостной хроматографии (уравнения I, V - VII, XI - XIII), однозначно свидетельствует, что механизм разделения этих соединений в обоих случаях идентичен, так как характеризуется аналогичными уравнениями (табл. 2). Это связано с тем, что при использовании силанизированного силикагеля в обращенно-фазовой хроматографии удерживание определяется преимущественно неспецифическим межмолекулярным взаимодействием в системе сорбат-сорбент, т.е. слабыми дисперсионными силами. Взаимодействие углеводородов с неполярными фазами в газовой хроматографии также основано на дисперсионных силах.

Уровень корреляции рассматриваемых уравнений в жидкостной хроматографии во многом зависит от природы и концентрации органического модификатора в подвижной фазе и согласуется с общеизвестными представлениями о влиянии этих факторов на величину  $k'$  [30]. Этим можно объяснить более высокий коэффициент корреляции уравнений (I, V - VII) по сравнению с уравнениями (XI - XIII).

Хроматографическое удерживание ароматических углеводородов  $C_6 - C_{11}$  наиболее точно отражается моделью, включающей ван-дер-ваальсов объем и индексы связности  ${}^5\chi_{pc}$  и  ${}^6\chi_p$ . Описывающий размер молекул ван-дер-ваальсов объем

объясняет большую часть изменений коэффициента емкости и индекса удерживания. Среди индексов связности, характеризующих особенности формы разделяемых веществ, преобладающий вклад в удерживание вносит индекс шестого порядка  ${}^6\chi_p$ , который более полно отражает структуру бензольного кольца по сравнению с индексами низших порядков -  ${}^1\chi$ ,  ${}^2\chi$ ,  ${}^3\chi_p$ . Вклад индекса  ${}^5\chi_{pc}$ , который весьма чувствителен к замещениям в алкильных цепях и бензольном кольце, связан с характеристикой степени разветвленности углеводородов. При этом индексы  ${}^5\chi_{pc}$  и  ${}^6\chi_p$  оказывают противоположные влияния на параметры удерживания (табл. 2).

При моделировании смесей, содержащих заметное количество разветвленных углеводородов, роль индекса  ${}^5\chi_{pc}$  оказывается решающей. Так, модель смеси ароматических углеводородов  $C_9 - C_{11}$  (изомерные метилэтил-, диэтил-, бутил-, пентил-, три- и тетраметилбензолы) включает наряду с  $V_w$ ,  ${}^1\chi$ ,  ${}^2\chi$  и индекс  ${}^5\chi_{pc}$  (табл. 2). При этом вклад  ${}^5\chi_{pc}$  в удерживание оказывается наибольшим среди других индексов связности (уравнения XI, XII). Вместе с тем, при переходе к смеси полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) необходимость с индексом  ${}^5\chi_{pc}$  отпадает, а решающее значение приобретает индекс цепи первого порядка  ${}^1\chi$ , который объясняет большую часть изменений параметров удерживания ПАУ. Вклад  ${}^1\chi$  в удерживание существенно превышает вклады остальных дескрипторов, в том числе  $V_w$ .

Сравнение предсказательных возможностей уравнений, представленных в табл. 2, показывает, что относительная ошибка рассчитанных значений газохроматографических индексов удерживания (1 - 2%) значительно меньше, чем относительная ошибка коэффициентов емкости в жидкостной хроматографии, которая может достигать 6 - 8% (табл. 3).

Для описания ароматических соединений, содержащих алкильную группу в бензольном кольце, очень полезным оказался дескриптор  $\lambda_c$ , характеризующий экранирующие свойства алкильных групп. В качестве объекта исследования были выбраны N-алкилбензамиды с алкильными группами  $C_1 - C_5$ , коэффициенты емкости которых для 16 соединений были получены на различных адсорбентах с применением метанола (MeOH) и ацетонитрила (MeCN) методом обращенно-фазовой хроматографии [23].

Зависимость между величиной  $\lg k'$  и структурой N-алкилбензамидов наиболее точно описывается четырехфакторным полиномом первой степени, статистическая обработка которого приведена в табл. 4.

Дополнительный ввод дескриптора  $\lambda_c$  в модель молекулярной связности позволяет повысить уровень корреляции и снизить величину стандартного отклонения. Значимость дескриптора  $\lambda_c$

подтверждается величиной его вклада в удержание: на всех сорбентах она существенно выше вклада всех индексов связности, кроме  ${}^6\chi_p$ . Физико-химический смысл предложенного уравнения регрессии обозначен достаточно четко: индексы связности  ${}^1\chi$ ,  ${}^5\chi_{pc}$ ,  ${}^6\chi_p$  подчеркивают тонкоструктурные особенности строения молекул N-алкилбензамидов, связанные с их размером и степенью разветвления, а  $\lambda_c$  характеризует природу и влияние алкильного заместителя. В квадратичном уравнении

$$\lg k' = f([{}^5\chi_{pc}]^2, [{}^6\chi_p]^2),$$

реализованном в работе [23], физико-химический смысл предложенной модели в значительной степени нивелирован.

Проведенные исследования дают возможность оценить особенности межмолекулярного взаимодействия ароматических соединений в условиях газовой и жидкостной хроматографии на основе топологических и структурных представлений (характеристик). Представленные корреляционные соотношения достаточно надежны и вполне пригодны для предсказания параметров удерживания, осуществления идентификации конкретных ароматических соединений и создания банка данных функциональных зависимостей на основе структурно-сорбционных корреляций.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Сахаров В.М., Богословский Ю.Н., Шевчук И.М. // Журн. физ. химии. 1972. Т. 46. № 7. С. 1878.
- Головня Р.В., Григорьева Д.Н., Журавлева И.Л. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1981. № 8. С. 1825.
- Гаммет Л. Основы физической органической химии: Пер. с англ. М.: Мир, 1972. 534 с.
- Набивач В.М., Дмитриков В.П. // Успехи химии. 1993. Т. 62. № 1. С. 27.
- Martin A.J.P., Synge R.L.M. // Biochem. J. 1941. V. 35. P. 1358.
- Martin A.J.P. // Biochem. Soc. Symp. 1949. V. 3. P. 4.
- Герасименко В.А., Набивач В.М. // Журн. физ. химии. 1991. Т. 65. № 8. С. 2261.
- Bondi A. // J. Phys. Chem. 1964. V. 68. № 3. P. 441.
- Имянитов Н.С. // Журн. орган. химии. 1987. Т. 23. № 5. С. 916.
- Справочник химика. Т. 3 / Под ред. Б.П. Никольского. Л.: Химия, 1965. 612 с.
- Fellous R., Luft R., Rabine J.P. // J. Chromatogr. 1977. V. 140. P. 137.
- Randić M. // J. Amer. Chem. Soc. 1975. V. 97. № 23. P. 6609.
- Kier L.B., Hall L.H. Molecular Connectivity in Chemistry and Drug Research. N.Y.: Acad. Press, 1976. 256 p.
- Kier L.B., Hall L.H. // J. Pharm. Sci. 1976. V. 65. № 12. P. 1806.
- Набивач В.М. // Журн. физ. химии. 1993. Т. 67. № 4. С. 821.
- Набивач В.М. // Там же. 1992. Т. 66. № 3. С. 824.
- Станкевич И.В., Скворцова М.И., Зефирова Н.С. // Докл. РАН. 1992. Т. 324. № 1. С. 133.
- Герасименко В.А., Набивач В.М. // Журн. аналит. химии. 1982. Т. 37. № 1. С. 110.
- Герасименко В.А., Набивач В.М. // Там же. 1988. Т. 43. № 1. С. 109.
- Киселев А.В., Пошкус Д.П., Яшин Я.И. Молекулярные основы адсорбционной хроматографии. М.: Химия, 1986. 272 с.
- Smith R.M., Burr C.M. // J. Chromatogr. 1989. V. 481. № 1. P. 85.
- Jinno K., Kawasaki K. // Chromatographia. 1983. V. 17. № 6. P. 337.
- Wells M.J.M., Clark C.R., Patterson R.M. // J. Chromatogr. 1982. V. 235. № 1. P. 61.
- Wells M.J.M., Clark C.R., Patterson R.M. // Anal. Chem. 1986. V. 58. № 8. P. 1625.
- Engewald W., Wennrich L. // Chromatographia. 1976. V. 9. № 11. P. 540.
- Kaliszan R., Lamparczyk H. // J. Chromatogr. Sci. 1978. V. 16. № 6. P. 246.
- Герасименко В.А., Набивач В.М. // Журн. физ. химии. 1993. Т. 67. № 10. С. 2038.
- Набивач В.М., Герасименко В.А. // Кокс и химия. 1993. № 5. С. 28.
- Герасименко В.А., Набивач В.М. // Журн. физ. химии. 1992. Т. 66. № 8. С. 2183.
- Шатиц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига: Зинатне, 1988. 390 с.

## МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544

### ВЫСОКОТЕМПЕРАТУРНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

© 1994 г. А. Н. Агеев, Я. И. Яшин

*Акционерное общество "Цвет", Дзержинск Нижегородской области*

Исследована зависимость эффективности колонок от температуры в разных вариантах хроматографии, обнаружено возрастание эффективности при 60 - 70°C с последующим уменьшением на гидроксилированных силикагелях с гексаном в качестве элюента. Измерены коэффициенты емкости производных бензола с полярными функциональными группами (-CN, -OCH<sub>3</sub>, -NO<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -OH, -CH<sub>2</sub>OH) на колонках с гидроксилированным силикагелем при высоких (от 100 до 140°C) температурах при использовании в качестве элюента декана. Показана возможность при этих условиях быстрого разделения сильнополярных веществ.

Температура колонки после природы сорбента является наиболее важным параметром хроматографического разделения. Температура влияет как на селективность разделения, так и на эффективность колонки. Кроме того, температура влияет на вязкость элюента. В жидкостной хроматографии разделения проводят обычно при температурах, близких к комнатной, и влияние температуры на селективность и эффективность колонки изучено недостаточно.

Влияние температуры на скорость движения зон в хроматографической колонке в работе [1] исследовано в интервале от 10 до 70°C. Было обнаружено, что для изученных систем в области 20 - 35°C температура слабо влияет на скорость движения зон, это привело позднее к ошибочному выводу, что термостатирование колонки в жидкостной хроматографии необязательно. Влияние температуры на скорость движения зон изучалось позднее в работах [2, 3]. В работе [4] было изучено влияние температуры на удерживание нитробензола, анилина, дифениламина и нитронафталина на гидроксилированном и дегидроксилированном силикагеле, была получена линейная зависимость логарифма удерживаемого объема от обратной температуры, из которой были определены теплоты адсорбции из растворов исследуемых веществ. В этой же работе показана эффективность применения режима программирования в жидкостной хроматографии.

При изучении влияния температуры на удерживаемые объемы веществ при добавлении различных полярных компонентов в неполярный растворитель было выявлено, что в зависимости от природы полярного компонента с повышением температуры величины удерживаемых объемов могут уменьшаться, оставаться постоянными или даже увеличиваться. Подобные же эффекты были обнаружены в случае разделения изомеров

нитрофенолов при разных температурах на оксиде алюминия [5] и изомеров терфенилов на бентоне-34, отложенном на носителе хроматоне [6]. В работе [7] изучено влияние температуры на удерживание производных бензола на жидких кристаллах, нанесенных на силикагель при разных температурах. В области жидкокристаллического состояния наблюдается улучшение разделения.

В работе [8] впервые было проведено разделение при высоких температурах (до 150°C) на насадочных колонках, с деканом в качестве подвижной фазы возможно элюирование на колонке с силикагелем таких сильнополярных веществ, как фенол. В работах [9, 10] проведено разделение на микрокапиллярных колонках длиной до 20 м с внутренним диаметром 50 мкм при 200°C, была достигнута эффективность более одного миллиона теоретических тарелок.

В данной работе продолжено исследование возможностей разделения при высоких температурах на насадочных колонках.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали жидкостный хроматограф "Цвет-304" с УФ-детектором, который имеет воздушный термостат с рабочим диапазоном температур от 30 до 150°C. В верхней части термостата имеются змеевики для предварительного подогрева элюента, поступающего в дозаторы и колонки. Для исследований использовали колонки длиной 10 и 15 см с внутренним диаметром 4 мм. В нормально-фазовом варианте хроматографии в качестве адсорбентов использовали гидроксилированные силикагели С-3 (удельная поверхность 270 м<sup>2</sup>/г, средний диаметр пор 16 нм), силохром С-120 (удельная поверхность 120 м<sup>2</sup>/г, средний диаметр пор более 50 нм) и неполярный

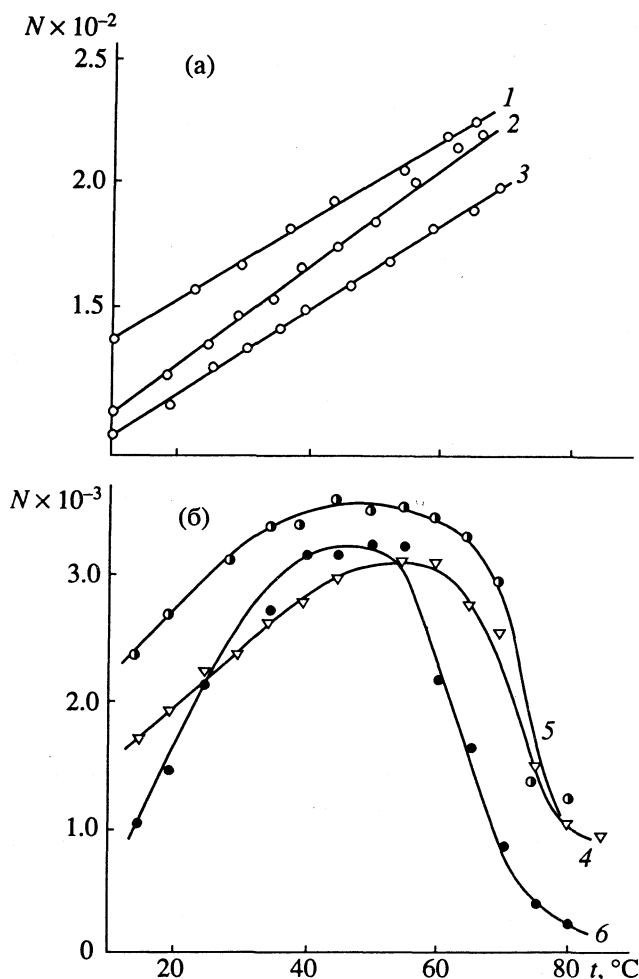


Рис. 1. Зависимости числа теоретических тарелок  $N$  от температуры колонок для фенола (1), нитрофенола (2), четыреххлористого углерода (3) на колонке  $10 \times 0.4$  см с полисорбом-1 (а) и для фенантрена (4), нитробензола (5), дифениламина (6) на колонке  $10 \times 0.4$  см с гидроксильрованным силикагелем (б), элюент для толуола (1), нитробензола (2) и фенола (3) на колонке  $10 \times 0.6$  см с силосорбом С-18, элюент изопропанол-вода (1 : 1).

пористый полимер полисорб-1 (сополимер стирола и дивинилбензола), (удельная поверхность  $300 \text{ м}^2/\text{г}$ ) размер зерен  $30 \text{ мкм}$ ). В обращенно-фазовой хроматографии использовали адсорбенты силосорб-300 с С-18, размер зерен  $5 \text{ мкм}$ . В ка-

честве элюентов использовали гексан, нонан и декан в нормально-фазовом варианте хроматографии и изопропанол с водой в обращенно-фазовой хроматографии.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Было исследовано влияние температуры на эффективность колонки в интервале температур от комнатной до  $100^\circ\text{C}$  в нормально-фазовой хроматографии на полярных и неполярных адсорбентах и в обращенно-фазовой хроматографии на неполярных адсорбентах. На неполярных адсорбентах в нормально-фазовой хроматографии эффективность (число теоретических тарелок) линейно возрастает с ростом температуры колонки (рис. 1а). Это находится в соответствии с теоретическими представлениями – повышением скорости массообмена и уменьшением вклада кинетического размывания с повышением температуры. На гидроксильрованных силикагелях в нормально-фазовой хроматографии зависимость эффективности от температуры имеет явно выраженный максимум в интервале температур  $50 - 70^\circ\text{C}$  для модельной смеси, состоящей из фенантрена, нитробензола и дифениламина, далее эффективность падает (рис. 1б).

Одним из объяснений этому экспериментальному факту может быть изменение природы поверхности силикагеля в связи с десорбцией влаги с поверхности. После десорбции поверхность становится более неоднородной и размывание увеличивается. В обращенно-фазовой хроматографии эффективность может уменьшаться, увеличиваться или слабо изменяться в зависимости от природы сорбента (рис. 2).

Времена удерживания с повышением температуры уменьшаются, особенно значительно они уменьшаются для сильно сорбирующихся соединений, тогда как ширина пика слабо изменяется с повышением температуры для этих случаев. Это означает, что вклад кинетического размывания, который с повышением температуры должен уменьшаться в исследуемых случаях, не является преобладающим.

Коэффициенты емкости  $k'$  полярных веществ на гидроксильрованном силикагеле при разных температурах на колонке  $15 \times 0.6$  см, элюент – декан, скорость элюента  $3 \text{ см}^3/\text{мин}$  (X – функциональная группа)

Вещества	X	$k'$			Вещества	X	$k'$		
		$100^\circ\text{C}$	$120^\circ\text{C}$	$140^\circ\text{C}$			$100^\circ\text{C}$	$120^\circ\text{C}$	$140^\circ\text{C}$
Бензонитрил	–CN	0.30	–	0.19	<i>n</i> -Нитрофенол	–NO <sub>2</sub> , –OH	–	2.00	1.28
Анизол	–OCH <sub>3</sub>	0.45	0.32	0.26	Фенол	–OH	4.10	2.43	1.51
Нитробензол	–NO <sub>2</sub>	0.68	0.47	0.33	Ацетофенон	–COCH <sub>3</sub>	3.88	2.74	1.93
<i>o</i> -Нитрофенол	–NO <sub>2</sub> , –OH	0.67	0.64	0.36	Анилин	–NH <sub>2</sub>	5.70	3.35	2.63
<i>m</i> -Нитрофенол	–NO <sub>2</sub> , –OH	0.80	0.61	0.46	<i>m</i> -Нитроанилин	–NO <sub>2</sub> , –NH <sub>2</sub>	–	7.34	4.74
Бензиловый спирт	–CH <sub>2</sub> OH	1.93	1.34	1.07					



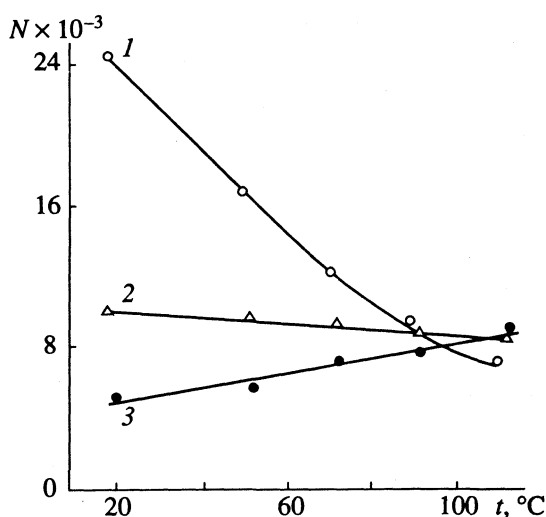


Рис. 2. Зависимости величины  $N$  от температуры колонок изопропанол-вода (1 : 1).

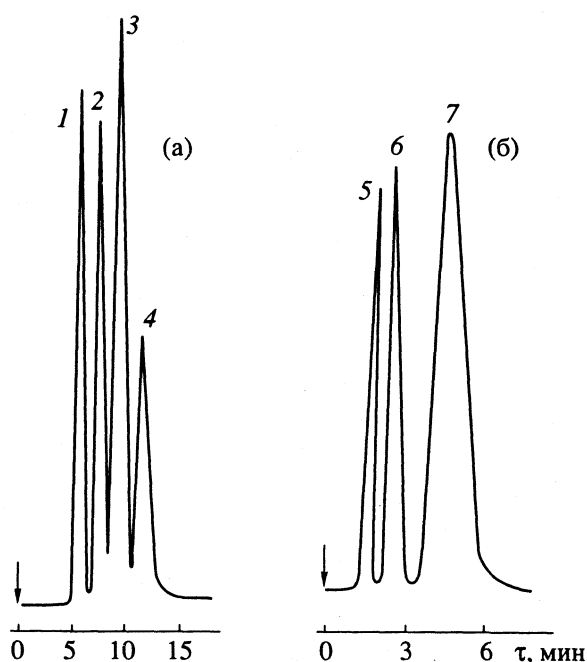


Рис. 3. Хроматограммы разделения производных бензола на колонке  $10 \times 0.4$  см с силихромом С-120, элюент – декан, температура –  $140^\circ\text{C}$ : 1 – бензол, 2 – анизол, 3 – ацетофенол, 4 – фенол и 5 – нитробензол, 6 – *o*-нитроанилин, 7 – *m*-нитроанилин.

Представляет интерес исследование закономерностей удерживания полярных соединений на гидроксированных силикагелях при температурах выше  $100^\circ\text{C}$  в нормально-фазовой хроматографии с неполярными элюентами. В таблице

приведены коэффициенты емкости для разных соединений. Примечательно, что при температурах выше  $100^\circ\text{C}$  за приемлемое время из колонки элюируют сильнополярные соединения с неполярным элюентом деканом, при комнатных температурах многие из этих соединений вообще не выходят из колонки.

На рис. 3а приведена хроматограмма сравнительно быстрого разделения некоторых сильнополярных смесей, а на рис. 3б – хроматограмма разделения изомеров нитроанилинов. Быстро и в виде практически симметричных пиков выходят такие сильнополярные соединения как фенол, изомеры нитроанилинов. Эти результаты открывают новые возможности нормально-фазовой хроматографии на гидроксированном силикагеле при повышенных температурах; используя режим программирования температуры, можно одновременно разделять в этом режиме как неполярные, так и сильнополярные соединения с неполярным элюентом.

Следует отметить также необычный факт, на некоторых образцах силикагеля (в частности на КСК-2) порядок времен удерживания анилина и фенола меняются с повышением температуры.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Le Rosen A.L., Rivet C.A. // Anal. Chem. 1948. V. 20. P. 1093.
2. Lie Tieh Chang // Ibid. 1953. V. 25. P. 1235.
3. Hesse G., Engelhardt H. // J. Chromatogr. 1966. V. 21. P. 228.
4. Lebedeva N.P., Frolov I.I., Yashin Ya.I. // Ibid, 1971. V. 58. P. 11.
5. Kiselev A.V., Frolov I.I., Yashin Ya.I. // Column Chromatography / Ed. by E. Kovats, Souerläemder, AG, CH-5001 Aarau, 1969. P. 116 - 120.
6. Kiselev A.V., Lebedeva N.P., Frolov I.I., Yashin Ya.I. // Chromatographia. 1972. V. 5. P. 341.
7. Aratskova A.A., Vetrova Z.P., Yashin Ya.I. // J. Chromatogr. 1986. V. 365. P. 27.
8. Yashin Ya.I. // Chromatographia. 1982. V. 16. P. 368.
9. Erni F. // J. Chromatogr. 1990. V. 507. P. 141.
10. Lin G., Djordjevic N.M., Erni F. // Ibid. 1992. V. 592. P. 239.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ПОДОБИЯ  
ХРОМАТОГРАММ И ФОРЕГРАММ

© 1994 г. И. Г. Шарина, А. В. Черкасов, А. А. Недоспасов

Российская академия наук, Институт молекулярной генетики, Москва

Предложен метод сравнения сходных хроматограмм, когда каждая хроматограмма отображается вектором из начала координат в  $n$ -мерном пространстве, где  $n$  – общее число учитываемых пиков в серии хроматограмм, каждому пику на хроматограмме соответствует своя ось, а координаты конца вектора по каждой из осей задаются площадями соответствующих пиков. Показано, что хроматограммам, различающимся лишь количеством вещества в пробе, соответствуют равнонаправленные векторы, модули (длины) которых пропорциональны количеству вещества. Степень подобия хроматограмм двух образцов выражена углом  $\alpha$  между их векторами (у идентичных образцов  $\alpha = 0$ ). Отмечена возможность расчета  $\alpha$  и для неполного набора пиков. Метод применен для анализа субстратной специфичности родственных протеаз, многокомпонентных смесей ферментов и для обнаружения ингибиторов экзогенных ферментов в смесях с ферментами. Проведена оценка предложенным методом сходства смесей близкого состава при электрофорезе белков.

Обычно хроматографический анализ вещества отвечает на вопросы “что?” и “сколько?”, причем информация для ответа на первый вопрос задается временами удержания пиков (положением пиков на хроматограмме), на второй – площадями или высотами соответствующих пиков. Существуют, однако, задачи, в которых исследователь либо заранее знает ответ на первый вопрос, либо он его не особенно интересуется. Более того, подчас ответ и на второй вопрос не является непосредственно решением проблемы, ради которой использовалась хроматография. Один из классов таких задач – оценка хроматографическими методами степени схожести количественного состава сложных смесей одинакового или близкого качественного состава. В задачах этого класса серии образцов соответствуют хроматограммы с фиксированным положением по крайней мере большинства пиков, и различия между хроматограммами разных образцов задаются лишь слабыми колебаниями отношения величин отдельных пиков. С двумя подобными задачами мы столкнулись непосредственно. Первая относится к идентификации источника ферментного препарата по спектру специфичности его ферментов, вторая – к идентификации внутривидовых отличий с помощью электрофореза белков в денатурирующих условиях.

Традиционный способ идентификации как индивидуальных ферментов, так и продуцирующих их тканей и целых организмов состоит в последовательном испытании их на эффективность превращения серии однотипных субстратов в стандартных условиях. По результатам испытания каждому ферменту или препарату противопоставляется “профиль специфичности” – перечень

субстратов в порядке уменьшения их эффективности. При  $n$  субстратах число различных профилей теоретически равно  $n!$ . Очевидно, что для эффективного использования метода необходимо использовать достаточно большое число субстратов, а кинетические характеристики самих субстратов по отношению к разным образцам не должны быть сильно закореллированы, т.е. каждый из субстратов должен иметь близкие вероятности оказаться как в начале, так и в конце ряда.

Метод достаточно широко используется для идентификации микроорганизмов по профилям специфичности аминопептидазной активности. В качестве субстратов используют аминокислотные производные какого-либо красителя – обычно, 2-нафтиламина или  $n$ -нитроанилина [1, 2]. Для идентификации видовой принадлежности яда змей используют серии хромогенных пептидных субстратов, расщепляемых протеазами [3]. Показано, что во многих случаях профили специфичности сохраняются для разных популяций змей внутри вида, несмотря на значительные колебания общей протеазной активности яда [3, 4]. Сходные подходы широко применяются и для идентификации индивидуальных ферментов [5 - 7].

Вследствие неизбежных погрешностей в приготовлении отдельных проб, в особенности, в количестве добавленного фермента, и из-за колебаний внешних условий при проведении ферментативной реакции, воспроизводимость метода невысока. Увеличение числа параллельных экспериментов при и так значительном числе образцов с разными субстратами делает метод весьма трудоемким.

Трудоемкость анализа существенно снижается, а воспроизводимость увеличивается, если все

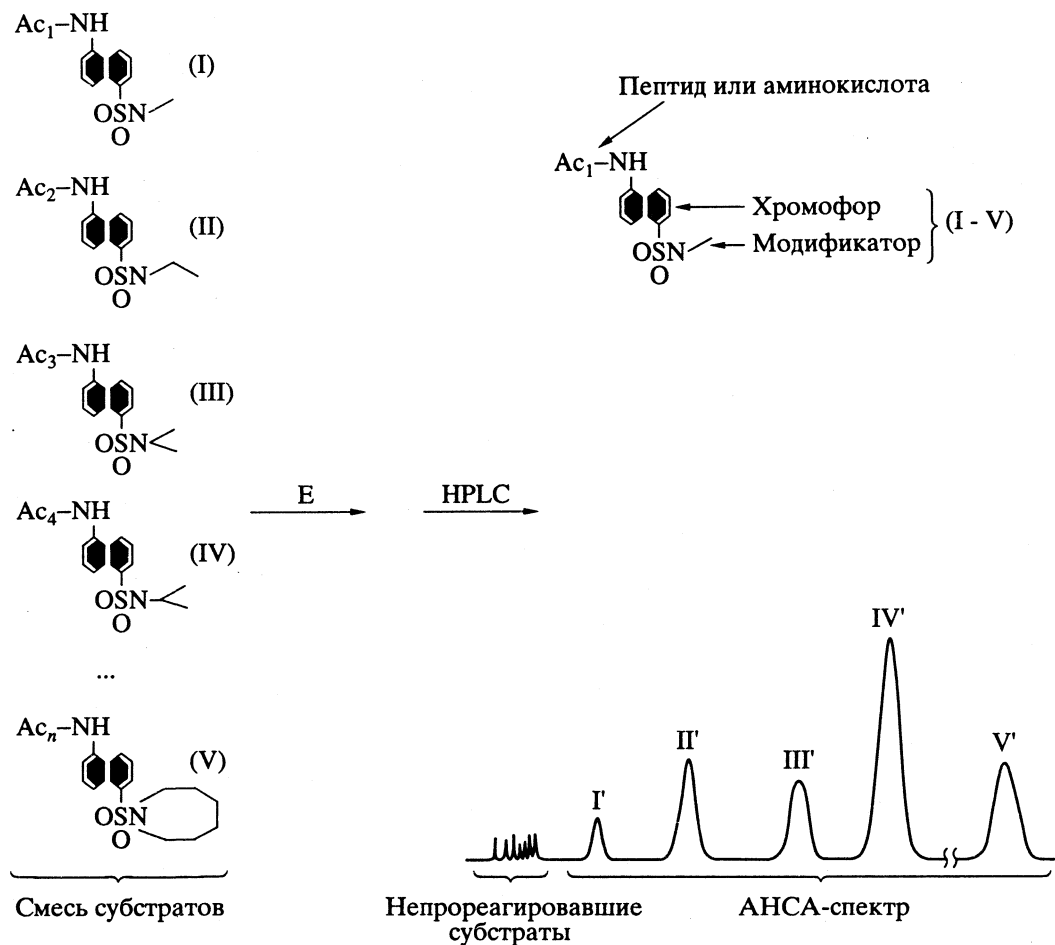


Рис. 1. Схематическое изображение принципа АНСА-анализа, приведен АНСА-спектр свободных аминафталинсульфамидов (I' - V').

субстраты испытывать одновременно, в смеси. Ясно, что анализируемые продукты превращения каждого из субстратов в этом случае должны быть различимы. Применительно к анализу смесей протеаз метод был впервые представлен на IV симпозиуме по колоночной хроматографии (Алма-Ата, 1987 г.) под названием АНСА-анализ (см. схему, представленную на рис. 1).

Идея АНСА-анализа – использование смесей хромогенных субстратов, различающихся детектируемыми группами, с определением хромофоров – продуктов превращения каждого из субстратов [8, 9]. Субстраты конкурируют за активные центры ферментов; в свою очередь, каждый из ферментов выбирает из смеси оптимальные для себя субстраты в соответствии с значениями отношений  $k_{cat}/K_M$  [10]. При этом появляется возможность анализировать смеси близких по специфичности протеаз. Все субстраты смеси находятся в идентичных условиях и анализируются одновременно – помимо выигрыша во времени, существенно повышается точность определения. В качестве детектируемых групп субстратов оказались удобными аминафталинсульфамиды

(АНСА – отсюда и название метода) – синтетически доступные флюоресцентные красители, содержащие две функциональные группы – к аминогруппе присоединяется пептид, отщепляемый протеазой в ходе анализа, сульфамидная группа с различными заместителями обеспечивает хроматографическую индивидуальность (комбинации заместителей в сульфамидных группах у субстратов различны). Очевидно, что положение пиков на хроматограмме в АНСА-анализе задается используемой смесью субстратов и не зависит от природы анализируемого ферментного препарата. Индивидуальность отдельных образцов проявляется в “АНСА-спектрах” – в простейшем случае это просто хроматограмма отщепленных протеазами свободных АНСА (вследствие спектральных отличий АНСА и ацил-АНСА можно регистрировать только первые, как показано на рис. 1). На рис. 2 приведены АНСА-спектры нескольких ядов змей – было показано, что для идентификации вида змеи удобна смесь шести АНСА-субстратов.

Другой случай, когда положение пиков практически не меняется от образца к образцу, –

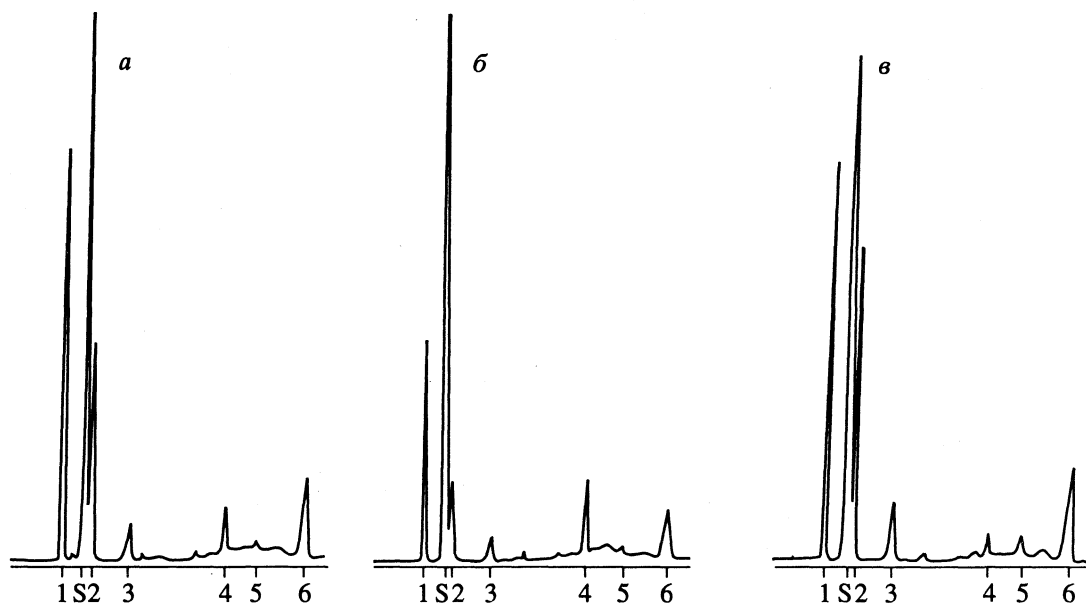


Рис. 2. Хроматограммы продуктов гидролиза смеси хромогенных субстратов (АНСА-спектры) ядами змей разных видов: а – *Vipera ursini*, б – *Vipera berus*, в – *Agkistrodon contortrix contortrix*.

сравнение белковых фореграмм сходного происхождения. Поскольку состав пула белков predetermined генетически, электрофореграммы аналогичных образцов (например, белков крови или яда змей) будут различаться положением полос (пиков) в случае филогенетически далеких орга-

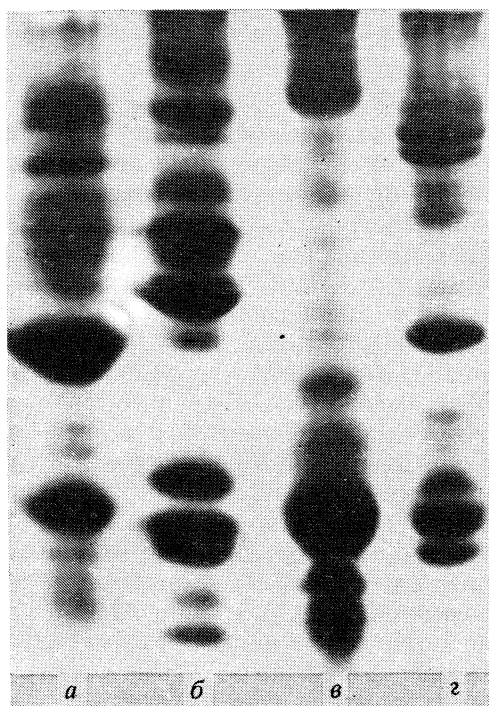


Рис. 3. Гель-электрофорез ядов змей разных видов в денатурирующих условиях: а – *Agkistrodon contortrix contortrix*, б – *Crotalus adamanteus*, в – *Vipera russelli*, г – *Vipera ursini*.

низмов. На рис. 3 приведены электрофореграммы ядов змей разных видов. Видно, что различия задаются уже положением полос. Серия электрофореграмм на рис. 4 принципиально отличается от предыдущей (представлены фореграммы индивидуальных образцов яда гадюки, исследованных в связи с поиском радиоактивных загрязнений в яде змей [11]) – здесь положение полос практически единообразно для всей серии: на левой панели представлено 5 наиболее несхожих (из нескольких десятков) фореграмм. Видно, что даже эти наиболее несхожие фореграммы идентичны по положению подавляющего большинства полос. На правой панели – одна из групп более сходных проб – здесь по положению полос отличий практически нет.

В обоих рассмотренных случаях, когда положение пиков (полос) predetermined (АНСА-спектры и электрофореграммы белков генетически близких организмов), может возникнуть задача установления количественных различий между отдельными образцами по принципу “более сходен – менее сходен”. Первая возникает, например, в связи с проблемами филогении – можно полагать, что у эволюционно близких ферментов или их групп и АНСА-спектры будут близки. Вторая, на примере яда змей, возникает при анализе внутрипопуляционных различий.

Примененный нами метод основан на векторном представлении хроматограмм. Каждая хроматограмма отображается вектором из начала координат в  $n$ -мерном пространстве, где  $n$  – общее число учитываемых пиков в серии хроматограмм. В случае приведенных на рис. 2 АНСА-спектров  $n = 6$  и задается числом использованных субстратов – каждый из субстратов порождает один пик

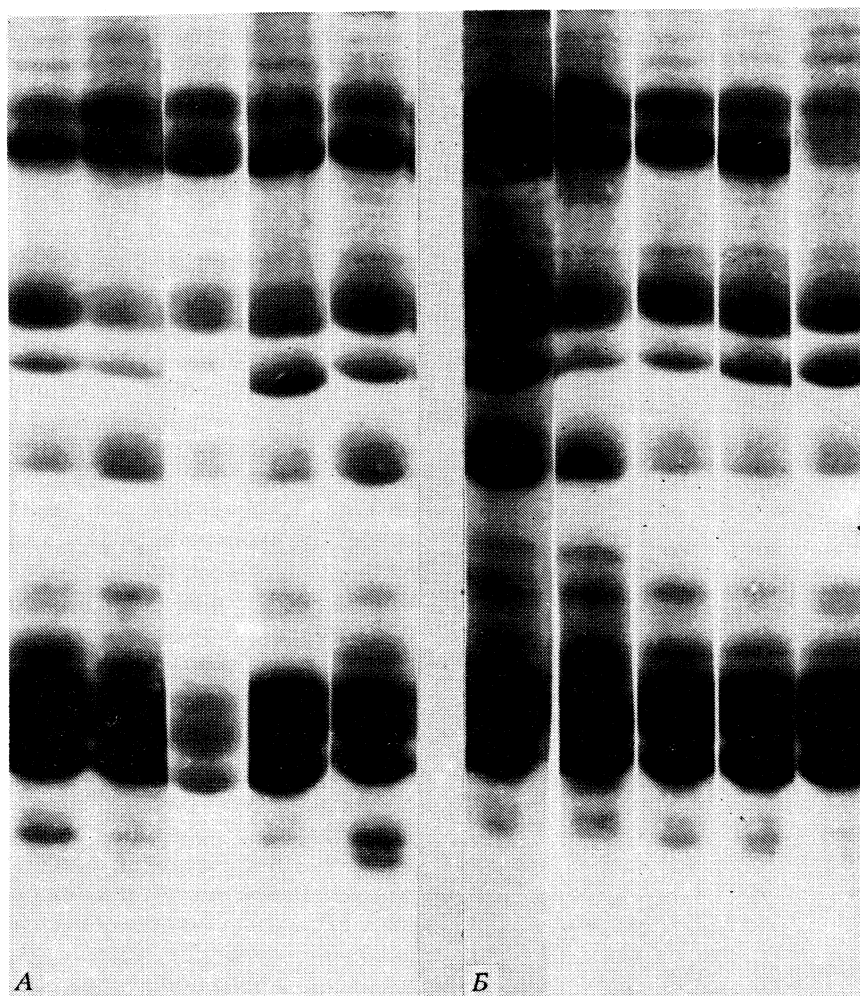


Рис. 4. Гель-электрофорез образцов яда *Vipera berus berus*, взятых из разных популяций. Выборка наименее (А) и наиболее (Б) сходных фореграмм.

АНСА-продукта на хроматограмме. В случае белкового электрофореза число  $n$  задано генетически – это число различных белков в исследуемом препарате. Для представленных на рис. 4 фореграмм  $n = 29$  – по общему числу всех полос. Каждому пику на хроматограмме (полосе на фореграмме) соответствует своя ось, а координаты конца вектора по каждой из осей задаются площадями соответствующих пиков. При этом хроматограммам, различающимся лишь количеством вещества в пробе, соответствуют равнонаправленные векторы, модули (длины) которых пропорциональны количеству вещества (рис. 5). Для электрофореграмм величины пиков получают сканированием.

Степень подобия хроматограмм (фореграмм) двух образцов можно выразить углом  $\alpha$  между их векторами (у идентичных образцов  $\alpha = 0$ ) (рис. 6). Угол между векторами находится по формуле

$$\alpha, \text{град} = (180^\circ/3.14159\dots) \times \arccos \left[ \frac{\sum M_i L_i}{(\sum M_i^2 \sum L_i^2)^{1/2}} \right], \quad (1)$$

где  $M_i, L_i$  – площади пиков  $i$ -вещества в хроматограммах  $M$  и  $L$ . Расчет угла  $\alpha$  может быть выполнен и для неполного набора пиков – исключительно удобный факт, широко используемый практически. Ясно, что векторы, соответствующие повторным измерениям, вследствие случайных ошибок при приготовлении проб, интегрировании хроматограмм и по другим причинам могут различаться по длине (количество образца в пробе) и по направлению. При этом пучок векторов окажется внутри конуса с вершиной в начале координат. (Из-за возможного несовпадения величины ошибки для разных пиков конус, строго говоря, не является круговым – см. рис. 7 и обсуждение ниже.) Образцы принимаются неидентичными, если соответствующие конусы не пересекаются. Удобной мерой воспроизводимости анализа является угол  $\gamma$  между векторами повторных измерений – для однотипных анализов углы  $\beta$  и  $\gamma$  взаимосвязаны, однако на величину  $\beta$  влияет и принимаемая доверительная вероятность правильного распознавания идентичных/неидентичных объектов

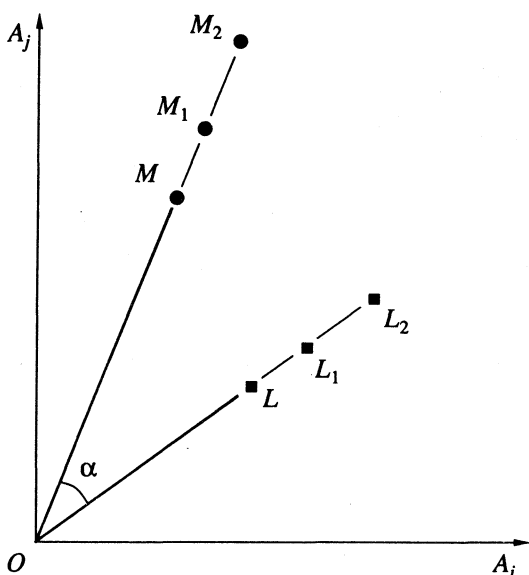


Рис. 5. Оси координат  $A_i$ ,  $A_j$  – площади пиков  $i$ ,  $j$  на хроматограмме,  $M$  и  $L$  – точки, соответствующие двум хроматограммам, угол  $MOL$  ( $\alpha$ ) – степень их подобия. Точки  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $L_1$ ,  $L_2$  – хроматограммы препаратов, отличающихся от  $M$  и  $L$  количеством фермента в пробе.

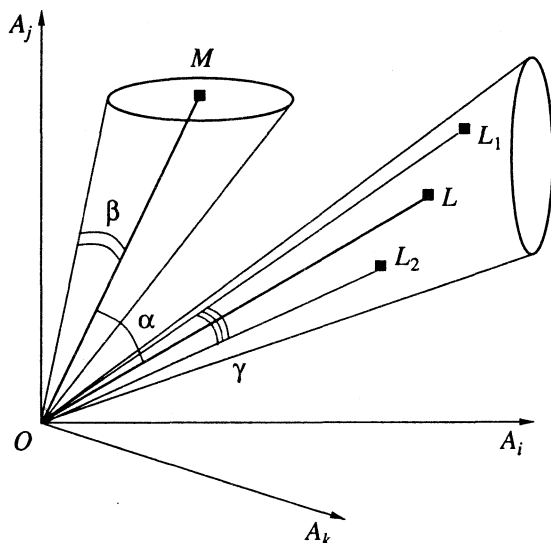


Рис. 6. Пучок векторов повторных измерений ( $L_1$  и  $L_2$  – точки повторных измерений) хроматограмм  $M$  и  $L$  (с доверительной вероятностью  $P$  лежит внутри конуса с углом  $\beta$  между осью и образующей), угол  $L_1OL_2$  ( $\gamma$ ) – мера воспроизводимости анализа. На рисунке с принятой доверительной вероятностью конусы разброса  $M$  и  $L$  не пересекаются ( $\alpha > 2\beta$ ), и хроматограммы  $M$  и  $L$  принимаются неидентичными.

(см. рис. 8 – для большей доверительной вероятности конус шире – угол  $\beta$  больше).

Поскольку многие причины случайных ошибок (например, количество добавленного образца в пробу) вызывают только изменение длины соответствующего вектора, не сказываясь на его

направлении, удобно нормировать хроматограммы на сумму всех пиков, а интенсивность (количество образца в пробе, активность фермента) рассчитывать с использованием внутреннего стандарта. Для многих задач интенсивность вообще не имеет значения.

Очевидно, что использованное нами представление хроматограмм (электрофореграмм) в виде векторов неприменимо, если положения пиков на разных хроматограммах не совпадают, как на рис. 3. Вычисление угла  $\alpha$  по предлагаемому алгоритму формально выполнить можно, но результат ( $90^\circ$ ) можно предсказать и без вычислений – по каждому из возможных местоположений полос (пиков) в одном из образцов пика не окажется, и соответствующие произведения в (1) окажутся равными нулю. Однако мы столкнулись со случаем, когда расчет  $\alpha$  по (1) давал близкие к  $90^\circ$  значения, тем не менее векторное представление хроматограмм имело физический смысл, а задача оценки степени подобия имела решение.

При исследовании ядов змей на присутствие ингибиторов экзогенных протеаз методом АНСА-анализа в субстратную смесь необходимо вводить как субстраты, расщепляемые ферментами ядов, так и субстраты, расщепляемые исследуемыми экзогенными протеазами. Для большинства гадюковых и гремух змей в ядах особенно активны кининогеназы – группа ферментов с высокой специфичностью к субстратам типа Pro-Phe-Arg-X, Arg-X – гидролизуемая связь. Экзогенные протеазы, использованные нами в работе, расщепляют эти субстраты относительно слабо (трипсин) или не расщепляют вообще (химотрипсин и тромбин). Оказалось, что в АНСА-спектрах ядов и их смесей с экзогенными протеазами субстраты типа Pro-Phe-Arg-X расщеплялись много эффективнее всех остальных. Соответственно, хроматограммы разных образцов неизменно отличались огромным пиком АНСА, образованного из Pro-Phe-Arg-X, в вычислениях углов  $\alpha$  он играл доминирующую роль (см. формулу (1) – произведения “с этим пиком” были велики) и величина угла  $\alpha$  была близка к нулю, если в обоих сравниваемых образцах были яды змей, или к  $90^\circ$ , если сравнивали спектры яда и экзогенной протеазы. Однако существует возможность рассчитать значение  $\alpha$  при учете только части пиков, что позволило рассчитать  $\alpha$  по субстратам экзогенной протеазы, без учета кининогеназного субстрата. Поскольку АНСА-спектры аддитивны, если протеазы не взаимодействуют, появилась возможность обнаружить присутствие ингибиторов в ядах – вектора яда ( $V$ ), экзогенной протеазы ( $P$ ) и их смеси ( $S$ ) коллинеарны

$$\alpha_{VS} + \alpha_{PS} = \alpha_{VP}, \quad (2)$$

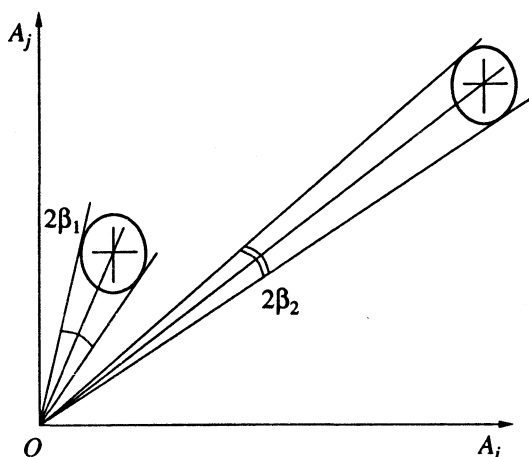


Рис. 7. Фореграммы при равных абсолютных ошибках (угол конуса разброса  $2\beta$  при малых  $A_i$ ,  $A_j$  увеличивается).

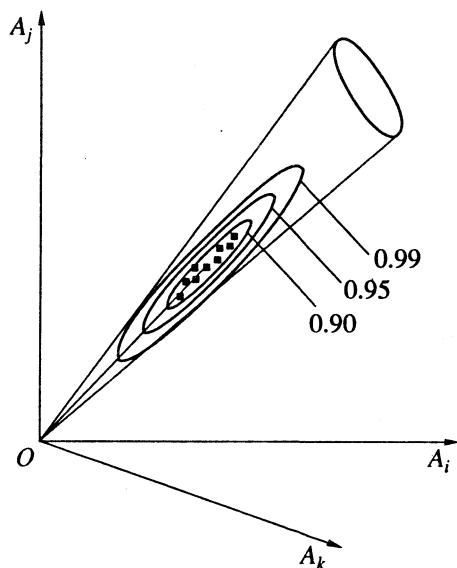


Рис. 8. Фореграммы при проведении повторных измерений. Точки повторных измерений с вероятностью  $P$  располагаются внутри фигуры типа эллипсоида, вытянутого вдоль оси, проходящей через начало координат. С увеличением  $P$  объем эллипсоида растет (показаны  $P = 0.90; 0.95; 0.99$ ).

но вектор смеси не равен сумме векторов яда и экзогенной протеазы. Ранее с использованием последовательного испытания субстратов для ядов с высокой протеазной активностью обнаружить ингибиторы не удавалось. Более того, для многих

случаев было показано, что соотношение (2) не выполняется, т.е. вектор АНСА-спектра смеси не лежит в плоскости векторов яда и экзогенной протеазы. Это возможно лишь при появлении новой протеазной активности при взаимодействии экзогенной протеазы с ядом. По-видимому, подход с расчетом  $\alpha$  по части всех пиков хроматограммы окажется весьма полезным при анализе хроматограмм смесей, когда исследователя интересует мера сходства/различия пула лишь определенных компонентов этих смесей, возможно, минорных относительно хроматограммы в целом.

Расчет величин  $\alpha$  по серии однотипных субстратов, расщепляемых гомологичными ферментами, позволил проследить связь между сходством вторичной специфичности фермента и филогенетическим родством. Так, для аргиниламинопептидазной активности ядов змей значений  $\alpha$  возрастали с  $3^\circ - 6^\circ$  для внутривидовых отличий до  $9^\circ - 10^\circ$  для межвидовых и  $11^\circ - 16^\circ$  для межродовых. Среднее значение  $\alpha$  между векторами АНСА-спектров змей двух семейств оказалось равным  $22.6^\circ$ .

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Huber D.M., Mulanax M.W. // *Phytopathology*. 1969. V. 59. P. 1032.
2. Coburn J.T., Lytle F.E., Huber D.M. // *Anal. Biochem.* 1986. V. 154. P. 305.
3. Meier J., Stocker K., Svendsen L.G., Brogli M. // *Toxicol.* 1985. V. 23. P. 393.
4. Meier J. // *Ibid.* 1986. V. 24. P. 41.
5. Termignoni C., Freitas J.O., Jr, Guimaraes J.A. // *Biochem. J.* 1986. V. 234. P. 469.
6. Sharma K.K., Ortwerth B.J. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 4295.
7. Ohtani Y., Takahashi H. // *Toxicol.* 1988. V. 26. P. 181.
8. Недоспасов А.А., Незавибатько В.Н., Потаман В.Н., Родина Е.В. // *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 1989. № 1. С. 129.
9. Недоспасов А.А., Лифанов А.П., Родина Е.В. // *Биохимия*. 1994. Т. 59. № 10.
10. Недоспасов А.А., Потаман В.Н., Родина Е.В. // *Биоорганич. химия*. 1989. Т. 15. № 4. С. 444.
11. Nedospasov A.A., Cherkasov A.V. // *Nature*. 1993. V. 361. P. 409.

## МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ АСПЕКТЫ РАЗДЕЛЕНИЯ БИНАРНЫХ ЖИДКИХ СМЕСЕЙ

© 1994 г. Р. Н. Куклин, Л. Т. Крецишина

Государственное научно-производственное предприятие "Квант", Москва

В предположении, что в основе разделения жидких смесей на исходные компоненты лежит прямое или косвенное использование адсорбционных сил, рассмотрены молекулярные аспекты этой проблемы. Исследована адсорбция из бинарной смеси жидкостей, ограниченно растворимых одна в другой, на плоскую поверхность. Поведение системы смоделировано функционалом свободной энергии, зависящим от распределения концентрации адсорбируемого компонента. С использованием вариационных решений рассчитаны изотермы адсорбции. Установлено, что их вид существенно зависит от величины температуры относительно характеристических значений: точки перехода смачивания, критических температур переходов смачивания. Рассчитанные изотермы сопоставлены с экспериментальными для бензола на платине, получено их удовлетворительное согласие.

Если взаимное растворение смешиваемых жидкостей осуществляется самопроизвольно под действием градиентов химических потенциалов, то обратный процесс – разделение жидкой смеси на исходные компоненты – требует затраты работы приложенных извне сил. В основе различных методов жидкостной хроматографии лежит прямое или косвенное использование адсорбционных сил, вступающих в конкуренцию с силами молекулярного сцепления в объеме раствора. Цель данной работы – рассмотрение механизма разделения бинарной жидкой смеси вблизи плоской поверхности, селективно взаимодействующей с одним из компонентов раствора, следствием чего является его многослойная адсорбция на межфазной границе. Близкая задача была сформулирована в работе [1]. В ней рассматривалось смачивание межфазной границы бинарным раствором и был предложен способ описания проблемы в терминах универсального функционала свободной энергии системы. Представляется перспективным обобщение модели, предложенной в работе [1], с целью континуального описания многослойной адсорбции компонент жидкой смеси на межфазной границе. Принимая во внимание, что функционал свободной энергии, использованный в работе [1], принадлежит к классу функционалов Ландау–Гинзбурга [2], можно установить соответствие параметров, фигурирующих в нем, с константами, характеризующими межмолекулярные силы и поля на межфазной границе. В этом смысле предлагаемый для описания адсорбции подход имеет микроскопическое обоснование.

Рассмотрим смесь двух жидкостей, обладающих ограниченной растворимостью одна в другой (например, вода–бензол, фенол), граничащих с плоской твердой поверхностью. Предполагается селективное взаимодействие поверхности с ком-

понентами раствора: одна из них обладает большим химическим сродством. Вследствие этого будет происходить изменение концентрации  $c(z)$  вблизи поверхности по сравнению с концентрацией  $c_s$  в объеме смеси. Следуя [1], представим избыточную свободную энергию  $\Delta F$ , связанную с выделением растворенного компонента у плоской поверхности, в виде следующего функционала по концентрации  $c(z)$  (в безразмерном виде):

$$\Delta F = \left( \frac{g}{RT} \right)^{1/2} \int_0^{\infty} \left[ \frac{1}{2} \left( \frac{dc}{dz} \right)^2 + \Delta f(c) \right] dz + \Phi(c_s), \quad (1)$$

где функция  $c(z)$  – описывает распределение концентрации компонента у поверхности вдоль координаты  $z$  по нормали к ней,  $c_s$  – ее значение непосредственно на границе ( $z = 0$ ),  $\Phi(c)$  – вклад энергии прямого взаимодействия компонента с границей. В качестве функции  $\Phi(c)$  использовано полиномиальное разложение по степеням отклонения значений концентрации компонента от критической точки расслоения раствора:

$$\Phi(c) = \Phi(c_c) + \Delta\mu_1(c - c_c) + \frac{1}{2} \frac{\lambda^{-1} g}{RT} (c - c_c)^2, \quad (2)$$

где  $\Delta\mu_1$  – локальная (приграничная) разность химических потенциалов жидкости относительно состояния с  $c = c_c$ ,  $\lambda$  – корреляционная длина, характеризующая скачкообразное изменение молекулярных связей на границе [2]. В формуле (1) интегральный член учитывает вклад косвенного взаимодействия компонентов с границей через распределение концентраций. Он аналогичен выражению, предложенному Ван-дер-Ваальсом в теории поверхностного натяжения. Второй член учитывает эффекты прямого взаимодействия компонентов с поверхностью. Он эквивалентен



вкладу в энергию, предложенному Каном при исследовании эффектов смачивания. Использование упомянутых вкладов в теории поверхностного натяжения и смачивания позволяет адекватно описать наблюдаемое явление.

Фигурирующая в формуле (1) функция  $\Delta f$  имеет следующий вид:

$$\Delta f(c) = f(c) - f(c_b) - (c - c_b) \left. \frac{df(c)}{dc} \right|_{c_b}, \quad (3)$$

где  $\Delta f$  – избыточно свободная энергия, связанная с увеличением концентрации компонента у поверхности по отношению к объемной концентрации  $c_b$ ,  $f(c)$  – плотность свободной энергии раствора в объеме. В работе [1] в качестве  $f(c)$  использовалось полиномиальное разложение по степеням концентраций. С целью учета правильных асимптотик функции при разбавлении раствора необходимо обобщить ее вид. Поэтому в дальнейшем будет использовано модельное выражение  $f(c)$ , применяемое в теории жидких смесей [3]:

$$f(c) = -\frac{1}{2} \frac{u}{RT} + \frac{u' - u}{RT} c(1 - c) + [c \ln c + (1 - c) \ln(1 - c)], \quad (4)$$

где  $u$  и  $u'$  – константы, пропорциональные энергии взаимодействия молекул одной и той же жидкости и молекул разных жидкостей соответственно. В единицах  $(RT/g)^{1/2}$  для  $\Delta F$ ,  $\Phi(c_s)$ ,  $\Delta\mu_1$  получим

$$\Delta F = \Delta F(RT/g)^{1/2}, \quad \Phi(c_s) = (RT/g)^{1/2} \Phi(c_s), \\ \Delta\mu_1 = (RT/g)^{1/2} \Delta\mu_1,$$

тогда выражения (1) и (2) принимают вид

$$\Delta F = \int_0^\infty \left[ \frac{1}{2} \left( \frac{dc}{dz} \right)^2 + \Delta f(c) \right] dz + \Phi(c_s), \quad (5)$$

$$\Phi(c) = \Phi(c_c) + \Delta\mu_1(c - c_c) + \frac{1}{2} G_1(c - c_c)^2, \quad (6)$$

где  $G_1 = \lambda^{-1}(g/RT)^{1/2}$ .

Минимизация функционала (5) приводит к уравнению Эйлера, определяющему распределение концентраций компонента вблизи поверхности:

$$d^2c/dz^2 = d(\Delta f)/dc \quad (7)$$

с граничным условием

$$\left. \frac{d\Phi(c)}{dc} \right|_{c_s} + \left. \frac{dc}{dz} \right|_{z=0} = 0, \quad (8) \\ \lim_{z \rightarrow \infty} c(z) = c_b.$$

Уравнение (7) допускает решение в квадратах

$$(dc/dz)^2 = 2\Delta f(c). \quad (9)$$

С учетом (9) граничное условие (8) принимает вид

$$-d\Phi(c_s)/dc_s = [2\Delta f(c_s)]^{1/2}. \quad (10)$$

Исследование уравнений (7), (8) дает возможность установить зависимость концентрации компонента на сорбенте от температуры и от концентрации  $c_b$  в растворе. Уравнение (10) выражает конкуренцию объемных и поверхностных факторов, определяющих значение поверхностной концентрации  $c_s$ .

Для характеристики объемной составляющей рассмотрим зависимость функции  $f(c)$  (4) от температуры и концентрации  $c$ . Прежде всего следует отметить симметричность  $f(c)$  при замене  $c$  на  $(1 - c)$  относительно точки  $c_c = 1/2$ . Первая и вторая производные  $f(c)$  по концентрации  $c$  имеют вид:

$$\frac{df}{dc} = \frac{K}{RT}(1 - 2c) + \ln \frac{c}{1 - c}, \quad K = u' - u, \quad (11)$$

$$\frac{d^2f}{dc^2} = -\frac{2K}{RT} + \frac{1}{c(1 - c)}. \quad (12)$$

Первая производная на концах интервала (0, 1) обращается в  $\pm\infty$ , вторая – изменяет знак при температуре (точка перегиба  $f(c)$ )

$$T = 2Kc(1 - c)/R. \quad (13)$$

Функциональная зависимость (13) представляет уравнение границы расслоения смеси. При  $c_c = 1/2$  формула (13) определяет критическое значение  $T_c = K/2R$ . Условие обращения (11) в ноль определяет положение минимума функции  $f(c)$ :

$$\frac{K}{RT}(2c - 1) = \ln \frac{c}{1 - c}. \quad (14)$$

Решение этого уравнения при  $T < T_c$  указывает на наличие двух эквивалентных минимумов функции  $f(c)$  при  $c_1 < 1/2$  и  $c_2 > 1/2$ , что, в свою очередь, означает сосуществование двух фаз, роль растворителя в каждой из которых играет преобладающий в количественном отношении компонент. Действие поверхностных факторов приводит к смещению равновесных значений концентрации у границы, т.е. к различной адсорбции компонентов смеси. На рис. 1 приводится графический анализ решения уравнения (10) с параметрами  $\Delta\mu_1 = -0.378$ ,  $G_1 = 0.204$ , моделирующими взаимодействие бензола с платиной в водных растворах. Видно, что характер решения зависит от степени близости температуры к критическому значению. В достаточно близкой окрестности  $T_c$  имеется одно пересечение кривых  $d\Phi/dc|_{c_s}$  и  $[2\Delta f(c_s)]^{1/2}$ . Поэтому существует лишь одно значение  $c_s$  – решение уравнения (10), т.е. при  $T \leq T_c$  минимумы сливаются в один.

При достаточной степени понижения температуры системы по отношению к  $T_c$  горб между корнями  $[2\Delta f(c)]^{1/2}$ , соответствующими минимумам  $\Delta f$ , увеличивается и достигает такой высоты,

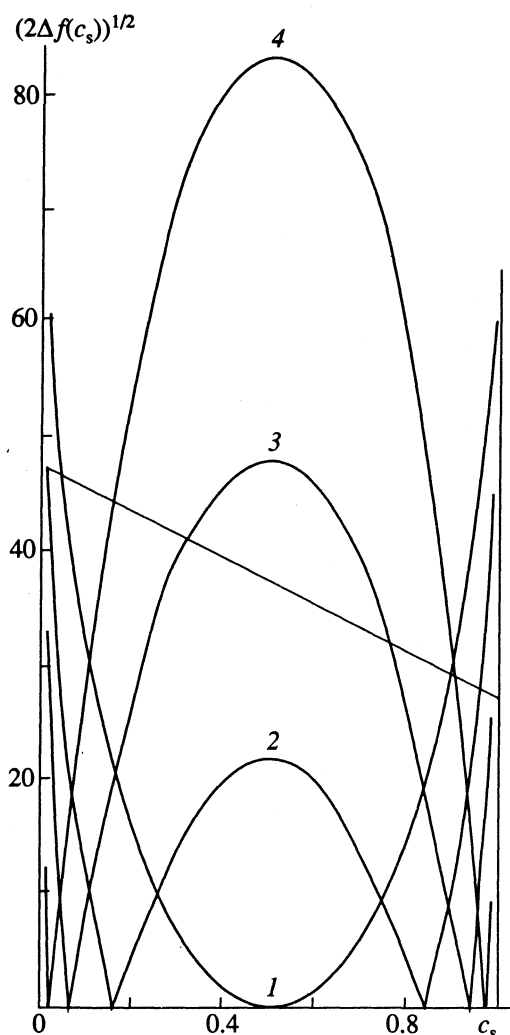


Рис. 1. Графическое решение уравнения (10) для концентраций раствора  $c$ , удовлетворяющих уравнению состояния (13) при следующих значениях  $RT/K$ : 1 – 2, 2 – 2.4, 3 – 3, 4 – 4.

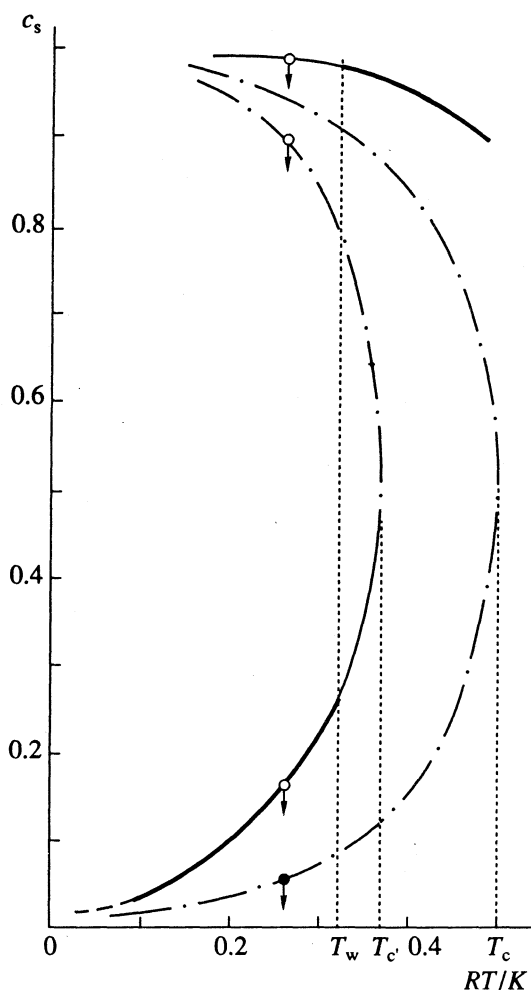


Рис. 2. Совокупность решений уравнения (10) при различных  $T$ ,  $c_b = c_b(T)$ . Белые кружки со стрелками показывают смещение многозначных решений при разбавлении раствора, черный – смещение единственного решения при достаточно сильном разбавлении.

что при условии  $c_b = c_1$  в уравнении (10) будут существовать три решения  $c_s^{(1)}$ ,  $c_s^{(2)}$ ,  $c_s^{(3)}$ . На рис. 2 приведена совокупность решений уравнения (10) в виде графика  $c(T)$ : возможных значений концентрации растворенного компонента на границе при заданной температуре и значении концентрации  $c_b$  в объеме электролита. Анализ характера зависимости  $c_s$  от параметров  $T$  и  $c_b$  целесообразно начать со случая, когда концентрация  $c_b$  смеси в объеме соответствует границе расслоения ( $c_b = c_b(T)$  – на диаграмме состояния). Множество решений уравнения (10) удобно соотнести с точками диаграммы состояния (13), также представленной на рис. 2 в виде функции  $c_s(T)$ . Часть решений заключена внутри  $c_b(T)$ , но имеется также ветвь функции  $c_s(T)$  снаружи  $c_b(T)$ . Физическую классификацию решений можно осуществить, если рассчитать свободную энергию согласно (5), используя квадратуру (8).

На рис. 3 представлены результаты этого расчета в виде набора кривых  $F(T, c_s)$ , положения минимумов и максимумов которых соответствуют кривой  $c_s(T)$  рис. 2. Сопоставляя рис. 2 и 3, можно заключить, что устойчивым термодинамическим состояниям (глубоко лежащий минимум) отвечают части функции  $c_s(T)$ , обозначенные сплошной жирной кривой. Тонкие сплошные кривые соответствуют значениям поверхностной концентрации метастабильных состояний, в которых локальный минимум  $F$  расположен выше. Часть кривой  $c_s(T)$ , обозначенная штрихпунктиром, соответствует неустойчивым состояниям (положениям максимумов  $F$ ). Из рис. 2, 3 следует, что существует единственное значение температуры  $T = T_w$ , для которого имеются два разных значения поверхностной концентрации  $c_s^{(1)}$ ,  $c_s^{(2)}$ , соответствующие устойчивым термодинамическим состояниям с одинаковыми энергиями. Указанная

температура является точкой фазового перехода смачивания [5], при переходе которой вдоль кривой состояния скачком изменяется характер смачивания. Границе многозначных решений отвечает температура  $T_c$ , соответствующая границе существования метастабильных состояний (перегретой плоской пленки, рис. 2). Связь найденных выше решений с эффектами смачивания рассмотрена в работе [1].

По мере отклонения  $c_b$  от границы расслоения характер зависимости  $\Delta F(T, c_b)$  изменяется (рис. 4). При переходе к более общему случаю концентраций, удаленных от границы расслоения раствора  $c_b < c_s^{(1)}(T)$ , в определенных пределах при  $T \geq T_w$  могут существовать три решения уравнения (10). Это свидетельствует о наличии перехода смачивания первого рода. Однако при этом возникает существенное отличие. Один из минимумов функции  $\Delta f(c)$  (ближайший к корню  $c_s^{(2)}$ ) перестает равняться нулю, следствием чего является конечный размер толщины адсорбционной пленки, т.е. происходит переход тонкая-толстая пленка (или скачкообразное изменение угла смачивания [1]). При уменьшении концентрации раствора корни уравнения (10) сливаются. Таким образом, имеется линия поверхностных переходов  $c_s(T)$  первого рода в области гомогенной смеси (выходящая из точки  $(T_w, c_w)$ , рис. 5), которая заканчивается в критической точке  $(T_c, c_c)$ , соответствующей слиянию трех решений уравнения (10) в одно. В достаточно разбавленных растворах решение уравнения (10) единственно.

Решения уравнения (10), полученные при различных значениях  $T$  и  $c_b$  и при указанных выше параметрах, были использованы при расчетах изотерм адсорбции по формуле [1]

$$\Gamma = g^{1/2} \int_{c_s}^{c_s} \frac{c - c_b}{[2\Delta f(c)]^{1/2}} dc. \quad (15)$$

Результаты представлены на рис. 5, где изображены совокупности значений  $\Gamma$  как функции температуры и концентрации  $c$  в области гомогенности растворов ( $c_b < c_s^{(1)}(T)$ ). Следует отметить неленгмюровский характер изотерм. Внутренняя область диаграммы состояния отвечает расслоенному (двухфазному) состоянию раствора. Переход к изотерме с более высокой температурой сопровождается увеличением адсорбции. На границе области устойчивости раствора это увеличение имеет экспоненциальный характер  $c_s \sim \exp(RT/K)$  вплоть до значения в точке смачивания  $T_w$ . При переходе точки смачивания вдоль диаграммы состояния происходит сильное уменьшение  $\Gamma$ , что объясняется переходом в область метастабильных состояний системы. Таким образом, адсорбция в точке смачивания имеет максимум по температуре.

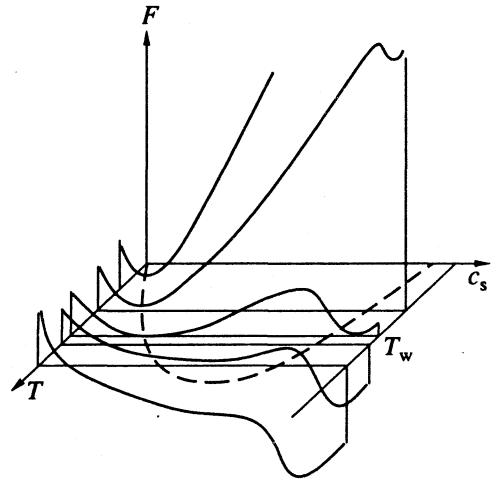


Рис. 3. Свободная энергия (1) в зависимости от  $T$  и  $c_s$  при  $c_b = c_b(T)$ .

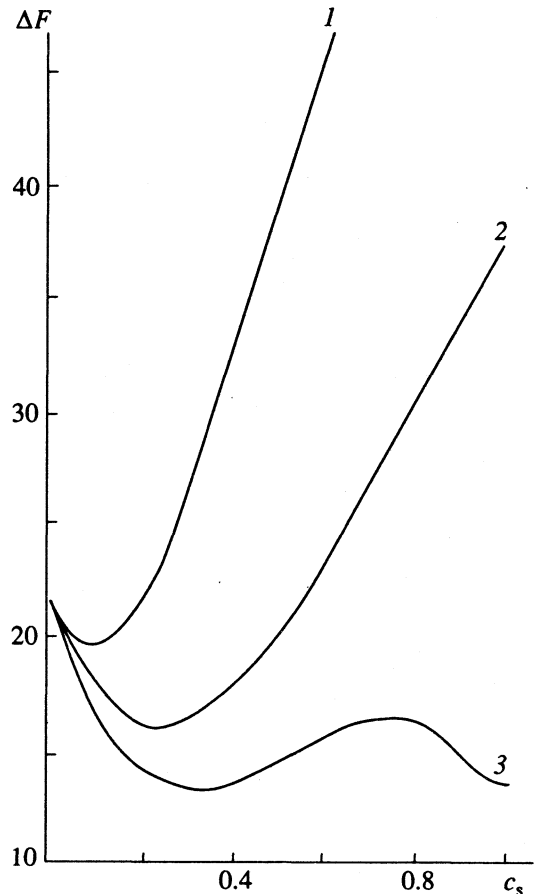


Рис. 4. Свободная энергия в зависимости от  $c_s$  при  $c_b < c_s(T)$ , фиксированной температуре  $T = T_w$  и различных значениях  $c_b$ : 1 -  $10^{-2}$ , 2 -  $5 \times 10^{-2}$ , 3 -  $7.2 \times 10^{-2}$ .

Экспериментальные изотермы многих органических веществ [4 - 6], адсорбируемых из водных растворов на различные поверхности (платина, ртуть, уголь) имеют вид, подобный рассчитанному выше. Поэтому представляется

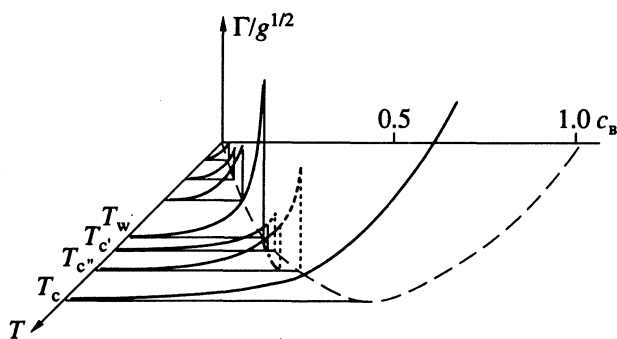


Рис. 5. Изотермы адсорбции. Штриховые кривые обозначают изотермы метастабильных состояний при  $T > T_w$ .

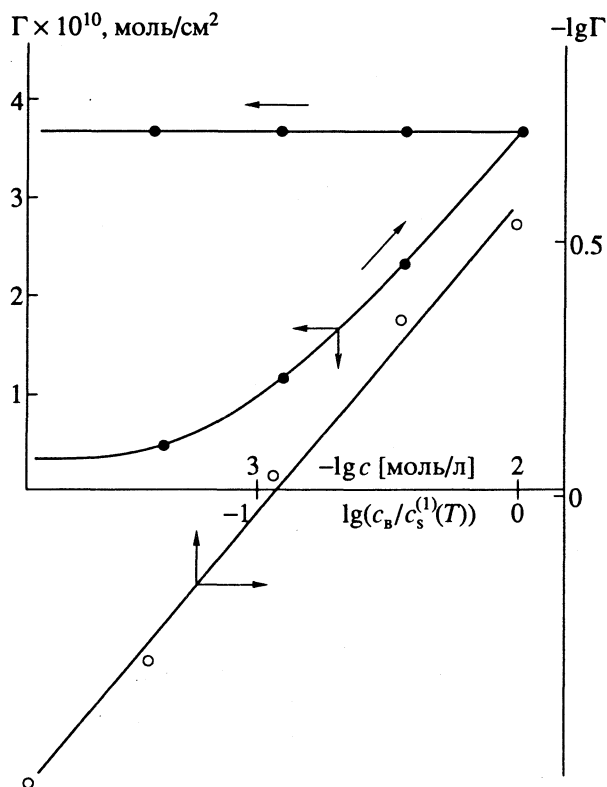


Рис. 6. Зависимость величины адсорбции бензола на платине от концентрации в растворе и ее анаморфоза. Стрелки указывают направление изменения концентрации.

естественным попытаться интерпретировать указанные экспериментальные результаты с позиций предложенного выше рассмотрения. В применении к данным электрохимических измерений приведенная выше модель соответствует случаю незаряженного электрода (точка нулевого заряда) и достаточно разбавленного электролита (радиус Дебая больше ван-дер-ваальсового), так как электрические эффекты не учитывались.

Смеси бензола и фенола с водой характеризуются диаграммными состояниями [7], подобными состояниями рассмотренной выше модельной

диаграмме (13) (у смеси воды с фенолом  $T_c = 65^\circ\text{C}$ , с бензолом – значение  $T_c$  не установлено). Пересчет экспериментальной изотермы бензола в относительных единицах  $c_s^{(1)}(T)/c_B$  и  $\Gamma(c_B)/\Gamma(c_s^{(1)}(T))$  позволяет совместить ее с одной из рассчитанных изотерм, отвечающей  $RT/K = 0.25$  (рис. 6). Предложенная выше теория объясняет также явление гистерезиса адсорбции по концентрации, наблюдаемого в [4]. Так, при увеличении концентрации бензола в электролите, контактирующем с поверхностью платины, адсорбция увеличивается согласно изотерме вида  $\Gamma(c_B)$  на рис. 6. При последующем разбавлении раствора она не изменяется. Это явление нетрудно понять, если обратиться к рис. 4, где изображены профили свободной энергии при  $T = T_w$  и разных значениях  $c_B$ . Разбавленным раствором отвечают состояния системы с более высокой энергией. При увеличении концентрации энергия уменьшается, и поэтому система самопроизвольно переходит в более выгодные энергетические состояния. При обратном процессе – разбавлении раствора в объеме электролита – не происходит изменения адсорбционного состояния, так как для этого необходимо затратить работу.

Предложенный выше метод описания многослойной адсорбции позволяет анализировать данное явление в зависимости от важнейших термодинамических параметров и индивидуального характера взаимодействия компонентов с поверхностью. Весьма важной представляется возможность дальнейшего обобщения функционального подхода на случай искривленных форм межфазной границы, ограниченных объемов растворов, стесненных стенками. Эти обобщения необходимы при моделировании адсорбции в пористых средах, которые обычно служат средством разделения растворов на компоненты.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cahn J.W. // Phys. 1977. V. 66. № 8. P. 3667.
2. Binder K. Critical behaviour at surfaces. Phase Transition and critical phenomena. V. 8. N.Y.: Acad. Press, 1983. P. 2 - 145.
3. Веденов А.А. Физика растворов. М.: Наука, 1984. 107 с.
4. Казаринов В.Е., Фрумкин А.Н., Пономаренко Е.А., Андреев В.Н. // Электрохимия. 1975. Т. 11. № 6. С. 860.
5. Авилова Г.И., Афанасьев Б.Н. // Там же. 1975. Т. 11. № 8. С. 1217.
6. Богдановская В.А., Тарасевич М.Р., Гольдин М.М. // Итоги науки и техники. Электрохимия. 1990. Т. 31. С. 151 - 166.
7. Краткий справочник химика / Под ред. И.Т. Горюновского, Ю.П. Назаренко, Е.Ф. Некряч. Киев: Наук. думка, 1987. 829 с.

**МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

УДК 543.544

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ ЗАВИСИМОСТЕЙ  
МЕЖДУ ПАРАМЕТРАМИ УДЕРЖИВАНИЯ В ТОНКОСЛОЙНОЙ  
И ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ  
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ АНАЛИЗИРУЕМЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

© 1994 г. В. Д. Чмиль, Л. П. Новицкая, М. Н. Герцюк

*Украинский научно-исследовательский институт экологии  
и токсикологии химических веществ им. Л.И. Медведя, Киев*

Исследованы закономерности удерживания различных классов токсических органических веществ, являющихся пестицидами, компонентами полимерных материалов и продуктами их деструкции и метаболизма (замещенные бензойные и феноксикислоты, эфиры тиокарбаминовой кислоты, окси-, метил- и хлорфенолы, производные *сис*-триазинов, арилалкильные спирты и кетоны, пероксиды и др.) в условиях нормально- и обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (плоскостной и колоночный варианты). Установлено, что в условиях нормально-фазовой жидкостной хроматографии основное влияние на межмолекулярные взаимодействия оказывает неподвижная фаза, в случае обращенно-фазовой жидкостной хроматографии влияние подвижной и неподвижной фаз сопоставимо. Показано, что полярное взаимодействие изученных соединений в тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии с подвижными и неподвижными фазами осуществляется с участием одних и тех же центров в молекулах сорбатов. Сделан вывод, что в сочетании с аддитивностью вкладов  $\text{CH}_2$ -групп в величину удерживания оно обуславливает наличие корреляционных зависимостей между параметрами удерживания членов гомологических рядов в двух указанных видах хроматографии; использование подобных зависимостей повышает надежность идентификации анализируемых соединений при решении различных аналитических задач.

Для уменьшения неблагоприятного влияния антропогенного воздействия на окружающую среду необходимо располагать аналитическими методами, которые бы позволяли контролировать накопление ксенобиотиков. Особое место среди этих методов занимает жидкостная и, в частности, тонкослойная хроматография, главным образом, благодаря простоте методики и доступности оборудования, и как следствие, высокой экономичности [1, 2].

Основная задача при определении многих нормируемых токсических веществ в различных объектах окружающей среды заключается в правильной идентификации анализируемых компонентов на фоне большого числа ненормируемых и в ряде случаев неизвестных соединений [3]. Один из способов повышения надежности идентификации при практическом осуществлении эколого-аналитического контроля с применением хроматографических методов – использование различных корреляционных зависимостей между характеристиками удерживания анализируемых компонентов, их физико-химическими свойствами и строением [4]. В настоящей работе исследованы закономерности удерживания различных классов нормируемых токсических органических веществ, являющихся пестицидами, компонента-

ми полимерных материалов, продуктами их деструкции и метаболизма, образующихся в процессах их производства и применения, в условиях тонкослойной (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), и получение различных корреляционных зависимостей на этой основе.

Хроматографическое поведение исследуемых соединений в условиях нормально-(НФТСХ) и обращенно-фазовой (ОФТСХ) ТСХ изучалось на готовых пластинках “Силуфол” и “Алуфол” и этих же пластинках, импрегнированных вазелиновым маслом, в подвижных фазах на основе слабополярных органических растворителей.

**Таблица 1.** Величины удерживания ( $R_f$ ) пероксисоединений в условиях НФТСХ

Соединение	1	2	3
<i>трет</i> -Бутилпероксидиизопропилбензол	0.08	0.40	0.92
1- <i>трет</i> -бутилпероксиизопропил-4-гидроксиизопропилбензол	0.00	0.00	0.03
Пероксид бензоила	0.00	0.00	0.11

Обозначения подвижных фаз: 1 – гексан, 2 –  $\text{CCl}_4$ , 3 – смесь гексан–диэтиловый эфир (9 : 1).

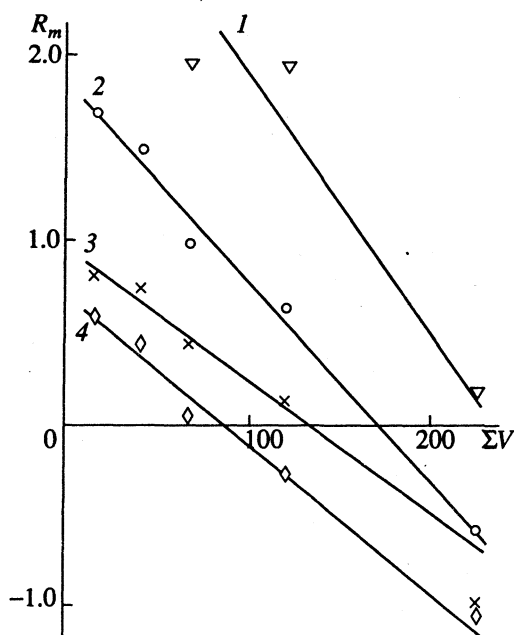


Рис. 1. Зависимости величин  $R_m$  алкилфенолов в НФТСХ (силикагель) от суммарного объема  $\Sigma V$  орто-заместителей: 1 – гексан, 2 – четыреххлористый углерод, 3 – ксилол, 4 – бензол.

Хроматографическое поведение исследуемых соединений в условиях ВЭЖХ изучалось на хроматографе “Милихром” на колонке  $64 \times 2$  мм с Силасорбом-600 (5 мкм) [5] и на хроматографе фирмы “Уотерс” на колонке  $250 \times 4.6$  мм с Нуклеосилом-С<sub>18</sub> с УФ-детектированием (250 и 280 нм). В качестве подвижных фаз использовались смеси метанола с водой и гексана и изопропанола в различных соотношениях.

Хроматографическое поведение замещенных бензойных и феноксикислот, арилалкильных спиртов и кетонов, пероксидов, эфиров тиокарбаминовой кислоты, окси-, метил- и хлорфенолов определяется влиянием электронных и стерических эффектов заместителей у атомов серы,

тиольных групп и заместителей в бензольном кольце, находящихся в орто-, мета- и пара-положениях по отношению к окси- и карбоксильной группам.

При изучении хроматографического поведения пероксидов в условиях НФТСХ установлено, что величины  $R_f$  увеличиваются при уменьшении числа пероксигрупп в молекулах (уменьшение числа сорбционных центров). Существует линейная зависимость ( $r = 0.91 - 0.97$ ) между величиной  $R_f$  и числом пероксигрупп в молекулах пероксидов.

Введение в молекулу пероксида гидроксильных и карбонильных групп (дополнительные сорбционные центры) значительно уменьшает их величины  $R_f$ . Наименьшая хроматографическая подвижность наблюдается для гидроксисодержащих пероксисоединений (табл. 1). Окислительные превращения пероксисоединений приводят к разрыву пероксидной связи и образованию арилалкильных спиртов, кетонов и кетоспиртов, отличающихся меньшей по сравнению с исходными пероксидами хроматографической подвижностью. Наиболее прочно удерживаются сорбентом арилалкильные диолы. Замена ОН-группы диола карбонильной группой увеличивает подвижность соединения. Наиболее подвижен в этом ряду 1,4-диацетилбензол (табл. 2).

Электронные эффекты заместителей практически не влияют на величины  $R_f$  алкил-, окси- и хлорфенолов; их хроматографическая подвижность определяется преимущественно стерическими препятствиями (создаваемыми заместителями) взаимодействию ОН-группы с сорбентом.

Для количественной оценки поведения орто-замещенных алкилфенолов и их производных в НФТСХ на силикагеле и оксиде алюминия использованы следующие параметры: 1) суммарные объемы орто-заместителей  $\Sigma V$  [6]; 2) стерические постоянные Чартона  $\nu$  [7]; 3) “кажущиеся”  $\sigma_k$  – константы орто-заместителей Барлина–Перрена [8]. В результате установлено, что между

Таблица 2. Величины  $R_f$  продуктов превращения пероксидов в условиях НФТСХ

Соединение	1	2	3	4	5
1,1-Диметилфенилкарбинол	0.00	0.07	0.21	0.25	0.69
1-Изопропил-4-( $\alpha,\alpha$ -диметил)фенилкарбинол	0.00	0.07	0.20	0.25	0.67
1,4-бис-(Пропан-2-ол)бензол	0.00	0.00	0.00	0.03	0.32
1,3-бис-(Пропан-2-ол)бензол	0.00	0.00	0.00	0.03	0.37
Ацетофенон	0.02	0.10	0.40	0.50	0.72
1,4-Диацетилбензол	0.00	0.00	0.20	0.31	0.85
1-Ацетил-4-( $\alpha,\alpha$ -диметил)фенилкарбинол	0.00	0.00	0.02	0.11	0.67
Бензальдегид	–	–	0.50	0.82	1.00
Гидропероксид изопропилбензола	0.00	0.08	0.22	0.28	–

Обозначения подвижных фаз: 1 – гексан, 2 – СС<sub>4</sub>, 3 – бензол, 4 – хлороформ, 5 – смесь хлороформа с ацетоном (4 : 1).

этими параметрами и величинами  $R_m$  алкилфенолов существуют линейные зависимости (рис. 1 - 3, табл. 3):

$$R_m = b - a\Sigma V, \quad (1)$$

$$R_m = b_1 - a_1 v, \quad (2)$$

$$R_m = b_2 + a_2 \sigma_k. \quad (3)$$

Установлено существование линейных корреляций между величинами  $R_m$  алкилфенолов и пероксидов и элюирующей способностью подвижных растворителей по Снайдеру [9] (рис. 4).

Существенное влияние на хроматографическое поведение исследуемых соединений в условиях ТСХ оказывает липо-гидрофильный характер заместителей в бензольном кольце, о чем свидетельствует наличие корреляционных зависимостей (рис. 5, табл. 4);

$$\pi = a_3 R_f + b_3 \quad (4)$$

( $\pi = \lg P_x - \lg P_n$ , где  $P_n$  и  $P_x$  – коэффициенты распределения между октанолом и водой незамещенного соединения и родственного соединения,

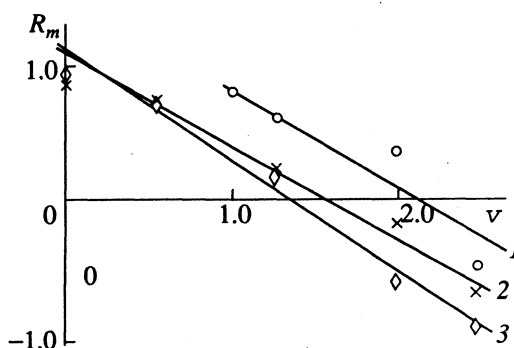


Рис. 2. Зависимости величин  $R_m$  алкилфенолов в НФТСХ (оксид алюминия) от стерических констант Чартона  $v$ ; 1 – четыреххлористый углерод, 2 – ксилол, 3 – бензол.

содержащего заместитель [10, 11]). В условиях ОФТСХ наблюдается более строгая корреляция между величинами  $R_f$  и  $\pi$ .

Для исследуемых соединений существуют линейные зависимости между величинами  $R_m$  и мольной долей  $N$  (или логарифмом мольной

Таблица 3. Коэффициенты уравнений (1) - (3) в условиях НФТСХ

Подвижная фаза	$b$	$a$	$r$	$b_1$	$a_1$	$r_1$	$b_2$	$a_2$	$r_2$
силикагель									
Гексан	3.19	0.01	-0.95	4.05	1.04	-0.85	2.84	2.38	0.93
CCl <sub>4</sub>	2.75	0.01	-0.99	1.83	0.85	-0.96	1.71	2.25	0.99
Бензол	1.08	0.01	-0.96	0.68	0.67	-0.98	0.59	1.6	0.99
Ксилол	1.08	0.01	-0.96	1.08	0.75	-0.98	0.96	1.8	0.97
оксид алюминия									
CCl <sub>4</sub>	2.27	0.01	-0.98	2.7	1.29	-0.94	2.14	2.74	0.98
Бензол	1.84	0.01	-0.99	1.73	1.3	-0.99	1.58	2.9	0.95
Ксилол	6.3	0.01	-0.99	1.58	1.01	-0.99	1.51	2.42	0.99

Примечание. Для гексана на оксиде алюминия  $b_1 = 4.1$ ,  $a_1 = 1.5$ ,  $r_1 = -0.80$ .

Таблица 4. Коэффициенты уравнения (4) для замещенных бензойных и феноксикислот, окси-, метил- и хлорфенолов в ТСХ

Гомологический ряд	НФТСХ				ОФТСХ			
	$a_3$	$b_3$	$r_3$	ПФ	$a_3$	$b_3$	$r_3$	ПФ
Замещенные бензойные кислоты ( $n = 12$ )	0.07	-2.94	0.83	I	-0.1	7.91	-0.90	IV
Замещенные феноксикислоты ( $n = 4$ )	2.64	-0.45	0.95	II	-	-	-	-
Окси-, метил- и хлорфенолы ( $n = 13$ )	6.56	-2.08	0.74	III	-5.78	4.30	-0.90	V

Обозначения подвижных фаз (ПФ): I и II – гексан–ацетон (6 : 4 и 2 : 1 соответственно), III – петролейный эфир–диэтиловый эфир–муравьиная кислота (50 : 50 : 2), IV и V – ацетон–вода (7 : 3 и 5 : 5 соответственно).

Таблица 5. Коэффициенты уравнения (5) в ОФТСХ ( $N$  – мольная доля ацетона)

Гомологический ряд	$B$	$A$	$-r$
Эфиры тиокарбаминовой кислоты			
N,N-Дипропил-S-этилтиокарбаминат (эптам)	1.99	6.60	0.97
N,N,S-Трипропилтиокарбаминат (вернолат)	1.59	5.82	0.97
N-Бутил-S-пропил-N-этилтиокарбаминат (пебулат)	2.00	6.69	0.97
N,N-Ди(изобутил)-S-этилтиокарбаминат (бутилат)	2.13	6.59	0.97

Таблица 5. Окончание

Гомологический ряд	<i>B</i>	<i>A</i>	<i>-r</i>
S-Бензил-N,N-ди(вторбутил)карбаминат (тиокарбазил)	2.64	7.66	0.95
S-(4-Хлорбензил)-N,N-диэтилтиокарбаминат (тиобенкарб)	1.99	7.11	0.98
S,N-Диэтил-N-циклогексилтиокарбаминат (циклоат)	1.91	6.22	0.97
N-Гексаметилен-S-этилтиокарбаминат (молинат)	1.24	5.18	0.98
Хлорфенолы			
2-Хлорфенол	0.70	3.77	0.98
4-Хлорфенол	0.81	3.82	0.99
2,4-Дихлорфенол	1.35	4.84	0.98
2,6-Дихлорфенол	0.53	2.36	0.64
2-Метил-4-хлорфенол	1.26	4.83	0.98
2,4,5-Трихлорфенол	1.76	5.81	0.96
2,4,6-Трихлорфенол	1.48	5.01	0.98
2,3,4,6-Тетрахлорфенол	1.40	4.83	0.97
Пентахлорфенол	1.34	4.88	0.98

Таблица 6. Коэффициенты емкости *k'* и величины *R<sub>f</sub>* алкилфенолов, арилалкильных спиртов, пероксидов, замещенных бензальдегидов и симм-триазинов

Соединение	<i>k', I</i>	<i>R<sub>f</sub>, II (ОФ)</i>	Соединение	<i>k', II</i>	<i>R<sub>f</sub>, III (НФ)</i>	<i>R<sub>f</sub>, IV (ОФ)</i>
Фенол	4.9	0.75	Пропазин	1.28	0.89	0.53
2,6-Ди- <i>трет</i> -бутил-4-метилфенол	20.9	0.25	Атразин	0.90	0.81	0.61
2,4,6-Три- <i>трет</i> -бутилфенол	30.4	0.21	Симазин	0.59	0.64	0.67
2,6-Ди(α-метилбензил)-4-метилфенол	17.9	0.33	Прометон	1.27	0.55	0.50
2,6-Ди- <i>трет</i> -бутил-4-метоксифенол	8.1	0.52	Атратон	0.87	0.48	0.63
Ацетофенон	5.8	0.73	Симетон	0.50	0.40	0.74
Бензиловый спирт	4.9	0.80	Прометрин	1.98	0.92	0.41
1,4-бис(Пропан-1-ол)бензол	5.0	0.71	Аметрин	1.37	0.85	0.55
<i>n</i> -Ацетил-1,1-диметилбензиловый спирт	4.9	0.74	Симетрин	0.96	0.78	0.64
Пероксид диизопропилбензола	23.5	0.22				
<i>n</i> -Нитробензальдегид	5.1	0.70				
<i>n</i> -Диметиламинобензальдегид	5.9	0.70				

Обозначения подвижных фаз: I и II – метанол–вода (8.5 : 1.5 и 7 : 3 соответственно), III – хлороформ–диэтиловый эфир (2 : 1), IV – этанол–вода (5 : 5).

более полярного компонента в подвижной фазе (рис. 6, табл. 5)

$$R_m = B - AN, \quad (5)$$

что соответствует представлениям, изложенным в работе [12].

Таблица 7. Коэффициенты уравнения (6) для ароматических аминов и алкилфенолов

Гомологический ряд	ПФ	<i>b<sub>3</sub></i>	<i>a<sub>3</sub></i>	<i>r<sub>3</sub></i>
НФТСХ				
Ароматические амины ( <i>n</i> = 4)	1	2.83	-8.58	-0.98
	2	2.16	-2.62	-0.99
Алкилфенолы ( <i>n</i> = 5)	3	2.05	18.82	0.82
	ОФТСХ			
Алкилфенолы ( <i>n</i> = 5)	4	33.63	-41.94	-0.92
	5	49.65	-68.92	-0.95

Обозначения подвижных фаз (ПФ): 1 – бензол, 2 – CCl<sub>4</sub>, 3 – ксилол, 4 и 5 – смесь метанол–вода (7 : 3 и 8 : 2 соответственно).

Установлено, что увеличение доли полярного компонента в смеси подвижных растворителей в случае НФТСХ для большинства исследуемых соединений практически не оказывает влияния на селективность разделения (постоянство фактора удерживания функциональной группы [13]), в то время как в случае ОФТСХ приводит к увеличению селективности разделения. Это свидетельствует о том, что в случае НФТСХ основное влияние на межмолекулярные взаимодействия и, следовательно, на величины *R<sub>f</sub>*, оказывает неподвижная фаза, а в случае ОФТСХ влияние подвижной и неподвижной фаз на межмолекулярные взаимодействия и величины *R<sub>f</sub>* сопоставимо.

В табл. 6 приведены данные по хроматографии исследуемых соединений в условиях ВЭЖХ и ТСХ. Рассмотрение межмолекулярных взаимодействий исследуемых соединений в условиях ВЭЖХ и ТСХ показывает, что в случае



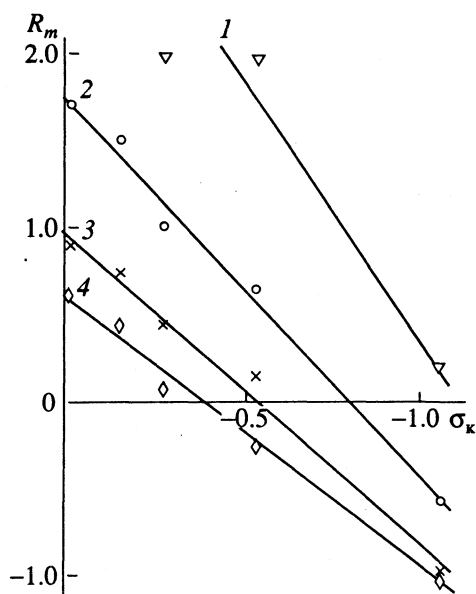


Рис. 3. Зависимости величин  $R_m$  алкилфенолов в НФТСХ (силикагель) от "кажущихся"  $\sigma_k$  — констант Барлина-Перрена, 1 - 4 — см. рис. 1.

ОФХ основное влияние на удерживание соединений оказывает количество атомов углерода в их молекулах. По мере увеличения количества атомов углерода (гидрофобности соединения) параметры удерживания увеличиваются в случае

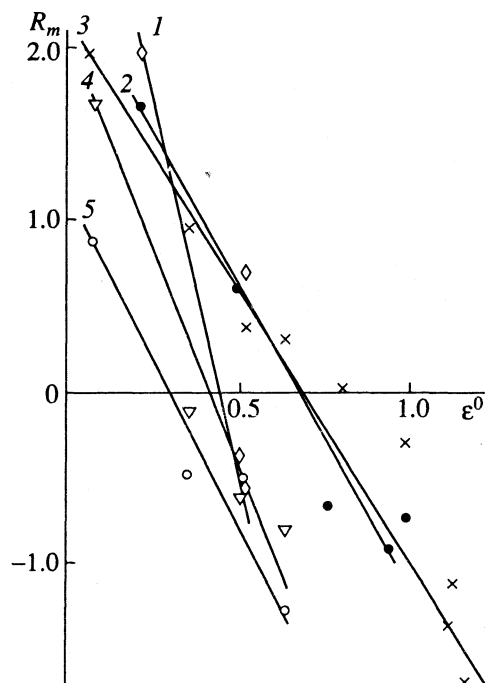


Рис. 4. Зависимости величин  $R_m$  алкилфенолов и пероксидов в НФТСХ от элюирующей способности растворителей  $\epsilon^0$ ; 1 — пероксид бензоила (силуфол), 2 — фенол (силуфол) 3 — 2,4-ди-*трет*-бутилфенол (алуфол), 4 —  $\alpha, \alpha$ -бис-(*n*-*трет*-бутилпероксиизопротил)пероксид (алуфол), 5 —  $\alpha, \alpha$ -бис-(*трет*-бутилпероксиизопротил)бензол (алуфол).

ВЭЖХ ( $k'$ ) и уменьшаются в случае ТСХ ( $R_f$ ). В то же время за полярное взаимодействие исследуемых соединений в НФХ и ОФХ ответственны одни и те же центры в молекулах сорбатов (карбонильная, гидроксильная, аминогруппы и др.). Это в сочетании с аддитивностью вклада  $\text{CH}_2$ -групп (атомов углерода) в величину удерживания обеспечивает существование корреляционных зависимостей между параметрами удерживания членов гомологических рядов в ВЭЖХ и ТСХ:

$$k' = b_4 + a_4 R_f. \quad (6)$$

Эти зависимости иллюстрируются на примерах ароматических аминов, *симм* триазинов, фенилендиаминов, толуидинов, нитроанилинов, толуиленидиаминов и алкилфенолов (рис. 7, 8, табл. 7).

Использование различных корреляционных зависимостей позволяет прогнозировать хроматографические параметры новых членов изученных гомологических рядов и повышает надежность идентификации анализируемых соединений при решении аналитических задач. Например, при использовании корреляционных зависимостей между величинами  $k'$  и  $R_f$  аликвотная часть пробы анализируется с помощью ВЭЖХ, определяются величины  $k'$ , и по уравнению (6) рассчитывают величины  $R_f$ . Затем оставшаяся часть пробы наносится на хроматографическую

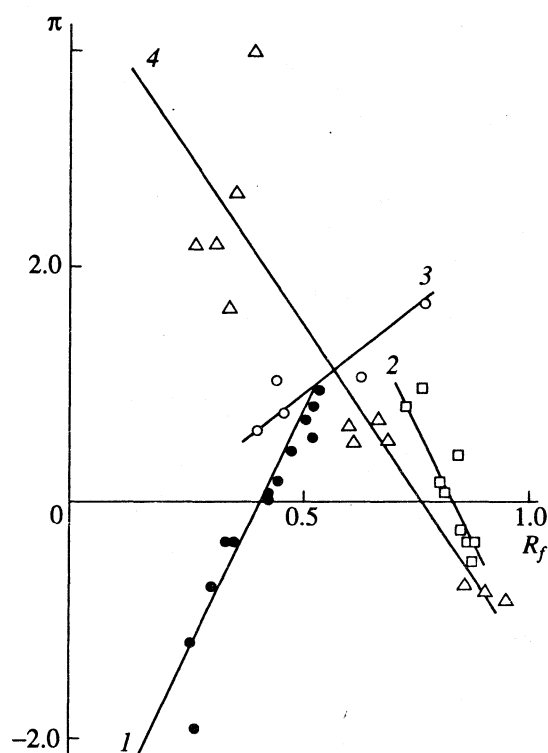


Рис. 5. Зависимости  $\pi$  от  $R_f$  в ТСХ; 1 и 2 — замещенные бензойные кислоты — НФТСХ и ОФТСХ соответственно, 3 — замещенные феноксикилоты (НФТСХ), 4 — окси-, метил- и хлорфенолы (НФТСХ).

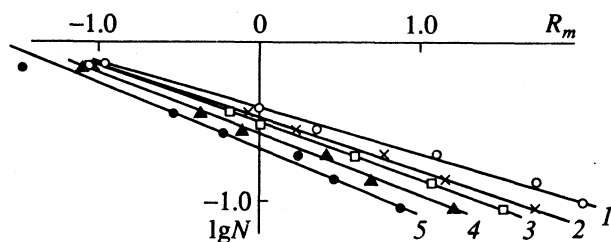


Рис. 6. Зависимости величин  $R_m$  эфиров тиокарбаминной кислоты от логарифма мольной доли ацетона в подвижной фазе в условиях ОФТСХ; 1 – эптам, 2 – вернолат, 3 – бутилат, 4 – тиокарбазил, 5 – молинат.

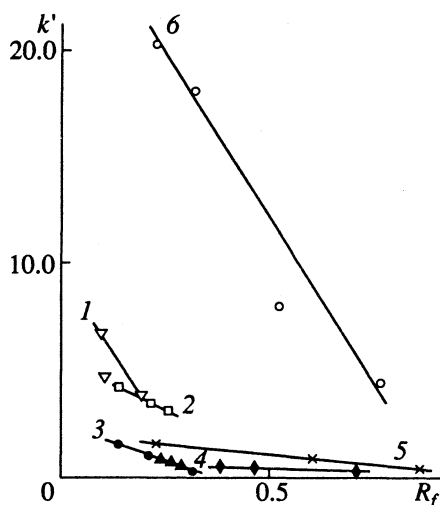


Рис. 7. Связь между параметрами удерживания компонентов полимерных материалов в ТСХ и ВЭЖХ; 1 – фенилендиамины, 2 – толуилендиамины, 3 – толуидины, 4 – нитроанилины, 5 – ароматические амины, 6 – алкилфенолы; 1 – 5 – НФТСХ–НФВЭЖХ, 6 – НФТСХ–ОФВЭЖХ.

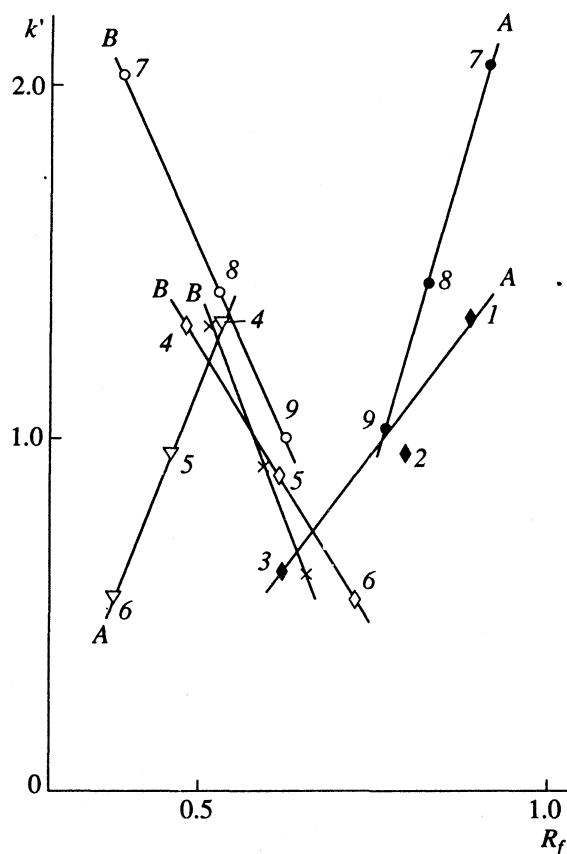


Рис. 8. Связь между параметрами удерживания симм-триазинов в ТСХ и ВЭЖХ; А – НФТСХ (хлороформ–диэтиловый эфир 2 : 1) – ОФВЭЖХ (метанол–вода 7 : 3), В – ОФТСХ (этанол–вода 5 : 5)– ОФВЭЖХ (метанол–вода 7 : 3); 1 – пропазин, 2 – атразин, 3 – симазин, 4 – прометон, 5 – атратон, 6 – симетон, 7 – прометрин, 8 – аметрин, 9 – симетрин.

пластинку, проводится анализ с помощью ТСХ и определяют величины  $R_f$ . В табл. 8 сравниваются рассчитанные по корреляционным уравнениям и экспериментально определенные хроматографические параметры алкилфенолов в

условиях НФТСХ. Совпадение между рассчитанными и экспериментально найденными хроматографическими параметрами позволяет более надежно идентифицировать анализируемые соединения.

Таблица 8. Рассчитанные по уравнениям (1) – (3) и экспериментально найденные хроматографические параметры алкилфенолов в условиях НФТСХ

Соединение	$R_m$		$R_f$	
	Расчет		Опыт	
2,5-Диметилфенол*	0.61	(1)	0.19	(1)
	1.64	(2)	0.02	(2)
4-трет-Бутилфенол	1.83	(2)	0.02	(2)
	0.33	(3)	0.32	(3)
4-Метилфенол*	1.51	(3)	0.03	(3)
	-0.63		0.81	
2-трет-Бутилфенол				
3,4-Диметилфенол				
2,4,6-Три-трет-бутилфенол*				

\*Силикагель, в остальных случаях – оксид алюминия.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Байерман К.* Определение следовых количеств органических веществ: Пер. с англ. М.: Мир, 1987. 429 с.
2. *Сакодынский К.И.* Новые возможности хроматографии в химической промышленности. Обзорная информация. М.: НИИТЭХИМ, 1988. 42 с.
3. *Золотов Ю.А., Кимстач В.А., Кузьмин Н.М. и др.* // Журн. Российского хим. об-ва им. Д.И. Менделеева. 1993. Т. 37. № 4. С. 20.
4. *Чмиль В.Д.* // Журн. аналит. химии. 1985. Т. 40. № 6. С. 1076.
5. *Духовная И.С., Чмиль В.Д.* // Журн. физ. химии. 1991. Т. 65. № 10. С. 2816.
6. *Быстров В.Ф., Лезина В.П.* // Оптика и спектроскопия. 1964. Т. 16. № 6. С. 1004.
7. *Пальм В.А.* Основы количественной теории органических реакций. Л.: Химия, 1977. 360 с.
8. *Барлин Д., Перрен Д.Д.* // Успехи химии. 1968. Т. 37. № 7. С. 1303.
9. *Snyder L.R.* // Anal. Chem. 1974. V. 46. № 11. P. 1384.
10. *Tomlinson E.* // J. Chromatogr. 1975. V. 113. № 1. P. 1.
11. *Коренман Я.И.* Коэффициенты распределения органических соединений. Справ. под ред. Н.В. Макарова. Воронеж: Изд-во ВГУ, 1992. 336 с.
12. *Soczewinski E.* // Anal. Chem. 1969. V. 41. № 1. P. 179.
13. *Чмиль В.Д.* // Журн. аналит. химии. 1985. Т. 40. № 3. С. 500.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 541.64:543.544.42:546.254

**ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРЕМНЕЗЕМОВ,  
МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИТРИФТОРСТИРОЛСОДЕРЖАЩИМ  
СОПОЛИМЕРОМ**

© 1994 г. А. Д. Катаев, В. В. Сабуров, И. Б. Машинистова,  
О. А. Резникова, М. Р. Муйдинов, В. П. Зубов

*Российская академия наук, Институт биоорганической химии  
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва*

Путем хемосорбции  $\alpha, \beta, \beta$ -трифторстиролсодержащего сополимера на поверхность кремнезема синтезированы новые сорбенты для жидкостной колоночной хроматографии. Исследованы хроматографические свойства этих сорбентов. Показано, что политрифторстиролсодержащие сорбенты обладают селективностью к галогенсодержащим соединениям и перспективны в хроматографии пептидов и белков.

Широкое распространение обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ОФЖХ) является результатом синтеза в последнее время широкого ассортимента сорбентов, различающихся по природе привитой фазы и по характеристикам пористой матрицы. Проблеме синтеза сорбентов для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) был посвящен специальный выпуск "Journal of Chromatography" [1]. В настоящее время можно выделить три основных подхода к синтезу сорбентов для жидкостной колоночной хроматографии: полимеризация мономеров (таких как стирол, акриламид и др.) с целью получения полимерных частиц определенного размера и пористости; модификация поверхности кремнеземов низкомолекулярными соединениями (например, алкил- и фторалкилсиланами) и модификация пористых кремнеземов тонкими слоями полимеров.

Наиболее широко применяются сорбенты на основе модифицированных кремнеземов, так как они характеризуются механической прочностью, контролируемой пористостью и разнообразными привитыми фазами. Сорбенты на основе кремнеземов, модифицированных полимерами, по мнению ряда авторов, являются наиболее перспективными. Они обладают повышенной гидролитической стабильностью, обусловленной тем, что макромолекула модификатора иммобилизована на поверхности кремнеземной матрицы множеством ковалентных связей [2 - 4]. Другое преимущество полимерсодержащих кремнеземных сорбентов определяется наличием в структуре поверхностного полимерного слоя "петель" и "хвостов", что способствует взаимодействию сорбента и сорбата [4].

Фторсодержащие сорбенты характеризуются, как правило, повышенной хемостойкостью по

сравнению с нефторированными аналогами, а также оригинальными хроматографическими свойствами. Благодаря этому они находят свое применение в жидкостной хроматографии как низкомолекулярных веществ, так и биополимеров [5]. Путем прививочной полимеризации тетрафторэтилена на поверхности кремнеземов авторы [6 - 8] синтезировали сорбенты весьма эффективные для ОФЖХ белков, пептидов, антибиотиков и нуклеиновых кислот. Однако, в силу химической инертности политetraфторэтилена (ПТФЭ), не представляется возможным введение в состав привитого полимера разнообразных лигандных групп, что иногда бывает необходимым. Для решения этой задачи, путем хемосорбции  $\alpha, \beta, \beta$ -трифторстиролсодержащего сополимера на поверхности кремнезема, используя подход, предложенный в работах [2, 3], был синтезирован новый сорбент для жидкостной колоночной хроматографии и изучены его хроматографические свойства в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

*Материалы и методы.* Макропористое стекло с диаметром пор 200 нм (МПС-2000) и диаметром частиц 0.25 - 0.50 мм (Нижний Новгород, Россия), силикагели "Silasorb 300" (5 мкм, Lachema, Чехия) и "Nucleosil 1000" (7 мкм, Macherey Nagel, Германия) были выбраны в качестве кремнеземных матриц.  $\alpha, \beta, \beta$ -Трифторстирол (ТФС) и винилметилдиэтоксисилан (ВМДЭС) очищали перегонкой в вакууме и хранили в запаянных ампулах.

Все растворители для синтеза имели марку "х. ч." и подвергались дополнительной сушке. Для ВЭЖХ использовали растворители марки "для жидкостной хроматографии" или "ос. ч.". Сополимер ВМДЭС и ТФС синтезировали радикальной

полимеризацией в массе, в качестве инициатора использовали бициклогексилпероксидкарбонат. Сополимер выделяли осаждением *n*-гексаном из раствора в бензоле. Соотношение звеньев ТФС и МВДЭС рассчитывали на основании данных элементного анализа. Молекулярную массу сополимера определяли методом гель-проникающей хроматографии на колонке "Zorbax PSM 60S" (Du Pont, США) с полистирольными стандартами, в качестве подвижной фазы использовали тетрагидрофуран (ТГФ).

Кинетику хемосорбции изучали, инкубируя 1.5 мл 2%-го раствора сополимера с навеской макропористого стекла в толуоле при 110°C в запаянной ампуле. Количество хемосорбированного сополимера устанавливали на основании данных элементного анализа образцов модифицированного МПС, а также спектральным определением количества оставшегося в растворе сополимера. Проверку на наличие физически адсорбированного сополимера проводили, анализируя экстракт после промывки сорбента толуолом в аппарате Сокслета.

**Модификация кремнезема.** Количество сополимера, используемое для модификации кремнезема, определяли, исходя из величины удельной поверхности исходного силикагеля. Силикагель "Silasorb 300" (3 г) помещали в трехгорлую колбу, снабженную мешалкой, насадкой Дина-Старка и капельной воронкой, приливали 30 мл сухого толуола и отгоняли 10 мл толуола для удаления воды. Затем в колбу вносили раствор 0.5 г сополимера в 10 мл толуола и суспензию перемешивали при кипячении в течение 2 ч. Горячую суспензию фильтровали через ПТФЭ-фильтр и дважды промывали 40 мл горячего перегнанного толуола. Затем проводили обработку силикагеля смесью 1 мл гексаметилдисилазана (ГМДС) и 15 мл толуола кипячением в течение 2 ч для модификации остаточных силанольных групп. Модифицированный силикагель промывали последовательно толуолом, этанолом, водой и сушили при 100°C.

Модификацию других кремнеземов проводили по аналогичной методике.

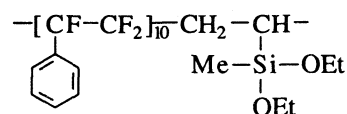
**Хроматографические эксперименты.** Модифицированные кремнеземы упаковывали при давлении 300 бар в стальные колонки (250 × 4.6 мм) из 5%-ой суспензии в смеси циклогексанол-толуол (1 : 1 по объему). Для промывки колонки использовали абсолютированный этанол. Для проведения хроматографических экспериментов использовали упаковочный стенд фирмы "Shandon" (Англия) и хроматографическую систему (насосы 114М, УФ-детектор 160 с фильтрами на 214 и 254 нм и контролер 421А) фирмы "Beck-

man" (США). Измерения проводили при комнатной температуре, объем вводимых проб составлял 1 - 5 мкл.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

**Модификация кремнеземов.** Синтезированный сополимер ТФС и МВДЭС анализировали методом гель-проникающей хроматографии. Было обнаружено, что профиль элюции полимера содержит два пика со средневесовой молекулярной массой  $M_w$ , равной 12700 ( $M_w/M_n = 2.9$ ,  $M_n$  - среднечисловая молекулярная масса) и 400 ( $M_w/M_n = 1.1$ ). Вещество с молекулярной массой 400 является, очевидно, продуктом димеризации трифторстирола 1,2- или 1,3-дифенилгексафторциклобутаном [9]. Фракционирование сополимера проводили дробным осаждением сополимера метанолом из раствора в бензоле. Было выделено четыре фракции сополимера с  $M_w = 11700, 6700, 6000$  и  $4000$  и  $M_w/M_n$  от 1.12 до 1.3, не содержащие продукта димеризации ТФС. Фракция с  $M_w = 11700$  была выбрана для дальнейшей работы.

Соотношение звеньев ТФС и МВДЭС в сополимере было рассчитано на основании данных элементного анализа и составило 10 : 1. Таким образом, структура сополимера может быть представлена в следующем виде:



В качестве кремнеземной матрицы для изучения кинетики хемосорбции сополимера ТФС и МВДЭС было выбрано МПС-2000 с целью исключить влияние эксклюзионных эффектов. Было обнаружено, что для окончания процесса достаточно 10 - 15 мин, что может определяться наличием множества реакционноспособных групп в молекуле модификатора и ее относительно небольшой молекулярной массой.

Образцы силикагелей и макропористых стекол, модифицированных ПТФС-содержащим сополимером, промывали горячим толуолом.

**Таблица 1.** Количество хемосорбированного сополимера ТФС с МВДЭС на кремнеземной матрице

$c_{\text{исх}}$ , мг/мл	$c'$	[C]	$c'$	[C]
	I		II	
2.5	44	2.8	46	3.0
5	84	5.5	86	5.6
10	184	12.0	189	12.3
20	369	24.1	371	24.3

Примечание. I и II - по данным методов УФ-спектроскопии и элементного анализа соответственно;  $c'$ , мг/г носителя; [C], мас. %.

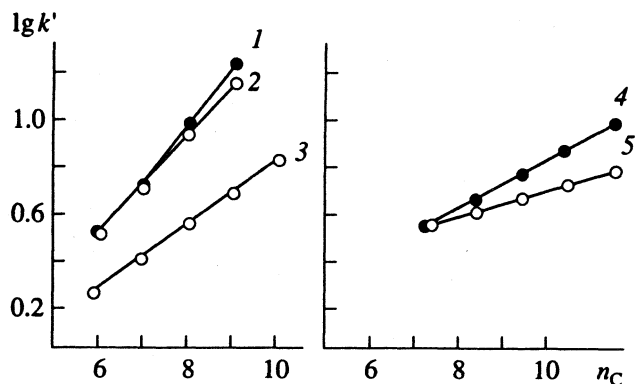


Рис. 1. Зависимости  $\lg k'$  от числа атомов углерода  $n_C$  в молекуле *n*-алкилбензолов (1, 3, 4) и полиметилбензолов (3, 5) на адсорбентах "Silasorb 300"-ПТФС (1 - 3) и силикагеле, модифицированном ГМДС (4, 5). Элюенты: 1, 2 - метанол-вода (3 : 7), 3 - метанол-вода (1 : 1), 4, 5 - изопропанол-вода (2 : 3).

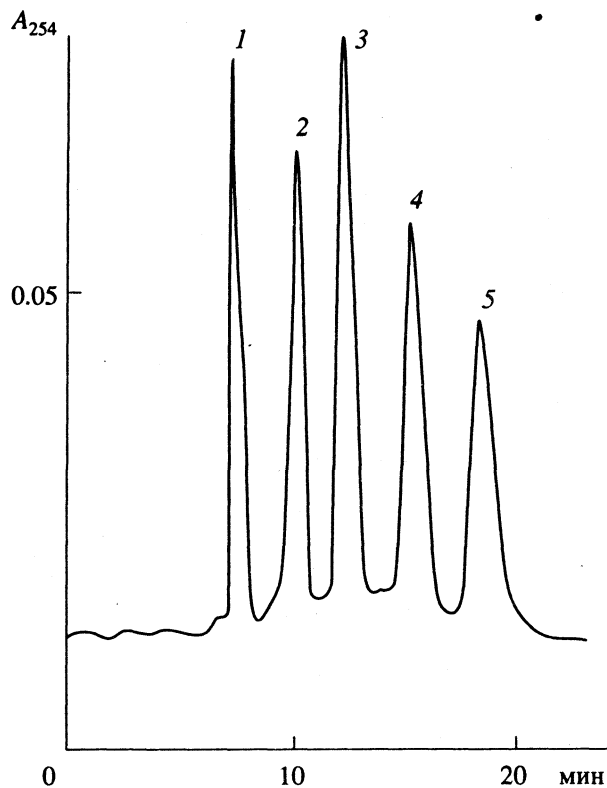


Рис. 2. Хроматограмма разделения смеси галогенбензолов на колонке "Silasorb 300"-ПТФС (250 × 4.6 мм), элюент ацетонитрил-вода (1 : 1), 1 мл/мин: 1 - бензол, 2 - фторбензол, 3 - хлорбензол, 4 - бромбензол, 5 - иодбензол.

Поскольку при этом не наблюдалось экстракции сополимера, то можно утверждать, что весь сополимер хемосорбировался на кремнеземе. Как следует из табл. 1, количество хемосорбированного полимера можно варьировать в широком диапазоне (в отличие от модификации кремнезема низкомолекулярными органосиланами) в зависимости от его концентрации в реакционной

смеси. При увеличении количества полимерного модификатора до 370 мг/г МПС (содержание углерода 24 мас. %) наблюдается практически линейная зависимость количества хемосорбированного полимера от его исходной концентрации в растворе. Объяснением этого явления, на наш взгляд, может служить следующее: после формирования первого полимерного слоя, обеспечивающего эффективное экранирование силанольных групп поверхности кремнезема, процесс хемосорбции других полимерных молекул может продолжаться за счет силанольных групп сополимера, образующихся в результате гидролиза якорных этоксигрупп следами воды. Это может приводить к формированию мультислойной поверхности и качественным образом влиять на структуру, а следовательно, и свойства синтезированных композиционных сорбентов.

Известно [2], что для эффективного экранирования поверхностных силанольных групп достаточно сформировать монослойное полимерное покрытие. В частности, для сорбента на основе силикагеля "Silasorb 300" (удельная поверхность 248 м<sup>2</sup>/г) содержание углерода составило 9 мас. % (лигандная емкость 7.5 мкмоль/м<sup>2</sup>). После проведения дополнительной обработки ГМДС содержание углерода увеличивается еще на 1.5 - 2.0 мас. %. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными в [2], для полистиролсодержащих кремнеземных сорбентов.

**Хроматографические свойства.** Механизм удерживания в ОФЖХ до настоящего времени остается предметом научных дискуссий даже для наиболее распространенных алкильных фаз. Поскольку в данной работе предложена новая стационарная фаза, то ее "обращенно-фазовую" природу необходимо подтвердить набором стандартных хроматографических тестов.

Полноту экранирования остаточных силанольных групп на поверхности кремнезема проверяли по удерживанию основных соединений в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ при нейтральных значениях pH. При разделении смеси пиридина, 4,4'-диаминобибензила и 3,4-диметилпиридина на колонке, заполненной сорбентом "Silasorb 300"-ПТФС, были получены симметричные пики (элюент ацетонитрил-вода (1 : 1 по объему), коэффициенты асимметрии пиков 1.2 - 1.22), при этом более гидрофобный диметилпиридин элюировался последним. Это свидетельствует об отсутствии заметного влияния остаточных силанольных групп на механизм удерживания этих сорбатов и о том, что молекулы основных сорбатов взаимодействуют с поверхностью, сформированной привитым полимерным слоем.

На рис. 1 представлены зависимости логарифма коэффициента емкости  $\lg k'$  от числа атомов углерода в молекуле адсорбата ( $n_C$ ) для гомологических серий алкилбензолов. Известно, что в этом

случае удерживание преимущественно определяется неспецифическим межмолекулярным взаимодействием адсорбата со стационарной фазой и специфическим взаимодействием его с элюентом. Видно, что удерживание возрастает с ростом числа атомов углерода в молекуле как в ряду полиметилбензолов, так и в ряду *n*-алкилбензолов. Однако необходимо отметить, что на ПТФС-содержащих сорбентах полиметилбензолы удерживаются практически так же, как и алкилбензолы. Для алкильных "обращенных фаз" меньшее удерживание полиметилбензолов объясняется их более сильным специфическим взаимодействием с элюентом [10]. В случае ПТФС-содержащих сорбентов фенильный лиганд сам по себе способен к слабым специфическим взаимодействиям, и кроме того, фторуглеродный заместитель поляризует молекулу, усиливая вклад специфических взаимодействий в общую энергию адсорбции. Зависимости коэффициентов емкости ( $k'$ ) метил- и алкилбензолов от состава элюента также имели форму, характерную для традиционных алкильных обращенно-фазовых сорбентов, т.е. с уменьшением полярности элюента удерживание уменьшается. Это свидетельствует о том, что механизмы удерживания алкилароматических соединений на этих фазах близки по природе.

Исходя из полученных экспериментально факторов емкости, были оценены величины гидрофобной селективности для гомологических рядов алкил- и полиметилбензолов (табл. 2). Значения селективности определяли как тангенс угла наклона зависимости ( $\lg k'$ ) от  $n_c$  на прямолинейном участке, они характеризовали вклад в изменение свободной энергии адсорбции двух соседних членов гомологического ряда. Сравнивая полученные значения с аналогичными для алкильных сорбентов [11, 12], можно заметить, что на селективность оказывает влияние состав элюента: с уменьшением полярности она уменьшается. При этом для ПТФС-содержащих сорбентов характерно более резкое уменьшение селективности.

Ранее было показано [13, 14], что фторсодержащие сорбенты обладают повышенной селективностью по отношению к галогенсодержащим соединениям. Подтверждением этого для ПТФС-содержащих сорбентов могут служить значения коэффициентов емкости  $k'$  и селективности  $\alpha^*$  ( $\alpha^*$  – отношение величины  $k'$  замещенного бензола к величине  $k'$  бензола) для ряда ароматических соединений, приведенные в табл. 3. Введение в молекулу бензола заместителей с большой поляризуемостью, таких как галогены, значительно увеличивает удерживание в ряду  $H < F < Cl < Br < I$ , что позволяет легко разделять данные соединения даже при высоком содержании метанола в элюенте (рис. 2). Однако, если галоген, в частности F, находится в *орто*-положении к другому заместителю в молекуле бензола, то такие соединения удерживаются слабее, чем их аналоги, не содержащие фтор-заместителей (ср. пары: *o*-фтор- и *n*-фтортолуол; *o*-фтор- и *n*-фторбензойная кислота). У таких соединений электронная плотность в кольце распределена наиболее неравномерно, что вызывает рост суммарного момента диполя молекулы и приводит к более сильному специфическому взаимодействию с полярным элюентом.

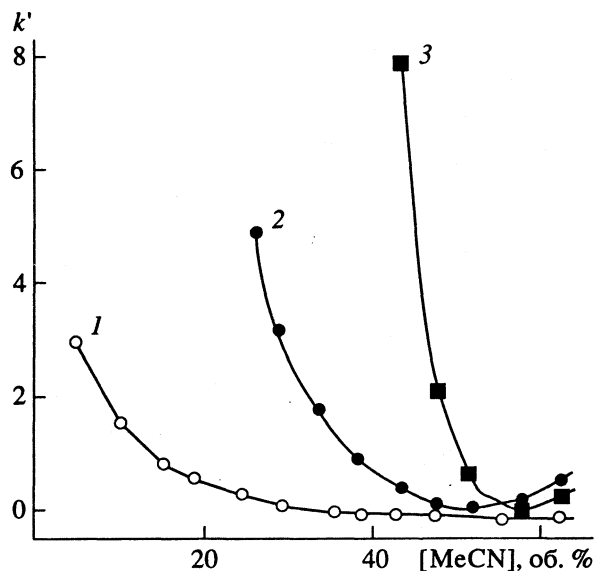


Рис. 3. Зависимости удерживания пептидов и белков на колонке "Nucleosil 1000"-ПТФС от содержания ацетонитрила в элюенте (0.1% ТФУ): 1 – β-эндорфин, 2 – цитохром С, 3 – бычий сывороточный альбумин.

живаются слабее, чем их аналоги, не содержащие фтор-заместителей (ср. пары: *o*-фтор- и *n*-фтортолуол; *o*-фтор- и *n*-фторбензойная кислота). У таких соединений электронная плотность в кольце распределена наиболее неравномерно, что вызывает рост суммарного момента диполя молекулы и приводит к более сильному специфическому взаимодействию с полярным элюентом.

Таблица 2. Значения величин гидрофобной селективности ( $\alpha^*$ ) для гомологических рядов алкил- (I) и полиметилбензолов (II) на адсорбентах "Silasorb 300"-ПТФС и силасорб  $C_{18}$

[MeOH], об. % (в элюенте)	"Silasorb 300"-ПТФС – $C_{18}$		"Silasorb 300"-ПТФС – $C_{18}$	
	I		II	
30	0.33	0.47	0.33	0.27
50	0.15	0.36	0.08	0.23

Таблица 3. Факторы емкости ( $k'$ ) и селективности ( $\alpha^*$ ) для замещенных бензолов (элюент метанол-вода (45 : 55), X – функциональная группа)

X	$k'$	$\alpha^*$	X	$k'$	$\alpha^*$
-H	2.5	1.00	<i>o</i> -F, -CH <sub>3</sub>	5.13	2.05
-F	2.9	1.16	<i>n</i> -F, -CH <sub>3</sub>	5.3	2.12
-Cl	3.17	1.27	-COOH	0.34	0.14
-Br	5.1	2.04	<i>o</i> -F, -COOH	0.13	0.05
-I	6.7	2.68	<i>n</i> -F, -COOH	0.57	0.23
-CH <sub>3</sub>	3.8	1.52			

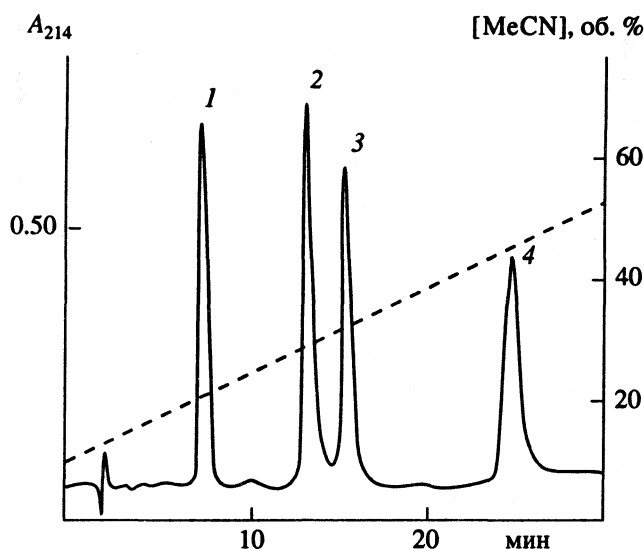


Рис. 4. Хроматограмма разделения смеси  $\beta$ -эндорфина (1), лизоцима (2), цитохрома С (3) и яичного альбумина (4) на колонке "Nucleosil 1000"-ПТФС (250  $\times$  4.4 мм); элюент: А - 0.1% ТФУ, Б - 90% ацетонитрила в буфере А, 1 мл/мин; градиент: 10 - 50% Б за 30 мин.

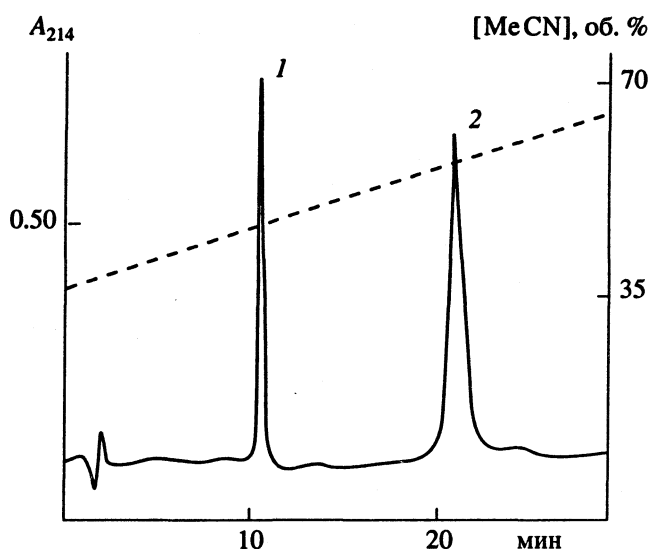


Рис. 5. Хроматограмма разделения смеси яичного альбумина (1) и бычьего сывороточного альбумина (2) на колонке "Nucleosil 1000"-ПТФС (250  $\times$  4.4 мм); элюент А - 0.1% ТФУ, Б - 90% ацетонитрила в буфере А, 1 мл/мин; градиент: 35 - 50% Б за 30 мин.

Применение ПТФС-содержащих сорбентов в обращенно-фазовой ВЭЖХ пептидов и белков. Колонки, упакованные сорбентом "Nucleosil 1000"-ПТФС, были использованы для обращенно-фазовой ВЭЖХ пептидов и белков. Зависимости величин  $k'$  от содержания ацетонитрила в 0.1% растворе трифторуксусной кислоты (ТФУ) для ряда модельных пептидов и белков приведены на рис. 3. Можно отметить резкое уменьшение удерживания всех сорбатов при увеличении содержания ацетонитрила в элюенте. Приведенные зависимости для ТФС-содержащих сорбентов имеют вид, характерный для традиционных обращенно-фазовых сорбентов  $C_8$  -  $C_{18}$ . Некоторое увеличение значений  $k'$  при содержании ацетонитрила в элюенте более 70% может быть вызвано эффектом остаточных силанольных групп. Другой причиной увеличения удерживания может быть некоторая "полярность" фторсодержащей фазы, что наблюдалось нами и в случае удерживания пептидных сорбатов на колонках с ПТФЭ-содержащими сорбентами.

На колонках с ПТФС-содержащими сорбентами успешно разделялись смеси пептидов и белков в условиях градиентной элюции. Примеры разделения модельных смесей пептидов и белков градиентом ацетонитрила в 0.1% растворе ТФУ приведены на рис. 4 и 5.

Сорбенты, полученные путем хемсорбции сополимера ТФС и МВДЭС на поверхности кремнезема, оказались достаточно гидролитически стабильными, что является характерным для сорбентов, синтезированных иммобилизацией полимеров за счет образования множества ковалентных связей с поверхностью пористых кремнезе-

мов. В заключение отметим, что ВЭЖХ-колонка, заполненная сорбентом "Silasorb 300"-ПТФС, использовалась в течение года в диапазоне pH от 2.0 до 8.5 без заметной потери селективности и эффективности.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Regnier F.E., Unger K.K., Majors R.E. (Guest Editors) // J. Chromatogr. 1991. V. 544.
2. Kurganov A.A., Kuzmenko O., Davankov V.A. et al. // Ibid. 1990. V. 506. P. 391.
3. Kurganov A.A., Tevlin A., Davankov V.A. // Ibid. 1983. V. 261. P. 223.
4. Ivanov A.E., Saburov V.V., Zubov V.P. // Adv. Polymer Sci. 1992. V. 104. P. 136.
5. Danielson N.D., Beaver L.G., Wangsa J. // J. Chromatogr., 1991. V. 544. P. 187.
6. Сабуров В.В., Муйдинов М.Р., Катаев А.Д. и др. // Журн. физ. химии. 1991. Т. 65. С. 2692.
7. Катаев А.Д., Сабуров В.В., Фони́на Л.А., Гурьянов С.А. // Proceedings of 8-th Conference on organic and bioorganic chemistry. Riga, November 1991. P. 292.
8. Фони́на Л.А., Сабуров В.В., Гурьянов С.А. и др. // Хим.-фармацевт. журн. 1993. Т. 6. С. 14.
9. Кнунянц И.Л., Пономаренко С.П. Фторполимеры. М.: Мир, 1975. С. 61.
10. Ageev A.N., Kiselev A.V., Yashin Ya. I. // Chromatographia. 1981. V. 14. P. 638.
11. Smith R.M. // J. Chromatogr. 1981. V. 209. P. 1.
12. Colin H., Guiochon G., Yun Z., Diez-Masa J.C. // J. Chromatogr. Sci. 1983. V. 21. P. 179.
13. Berendsen G., Pikaart K.A., de Galan L., Olieman C. // Anal. Chem. 1990. V. 218. P. 455.
14. Billiet H.A., Schoenmackers P.J., de Galan L. // J. Chromatogr. 1981. V. 218. P. 455.



МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 541.64:547.462

ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ДРОЖЖЕЛИТИНА

© 1994 г. Л. Я. Царик, В. И. Кузнецов, С. В. Кондратьев, З. И. Васильева, А. И. Кузаев

Иркутский государственный университет

Путем радикальной сополимеризации дивинилбензола (ДВБ) с малеиновым ангидридом (МА) и стиролом (Ст) синтезированы полимеры трехмерного строения гелевой и пористой структуры. Гидролизом сополимеров МА-ДВБ, а также МА-ДВБ-Ст получены карбоксильные катиониты, пригодные для иммобилизации ферментного препарата. Установлена возможность гидролиза казеината натрия при помощи дрожжелитина, иммобилизованного на сорбентах МА-ДВБ и Ст-МА-ДВБ. Обнаружено, что степень расщепления белка на иммобилизованном дрожжелитине значительно выше, чем степень его расщепления с помощью нативного дрожжелитина.

В настоящее время в производстве питательных сред для получения белковых гидролизатов широко применяется поджелудочная железа крупного рогатого скота – нестандартное сырье, и, как все протолитические ферменты, в рН-оптуме своего действия подвергающаяся автолизу, который сопровождается инактивацией. Нашей промышленностью широко выпускаются сухие ферментные препараты микробиологического происхождения – грибные и бактериальные протеазы.

Имеются литературные данные о применении этих препаратов в производстве микробиологических питательных сред (протосубтилин, дрожжелитин и т.д.) [1]. До настоящего времени применение сухих ферментных препаратов не получило широкого распространения, что объясняется высокой стоимостью ферментов, связанной со сложностью их выделения и очистки, неустойчивостью ферментов к таким факторам, как температура и рН среды, а также тем, что отделение фермента от продуктов реакции крайне затруднено и практически себя не оправдывает. Таким образом, дорогостоящий фермент используется только один раз и, кроме того, загрязняет конечный продукт.

Стремление обойти указанные факторы привело к идее иммобилизации ферментов – их локализации в реакторе при проведении процесса. Иммобилизованные ферменты специфичны и активны и обладают в то же время рядом преимуществ: подобно гетерогенным катализаторам они могут быть использованы многократно в периодических процессах, а также в непрерывных, реакцию легко можно остановить, отделив фермент от реакционной смеси, во многих случаях фермент при иммобилизации стабилизируется. Оптимальные условия среды (например, рН) для иммобилизованного фермента в ряде случаев можно изменить в нужном направлении, в отличие от нативных препаратов; продукт реакции не

загрязнен ферментом, что зачастую имеет немаловажное значение.

Для разработки новых видов носителей широкие возможности открывает введение реакционноспособных ангидридных групп в состав синтетических полимеров. В этой связи отметим новый тип носителя, полученного сополимеризацией эквимольных количеств стирола и малеинового ангидрида. Такие носители обладают довольно высокой емкостью по отношению к белкам, могут применяться как для нековалентной, так и для ковалентной иммобилизации ферментов [2].

Цель данной работы – синтез сополимера дивинилбензола и малеинового ангидрида и изучение возможности использования его после гидролиза в качестве носителя для иммобилизации ферментного препарата дрожжелитина.

Путем радикальной сополимеризации в присутствии инициатора были синтезированы чередующиеся сополимеры дивинилбензола (ДВБ) с малеиновым ангидридом (МА)

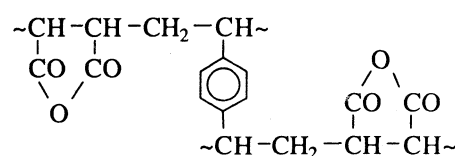


Таблица 1. Влияние количества стабилизатора ЛММК на размеры и форму частиц сополимера тройной системы (Ст – 35, ДВБ – 10, МА – 55 мол. %)

N	m	d	N	m	d
1	0.1	2 - 200	3	1.0	2.0
2	0.5	2 - 70	4	2.0	2.0

Примечание. Частицы образцов 1 и 2 имеют неправильную форму, агломераты; образцов 3 и 4 – сферическую форму и однородный состав. Количество стабилизатора m выражено в массовых процентах от количества дисперсионной среды; d, мкм.

**Таблица 2.** Условия проведения синтеза сорбентов (стабилизатор – ОПЦ, растворитель – ДМЭДЭГ–бензол, в соотношениях 100 : 0 и 50 : 50 об. %)

Образец	[ЛММК], мас. %	ДВБ	Ст	МА	t, °C	d, мкм
100 : 0						
1.1	1.0	0.11	0.22	0.67	70	10 - 30
50 : 50						
1.2	0.5	0.33	–	0.67	70	85 - 125
1.3	1.0	0.33	–	0.67	60	100 - 240
1.4	1.0	0.11	0.22	0.67	60	70 - 210
1.5	0.2	0.11	0.22	0.67	65	5 - 25

**Таблица 3.** Характеристики полученных сорбентов (V – общий объем пор)

Образец	K <sub>наб</sub>		V, см <sup>3</sup> /г	СОЕ, мг-экв/г
	вода	бензол		
1.1	0.23	0.59	0.63	9.0
1.2	0.34	0.31	0.59	7.9
1.3	0.37	0.55	0.89	7.9
1.4	0.34	0.34	0.93	8.6
1.5	0.50	0.13	0.64	8.6

**Таблица 4.** Условия проведения синтеза сорбентов (стабилизатор – крахмал и КМЦ, растворитель – диоксан–толуол, время реакции τ = 2 ч, t = 70°C)

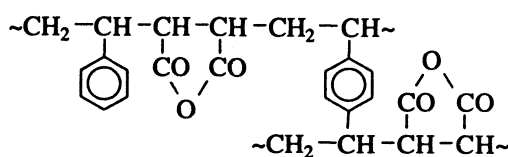
Образец	Диоксан	Толуол	Крахмал	КМЦ	ДВБ	Ст	МА
2.1	5.06	13.01	1.77	–	13.7	30.6	56.7
2.2	5.06	–	1.59	–	9.1	34.7	56.29
2.3	6.75	–	–	0.79	25.2	18.6	56.29

Примечание. Содержание диоксана и толуола – мас. % от количества мономеров, крахмала и КМЦ – мас. % от количества дисперсионной среды.

**Таблица 5.** Условия проведения синтеза сорбентов (растворитель – диоксан–толуол (1 : 1), ω – скорость перемешивания)

Образец	[ЛММК], мас. %	ДВБ	Ст	МА	τ, ч	ω, об/мин	d, мкм
3.1	0.34	1.2	58.8	40.0	2.0	400 - 600	85 - 460
3.2	0.34	1.2	58.8	40.0	3.0	200 - 300	40 - 100
3.3	0.50	1.2	58.8	40.0	4.5	400 - 600	15 - 85

и дивинилбензола с малеиновым ангидридом и стирилом (Ст) [3, 4]



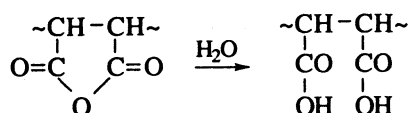
Сорбенты были получены методом суспензионной сополимеризации. Использовались различные варианты ее проведения; варьировался состав мономерной смеси, растворитель и стабилизатор суспензии. Изучалось влияние условий проведения реакции на характеристики получаемого сорбента (пористость, набухаемость, размер частиц, СОЕ) и исследовалась иммобилизация ферментного препарата дрожжелатина на полученных сорбентах.

В качестве полимерных стабилизаторов использовались различные эфиры целлюлозы, крахмал и сополимер лаурилметакрилата с метакриловой кислотой (ЛММК). С последним из перечисленных стабилизаторов удалось получить наиболее мелкие и однородные сферические частицы сополимеров, причем найдено, что оптимальная концентрация этого стабилизатора в сополимеризации тройной системы ДВБ–Ст–МА составляет один массовый процент от количества дисперсионной среды (табл. 1).

С дифильным стабилизатором ЛММК возможно получение микросферических сополимеров с размером частиц менее 5 мкм. В присутствии оксипропилцеллюлозы (ОПЦ) образуются сополимеры, имеющие размер частиц от 5 до 250 мкм (табл. 2). Смесь растворителей диметиловый эфир диэтиленгликоля (ДМЭДЭГ)–бензол позволяет получить пористую структуру сополимеров (табл. 3). Однако механическая прочность полученных частиц сополимеров невысока. Применение в качестве стабилизатора крахмала и карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) не позволило решить задачу повышения механической прочности (табл. 4).

В последнее время были начаты детальные исследования нового стабилизатора в процессе синтеза сорбента (табл. 5). Были получены сорбенты, характеристики которых приведены в табл. 6.

Сорбенты серий 1 и 2 подвергались набуханию в воде в течение 24 ч для гидролиза ангидридных групп:



Затем проводилась иммобилизация дрожжелатина на сорбентах путем обработки набухших сополимеров 5%-ным раствором дрожжелатина в боратном буфере с pH 8.5 в течение 2 ч. Неиммо-

Таблица 6. Характеристики полученных сорбентов

Образец	$K_{\text{наб}}$		СОЕ, мг-экв/г
	вода	толуол	
3.1	—	0.7	3.0
3.2	—	1.6	3.1
3.3	0.0	2.6	1.8

Таблица 7. Результаты гидролиза казеината натрия (НФ – нативный фермент) на иммобилизованном дрожжелитине (условия исследования – статические),  $c$  – количество аминокислот

Образец	$c$ , мас. %	
	начало опыта	через 3 ч
НФ	39.9	68.9
1.1	39.9	58.4
1.2	39.9	55.0
1.3	39.9	66.4
1.4	39.9	76.0
1.5	39.9	83.6
2.1	39.9	100.8
2.2	39.9	77.3
2.3	39.9	89.9

Таблица 8. Результаты гидролиза казеината натрия на иммобилизованном дрожжелитине при различных рН (сорбент 2.2, условия исследования – динамические)

рН	$c$ , мас. %	
	начало опыта	через 2 ч
4.99	39.9	48.3
5.30	39.9	48.3
7.20	39.9	56.7
9.40	39.9	78.1

близованный препарат отмывался дистиллированной водой. Активность фермента изучалась в реакции гидролиза казеината натрия. Реакция проводилась с 1%-ным раствором казеината натрия в течение 3 ч при температуре 45°C. Определялось количество аминокислот, полученных в результате гидролиза. Данные исследования приведены в табл. 7.

Как следует из этих данных, в большинстве случаев гидролиз на иммобилизованном дрожже-

литине идет до больших степеней превращения, чем при гидролизе с нативным дрожжелитином. Степень расщепления белка на иммобилизованном препарате превысила степень расщепления на нативном ферменте в 1.4 раза (наилучший показатель). Это свидетельствует о более высокой эффективности процесса на иммобилизованном дрожжелитине.

Выяснено, что на процесс влияет кислотность среды. Исследовался гидролиз раствора казеината натрия в буферных смесях с различным рН. Из результатов, приведенных в табл. 8, видно, что рН-оптимум иммобилизованного дрожжелитина на данном сорбенте лежит в области рН 9.4.

На процесс иммобилизации также влияют, видимо, размер частиц сополимера и его набухаемость в воде. Как видно из результатов исследований, в первой серии сорбентов наиболее полно иммобилизация протекает на образце 1.5, имеющем наименьший размер частиц и наибольшую набухаемость в воде. Чем меньше частицы, тем больше полезная поверхность, на которой происходит взаимодействие фермента с носителем. При набухании сорбента в воде на этой поверхности образуются группы –СООН, которые затем принимают участие в иммобилизации, взаимодействуя с группами –NH<sub>2</sub> иммобилизуемого белка. Поры, имеющиеся в сорбенте, также способствуют иммобилизации, так как часть молекул фермента, предположительно, проникает в поры и удерживается там при помощи водородных связей и электростатических взаимодействий.

Гидролизаты казеина, полученные на дрожжелитине иммобилизованном на сорбенте 2.3, исследовались в качестве питательной среды для роста холерного вибриона и чумного микроба. Отмечено, что эти среды обладают лучшими ростовыми свойствами, чем гидролизаты, полученные на нативном ферменте, но худшими по сравнению с контрольными средами.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кондрашкова Т.В., Лискина И.В. и др. // Тр. противочумных учреждений. Саратов, 1992. С. 69 - 71.
2. Антонов В.К., Бессмертная Л.Я., Бровко Л.Ю. и др. Химическая энзимология. М.: Изд-во МГУ, 1982. 275 с.
3. Царик Л.Я., Зилев С.В., Наумов В.Н. и др. Способ получения полимерных сорбентов: А. с. 2044363 СССР // Б. И. 1983. № 42.
4. Зилев С.В., Царик Л.Я., Ратовский Г.В. и др. // Высокмолекуляр. соединения. 1987. Т. 29А. № 10. С. 2026.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544

СОРБЦИЯ ИНСУЛИНА НА КАТИОНИТАХ "БИОХРОМ"

© 1994 г. Ю. Я. Лебедев, Л. П. Гаврюченкова, К. Э. Сарапов, Н. Н. Момот,  
О. А. Громова, В. В. Константинов, Л. Н. Давидюк

Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург

Исследованы закономерности равновесия, кинетики и динамики сорбции свиного инсулина на новых сорбентах "Биохром". Проанализировано влияние природы функциональных групп ( $\text{COO}^-$ ,  $\text{SO}_3^-$ ,  $\text{PO}_3\text{H}^-$ ) на форму изотерм и кинетических кривых сорбции в статистических условиях опыта, а также на закономерности сорбции инсулина в динамических условиях опыта. Установлен внутридиффузионный механизм кинетики сорбции инсулина. Обнаружено наличие линейных участков и различие в предельных емкостях на изотермах сорбции. Рассчитаны коэффициенты распределения для линейных участков изотерм, эффективные коэффициенты диффузии инсулина в порах зерен сорбентов, а также средние времена сорбции инсулина. Показано преимущество сорбционных характеристик новых сорбентов "Биохром" по сравнению с характеристиками катионита КУ-23, традиционно используемого в технологии выделения инсулина.

Сорбционные свойства новых сорбентов "Биохром" по отношению к белкам систематически не изучались. Цель данной работы состоит в исследовании сорбционных характеристик катионитов "Биохром" на примере свиного инсулина в условиях равновесия, а также в изучении кинетики и динамики сорбции. Некоторые сорбционные характеристики инсулина на отечественных макропористых катионитах приведены в [1 - 4].

Новые сорбенты "Биохром" представляют собой полужесткие микросферические полимеризационные материалы, выполненные на основе мономеров и кросс-агентов метакрилатной природы [5]. Биосовместимость системы матрица сорбента-белок достигается возможностью варьирования гидрофильно-гидрофобного баланса поверхности, размера пор и гранул, величины основности и обменной емкости ионогенных групп. В работе использовали товарные образцы катионитов, физико-химические характеристики которых представлены в табл. 1 [6]. Там же приведены характеристики катионита КУ-23, традиционно используемого в технологии выделения инсулина, и рассматриваемого в работе в качестве образца сравнения.

Сульфокатионит КУ-23 макросетчатой структуры получают сополимеризацией стирола и дивинилбензола в присутствии инертного наполнителя с последующим сульфированием. Сильнокислотные катиониты Сульфо-Биохром К, Фосфо-Биохром К и слабокислотный катионит Карбокси-Биохром К2 получены путем модификации нейтральной матрицы, синтез которой описан в работе [7]. Другой слабокислотный катионит Карбокси-Биохром К1 получен методом прямой сополимеризации метакриловой кислоты с кросс-реагентами метакрилатной природы. Карбоксильные

катиониты Биохром К1 и Биохром К2 отличаются гидрофильно-гидрофобным балансом поверхности. Так, параметры гидрофобности  $\epsilon$  [8] Карбокси-Биохромов К1 и К2 составляют 0.97 и 1.13 единиц соответственно. Следовательно, матрица Карбокси-Биохрома К1 более гидрофобна по сравнению с матрицей Карбокси-Биохрома К2, что согласуется с химией поверхности, закладываемой при синтезе сорбентов. Все иониты перед использованием рассеивали мокрым способом в дистиллированной воде и уравнивали буфером, из которого велась сорбция инсулина.

Сорбционные свойства ионитов изучали по отношению к свиному кристаллическому инсулину, соответствующему требованиям фармакопейной статьи 42-1503-80. Сорбцию инсулина проводили из 0.02 М ацетатного буфера с рН 3.7, содержащего NaCl с концентрацией 0.15 М. Выбор рН 3.7 был обусловлен малой растворимостью инсулина в изоточке белка [9].

Температура опытов составляла 20°C. Количественный анализ растворов инсулина осуществляли спектрофотометрическим методом при длине волны 280 нм. Статистические опыты по изучению равновесия и кинетики сорбции инсулина проводили в ограниченном объеме раствора (отношение внешнего раствора к объему сорбента сохранялось постоянным и соответствовало 500 единицам) при непрерывном перемешивании раствора. Фронтальные кривые сорбции снимали с помощью УФ-детектора при длине волны 280 нм и записывали на ленте самописца.

Обсуждение работы начнем с результатов по закономерностям равновесия в системе катионит-раствор инсулина. На рис. 1 приведены изотермы сорбции инсулина. Все изотермы имеют линейные участки, соответствующие concentra-

циям инсулина во внешнем растворе в интервале до 0.3 г/л. При этом крутизна линейных участков возрастает в последовательности: КУ-23 ( $\Gamma = 159$ ), Карбокси-Биохром К2 ( $\Gamma = 417$ ), Карбокси-Биохром К1 ( $\Gamma = 700$ ), Сульфид-Биохром К ( $\Gamma = 1626$ ), Фосфо-Биохром К ( $\Gamma = 1650$ ), где  $\Gamma$  – безразмерный коэффициент распределения инсулина между фазами ионита и раствора для линейного участка изотермы  $\Gamma = a/cV_{уд}$ ,  $a$  – удельная концентрация инсулина в ионите (мг инсулина/г сухого сорбента),  $c$  – объемная концентрация инсулина в растворе (мг/мл),  $V_{уд}$  – удельный объем ионита (табл. 1).

Наименьшую избирательность инсулина к иониту КУ-23 можно объяснить недоступностью для белка части сульфогрупп на внутренней поверхности ионита, так как КУ-23 имеет бипористую структуру из мелких (недоступных для белка) и крупных (доступных для белка) пор. По этой же причине предельная обменная емкость КУ-23 по инсулину также минимальна. Наибольшее сродство инсулина к катионитам Фосфо- и Сульфид-Биохром обусловлено, по-видимому, сильным взаимодействием аминокрупп белка с группами  $-PO_3H^-$  и  $-SO_3^-$  ионов и полной доступностью последних для инсулина (средний диаметр пор ионитов превышает средний диаметр молекулы в  $\sim 7$  раз). Некоторое различие в адсорбционных характеристиках к инсулину Сульфид- и Фосфо-катионитов обусловлено различием в величинах полной обменной емкости (ПОЕ) ионитов (табл. 1). Сродство инсулина к Карбокси-катионитам соответствует промежуточному положению в ряду обсуждаемой последовательности. Связано это с малой степенью ионизации карбоксильных групп (катиониты – слабые), так как  $pH(\text{опыта}) \ll pK(\text{катионита})$  (табл. 1). Что же касается различия самих Карбокси-Биохромов в крутизне кривых и предельной емкости по инсулину на изотермах, то они вызваны разницей в ПОЕ (табл. 1) и большей гидрофобностью матрицы катионита Карбокси-Биохром К1 по сравнению с катионитом Карбокси-Биохром К2.

Результаты по кинетике сорбции инсулина на сорбентах “Биохром” и КУ-23 представлены на рис. 2 и в табл. 2. Параметры системы по объемам сорбентов и растворов, а также исходные концен-

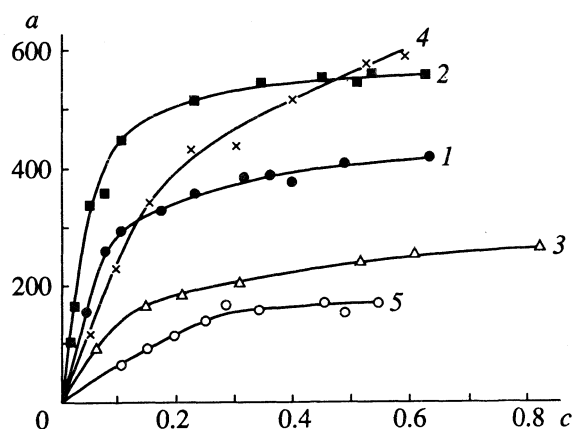


Рис. 1. Изотермы сорбции инсулина для различных катионитов ( $a$ , мг инсулина/г сухого сорбента,  $c$ , мг/мл): 1 - 5 – см. табл. 1.

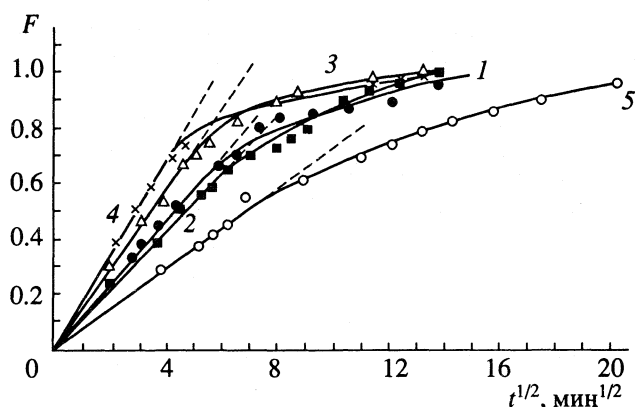


Рис. 2. Кинетические кривые сорбции инсулина для различных катионитов: 1 - 5 – см. табл. 1.

трации ( $c_{исх}$ ) инсулина в растворах были выбраны из расчета, чтобы равновесные концентрации инсулина в обеих фазах (рис. 1) соответствовали линейным участкам изотерм сорбции ( $c_{исх} = 0.25$  г/л – для катионитов “Биохром” и  $c_{исх} = 0.5$  г/л для КУ-23), или прямоугольным участкам изотерм сорбции ( $c_{исх} = 0.5$  г/л для катионитов “Биохром”). Кинетические кривые в координатах степень завершенности процесса ( $F$ ) – корень квадратный из времени ( $t$ ) сорбции имеют ярко выраженные

Таблица 1. Физико-химические характеристики катионитов

№	Катионит	$V_{уд}$ , см <sup>3</sup> /г	$k_{наб}$	$\beta$	$D \times 10^{-3}$	$p$ , атм	$pK$	ПОЕ, мг-экв/мл
1	Сульфид-Биохром К	4.1	1.0	0.78	80	1 - 100	1 - 2	0.11
2	Фосфо-Биохром К	3.4	1.2	0.78	80	1 - 100	1 - 6, 6 - 7	0.25
3	Карбокси-Биохром К2	4.0	1.2	0.78	80	1 - 100	5 - 6	0.14
4	Карбокси-Биохром К1	7.7	2.2	0.91	500	1 - 70	5 - 6	0.6
5	КУ-23	3.3	1.0	0.75	–	–	1 - 2	1.4

Примечание. Приняты обозначения:  $V_{уд}$  – удельный объем,  $k_{наб}$  – коэффициент набухания,  $\beta$  – пористость,  $D$  – предел эксклюзии в Дальтонах,  $p$  – рабочее давление, ПОЕ – полная обменная емкость: значения  $pK$  приведены для ионогенных групп.

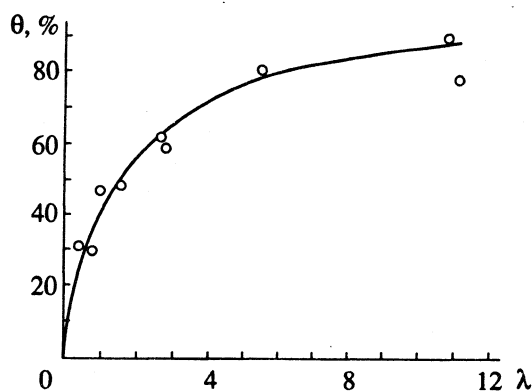


Рис. 3. Зависимость степени сорбции инсулина от обобщенной координаты длины колонки для катионитов Сульфид-Биохром К. Варьируемые параметры:  $R$  (15 и 63 мкм),  $h$  (2 - 4 см),  $u$  (420 - 2437 мл/(ч см<sup>2</sup>)).

линейные участки, что является надежным критерием внутридиффузионного механизма кинетики сорбции, который характерен для крупных органических ионов [10].

Расчет эффективных коэффициентов диффузии инсулина в фазе ионита проводили как с учетом начального хода кинетических кривых, так и с учетом всего хода кривых. В первом случае использовали асимптотическое выражение функции  $F(t)$  для малых времен [10]

$$F = 6(1 + \Gamma V_{\text{сорб}}/V_{\text{раст}})(Dt/\pi R^2)^{1/2}, \quad (1)$$

где  $V_{\text{сорб}}$ ,  $V_{\text{раст}}$  – объемы сорбента и внешнего раствора,  $D$  – коэффициент диффузии, а во втором случае – выражение для среднего времени сорбции  $\bar{t}$  [10]

$$\bar{t} = R^2/15D(1 + \Gamma V_{\text{сорб}}/V_{\text{раст}}), \quad (2)$$

при этом численное значение  $\bar{t}$  определяли по площади под кривой  $t = f(F)$

$$\bar{t} \equiv \int_0^1 t dF. \quad (3)$$

Формулы (1), (2) адекватны экспериментам, в которых концентрация вещества во внешнем рас-

творе химического реактора соответствует линейному участку изотермы сорбции. В связи с этим, как следует из рис. 1, формулы (1), (2) оправдано было использовать лишь для концентраций, не превышающих 0.25 мг/мл (при сорбции на катионитах “Биохром”) и 0.6 мг/мл (при сорбции на КУ-23). При сорбции же белка из растворов с концентрацией ~0.5 мг/мл расчет коэффициентов диффузии инсулина в ионитах “Биохром” осуществляли по формулам, отвечающим прямоугольному участку изотерм сорбции [10]:

$$F = 6(Dt/\pi R^2)^{1/2}, \quad (4)$$

$$\bar{t} = R^2/15D. \quad (5)$$

При этом величину  $\bar{t}$  находили прежним способом по соотношению (3).

При анализе данных табл. 2 можно подчеркнуть несколько основных моментов. Имеет место падение величины коэффициентов диффузии инсулина в фазе ионитов “Биохром” с уменьшением концентрации белка в исходном растворе, что свидетельствует о неравноценности механизмов диффузии белка: при малых концентрациях инсулина (линейная изотерма) диффундируют преимущественно молекулы, взаимодействующие с матрицей и потому диффузия их замедлена, а при больших концентрациях (прямоугольная изотерма) – преимущественно те молекулы инсулина, которые свободно двигаются в порах. В пределах одной концентрации инсулина (отвечающей прямоугольной изотерме) наблюдается хорошая сходимость расчетных данных для величин  $D$  в фазе ионитов “Биохром”, вычисленных двумя способами (т.е. по формулам (4) и (5), табл. 2), что свидетельствует об одном механизме диффузии белка в течение всего процесса сорбции. Несовпадение расчетов для  $D$  по формулам (1) и (2) (отличие почти в три раза) для фазы катионита КУ-23 свидетельствует о наличии разных механизмов диффузии белка в этом катионите (медленном механизме в начальные моменты времени и более быстром – на поздних стадиях), что согласуется с данными [4] о двух механизмах кинетики, обусловленных бипористостью катионита КУ-23.

Таблица 2. Численные значения коэффициентов внутренней диффузии и средних времен сорбции инсулина на катионитах 1 - 5 (см. табл. 1)

№	R, мкм	$D \times 10^{10}$ , см <sup>2</sup> /с		$\bar{t}$ , мин			
		$c = 0.25$ мг/мл	$c = 0.5$ мг/мл	$c = 0.25$ мг/мл	$c = 0.5$ мг/мл		
1	30 ± 10	0.52(1)	0.39(2)	2.0(4)	2.0(5)	40	50
2	33 ± 8	–	–	2.0(4)	2.1(5)	–	56
3	33 ± 8	–	–	3.1(4)	3.4(5)	–	35
4	25 ± 5	0.7(1)	–	2.6(4)	2.4(5)	16	29
5	85 ± 5	–	–	1.1(1)	3.0(2)	–	118

Примечание. В скобках приведены номера формул, используемых для расчета коэффициентов диффузии.

Параметры  $D$ , а также  $\bar{t}$  для Сульфо- и Фосфо-Биохромов близки по величине, но несколько уступают тем же параметрам катионитов Карбокси-Биохром К1 и К2, что согласуется с данными по величинам коэффициентов равновесного распределения между фазами.

Суммируя все данные по равновесию и кинетике сорбции инсулина, полученные в статических условиях, можно сделать вывод, что сорбционные характеристики Фосфо- и Сульфо-Биохромов по отношению к инсулину близки и превосходят сорбционные характеристики как Карбокси-Биохром, так и КУ-23. Последний катионит существенно уступает катионитам “Биохром” по емкостным характеристикам и в меньшей степени – по кинетическим. Однако следует предположить, что при малых концентрациях инсулина (в технологии выделения инсулина сорбционными методами используются растворы инсулина с концентрацией менее 0.1 г/л) превосходство катионитов “Биохром” в отношении их кинетических характеристик по инсулину может также усилиться (об этом можно судить по данным табл. 2).

Опыты по динамике сорбции инсулина проводили на наиболее перспективном с практической точки зрения катионите Сульфо-Биохром К. В опытах варьировали радиус зерна ( $R$ ), линейную скорость движения подвижной фазы ( $u$ ), высоту слоя ионита ( $h$ ). По фронтальным выходным кривым рассчитывали степень сорбции инсулина катионитом

$$\theta \equiv (Q_c / Q_n) \times 100\%, \quad (6)$$

где  $Q_c$  и  $Q_n$  – количества сорбированного и пропущенного белка. Сами же условия процесса динамики сорбции характеризовали с помощью безразмерной координаты  $\lambda$  [10 - 12]

$$\lambda \equiv 3(1 - \alpha)\Gamma D h / \alpha u R^2, \quad (7)$$

величина которой изменяется при варьировании параметров  $u$ ,  $R$ ,  $h$  (значения  $\Gamma$  и  $D$  взяты из данных по равновесию – рис. 1 и по кинетике – табл. 2;  $\alpha \approx 0.4$  – порозность). Влияние различных вариаций параметров  $u$ ,  $R$ ,  $h$  на степень сорбции инсулина отражено на универсальной зависимости  $\theta = f(\lambda)$  (рис. 3). Экспериментальная зависимость на рис. 3 согласуется с теоретической зависимостью в подобных координатах, когда реализуется внутридиффузионный механизм межфазного массообмена [10].

Внутридиффузионный механизм кинетики сорбции в рассматриваемой системе доказан. Следовательно, малая степень сорбции инсулина при  $\lambda < 8$  обусловлена, прежде всего, неравновесностью процесса межфазного массообмена. Известно, что по отклонению от равновесия межфазного массораспределения в колонке можно говорить о существовании неравновесного ( $\lambda \leq 0.22$ ), переходного ( $0.22 < \lambda < 8$ ) и квазиравновесного ( $\lambda \geq 8$ ) режимов динамики сорбции [11, 12]. Таким образом, из рис. 3 по существу следует, что при опре-

деленных параметрах процесса фронтальный процесс сорбции инсулина может быть реализован как в квазиравновесном режиме – рациональном для технологии, так и в неравновесном, который в данном случае не рационален для процесса выделения инсулина.

В рассматриваемой системе условие реализации квазиравновесного режима будет иметь место при выполнении условия

$$h / u R^2 \geq 6.7 \times 10^3 \text{ ч/см}^2 \quad (8)$$

(предполагается, что концентрация белка отвечает линейному участку изотермы сорбции). Критериальное соотношение (8) имеет решающее значение для рекомендаций при переходе от лабораторного к масштабированному процессу динамики сорбции инсулина, реализуемому в промышленной технологии. Так, при  $u = 50$  мл/(ч см<sup>2</sup>),  $R = 300$  мкм,  $S = 100$  см<sup>2</sup> квазиравновесный режим сорбции будет иметь место при объеме сорбента ( $V_c$ ) в колонке, равном или более 18 л, и скорости процесса  $\sim 2$  л/ч. При уменьшении же радиуса зерен до 150 мкм (с сохранением других параметров) критический объем сорбента составит уже 4.5 л и т.д.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Донецкий И.А., Гуляев В.А., Агафонова О.Д. и др. Материалы 4-ой Всесоюз. научно-техн. конференции “Актуальные проблемы улучшения качества кровезаменителей, консервантов крови, гормональных и органотерапевтических препаратов”. Москва, 24 - 25 сент. 1991 г. М., 1991. С. 162.
2. Шатаева Л.К., Широхова Т.О., Самсонов Г.В. // Коллоид. журн. 1975. Т. 38. № 3. С. 530.
3. Островский Д.И., Дмитренко Л.В., Самсонов Г.В. и др. // Хим. фармацевт. журн. 1976. Т. 10. № 7. С. 96.
4. Островский Д.И. // Исследование взаимодействия инсулина и некоторых других белков с макропористыми полиэлектролитами: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Л.: Ин-т высокомолекуляр. соединений АН СССР, 1974. 49 с.
5. Громова О.А., Гаврюченкова Л.П., Хрущева Т.А. и др. // Тез. докл. конф. “Молекулярная сорбция биологически-активных веществ”. Пенза, 10 - 11 сент., 1990.
6. Каталог ВНИИ Особо чистых биопрепаратов. Универсальные промышленные биосовместимые сорбенты для биотехнологии. С.-Пб., 1992.
7. Гаврюченкова Л.П., Морозов С.Н., Болдырев А.Г. и др. Способ получения полимерных гидрофильных сорбентов для хроматографии: А. с. 1398902 СССР // Б. И. 1988. № 20.
8. Черкасов А.Н., Пасечник В.А. // Мембраны и сорбенты в биотехнологии. Л.: Химия, 1991. С. 145.
9. Берёзов Т.Т., Коровкин Б.Ф. // Биологическая химия. М.: Медицина, 1990. С. 48, 186.
10. Шатаева Л.К., Кузнецова Н.Н., Елькин Г.Э. // Карбоксильные катиониты в биологии. Л.: Наука, 1979. С. 130, 225, 229.
11. Лебедев Ю.Я. // Журн. физ. химии. 1990. Т. 64. № 3. С. 755.
12. Лебедев Ю.Я. // Там же. 1993. Т. 67. № 9. С. 1915.

**МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

УДК 541.183

**МОДИФИКАЦИЯ СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТИ  
МАКРОПОРИСТЫХ СОПОЛИМЕРОВ ПУТЕМ АДсорбЦИИ  
ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

© 1994 г. Г. Э. Елькин, Н. В. Глазова, Л. В. Курдюк

*Химико-фармацевтический институт, Санкт-Петербург*

Исследована сорбция фенола и ряда ароматических карбоновых кислот (фенилуксусной, феноксиуксусной, феноксипропионовой) на макропористом сополимере стирола и дивинилбензола (ПС 1/85) в статических условиях. Сопоставлены равновесные параметры сорбции указанных веществ на исходном ПС 1/85 и модифицированном катамином. Показано, что при сорбции в системе сорбент-поверхностно-активное вещество достигается существенное расхождение между коэффициентами распределения исследуемых веществ, в то время как в системе, не содержащей катамин, коэффициенты распределения различаются незначительно. Полученные результаты могут быть использованы для разработки сорбционных и хроматографических методов разделения этих и подобных им веществ.

Известно, что при сорбции поверхностно-активных веществ (ПАВ) поверхность молекулярных сорбентов приобретает новые адсорбционные свойства. Так, обработанный катамином (алкилдиметилбензиламоний хлорид  $C_nH_{2n+1}(CH_3)_2(C_6H_5CH_2)NCl$ ,  $n = 9 - 14$ ) макропористый сополимер, оставаясь способным к молекулярной сорбции, приобретает анионообменные свойства за счет сильно основных групп катамина [1]. Такое сочетание свойств молекулярного и ионообменного сорбента иногда оказывается полезным для изменения селективности сорбции по отношению к веществам, сходным по химической структуре, трудноразделяемым при сорбции на немодифицированных сорбентах.

Цель данной работы – изучение сорбции фенола (Ф) и ряда ароматических карбоновых кислот: фенилуксусной (ФУК), феноксиуксусной (ФОУК) и феноксипропионовой (ФОПК) на сорбенте ПС 1/85 (макропористом сополимере стирола и дивинилбензола), предварительное обработанном катамином, и сопоставление равновесных параметров сорбции указанных веществ на модифицированном сорбенте с параметрами их сорбции на исходной матрице сополимера.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

В работе использовали водные растворы Ф, ФУК, ФОУК, ФОПК (рН 7), исходные концентрации которых варьировали в диапазоне 0.1 - 10 г/л, сорбент ПС 1/85.

Сорбцию проводили при 297 К и соотношении сорбент : раствор 1 : 50 в течение 4 ч. Достижение равновесия за указанное время проверяли методом концентрационного сдвига [2]. Концентрации

исследуемых веществ определяли спектрофотометрически при  $\lambda = 270$  нм.

С целью модификации поверхности сополимер предварительно обрабатывали 2%-ным раствором катамина. Для определения исходной концентрации модификатора предварительно исследовали сорбцию-десорбцию катамина, его максимальное остаточное количество составляло 0.3 - 0.4 ммоль/г, что соответствует  $c_{исх} = 0.44$  ммоль/г (2%).

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Были изучены зависимости концентраций Ф, ФУК, ФОУК и ФОПК в фазе сорбента от их концентраций в растворе в состоянии равновесия.

Равновесные параметры сорбции на немодифицированном и модифицированном сорбенте

Вещество	$K$ , л/моль	$a_m$ , ммоль/г	$K_d$	$r$
немодифицированный				
Ф	130	1.0	130	0.96
ФУК	–	–	–	–
ФОУК	15	0.4	6	0.99
ФОПК	16	0.5	8	0.92
модифицированный				
Ф	–	–	–	–
ФУК	68	0.6	38	0.99
ФОУК	145	1.2	174	0.92
ФОПК	90	0.8	72	0.92

Примечание. Изотерма сорбции фенола на немодифицированном сорбенте описывается уравнением Ленгмюра, в остальных случаях – уравнением БЭТ.



Анализируя полученные изотермы сорбции (рис. 1, 2), следует отметить, что при переходе от фенола к карбоновым кислотам изменяется тип кривых: от выпуклой Ленгмюровской изотермы к изотермам с перегибом. Результаты обработки экспериментальных данных по методу наименьших квадратов (таблица) дают основание утверждать, что в пределах ошибки опыта полученные экспериментальные зависимости удовлетворяют уравнениям Ленгмюра (1) и БЭТ (2). Это подтверждается близкими к единице коэффициентами линейной корреляции ( $r$ ) между переменными указанных уравнений, преобразованных к линейной форме, а именно между обратными значениями концентраций адсорбата и адсорбтива для (1):

$$1/a = 1/a_m + (1/(a_m K)) \times 1/c \quad (1)$$

и между соответствующими координатами (2):

$$N/(a(1-N)) = 1/(a_m K) + [(K-1)/(a_m K)]N, \quad (2)$$

где  $a$  – равновесная концентрация адсорбата,  $c$ ,  $N$  – равновесная концентрация адсорбтива,  $a_m$  – предельная емкость сорбции,  $K$  – константа адсорбционного равновесия.

По этим уравнениям были рассчитаны  $K$  и  $a_m$  для данных систем. Результаты расчета (таблица) показали, что модифицирование поверхности данного сорбента катамином приводит к существенному увеличению  $a_m$  и  $K$  при сорбции исследуемых карбоновых кислот и, напротив, к их резкому снижению при сорбции фенола, а также к появлению заметного различия между значениями коэффициентов распределения ( $K_d = Ka_m$ ) перечисленных веществ.

Возрастание значений  $K$  (для ФОУК в 9, для ФОПК в 5 раз) при сорбции на сополимере, обработанном катамином, может быть объяснено большей энергией взаимодействия этих веществ с модифицированной поверхностью, чем с матрицей исходного ПС 1/85, обусловленной возникновением кулоновских взаимодействий анионов ФУК, ФОУК и ФОПК с положительно заряженными группировками катамина, обращенными вследствие гидрофильности в сторону раствора. Что касается резкого ухудшения сорбции фенола, оно происходит, скорее всего, по причине экранизации гидрофобными концами молекул катамина сопряженной системы  $\pi$ -связей углеводородного скелета сорбента. Это, вероятно, снижает энергию дисперсионного взаимодействия молекул фенола с модифицированным ПС 1/85 [3] (для фенола  $pK = 9.95$ , значение pH растворов 7), а так как  $pH < pK$ , то ион-ионное взаимодействие отсутствует.

Отмеченное заметное различие между значениями  $K_d$  карбоновых кислот в присутствии ката-

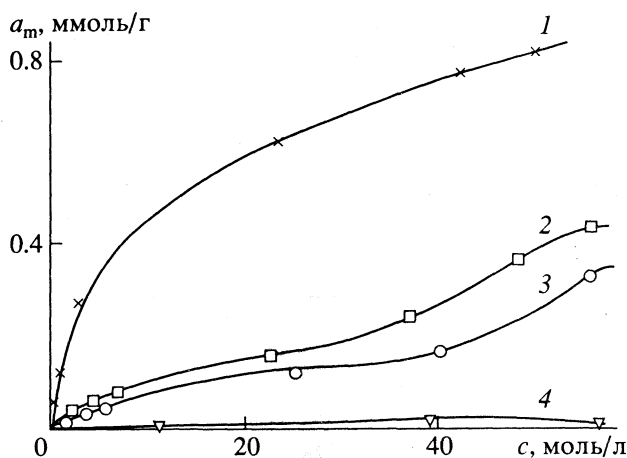


Рис. 1. Изотермы сорбции исследуемых веществ на немодифицированном сорбенте: 1 – Ф, 2 – ФОУК, 3 – ФОПК, 4 – ФУК.

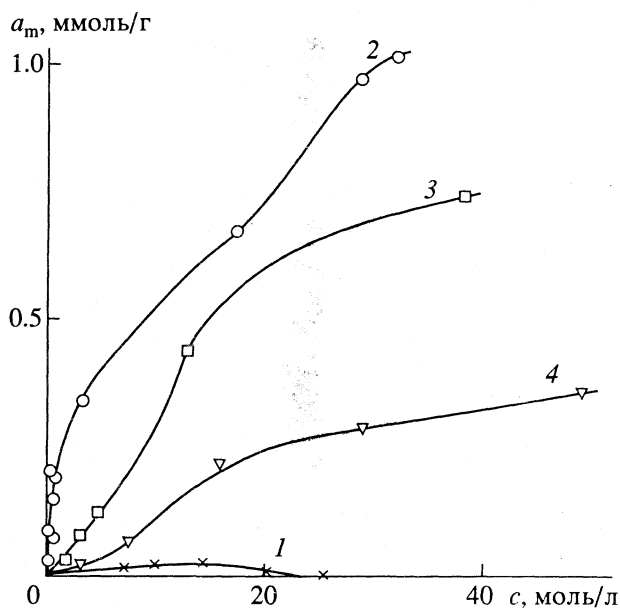


Рис. 2. Изотермы сорбции исследуемых веществ на модифицированном сорбенте: 1 – 4 – см. рис. 1.

мина может быть использовано для разработки сорбционных и хроматографических методов разделения этих и подобных им веществ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яскович Г.А., Елькин Г.Э. // Журн. прикл. химии. 1985. Т. 58. № 5. С. 1175.
2. Яскович Г.А., Елькин Г.Э., Момот Н.Н., Самсонов Г.В. // Хим.-фарм. журн. 1981. № 1. С. 86.
3. Волькенштейн М.В. Молекулярная биофизика. М.: Наука, 1975. С. 189 - 204.

**МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

УДК 541.64:543.544

**ХРОМАТОГРАФИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ОЛИГОБУТАДИЕНОВ  
В КРИТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ НА СИЛИКАГЕЛЕ**

© 1994 г. Я. И. Эстрин, Л. Т. Касумова

Российская академия наук, Институт химической физики, Черноголовка

Рассмотрены два варианта анализа по типу функциональности олигодиенов с концевыми ОН-группами методом хроматографии в критических условиях, позволяющие уменьшить различие энергий адсорбции концевых групп и основной цепи и довести константы удерживания функциональных макромолекул до приемлемых величин: 1) модификация сорбента солью серебра, селективно взаимодействующей с двойными связями цепи, 2) использование необычного поведения диоксана в качестве сильного компонента элюирующей смеси и нативного силикагеля в качестве сорбента. Установлено, что наиболее эффективен второй вариант, обеспечивающий разрешение всех основных фракций; в обоих вариантах модификация ОН-групп путем перевода их в хромофорные нафтилуретановые группы позволяет не только существенно улучшить разделение фракций различной функциональности и топологии, но и определить их эквивалентные молекулярные массы методом двухволнового детектирования из соотношения оптических плотностей в максимумах поглощения концевых групп и основной цепи.

Распределение по типам функциональности (РГФ) – одна из основных характеристик олигомеров с реакционноспособными группами, знание которой необходимо как для оценки качества продуктов, так и для изучения механизмов их синтеза. Наиболее надежным и эффективным способом анализа РГФ является жидкостная хроматография в критических условиях, когда параметры удерживания макромолекул практически не зависят от их длины и определяются числом и природой функциональных групп, а также топологией основной цепи [1]. При этом константа удерживания бесфункциональных молекул  $K_d^{(0)} = 1$ . В настоящее время для многих типов реакционноспособных олигомеров найдены критические условия элюирования, позволяющие подробно изучить их структурные характеристики [2 - 4]. Однако в случае олигодиенов с гидроксильными концевыми группами (ГОД) вследствие большого различия в адсорбционной способности слабополярной углеводородной цепи и полярных ОН-групп, способных к образованию водородных связей, константы удерживания функциональных макромолекул в критических условиях оказываются, как правило, слишком велики. Как показано в работах [1, 5], при использовании силикагеля в качестве сорбента и смесей нормальных углеводородов с метилэтилкетонем (МЭК) или тетрагидрофураном (ТГФ) в качестве элюента значения констант удерживания монофункциональных ГОД в критических условиях должны составлять в зависимости от размера пор сорбента  $K_d^{(1)} = 10^1 - 10^2$ , для бифунк-

циональных  $K_d^{(2)} = 10^2 - 10^4$  в соответствии с уравнениями:

$$K_d^{(1)} = 1 + \frac{2a}{D} (\exp(\varphi_f - \varphi_{кр}) - 1), \quad (1)$$

$$K_d^{(2)} = [K_d^{(1)}]^2, \quad K_d^{(3)} = [K_d^{(1)}]^3. \quad (2)$$

Здесь  $a$  – размер сегмента цепи,  $D$  – диаметр поры сорбента,  $\varphi_f$  – эффективная энергия взаимодействия концевой группы с поверхностью сорбента,  $\varphi_{кр}$  – то же для сегмента цепи. Эти уравнения справедливы для относительно узких пор ( $R \geq D$ ,  $R$  – радиус клубка макромолекулы в растворе). Для широких пор ( $R < D$ ) выражения усложняются, и появляется зависимость  $K_d^{(2)}$  и  $K_d^{(3)}$  от длины цепи полифункциональных макромолекул.

Поскольку регистрация пиков в изократической жидкостной хроматографии реальна лишь при  $K_d \leq 20$  (редко 40 - 50), очевидно, что при  $K_d^{(1)} \geq 3$  возможность элюирования полифункциональных макромолекул становится проблематичной. Как видно из уравнений (1), (2), в наибольшей степени на величину  $K_d$  влияет разность  $(\varphi_f - \varphi_{кр})$ . Уменьшение  $\varphi_f$  и увеличение  $\varphi_{кр}$  возможны, как показано в [5], за счет модификации сорбента (заменой силанольных групп на аминопропильные) и модификации функциональных групп олигомера, в частности, путем превращения ОН-групп в нафтилуретановые (НУ). В комбинации с использованием широкопористого сорбента (Lichrospher-NH<sub>2</sub>, 500 Å), варьированием температуры колонки и способности компонента элюирующей смеси (ТГФ) к специфическим взаимодействиям

(образование водородных связей) удалось подобрать условия, близкие к критическим, и разделить бес-, моно- и бифункциональные макромолекулы ГОД. При этом некоторые образцы в НУ-форме обнаружили наличие дополнительных пиков на спаде основных моно- и бифункциональных. Природа "побочных" пиков была неясна, а разрешение с основными далеко недостаточное.

Цель данной работы заключалась в том, чтобы найти систему, позволяющую более полно реализовать критические условия для ГОД и добиться улучшения разрешения пиков различной природы. Кроме того, одной из проблем анализа РТФ реакционноспособных олигомеров в критических условиях является установление молекулярной массы (ММ) каждой фракции, что необходимо для определения мольных долей макромолекул каждого типа и вычисления среднечисловой функциональности ( $f_n$ ). В то же время в критических условиях величину ММ нельзя найти из положения пиков на хроматограмме по определению. В данной работе описан один из вариантов решения этой проблемы.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работу проводили на микроколоночном хроматографе "Милихром", соединенном с ПКВЭМ "Искра 226" [6]. Для подбора критических условий использовали бес- и монофункциональные олигомеры с  $\bar{M}_n$  от 2000 до 72000 ( $\bar{M}_w/\bar{M}_n < 1.1$ ) анионной полимеризации.

Образец ГОД, содержащий би- и трифункциональную фракции, имел  $\bar{M}_n = 5600$ ,  $\bar{M}_w/\bar{M}_n = 1.15$ ; концентрация ОН-групп 0.51%. Уретанирование ГОД проводили в гептане при двукратном избытке  $\alpha$ -нафтилизотицианата в присутствии ацетилацетоната железа при 40 - 50°C в течение 4 ч. Гептан очищали по методике, изложенной в [7]. Диоксан после очистки по методу, предложенному в [7], подвергали тщательной ректификации на колонке с высотой насадки 1 м.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Использование УФ-детектора для регистрации хроматограмм в случае ГОД предъявляет жесткие требования к элюенту с точки зрения прозрачности в области поглощения ниже 220 нм, поскольку для основной цепи ГОД значение  $\lambda_{\max} \sim 200$  нм, а при 220 нм поглощение практически отсутствует. Оказалось, что из многих растворителей, которые могут быть использованы в качестве сильного компонента элюирующей смеси, наиболее подходящим является диоксан, который можно очистить до вполне удовлетворительной прозрачности при 210 нм. В смесях с гептаном, которые использовались в работе, диоксан позволяет работать и при 200 нм. Исходя из того, что

один из способов уменьшения констант удерживания в критических условиях состоит в увеличении энергии сорбции основной цепи, мы попытались добиться этого приемом, аналогичным используемому в ГЖХ для повышения сорбируемости олефинов: введением в неподвижную фазу солей серебра, способных к образованию  $\pi$ -комплексов. После введения на поверхность Lichrospher-NH<sub>2</sub>, 500 Å хлорида серебра оказалось, что варьированием концентрации диоксана легко подобрать критические условия, позволяющие разделять компоненты, особенно в НУ-форме, существенно лучше, чем в [5], особенно при повышенной температуре (50°C), при этом критическая концентрация диоксана составила  $\sim 5.5\%$ .

Для определения эквивалентных ММ ( $M_z$ ) фракций, содержащих функциональные группы, можно использовать принцип двухволновой регистрации, особенно в тех случаях, когда упомянутые группы хромофорны и обладают высоким коэффициентом экстинкции в той области спектра, где основная цепь макромолекул практически не поглощает. Указанным условиям вполне отвечают НУ-группы ( $\lambda_{\max} = 220$  нм,  $\epsilon_{\max} \sim 4 \times 10^4$ ). Поскольку хроматограф "Милихром" позволяет проводить одновременную регистрацию хроматограмм на двух (или более) длинах волн, такое соотношение можно считать идеальным для определения  $M_z$  фракций из отношения интегральных оптических плотностей соответствующих пиков. При этом важно, что взаимодействие ГОД с  $\alpha$ -нафтилизотицианатом может быть проведено количественно и без побочных реакций. Из хроматограмм стандартных ГОД в НУ-форме, полученных в двухволновом режиме, найдены линейные калибровочные зависимости между  $M_z$  и отношениями интегральных оптических плотностей пиков (в интервале ММ от 2000 до 25000):

$$M_z = A + B (S_{\lambda_1}/S_{\lambda_2}). \quad (3)$$

Здесь  $A = -2134$ ,  $B = 3736$  при  $\lambda_1 = 200$  нм;  $A = -678$ ,  $B = 710$  при  $\lambda_1 = 210$  нм;  $\lambda_2 = 220$  нм.

На рис. 1 показаны хроматограммы образца ГОД в ОН- и НУ-формах, полученные в описанных условиях. Они качественно совпадают с хроматограммами, приведенными в [5], т.е. в ОН-форме наблюдаются только три пика, в то время как в НУ-форме хроматограмма содержит дополнительные пики 3 и 5 на спаде основных пиков 2 и 4 (моно- и бифункциональная фракции).

Мы пришли к выводу, что дополнительные пики следует идентифицировать как разветвленные би- и трифункциональные фракции. Доказательство этого предположения было получено путем микропрепаративного выделения указанных фракций в НУ-форме и независимого измерения их  $\bar{M}_n$  в сопоставлении с  $M_z$ . Значительно меньшие значения объемов удерживания данных

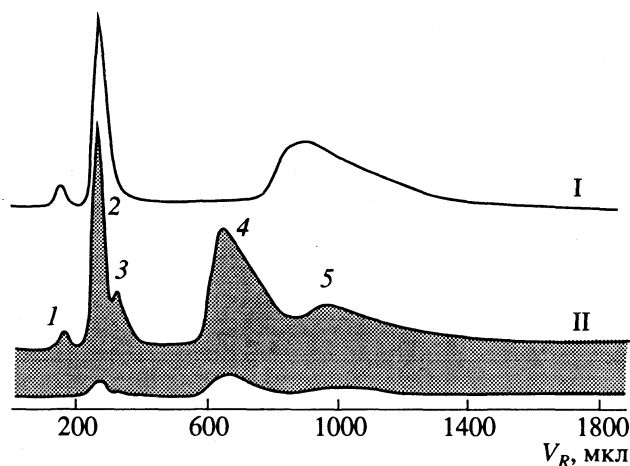


Рис. 1. Хроматограммы ГОД: ОН- (I, 200 нм) и НУ-форма (II, верхний контур 200 нм, нижний – 220 нм); сорбент Lichrospher-NH<sub>2</sub>, 500 Å + AgCl, элюент диоксан/гептан (5.5/94.5), 50°C, 100 мкл/мин.

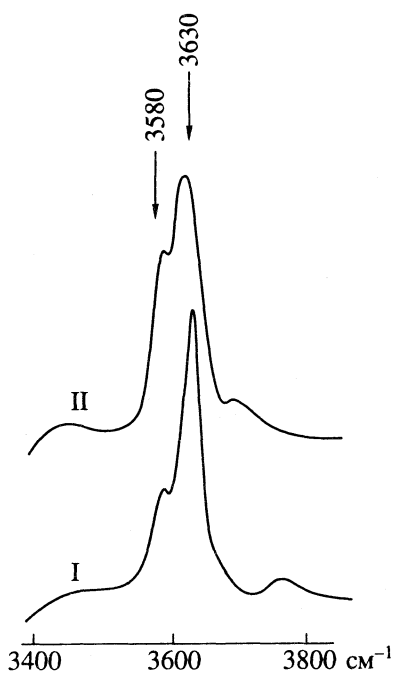


Рис. 2. ИК-спектры ГОД в CCl<sub>4</sub>, I – нефракционированный образец, II – трифункциональная фракция; 3580 см<sup>-1</sup> – поглощение ОН-π, 3630 см<sup>-1</sup> – свободных ОН-групп.

фракций по сравнению с ожидаемыми в соответствии с уравнениями (2), объясняются, очевидно, тем обстоятельством, что значения  $K_d$  для разветвленных макромолекул должны быть существенно меньше, чем для линейных той же функциональности. Отсутствие разделения тех же фракций в ОН-форме мы склонны объяснять тем, что ОН-группы способны образовывать внутримолекулярные водородные связи с двойными связями основной цепи [8]. При этом, как выяснилось, в по-

лифункциональных разветвленных фракциях доля ОН-групп, связанных с π-электронами С=С-связей, значительно выше, чем в линейных макромолекулах (рис. 2), что неизбежно должно дополнительно снижать адсорбционную способность функциональных разветвленных молекул в ОН-форме и ухудшать разрешение с предшествующим пиком. В то же время НУ-группы не способны к такого рода внутримолекулярным взаимодействиям, вследствие чего реализуется частичное разделение.

Изложенная здесь методика анализа РТФ позволила провести исследование ГОД, полученных под действием дилитиевых инициаторов на основе 2,4-гексадиена, и установить, что данные олигомеры содержат наряду с бифункциональными макромолекулами (~60%) как моно-, так и трифункциональные [9]. Выяснилось также, что, несмотря на довольно узкое суммарное молекулярно-массовое распределение (ММР) этих олигомеров ( $\bar{M}_w/\bar{M}_n < 1.1$ ), оно полимодально, так как каждая фракция существенно отличается от остальных по величине ММ.

Анализ теоретических зависимостей  $K_d$  в критических условиях показывает, что возможен еще один способ уменьшения величины  $(\varphi_f - \varphi_{кр})$ . Действительно;

$$\varphi_f - \varphi_{кр} = 2.3\alpha [(X_{of} - X_{op}) - (A_{xf} - A_{xp}) \epsilon_0^{кр}]. \quad (4)$$

Здесь  $\alpha$  – активность сорбента,  $X_{of}$  и  $X_{op}$  – энергии адсорбции,  $A_{xf}$  и  $A_{xp}$  – молекулярные площадки функциональной группы и сегмента цепи соответственно.

Хотя строгое следование корреляционной теории Снайдера приводит к выводу о том, что для данной пары сорбент–полимер величина  $\epsilon_0^{кр}$  не должна зависеть от природы элюента, в действительности разные пары растворителей дают разные значения  $\epsilon_0^{кр}$  [1]. Так, если для систем гексан–МЭК или гексан–ТГФ для полибутадиена на силикагеле величины  $\epsilon_0^{кр} \sim 0.1$ , то для смеси гексан–метилхлорид – 0.26, а для CCl<sub>4</sub>–CHCl<sub>3</sub> достигает 0.38. Если учесть, что для ГОД разность  $(A_{xf} - A_{xp}) > 0$ , увеличение  $\epsilon_0^{кр}$  должно привести к уменьшению  $(\varphi_f - \varphi_{кр})$  и соответственно констант удерживания в критических условиях.

Мы обратили внимание на то, что на модифицированных силикагелях концентрация диоксана в смеси с углеводородом, необходимая для создания критических условий, всегда выше, чем концентрация ТГФ или МЭК, хотя в соответствии с элюотропным рядом он является более сильным элюентом. Как удалось установить, данное соотношение выполняется и на нативном силикагеле, при этом критическая концентрация диоксана в гептане для бесфункциональных олигобутадиенов

составила ~5% (силикагель типа Lichrospher Si, 100 Å) при 25°C, в то время как для МЭК критическая концентрация составляет ~0.5%, для ТГФ – ~0.9% [1]. Для монофункциональных ГОД величина  $K_d^{(1)}$  ~ 8. Это значение, конечно, слишком велико для анализа ГОД, содержащих полифункциональные фракции, однако очевидно, что необходимый результат может быть легко получен за счет увеличения пор сорбента. Действительно, на силикагеле Lichrospher Si, 500 Å в критические значения  $K_d^{(1)}$  составили ~3 и ~2 для ОН- и для НУ-форм ГОД соответственно.

Как уже отмечалось, одним из важных параметров при оптимизации хроматографического процесса является температура. В таблице приведены критические параметры для системы (Lichrospher Si, 500 Å–диоксан/гептан–ГОД). Видно, что критические параметры не слишком сильно зависят от температуры, тем не менее, влияние ее на степень разделения довольно существенно. На рис. 3 приведены хроматограммы того же образца ГОД, что и на рис. 1, как в ОН-, так и в НУ-форме, при разных температурах. Видно, как с повышением температуры улучшается разре-

Критические параметры функциональных олигобутидиенов при элюировании смешанным элюентом гептан/диоксан ( $c$  – концентрация диоксана), сорбент Lichrospher Si, 500 Å

$t, ^\circ\text{C}$	$c, \%$	$\epsilon_0^{\text{KP}}$	$K_d^{(1)}$		$K_d^{(2)}$		$K_d^{(3)}$	
			ОН	НУ	ОН	НУ	ОН	НУ
10	5.8	0.287	3.08	2.08	6.40	5.53	–	8.9
25	4.2	0.268	3.01	2.10	7.84	6.27	–	11.6
40	3.5	0.257	2.83	2.09	8.00	6.48	–	13.1
60	3.1	0.250	2.65	2.01	7.04	6.68	15.0	14.1

Примечание. Величины  $\epsilon_0^{\text{KP}}$  при 10, 40 и 60°C рассчитаны без учета температурной зависимости элюирующей силы компонентов.

ние всех пиков в НУ-форме, вплоть до их полного разделения при 60°C. Но самое замечательное заключается в том, что и в ОН-форме при повышенной температуре проявляется частичное разделение, которого не удавалось добиться в других системах. Кроме того, на хроматограммах заметен широкий пик малой интенсивности между

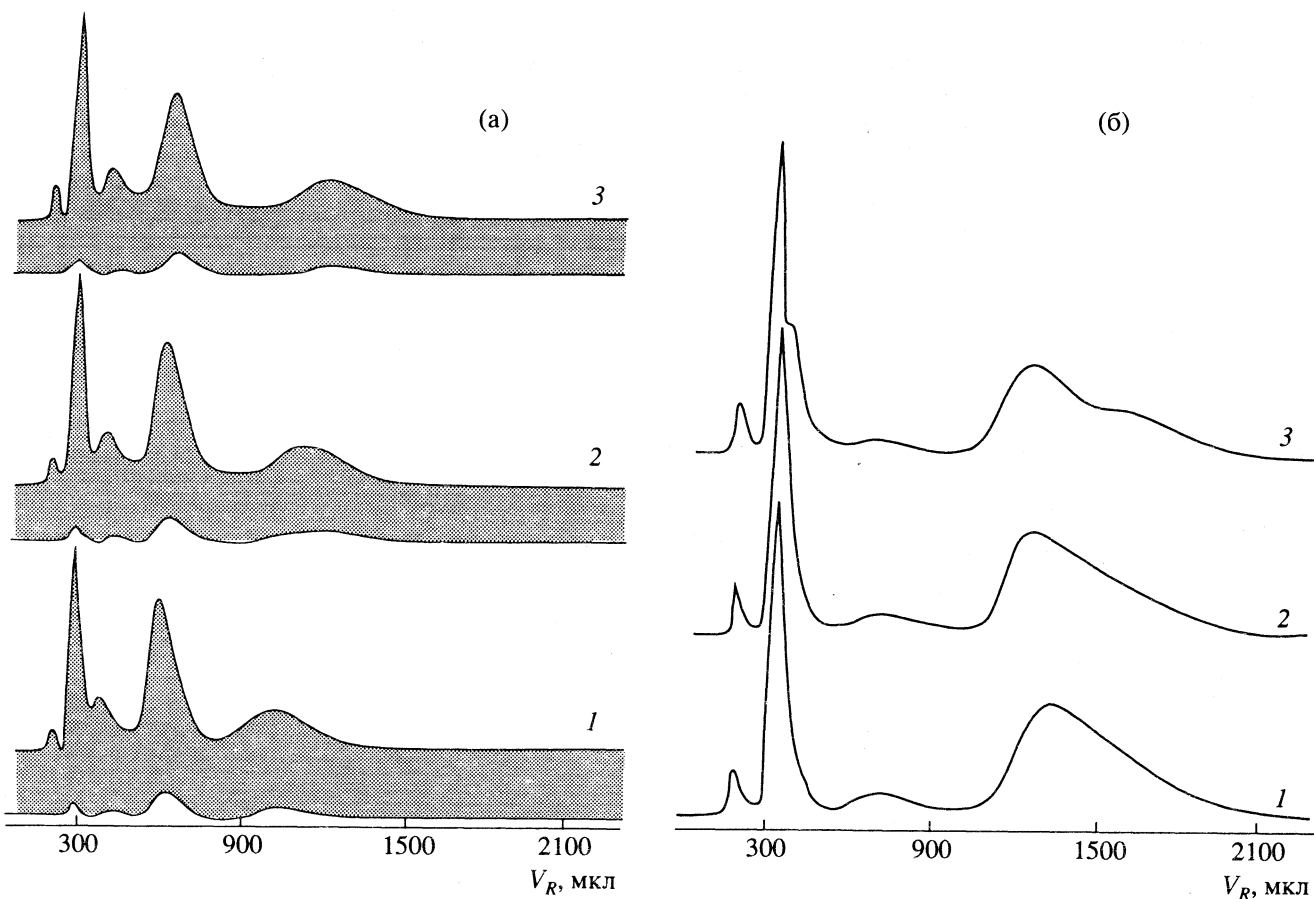


Рис. 3. Хроматограммы ГОД при 25 (1), 40 (2) и 60°C (3); сорбент Lichrospher-Si, 500 Å, диоксан/гептан (см. таблицу), 100 мкл/мин; а – НУ-форма, детектирование при 200 нм (верхний контур) и 220 нм (нижний контур); б – ОН-форма, детектирование при 200 нм.

пиками моно- и бифункциональной фракций, не обнаруженный в других хроматографических системах. Происхождение и природа этой фракции пока неясны.

Для нативного силикагеля, в отличие от модифицированных, возможно проведение расчетов с использованием табличных значений корреляционных параметров. Оказалось, что значения разности ( $\Phi_f - \Phi_{кр}$ ), найденные из величины  $K_d^{(1)}$  и вычисленные по уравнению (4) для ОН-формы ГОД с использованием табличных значений параметров  $X_0$  и  $A_x$ , практически совпадают (3.95 и 3.9 соответственно).

Таким образом, даже для такого сложного объекта, как ГОД, наиболее эффективной оказалась хроматография на нативном силикагеле. В сочетании с модификацией концевых групп хромофором эта система позволяет полностью решать проблему анализа РТФ такого рода олигомеров с высокой степенью разрешения. Важно отметить то обстоятельство, что для оптимизации хроматографического процесса существенно не только положение элюента в элюотропном ряду, но и его химическая природа и особенности строения молекул. Можно предположить, в частности, что "неправильное" поведение диоксана связано с тем, что, в отличие от многих других сильных элюентов, он содержит два сорбционно-активных цен-

тра в молекуле, с одной стороны, и имеет нулевой дипольный момент, с другой.

Авторы признательны Е.Г. Атовмян за получение спектров и обсуждение результатов, С.Д. Колесниковой – за выделение трифункциональной фракции.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Энтелис С.Г., Евреинов В.В., Кузаев А.И.* Реакционноспособные олигомеры. М.: Химия, 1985. 304 с.
2. *Филатова Н.Н., Горшков А.В., Евреинов В.В., Энтелис С.Г.* // Высокомолекуляр. соединения. 1988. Т. 30А. № 5. С. 953.
3. *Горшков А.В., Оверим Т., Ван-Альтен Х., Евреинов В.В.* // Там же. 1989. Т. 31А. № 4. С. 818.
4. *Горшков А.В., Веренич С.С., Маркевич М.А. и др.* // Там же. 1989. Т. 31А. № 9. С. 1878.
5. *Горшков А.В., Веренич С.С., Эстрин Я.И. и др.* // Там же. 1988. Т. 30А. № 5. С. 945.
6. *Эстрин Я.И., Рабец В.С., Грищук А.А.* // Тез. докл. Всесоюз. школы-семинара по автоматизации химических исследований. Тбилиси, 1988. С. 106.
7. *Вайсбергер А., Проскауэр Э., Риддик Дж., Тупс Э.* Органические растворители. М.: Изд-во иностр. лит., 1958. 520 с.
8. *Атовмян Е.Г., Лодыгина В.П., Федотова Т.Н.* // Высокомолекуляр. соединений. 1983. Т. 25А № 8. С. 1649.
9. *Эстрин Я.И., Касумова Л.Т., Кольтовер В.К.* // Там же. 1991. Т. 33А. № 11. С. 2425.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 541.64:543.544.

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ОЛИГОМЕРОВ МЕТОДОМ ЖИДКОСТНОЙ  
ХРОМАТОГРАФИИ В КРИТИЧЕСКОЙ ОБЛАСТИ

© 1994 г. С. И. Соломко, А. И. Кузаев

Российская академия наук, Институт химической физики, Черноголовка

С использованием хроматографа GPC-II фирмы "Waters" с колоннами фирмы "Элсико", заполненными силикагелем Силасорб SPH 600, разработана методика разделения олигоэпихлоргидринов по типам функциональности в режиме жидкостной хроматографии в критической области и подобраны элюирующие смеси ацетон-гептан и тетрагидрофуран-гептан. Показано, что последняя позволяет производить разделение макромолекул одной функциональности, отличающихся содержанием одного мономерного звена в цепи полимера. Изучены условия применимости жидкостной хроматографии в критической области в зависимости от молекулярной массы анализируемых олигомеров. Показано, что для низкомолекулярных олигомеров происходит расщепление на полимерные гомологи, в то время как для олигомеров с молекулярной массой выше 800 расщепление отсутствует, что обусловлено недостижимостью критических условий для низкомолекулярных олигомеров вследствие отсутствия конформационного отталкивания.

В настоящее время все чаще привлекает к себе внимание и успешно используется для определения молекулярной неоднородности полимеров и олигомеров новый метод анализа – метод жидкостной хроматографии в критической области (критических условиях) (ЖХКО). Разработке этого метода посвящено достаточно большое количество работ [1 - 8]. Отличительной чертой метода ЖХКО является практически полное отсутствие деления по молекулярным массам, что позволяет провести деление по различным типам молекулярной неоднородности: тип функциональной группы, количество функциональных групп, их расположение в цепи и т.п. Как показывает практика, этот метод является достаточно тонким инструментом исследования молекулярной структуры реакционноспособных олигомеров и позволяет провести разделение макромолекул, отличающихся друг от друга только местом расположения в цепи звена, имеющего иное химическое строение.

Для изучения возможностей метода при разделении по типу и количеству функциональных групп (гидроксильных -ОН) в качестве объектов исследования были использованы олигомеры эпихлоргидрина. Молекулярно-массовые характеристики (ММР – молекулярно-массовое распределение, РТФ – распределение по типам функциональности) олигомеров определялись методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ). Степень полимеризации олигомеров  $N = 15 - 18$ . Олигомеры такой молекулярной массы – еще достаточно жесткие цепочки и находятся в состоянии конфигурационно-поворотных изомеров. Размеры олигомеров, полученные при помощи формализма поворотного-изомерного при-

ближения [9], оцениваются как 30 - 50 Å. Синтез проводили методом катионной полимеризации. Условия синтеза описаны в [10]. При синтезе в отсутствие гидроксилсодержащего вещества (ГСВ) в реакторе в виде примеси присутствовало некоторое количество воды, которая способствовала образованию монофункциональных (мономеров –  $\text{CH}(\text{CH}_2\text{Cl})=\text{CH}-\text{O}-(\text{CH}(\text{CH}_2\text{Cl})\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}(\text{CH}_2\text{Cl})\text{CH}_2-\text{OH}$ ) и бифункциональных олигомеров (диолов –  $\text{HO}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{Cl})-(\text{CH}(\text{CH}_2\text{Cl})\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}(\text{CH}_2\text{Cl})\text{CH}_2-\text{OH}$ ) наряду с бесфункциональными (линейными –  $\text{F}-(\text{CH}(\text{CH}_2\text{Cl})\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}(\text{CH}_2\text{Cl})\text{CH}_2-\text{OBF}_2$  и циклическими –  $\left(\text{CH}(\text{CH}_2\text{Cl})\text{CH}_2\text{O}\right)_n$ ) [11] молекулами.

Методика опыта разработана с использованием хроматографической системы GPC-II фирмы "Waters". Режим критической области достигался путем изменения полярности элюента. В качестве элюента использовались смеси тетрагидрофуран(ТГФ)-гептан в соотношении 45 : 55

Таблица 1. Зависимость ММР и РТФ ( $[\text{ЭГ}] = 0$ ,  $[\text{ЭГХ}] = 6.3 \text{ M}$ ,  $[\text{Kt}] = 0.1 \text{ M}$  (Kt – катализатор)) от способа загрузки мономера (I – единовременная, II – непрерывный ввод мономера)

ММР			РТФ			Способ
$\bar{M}_n$	$\bar{M}_w$	$\bar{M}_w/\bar{M}_n$	$f = 0 (0^*)$	$f = 1$	$f = 2$	
610	910	1.49	59.6 (34.9)	26.3	14.1	I
1400	1770	1.26	8.8 (3.5)	35.3	55.9	II

0\* – Циклический тетрамер.

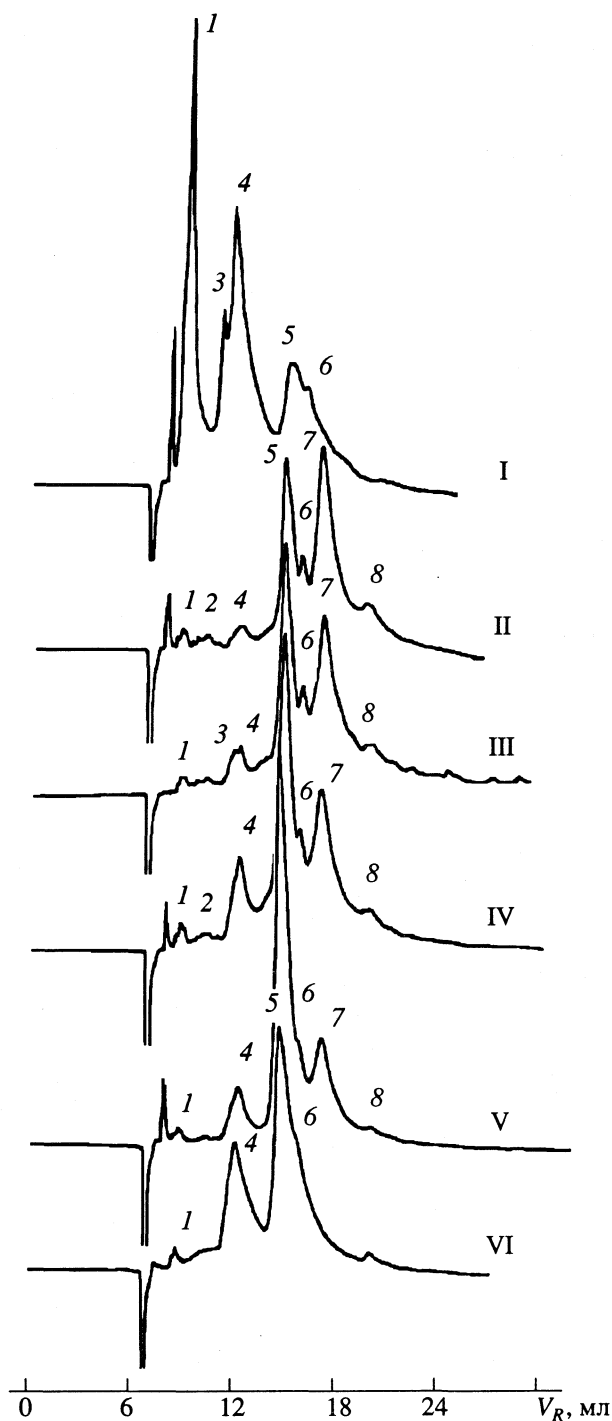


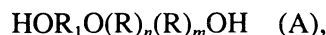
Рис. 1. РТФ-хроматограммы олигоэпихлоргидринов, полученных с ЭГ (II), водой (VI), смесью вода + ЭГ (III, IV, V) и без добавок ЭГ и воды (I). Зона выхода: 1, 2 – бесфункциональные и циклические, 3, 4 – монофункциональные, 5, 6 – бифункциональные, 7 – бифункциональные с ЭГ на конце, 8 – бифункциональные молекулы с ЭГ в цепи.

и ацетон–гептан в соотношении 42 : 58 объемных единиц. Соотношение в смеси подбиралось эмпирически от более полярной смеси (из области ГПХ) к менее полярной (в область адсорбционной хроматографии) по максимальному разделе-

нию пиков и минимальному их уширению. В качестве твердой фазы использовался силикагель. Три колонки фирмы “Элсико” (250 × 4 мм) были упакованы силикагелем Силасорб SPH 600 со средним диаметром пор 60 Å. При детектировании был использован дифференциальный рефрактометр R 401.

Анализ методом жидкостной хроматографии в критической области позволил определить количественную зависимость распределения олигомеров по типу и количеству функциональных групп от способа загрузки мономера эпихлоргидрина в реактор. Так, совершенно однозначно удалось установить, что при одновременной загрузке мономера основную массу синтезированного вещества составляют бесфункциональные и циклические олигомеры. При равномерной подаче мономера с помощью дозатора в полимеризационной системе существенно снижается доля бесфункциональных и циклических олигомеров (табл. 1).

Было интересно пронаблюдать, до какой молекулярной массы низкомолекулярные олигомеры могут проявлять свойства высокомолекулярных полимеров, и, в частности, разделиться в соответствии с незначительными различиями в структуре. Для этой цели методом катионной полимеризации были синтезированы олигоэпихлоргидрины:



отличающиеся местом расположения этиленгликолевого звена ( $-\text{OR}_1\text{O}-$ ) в цепи. Здесь  $(\text{R})_n$ ,  $(\text{R})_m$  – звенья эпихлоргидрина. Молекулярная масса этих олигоэпихлоргидринов  $M_n = 1600 - 1800$ . Из результатов анализа (рис. 1) видно, что происходит и деление макромолекул по структуре. По условиям синтеза в качестве ГСВ в реакторе присутствуют не только гликоль, но и вода. Поэтому пики 5 и 6 соответствуют выходу олигомеров типа  $\text{HO}(\text{R})_n\text{OH}$  (обозначим их макромолекулы типа С). Пикам 7 и 8 соответствуют олигомеры А и В. Для идентификации пиков была проведена серия синтезов олигоэпихлоргидринов (ОЭХГ) с разными количествами воды и этиленгликоля. Также был проведен синтез только с водой. Результаты анализа всех этих олигомеров позволили однозначно провести идентификацию пиков и выявить количественное распределение по типам функциональности (табл. 2).

Как видно из хроматограмм, олигомеры типа В адсорбируются сильнее, чем олигомеры типа А. Соответствие олигомеров А и В их пикам было приведено из соображений, что макромолекулы типа А должны иметь более узкое распределение, макромолекулы типа В – более широкое, как



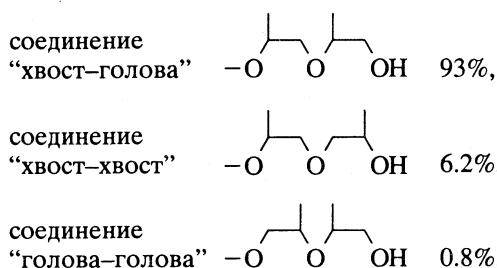
Таблица 2. Зависимость ММР и РТФ олигоэпихлоргидринов от типа ГСВ

[ЭГ], М	[H <sub>2</sub> O], М	ММР			РТФ				
		$\bar{M}_n$	$\bar{M}_w$	$\bar{M}_w/\bar{M}_n$	$f=0(1)$	$f=2$	$f=2^*$	$f=2^{**}$	$f=2^{***}$
–	–	1010	1560	1.55	25.9 (43.2)	30.9	–	–	30.9
0.41	–	1384	1569	1.13	4.4 (4.5)	29.5	33.0	28.6	91.1
0.33	0.13	1186	1314	1.11	3.8 (8.6)	32.5	29.1	26	87.6
0.22	0.20	1328	1486	1.12	4 (13.5)	42.3	22	18.2	82.5
0.11	0.34	1242	1380	1.11	2.6 (9.3)	59.3	17.8	11	88.1
–	0.40	1515	1738	1.15	5.6 (26.1)	68.3	–	–	68.3

Примечание.  $f = 2, 2^*, 2^{**}$  – бифункциональные молекулы с гидроксилами на концах, с этиленгликолем на одном конце, с этиленгликолем в цепи,  $f = 2^{***}$  – общее количество бифункциональных молекул.

результат “флуктуации” этиленгликолевого звена (–OR<sub>1</sub>O–) по всей длине цепочки.

Пики 3 и 4 соответствуют монофункциональным молекулам, у которых с одного конца цепочки находится гидроксил, а с другого – двойная по углероду связь. Очевидно, что бимодальность группы пиков 3, 4 объясняется тем, с какого конца к мономеру присоединен гидроксил. В работе [12] изучается порядок присоединения мономеров эпихлоргидрина в цепи. Результаты таковы:



Из очевидных соображений на месте пиков 5 и 6 должен быть триплет, но вследствие недостаточной разрешаемости видно только две моды.

С целью изучения поведения на адсорбируемой поверхности блочных сополимеров был проведен ряд синтезов, в которых в качестве ГСВ использовались полигликоли: диэтиленгликоль, триэтиленгликоль и тетраэтиленгликоль. Методом ГПХ определены молекулярные массы олигомеров. Отмечено падение молекулярной массы олигомеров с ростом молекулярной массы полигликоля (табл. 3) при синтезе в одинаковых условиях. Для высокомолекулярных полимерных цепочек, как известно, установлена зависимость коэффициента распределения макромолекул  $K_d = c_1/c_2$  ( $c_1$  и  $c_2$  – концентрации макромолекул в порах и в объеме соответственно) от характера расположения “дефектов” в полимерной цепочке, при этом учитывается тот факт, что “дефектов” гораздо меньше, чем основных мономеров цепочки. Так, для случая равномерного распределения  $N$  “дефектов” по цепочке  $K_d \sim 1 + \text{const} \times N$ , а для случая  $N$  “дефектов” в блоке  $K_d \sim \exp(\text{const} \times N)$ .

Таким образом, в случае блока из “дефектов” коэффициент  $K_d$  должен очень быстро увеличиваться с ростом  $N$ . Такой явной зависимости в нашем опыте не наблюдается. Причиной тому, очевидно, является малая молекулярная масса и, как следствие этого, достаточно большая жесткость олигомерных молекул. Ширина варьирования конформационных потерь у них довольно мала и критические условия для такой молекулярной массы не достигаются. Реализуется случай адсорбции даже при увеличении элюирующей силы смеси растворителей (рис. 2, 3).

В тех случаях, когда еще реализуются критические условия (молекулярная масса выше 800), замечен довольно широкий адсорбционный переход. При варьировании состава элюента в ту или иную сторону на 1 - 2% существенных изменений в процессе разделения не происходит. Очевидно, это еще раз свидетельствует о жесткости молекул низкомолекулярных олигомеров. Мономерные звенья, взаимодействующие со стенкой, лишают макромолекулу некоторой доли конформаций и таким образом уменьшают энтропию. Эти же звенья, взаимодействующие с поверхностью, дают вклад в изменение свободной энергии

$$\Delta F \sim (E - E_c)N_s \sim wN_s,$$

Таблица 3. Зависимость ММР и РТФ олигоэпихлоргидринов от типа гликоля

Гликоль	ММР			РТФ		
	$\bar{M}_n$	$\bar{M}_w$	$\bar{M}_w/\bar{M}_n$	$f=0$	$f=1$	$f=2$
ЭГ	1400	1600	1.13	4.4	4.5	91.1
ДЭГ	1300	1540	1.19	5.3	3.0	91.7
ТЭГ	920	1200	1.31	5.7	2.0	92.3
ТеЭГ	625	810	1.30	7.6	1.8	90.6

Обозначения: ЭГ – этиленгликоль, ДЭГ, ТЭГ, ТеЭГ – ди-, три-, тетраэтиленгликоль.

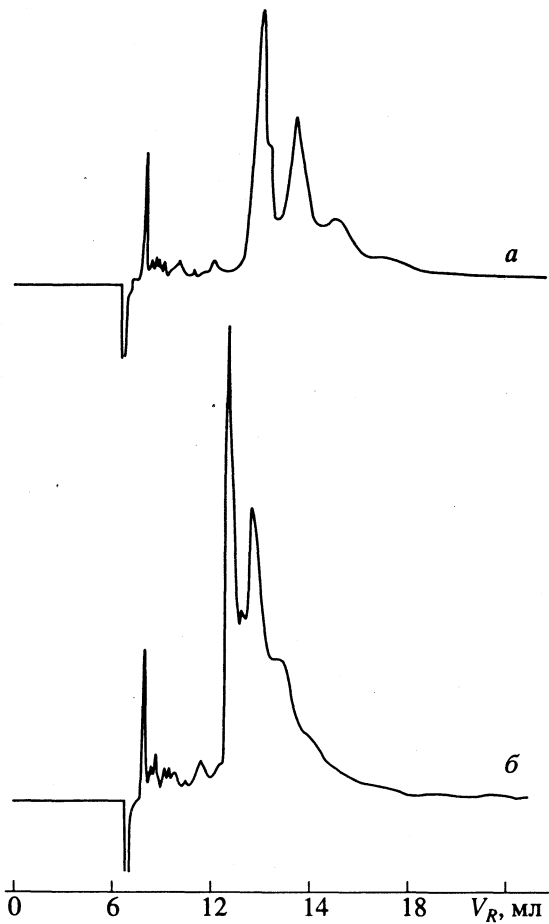


Рис. 2. Хроматограммы олигоэпихлоргидринов, полученных с диэтиленгликолем. Элюент: ТГФ/гептан = 45/55 (а) и 49/51 (б).

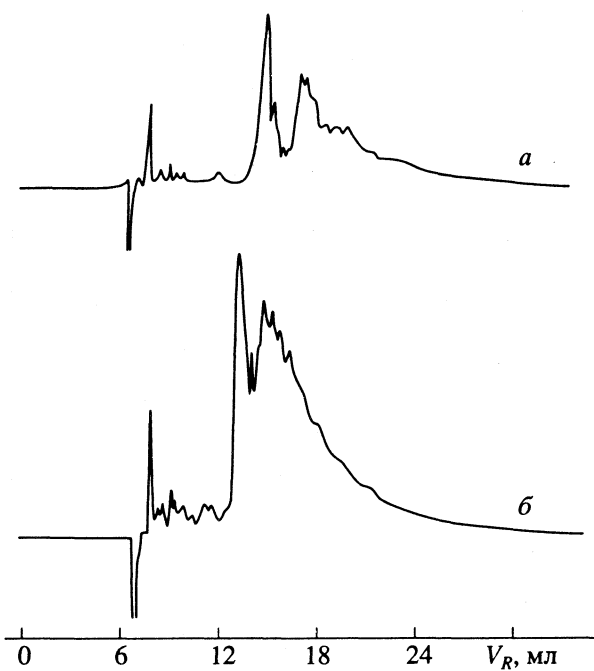


Рис. 3. Хроматограммы олигоэпихлоргидринов, полученных в присутствии триэтиленгликоля. Элюент: ТГФ/гептан = 45/55 (а) и 49/51 (б).

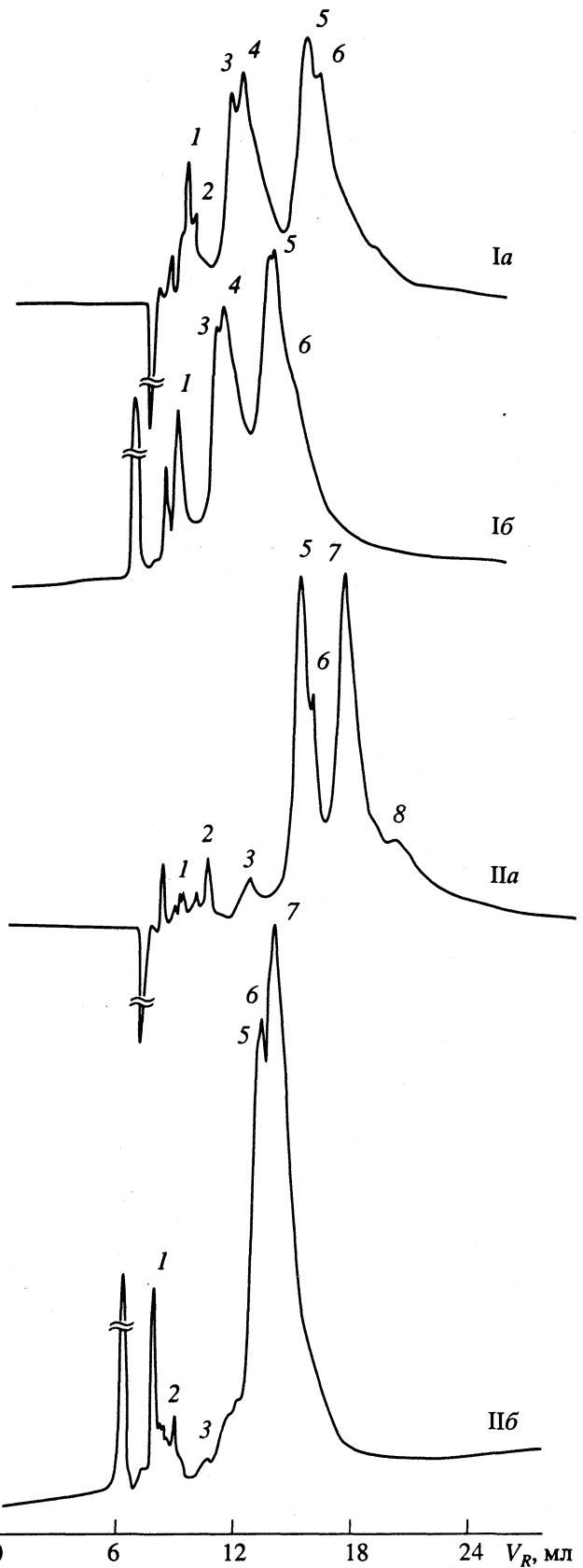


Рис. 4. РТФ олигоэпихлоргидринов, полученных при непрерывном вводе мономера без ЭГ (I) и с ЭГ (II); элюент ТГФ/гептан = 45/55 (а), ацетон/гептан = 42/58 (б): 1 - 8 - см. рис. 1.

где  $w = E - E_c$  — ширина перехода. Здесь  $E$  — энергия взаимодействия мономера с поверхностью,  $E_c$  — энергия взаимодействия в критической точке,  $N_s$  — число мономеров, взаимодействующих с поверхностью. Ширина адсорбционного перехода определяется из условия, когда этот вклад  $\Delta F$  становится порядка  $kT$ , следовательно

$$\Delta F < kT, \quad wN_s < kT, \quad w < kT/N_s.$$

Таким образом, очевидно, что чем меньше звеньев взаимодействует с поверхностью стенки, тем шире адсорбционный переход  $w$ . В нашем случае олигомеров число  $N_s$  вообще может быть равно нескольким единицам. Это довольно грубая скейлинговая оценка, но и она может качественно объяснить некоторую нечувствительность олигомеров эпихлоргидрина к неточному составу элюента в процессе разделения.

Как было сказано выше, анализ проводился при помощи двух различных элюентов и смеси ацетон-гептан. Анализ в смеси ацетон-гептан оказался менее информативным. Так, разделение пиков, соответствующих макромолекулам типа А и С, в этой смеси гораздо хуже, чем в смеси тетрагидрофуран-гептан, а разделения пиков, соответствующих молекулам типа А и В, нет вообще (рис. 4). Причины таких результатов, видимо, имеют чисто энергетическую основу (энергия адсорбции, величина адсорбирующей площадки, сольватация и образование водородных связей между молекулами тетрагидрофурана и гидроксильными группами и т.п.).

Авторы выражают благодарность Е.Л. Стыскину за предоставленные колонки фирмы "Эл-сико".

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беленький Б.Г., Ганкина Э.С., Нестеров В.В. // Докл. АН СССР. 1976. Т. 231. № 5. С. 1147.
2. Тенников М.Б., Нефедов П.П., Лазарев М.А. и др. // Высокомолекуляр. соединения. 1977. Т. 19А. № 3. С. 657.
3. Тихонова Т.З., Петракова Е.А. // Журн. физ. химии. 1991. Т. 65. № 10. С. 2759.
4. Горшков А.В., Евреинов В.В., Энтелис С.Г. // Высокомолекуляр. соединения. 1982. Т. 24А. № 3. С. 524.
5. Горшков А.В., Евреинов В.В., Энтелис С.Г. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 242. № 3. С. 632.
6. Горбунов А.А., Скворцов А.М. // Высокомолекуляр. соединения. 1986. Т. 28А. № 11. С. 2453.
7. Горбунов А.А., Скворцов А.М. // Там же. 1988. Т. 30А. № 1. С.3.
8. Горшков А.В., Прудскова Т.Н., Гурьянова В.В. и др. // Там же. 1985. Т. 27Б. № 3. С. 182.
9. Волькенштейн М.В. Конфигурационная статистика полимерных цепей. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1959.
10. Кузаев А.И., Ольхова О.М. // Высокомолекуляр. соединения. 1982. Т. 24А. № 10. С. 2197.
11. Энтелис С.Г., Евреинов В.В., Кузаев А.И. Реакционноспособные олигомеры. М.: Химия, 1985. С. 25.
12. Kubisa P., Penczek S. // Polymer Preprint. Amer. Chem. Soc. 1990. V. 31. № 1. P. 89.

**МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

УДК 541.64:543.544

**ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ  
В КРИТИЧЕСКОЙ ОБЛАСТИ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ  
ПО ТИПАМ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ ОЛИГОЭПИХЛОРИДИНОВ**

© 1994 г. А. И. Кузаев, О. М. Ольхова, С. И. Соломко, С. М. Батурич

*Российская академия наук, Институт химической физики, Черноголовка*

Разработана методика разделения олигоэпихлоридринов по типам функциональности с использованием жидкостной хроматографии в критической области. Разделение проведено на хроматографе фирмы "Waters" GPC-II с тремя колонками 250 × 4 мм, заполненными силикагелем "Силасорб SPH 600". Для достижения критических условий разделения в качестве элюэнта использованы смеси тетрагидрофуран-гептан в соотношении 45 : 55 и ацетон-гептан в соотношении 42 : 58 объемных единиц. Исследовано распределение по типам функциональности олигомеров эпихлоридрина, синтезированных в 1,2-дихлорэтаноле в присутствии тетрагидрофураната трехфтористого бора и низкомолекулярных гидроксилсодержащих веществ. Установлено, что олигомеры содержат небольшое количество побочных продуктов, уменьшающих среднечисленную функциональность в основном за счет образования монофункциональных и циклических макромолекул.

Известно, что олигомеры циклических эфиров, полученных при катионной полимеризации, содержат широкий набор макромолекул с различным типом концевых функциональных групп [1]. Их неоднородность по функциональным группам объясняется протеканием ряда побочных реакций (циклизация, передача цепи на мономер и примеси, обрыв цепи). В последнее время для экспериментального определения молекулярно-массового распределения (ММР) и распределения по типам функциональности (РТФ) реакционноспособных олигомеров используются методы жидкостной хроматографии. Так, гель-проникающая (эксклюзионная) хроматография (ГПХ) является наиболее распространенным методом определения параметров ММР олигомеров и полимеров, а адсорбционная хроматография используется для разделения высокомолекулярных соединений по составу и типам концевых функциональных групп [2]. Поскольку на разделение олигомеров по функциональным группам оказывают влияние химическая природа полимерной цепи, молекулярная масса и ММР, то для анализа олигомеров по РТФ целесообразно использовать жидкостную хроматографию в критической области (критических условиях) (ЖХКО).

Хроматография в критических условиях осуществляется в переходном от эксклюзионного к адсорбционному режиму и является достаточно новым методом анализа [3]. В отличие от адсорбционного режима молекулярная масса макромолекул не оказывает влияния на процесс разделения макромолекул по количеству и типу функциональных групп. Режим хроматографии в критических условиях находится в довольно уз-

кой области между адсорбционным и эксклюзионным и достигается плавным переходом из эксклюзионного или адсорбционного режима путем экспериментального подбора состава элюэнта (обычно двухкомпонентного). При переходе из эксклюзионного режима полярность смеси уменьшаются, при переходе из адсорбционного — увеличиваются.

Ранее нами для исследования молекулярной неоднородности олигоэпихлоридринов были использованы методы ГПХ [4] и колоночной адсорбционной хроматографии с градиентным режимом [5], где хроматографический процесс осуществлялся в течение нескольких часов.

Цель данной работы — отработка методики разделения олигоэпихлоридринов в критической области с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и исследование влияния условий полимеризации эпихлоридрина (ЭХГ) на параметры РТФ олигоэпихлоридринов (ОЭХГ).

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигомеры эпихлоридрина получали катионной полимеризацией в растворе 1,2-дихлорэтанола (ДХЭ) на катализаторе тетрагидрофуранат трехфтористого бора в присутствии гликолей и без них. Все используемые реагенты очищали по описанной ранее методике [6]. Синтез олигоэпихлоридринов проводили при 298 К с использованием дозирующего устройства, условия синтеза приведены в работах [7, 8]. Для удаления катализатора из полимеризационной системы использовали адсорбционную методику. Оборвав реакцию

аммиаком, реакционную смесь пропускали через колонку, заполненную силикагелем марки КСМ, в качестве элюэнта использовали этиловый спирт. Удаление растворителя проводили под вакуумом при 300 К и далее полимер сушили над  $P_2O_5$ . Регенерацию силикагеля проводили многократным промыванием его горячей водой с последующим высушиванием при 433 - 453 К. Для получения олигомеров различной функциональности и структуры использовали гликоли (этилен-, ди-, три-, тетраэтиленгликоль), бутанол, воду.

Молекулярно-массовые характеристики олигоэпихлоргидринов определяли методом гель-проникающей хроматографии на гель-хроматографе фирмы "Waters" с тремя стирогелевыми колонками (размеры пор геля 20, 50 и 100 нм) по методике, описанной ранее [9].

Параметры РТФ исследовали методом критической хроматографии, используя хроматограф фирмы "Waters", насос серии "Model 590", дифференциальный рефрактометр R 401 и счетно-регистрирующее устройство "Data Module". Три колонки высотой 250 мм и внутренним диаметром 4 мм наполняли силикагелем Силасорб SPH 600, размер зерен 7 мкм, средний диаметр пор 6 нм. В качестве элюэнта использовали смесь тетрагидрофуран-гептан в соотношении 45 : 55 объемных процента соответственно. Температура эксперимента составляла 303 К. Переход в критическую область осуществляли из эксклюзионного режима.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Традиционный способ получения олигоэфиров на основе трехчленных циклических эфиров (пропиленоксида, эпихлоргидрина) заключается в одновременной загрузке исходного мономера, растворителя, катализатора и проведении полимеризации до полной конверсии мономера. Для получения гидроксилсодержащих олигомеров в систему вводят низкомолекулярные спирты, диолы или триолы, с помощью которых задается функциональность по гидроксильным группам синтезируемых олигомеров.

Однако при использовании катионных инициаторов (например, трехфтористого бора и его эфиров, хлорной кислоты, кислот Льюиса или других катализаторов) в полимеризационной системе наблюдается широкий спектр побочных реакций, приводящих к образованию дефектных по функциональности макромолекул. Как совместная, так и раздельная катионная полимеризация циклических эфиров сопровождается такими побочными реакциями, как циклизация, изомеризация, передача цепи на мономер, обрыв цепи противоионом, что приводит к накоплению в системе

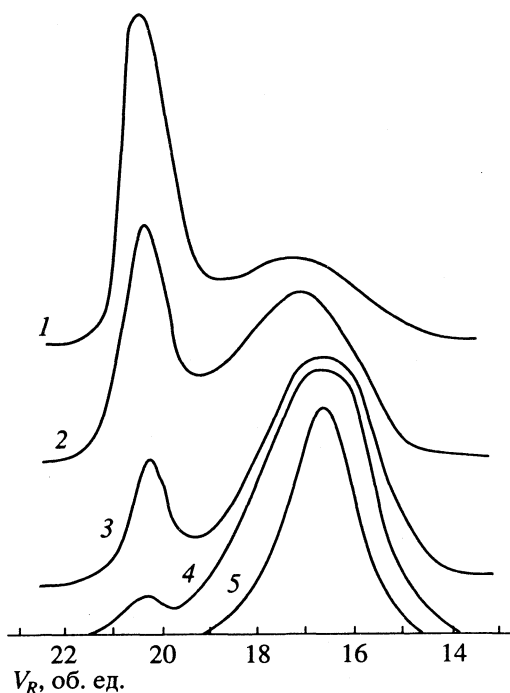


Рис. 1. Гель-хроматограммы олигоэпихлоргидринов, полученных при одновременной загрузке мономера (1) и с непрерывным его вводом (2 - 5) без этиленгликоля (1 - 4) и с этиленгликолем (5). Соотношение ЭХГ-катализатор в системе: 60 (1), 10 (2), 1 - 2 (3), 0.5 - 0.8 (4, 5).

макромолекул с различными концевыми группами и макроциклов [10].

Образование макроциклов характерно при полимеризации всех эпоксидов, однако число мономерных звеньев в таких циклах зависит от целого ряда факторов, в частности, от типа эпоксида и катализатора. Так, полимеризация этиленоксида и стиролоксида сопровождается преимущественно образованием циклических димеров [11, 12]. При полимеризации пропиленоксида (ПО) под действием трехфтористого бора образуются ди-, тетра- и пентамерные циклы [13], но основным продуктом является циклический тетрамер (ЦТ).

Таблица 1. Молекулярные параметры олигоэпихлоргидринов, полученных без добавок этиленгликоля ( $f$  - функциональность, %)

М/К	ГПХ				ЖХКО			
	$\bar{M}_n$	$\bar{M}_w$	$\bar{M}_w/\bar{M}_n$	ЦТ, %	$f=0$	$f=1$	$f=2$	ЦТ, %
60	610	910	1.49	49.0	59.6	26.3	14.1	34.9
10	730	1070	1.46	31.3	45.4	33.4	21.2	20
2	1000	1560	1.56	18.0	25.9	43.2	30.9	12.5
0.5	1400	1770	1.26	5.2	8.8	35.3	55.9	3.5

Примечание. Циклический тетрамер (ЦТ) входит в массовую долю  $c f = 0$ ; М/К - соотношение мономер/катализатор.

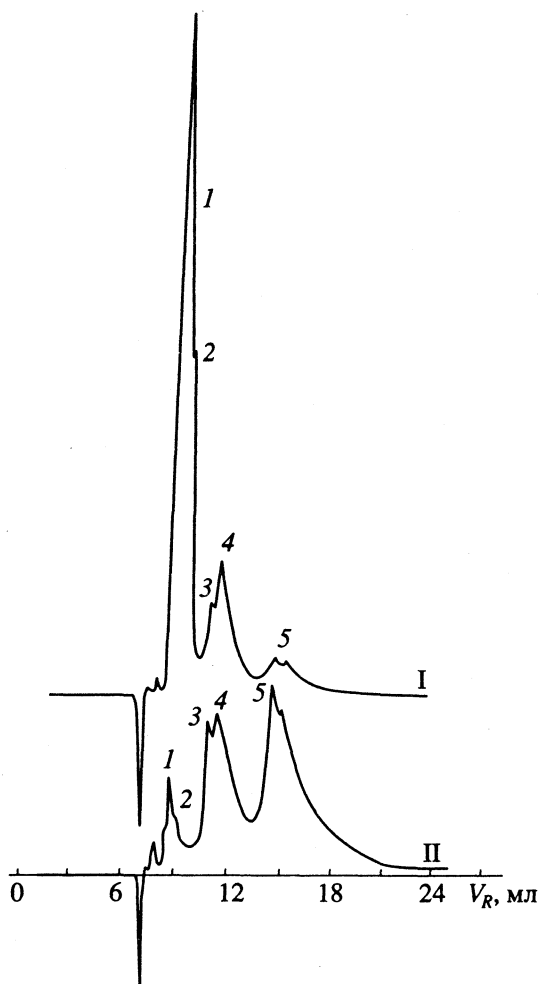


Рис. 2. Хроматограммы олигоэпихлоргидринов в критической области: I – олигомер получен с единовременной загрузкой мономера, II – с непрерывным вводом мономера. Зона выхода: 1, 2 – циклические и бесфункциональные, 3, 4 – монофункциональные и 5 – бифункциональные молекулы.

Образованием ЦТ сопровождается катионная полимеризация эпихлоргидрина и нитрата глицидного спирта (НГС). При исследовании катионной полимеризации ПО, ЭХГ и НГС с помощью гели-проникающей хроматографии было показано [10],

Таблица 2. Зависимость ММР и РТФ олигоэпихлоргидринов от типа ГСВ (ЭГ и ДЭГ – этилен- и диэтиленгликоль; [ГСВ] = 0.4 М)

ГСВ	ММР			РТФ		
	$\bar{M}_n$	$\bar{M}_w$	$\bar{M}_w/\bar{M}_n$	$f=0$	$f=1$	$f=2$
ЭГ	1400	1600	1.13	4.4	4.5	91.1
ДЭГ	1300	1540	1.19	5.3	3.0	91.7
ЭГ + H <sub>2</sub> O*	1328	1486	1.12	4.0	13.5	82.5
H <sub>2</sub> O	1500	1700	1.15	5.6	26.1	68.3
Бутанол	1500	1600	1.08	7.8	45.9	46.3

\* Отношение концентраций [ЭГ]/[H<sub>2</sub>O] = 1 : 1.

что способность эпоксидов образовывать макроциклы падает в ряду ПО > ЭХГ > НГС с ростом стерических затруднений за счет заместителей у эпоксидного кольца.

При полимеризации ЭХГ под действием эфира трехфтористого бора, как видно из гели-хроматограммы I на рис. 1, основным продуктом полимеризации является циклический тетрамер ЭХГ с объемом выхода 20.25 ед. Его содержание в олигомере достигает 50% (табл. 1). Нами разработан метод полимеризации эпоксидов с поддержанием в полимеризационной системе концентрации мономера, соизмеримой с концентрацией активных центров (катализатора). В этом случае, согласно механизму катионной полимеризации, должны подавляться побочные реакции передачи цепи на мономер и циклизации, а рост цепи должен происходить “ступенчато” с многократным зарождением активных центров полимеризации и их последующего взаимодействия с диольными компонентами системы.

Действительно, с уменьшением концентрации мономера в реакционной системе резко падает доля ЦТ в олигомере и при концентрации ЭХГ меньше концентрации катализатора содержание ЦТ падает до 5 - 6%. При введении этиленгликоля в систему пик, характерный для ЦТ, исчезает на гели-хроматограмме (кривая 5 на рис. 1).

Исследования по катионной полимеризации эпихлоргидрина в присутствии гидроксилсодержащих веществ и без них с различными способами ввода мономера [7, 8] показали, что при непрерывной подаче раствора ЭХГ в реакционную смесь, состоящую из катализатора и этиленгликоля, на ранних стадиях процесса фактически не происходит роста цепи и олигомерный продукт представляет смесь моно-, ди- и тримерных олигоэпихлоргидриндиолов. Дальнейшее многократное взаимодействие олигомерных гликолей с активными центрами приводит к росту макромолекул получаемого олигоэфирдиола до заданной молекулярной массы. Величина молекулярной массы задается соотношением подаваемых в реактор циклического эфира и гликоля и рассчитывается по формуле  $\bar{M}_n = M [\text{ЦЭ}]/[\text{Г}]$ , где  $M$  – молекулярная масса мономера, [ЦЭ] и [Г] – количество циклического эфира и гликоля.

Использование жидкостной хроматографии в критической области (ЖХКО) применительно к олигомерам ЭХГ позволило выяснить влияние условий полимеризации на параметры РТФ синтезируемых олигомеров. Количественно определено содержание макромолекул различной функциональности в зависимости от способа полимеризации (табл. 1, рис. 2) и типа гидроксилсодержащих веществ (ГСВ) (вода, гликоль, бутанол) (табл. 2, рис. 3 и 4).

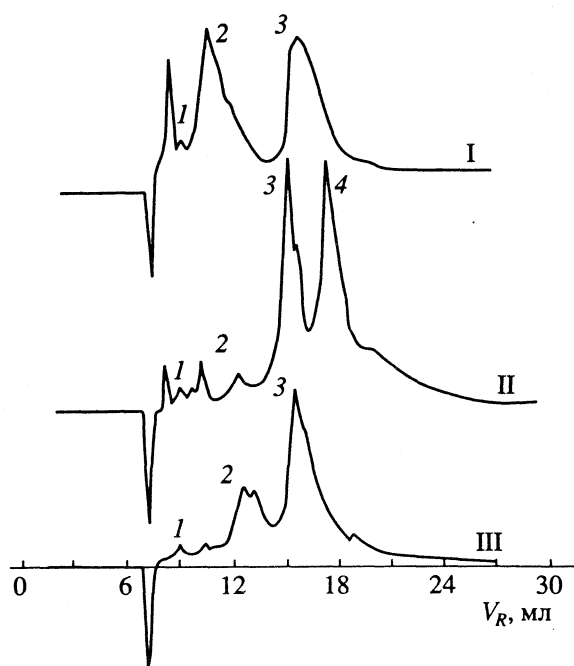


Рис. 3. Хроматограммы олигоэпихлоргидринов в критической области при использовании в качестве ГСВ бутанола (I), этиленгликоля (II) и воды (III): 1 – бес-, 2 – моно- и 3 – бифункциональные молекулы, 4 – бифункциональные молекулы с этиленгликолевым звеном в цепи.

На рис. 2 представлены РТФ хроматограммы олигоэпихлоргидринов, полученных при единовременной загрузке мономера и при непрерывном вводе его в реакционную систему с зонами выхода циклических и бесфункциональных (1, 2), монофункциональных (3, 4) и бифункциональных (5) по гидроксильным группам молекул. Из табл. 1 видно, что при непрерывном вводе мономера содержание циклического тетрамера уменьшается с 49 до 3 - 5% (пик 1), возрастает суммарная доля моно- и бифункциональных молекул и, соответственно, происходит рост молекулярной массы олигомера. Видно, что в зависимости от способа полимеризации существенно меняется молекулярно-массовый состав конечного олигоэпихлоргидрина.

В табл. 2 приведены результаты по влиянию природы ГСВ на ММР и РТФ олигоэпихлоргидрина. Для получения монофункционального олигомера в качестве обрывающего агента использовали бутиловый спирт. Поскольку синтез проводили заведомо не в строгих условиях и в системе присутствует небольшое количество воды, то наряду с монофункциональными молекулами в конечном продукте присутствуют бифункциональные макромолекулы.

Полимеризация в присутствии специально вводимой воды, как следует из рис. 3, не приводит к образованию строго бифункциональных ОЭХГ и содержание монофункциональных молекул достигает 26%. Следует отметить, что бифункциональные макромолекулы, образующиеся при полимеризации с добавками гликолей, элюируются в виде двух пиков. Первый пик соответствует макромолекулам, имеющим концевую гликолевую гидроксильную группу. Последующий пик (пик 4 на рис. 3) соответствует, как и предполагалось ранее [5], макромолекулам, имеющим гликолевый фрагмент в середине цепи. Естественно, олигомердиолы, образованные в отсутствие гликоля, как видно из рис. 3, элюируются в виде одного пика (пик 3, кривые I и III).

Варьирование типа гликоля – этилен-, ди-, три-, тетраэтиленгликоль – показало (рис. 4), что доля примесных пиков (пики 1, 2) мала во всех случаях и доля бифункциональных макромолекул достигает ~90 - 95%.

Таким образом, разработанная хроматографическая методика позволяет производить разделение макромолекул не только по числу функциональных групп, но и по их природе и структуре.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Энтелис С.Г., Евреинов В.В., Кузавев А.И. Реакционноспособные олигомеры. М.: Химия, 1985. С. 6.

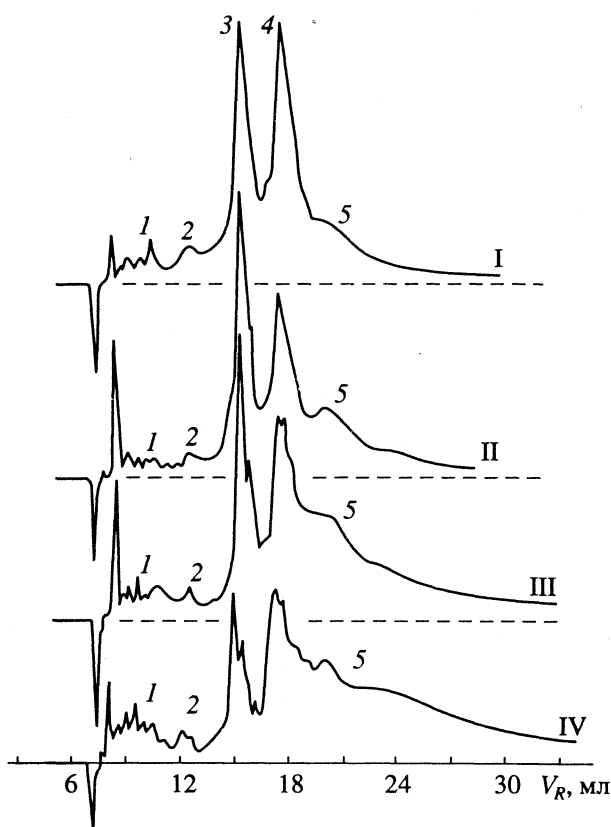


Рис. 4. Хроматограммы олигоэпихлоргидринов в критической области (I – этилен-, II – диэтилен-, III – триэтилен- и IV – тетраэтиленгликоль). Зона выхода: 1 – бес-, 2 – моно-, 3 - 5 – бифункциональных молекул.

2. Кузаев А.И. Гель-проникающая хроматография. Черногловка: Изд. ИХФ АН СССР, 1974. С. 35.
3. Горшков А.В., Евреинов В.В., Энтелис С.Г. // Журн. физ. химии. 1983. Т. 57. № 11. С. 2665.
4. Кузаев А.И., Ольхова О.М. // Высокомолекуляр. соединения. 1982. Т. 14А. № 10. С. 2197.
5. Кузаев А.И., Колесникова С.Д., Ольхова О.М. // Там же. 1989. Т. 31А. № 10. С. 2116.
6. Энтелис С.Г., Кузаев А.И., Евреинов В.В. Современные физические методы исследования полимеров. М.: Химия, 1982. С. 234.
7. Кузаев А.И., Ольхова О.М., Батулин С.М. А. с. 887584 СССР // Б. И. 1987. № 45.
8. Кузаев А.И., Ольхова О.М., Батулин С.М. // Высокомолекуляр. соединения. 1986. Т. 28А. № 4. С. 739.
9. Кузаев А.И. // Там же. 1980. Т. 22А. № 5. С. 1146.
10. Энтелис С.Г., Коровина Г.В., Кузаев А.И. // Там же. 1971. Т. 13А. № 6. С. 1438.
11. Плей П. Катионная полимеризация. М.: Мир, 1966. С. 341.
12. Pasika W.M. // J. Polymer. Sci. 1969. V. 7B. № 5. P. 621.
13. Kern R.J. // J. Organ. Chem. 1968. V. 33. № 3. P. 388.



МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544

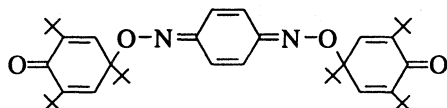
ПРИРОДА ФОТОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВУЛКАНИЗАТОВ,  
ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ ДИЕНОВЫХ КАУЧУКОВ  
И ХИНОЛОВОГО ЭФИРА

© 1994 г. И. Б. Цветковский

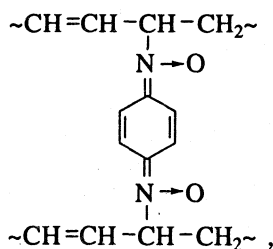
Научно-исследовательский институт синтетического каучука им С.В. Лебедева, Санкт-Петербург

Показано, что вулканизаты *цис-транс*-диеновых каучуков, полученные с помощью 0,0'-*бис*-эфира *n*-хинондиоксида и 2,4,6-три-*трет*-бутилфенола (хинолового эфира), содержат динитронные межмолекулярные шивки, обладающие высокой фоточувствительностью. Установлено, что на свету в разбавленных растворах эти шивки подвергаются деструкции, сопровождающейся разрушением вулканизата. В конденсированных системах наряду с деструкцией обнаружена рекомбинация с образованием нерастворимых и нефоточувствительных продуктов. Показано, что фотодеструкция динитронных межмолекулярных шивок приводит к резкому изменению физико-механических свойств вулканизатов.

0,0'-*бис*-Эфиры *n*-хинондиоксида и 2,4,6-три-*трет*-бутилфенола (хиноловые эфиры) известны как эффективные низкотемпературные вулканизующие агенты диеновых каучуков [1]. Ранее было установлено [2, 3], что вулканизация *цис-транс*-диеновых каучуков 0,0'-*бис*-эфиром *n*-хинондиоксида и 2,4,6-три-*трет*-бутилфенола (ХЭФ)



протекает через образование ряда промежуточных продуктов и завершается образованием шитого полимера, содержащего межмолекулярные шивки преимущественно хинодинитронного строения:

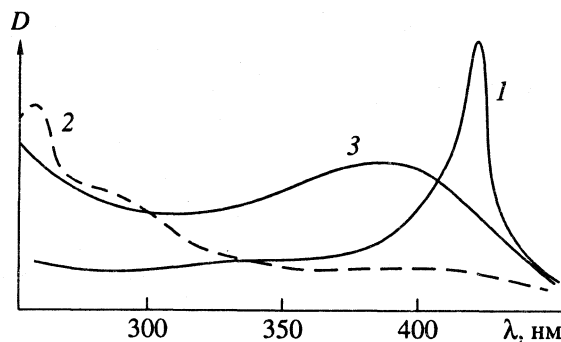


имеющих в УФ-спектре интенсивную полосу поглощения 412 нм [2, 3].

Несмотря на ряд бесспорных преимуществ процесса вулканизации диеновых каучуков хиноловыми эфирами, имеются данные, свидетельствующие о наблюдаемом иногда быстром снижении и невозпроизводимости прочностных и эластических свойств вулканизатов, указывающие на фоточувствительность последних.

В данной работе приведены результаты исследования изменения молекулярно-структурных характеристик диеновых каучуков, обработанных хиноловым эфиром, при их экспозиции на свету, полученные методом высокоэффективной двухдетекторной эксклюзионной хроматографии.

Реакцию диеновых каучуков с ХЭФ проводили в растворе, в термостатируемом реакторе при непрерывном перемешивании, в интервале температур 60 - 80°C. В зависимости от количества взятого ХЭФ, при прочих равных условиях, реакция завершалась или не завершалась гелеобразованием. Растворителями служили толуол или минеральное масло. Концентрация каучука в растворе (*c*) составляла 25 об. %. Мольное соотношение ХЭФ: мономерное звено каучука (*n*) выбиралось равным от 0.0005 до 0.008, что обеспечивало при необходимости получение как полностью шитого вулканизата, так и слабо вулканизованных, сохраняющих



УФ-спектры ПИ, обработанного хиноловым эфиром до (1) и после фотодеструкции в разбавленном (*c* = 0.3 об. %) (2) и в концентрированном (*c* = 25 об. %) растворах (3).

**Таблица 1.** Фотодеструкция вулканизатов ПИ-90 000 ( $\tau_b$  – продолжительность вулканизации (после точки геля),  $\tau_s$  – предварительная экспозиция вулканизата на свету,  $\tau_p$  – время разрушения вулканизата в толуоле)

$\tau_b$ , ч	$\tau_s$ , ч	$\tau_p$ , ч	
		в темноте	на свету
0.5	–	$\infty$	–
1.5	–	–	2
1.5	7	–	55
2.5	–	–	10
5.5	–	–	16
5.5	7	–	60*
24	–	$\infty$	24
24	7	–	120*
48	–	–	36
48	7	–	$\infty$
96	–	–	72
96	7	–	$\infty$
168	–	$\infty$	96
168	7	–	$\infty$

\* Частичное разрушение.

**Таблица 2.** Влияние света на средние молекулярные массы ПИ-90 000, обработанного ХЭФ

Образец	$M_w$	$M_n$	Образец	$M_w$	$M_n$
1	86 060	70 780	4	84900	59 000
2	179 400	89 000	5	121000	71400
3	187 000	92 000			

Примечание. Образец № 1 – исходный, № 2 – обработанный ХЭФ в течение 7 ч, № 3 и № 4 – хранение раствора (0.3 об. %) образца № 2 соответственно в темноте 24 ч и на свету 2 ч, № 5 – хранение образца № 2 на свету 2 ч.

**Таблица 3.** Фотодеструкция толуольных растворов ( $c = 0.3$  об. %) исходного (1 - 3) обработанного ХЭФ (4 - 6) образцов ПИ-90 000 ( $\tau_x$  – время хранения раствора)

Образец	$\tau_x$ , ч		$M_w$	$M_n$
	в темноте	на свету		
1	–	–	86 060	70 780
2	48	–	85 700	69 500
3	–	48	72 200	54 350
4	–	–	91 300	56 400
5	48	–	90 100	56 700
6	–	48	37 280	23 590

полную растворимость, образцов. В качестве субстратов были взяты полиизопрен (ПИ) ( $M_w = 90\,000$ , 90% *цис*-) и полибутадиены (ПБ) ( $M_w = 200\,000$  и  $M_w = 7000$ , 90% *цис*-), не содержащие антиоксидантов.

Анализ реакционных смесей проводили с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа, снабженного рефрактометром “Waters M410” и сканирующим спектрофотометрическим детектором “Waters M490”, на колонках “Микростирагель”. В качестве подвижной фазы использовали свежеперегнанный под аргоном тетрагидрофуран.

Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что независимо от продолжительности вулканизации, вулканизаты диеновых каучуков, помещенные в растворитель (толуол) на свету, рано или поздно полностью разрушаются (растворяются), в то время как в темноте наблюдается лишь их обычное набухание. Вместе с тем, есть основания утверждать, что на свету в вулканизатах протекает не только деструкция, но и рекомбинация ее продуктов с образованием новых межмолекулярных сшивок, не обладающих фоточувствительностью. Об этом свидетельствует тот факт, что предварительная экспозиция вулканизатов на свету заметно уменьшает их способность к последующей деструкции. Не вызывает сомнений, что процесс рекомбинации протекает и при экспонировании вулканизата в растворителе, однако в существенно меньшей степени из-за снижения концентрации продуктов деструкции в вулканизате вследствие его набухания.

Постепенное исчезновение в УФ-спектрах каучуковой компоненты полосы поглощения 412 нм при облучении образцов, установленное с помощью сканирующего фотометрического детектирования при хроматографическом анализе реакционных смесей, свидетельствует о том, что фотодеструкции подвергаются динитронные межмолекулярные сшивки. При этом вид спектров образующихся продуктов зависит от степени конденсированности системы. В разбавленных системах, где рекомбинация затруднена, в спектрах преобладает полоса поглощения 260 нм, отвечающая ароматическим фрагментам. В случае же высокой конденсированности системы, спектры характеризуются диффузным поглощением в области 300 - 400 нм (рисунки). Это, в частности, позволяет предположить, что фотодеструкция динитронных сшивок протекает через образование нитроксильных радикалов, вызывающих конденсацию динитронов с образованием фотостойчивых продуктов с частичным сохранением ими хиноидной структуры.

Данные хроматографического анализа образцов полиизопрена, обработанного небольшим (недостаточным для гелеобразования) ко-

**Таблица 4.** Содержание (*m*, об. %) и молекулярные характеристики золь-фракций, выделенных из вулканизатов пластифицированной минеральным маслом смеси ПИ-7000 и ПИ-90 000 (1 : 1)

$\tau_b$ , сут.	$\tau_3$ , сут.	$M_z$	$M_w$	$M_n$	<i>m</i> , об. %
1	–	46 280	13 390	6190	42.2
5	–	47 490	15 010	6380	42.5
7	–	46 400	14 810	6460	42.2
7	7	61 410	19 210	6680	50.0

личеством ХЭФ, подтверждают протекание фотодеструкции и ее ускорение в растворах (табл. 2, образцы 4 и 5).

Взаимодействие *цис-транс*-диеновых каучуков с хиноловым эфиром в очень разбавленных растворах (*c* = 0.5 об. %), несмотря на полное расходование хинолового эфира и наличие в УФ-спектре каучуковой компоненты всех характерных полос поглощения, свидетельствующих о протекании реакции, не приводит к заметному изменению молекулярной массы каучука, определяемой методом эксклюзионной хроматографии, и кривой его молекулярно-массового распределения (ММР) (табл. 3). Причина этого состоит в

том, что большинство образующихся при этом сшивок оказываются внутримолекулярными. Интересно, что фотодеструкция такого каучука в разбавленном растворе приводит к продукту с молекулярной массой почти втрое ниже исходной. Поскольку, как следует из табл. 3, фотодеструкция невулканизованного каучука существенно ниже, чем каучука, обработанного хиноловым эфиром, есть основания полагать, что деструкции в последнем случае подвергаются не только собственно меж- (внутри-) молекулярные сшивки, но и макромолекулярные цепи каучука в непосредственной близости от них.

Перестройка вулканизационной сетки, происходящая в вулканизатах на свету, не проходит бесследно для их физико-механических характеристик. Экспозиция вулканизата пластифицированной минеральным маслом смеси ПИ и низкомолекулярного полибутадиена на дневном свете в течение 7 сут. приводит к возрастанию на 15% количества золь-фракции (табл. 4). Для наполненных и ненаполненных вулканизатов наблюдается достоверное снижение прочности и, по-видимому, эластичности (табл. 5). Исключение составляют лишь вулканизаты, наполненные сажей, фотопротекторные свойства которых хорошо известны.

**Таблица 5.** Изменение физико-механических свойств под действием света вулканизатов диеновых каучуков, пластифицированных минеральным маслом

$\tau_b$ , сут.	$\sigma$ , МПа	$\epsilon$ , отн. %	$\epsilon$ , ост. %	$\sigma$ , МПа	$\epsilon$ , отн. %	$\epsilon$ , ост. %
	в темноте (7 сут.)			на свету (7 сут.)		
ПИ-90 000 без наполнителя						
1	0.12 ± 0.03	490 ± 100	7	0.05 ± 0.01	390 ± 10	5
3	0.12 ± 0.03	480 ± 60	5	0.06 ± 0.01	430 ± 40	5
5	0.10 ± 0.02	440 ± 20	6	0.06 ± 0.01	420 ± 50	5
7	0.12 ± 0.01	500 ± 80	7	0.06 ± 0.01	440 ± 50	5
Al-порошок						
7	0.34 ± 0.03	500 ± 40	6	0.22 ± 0.03	400 ± 50	3
сажа						
7	0.13 ± 0.03	110 ± 30	0	0.11 ± 0.01	110 ± 30	0
аэросил						
7	0.90 ± 0.01	380 ± 40	31	0.51 ± 0.03	220 ± 30	15
ПБ-200 000 без наполнителя						
7	0.06 ± 0.02	380 ± 80	0	0.03 ± 0.01	190 ± 40	5
аэросил						
7	0.64 ± 0.05	470 ± 70	0	0.24 ± 0.02	300 ± 30	5

Примечание. Доверительные интервалы рассчитаны для *P* = 0.95.

Таким образом, полученные данные доказывают, что вулканизаты *цис-транс*-диеновых каучуков, полученные с помощью ХЭФ, вследствие высокой фоточувствительности преобладающих в них хинондитронных сшивок, следует с осторожностью применять в качестве основы изделий, эксплуатирующихся на свету. Но даже независимо от условий дальнейшего использования этих вулканизатов, их низкую фотостойкость необходимо учитывать при контроле процесса вулканизации. Игнорирование этого обстоятельства может привести к различного рода артефактам и неадекватному представлению о протекании процесса.

Справедливость всех сформулированных выводов, основанных на экспериментах с использованием каучуков, имеющих преимущественно *цис*-структуру, была подтверждена и для *транс*-полидиенов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зорик В.В., Комаров В.Ф., Зорик С.Ф., Королев Г.В. // Каучук и резина. 1978. № 6. С. 15.
2. Цветковский И.Б. // Журн. прикл. химии. 1988. Т. 61. № 9. С. 2090.
3. Цветковский И.Б., Коренная А.Б., Андреева Н.В. // Там же. 1991. Т. 64. № 2. С. 387.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 615.355:577.152.314.07

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО МЕТОДА  
ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА ПИРОГЕННЫХ ПРИМЕСЕЙ  
В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

© 1994 г. Н. В. Глазова, Т. Б. Ефимова, Л. В. Дмитренко

Химико-фармацевтический институт, Санкт-Петербург

Показана возможность количественной оценки пирогенных примесей бактериального происхождения (эндотоксинов грамотрицательных бактерий) по хроматографическому анализу продуктов их кислотного гидролиза. Проведено сравнение данных хроматографического метода анализа бактериальных эндотоксинов в препаратах рибонуклеаза и флоримицина сульфата с оценкой их пирогенности по фармакопейному методу на кроликах.

Известно, что пирогенами бактериальной природы являются эндотоксины – высокомолекулярные липополисахариды (ЛПС), часто связанные с белковыми компонентами. Молекулярная масса такого липополисахаридобелкового комплекса (ЛПК) может достигать  $\sim 10^6$  Да в зависимости от молекулярных масс полисахарида и белка, входящих в комплекс. Пирогенную активность ЛПК, в основном, определяет липид А, связанный с полисахаридом (ПС) кислототалабильной связью.

Быстрая количественная оценка пирогенных примесей при производстве лекарственных препаратов является актуальной задачей фармацевтической промышленности (ЛАЛ-тест, применяемый за рубежом для этих целей, дорогостоящ, не всегда доступен и пока не нашел широкого применения в России).

Ранее [1] был предложен экспресс-метод анализа бактериальных эндотоксинов по асимметрии гель-хроматографического пика. Данная работа является продолжением исследований, связанных с разработкой количественных методов анализа бактериальных эндотоксинов. Цель настоящей работы – создание простого и эффективного метода оценки пирогенных примесей в лекарственных препаратах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве модели бактериального эндотоксина использовали препарат пирогенал (эндотоксин *Salmonella typhi*). В качестве объектов исследования были выбраны ферментный препарат рибонуклеаза (РНК-аза) и антибиотик флоримицина сульфат, которые легко тестируются и не подвергаются гидролизу при pH 2.

Гель-хроматографический анализ проводили на колонке с сефадексом G-75 ( $d = 0.9$  см,  $H = 35$  см) при автоматическом детектировании на установке фирмы "Фармация" при длине волны  $\lambda = 280$  нм.

Для определения белка использовали метод Лоури [2], для определения концентрации полисахаридов – цветную реакцию с фенолом в присутствии концентрированной серной кислоты [3].

Пирогенную активность определяли по ЛАЛ-тесту [4] и методом газовой хроматографии (ГФ) по суммарному повышению температуры у кроликов [5].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение компонентного состава бактериальных эндотоксинов *Salmonella typhi* проводили при нейтральных значениях pH, где ЛПК имеет целостную структуру, а также после предварительного гидролиза пирогенала в течение 1 ч при pH 2 (рис. 1). Из рисунка видно, что пирогенал представляет собой ЛПК, характеризующийся отношением  $(V_e - V_0)/V_k = 0.30$ . Объем задержки основного углеводного компонента совпадает с выходом наибольшего белкового пика и максимальной концентрацией бактериальных эндотоксинов по ЛАЛ-тесту (рис. 1а).

Ключевым моментом является обнаружение того обстоятельства, что после гидролиза объем выхода полисахаридного фрагмента уменьшается ( $(V_e - V_0)/V_k = 0.11$ ), в то время как объем выхода белковых компонентов не изменяется.

Результаты статистической обработки экспериментальных данных ( $r$  – порядок регрессии,  $F_{\text{ош}}$  – функция ошибок,  $S$  – стандартное отклонение,  $R$  – коэффициент корреляции; 1 – РНК-аза, 2 – флоримицина сульфат)

Метод	$r$	$F_{\text{ош}}$		$S$		$R$	
		1	2	1	2	1	2
I	2	6.2	8.1	0.79	0.81	0.74	0.69
II	2	1.5	–	0.216	–	0.74	–

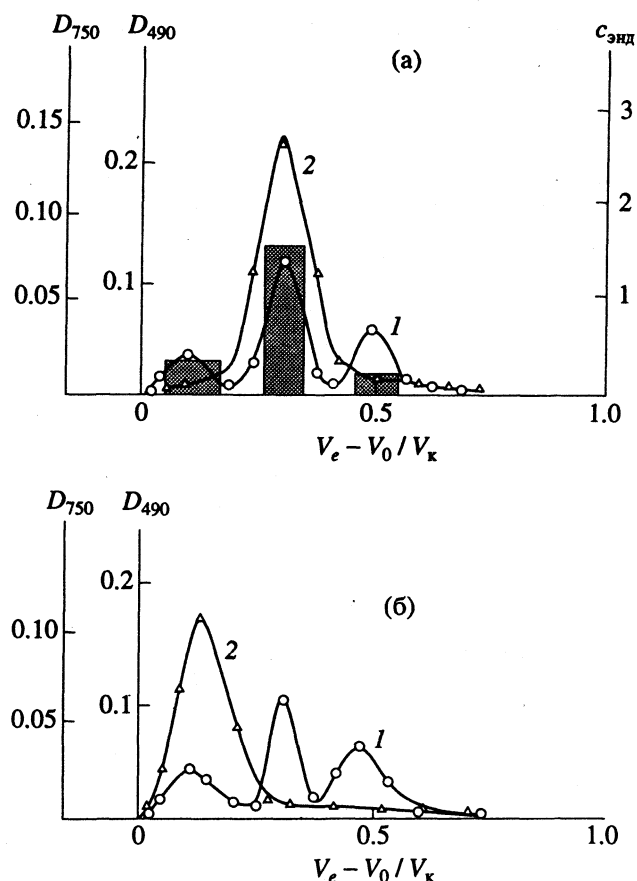


Рис. 1. Гель-хроматограммы пирогенала до (а) и после (б) кислотного гидролиза: 1 – белок ( $D_{750}$ ); 2 – полисахарид ( $D_{490}$ ); 3 – бактериальные эндотоксины ( $c_{\text{энд}}$ , ЕДЭ/мл).

Уменьшение объема выхода полисахаридного компонента после гидролиза может служить доказательством гидролиза ЛПК с освобождением высокомолекулярного полисахарида, который приобретает более рыхлую структуру, чем в ЛПК (рис. 1).

Метод анализа основан на кислотном гидролизе эндотоксинов, являющихся ЛПС, с последующим хроматографическим определением полисахаридной части структуры. Сравнение гель-хроматограмм, полученных после кислотного гидролиза эндотоксинов *Salmonella typhi*, а также эндотоксинов, содержащихся в препаратах различной природы (флоримицина сульфат, РНК-аза), показало совпадение объемов выхода наиболее высокомолекулярного компонента (рис. 2). Количественную оценку указанного компонента проводили, измеряя площадь ( $S_1$ ) его пика на хроматограмме.

Для количественной оценки содержания эндотоксинов в исследуемых препаратах проводили гель-хроматографический анализ модельной смеси препарат + пирогенал (эндотоксин *Salmonella typhi*), изменяя концентрацию пирогенала (рис. 3).

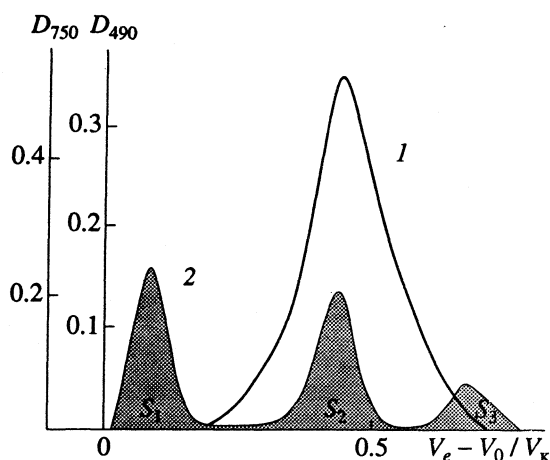


Рис. 2. Гель-хроматограмма пирогенного препарата РНК-азы после кислотного гидролиза: 1 – белок ( $D_{750}$ ); 2 – полисахарид ( $D_{490}$ ).

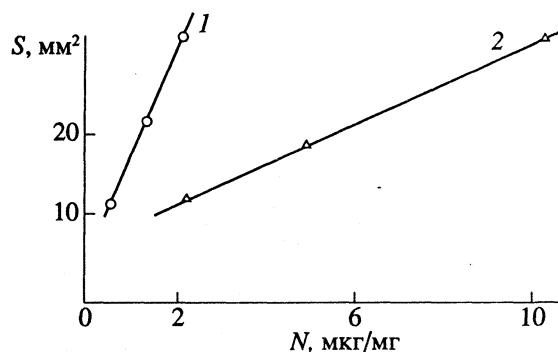


Рис. 3. Зависимости площади полисахаридного пика ( $S$ ) от количества пирогенала в смеси ( $N$ ) с РНК-азой (1) и флоримицина сульфатом (2).

Данные хроматографического метода анализа эндотоксинов для РНК-азы и флоримицина сульфата сравнивали с оценкой пирогенности по фармакопейному методу, в котором величина пирогенности характеризуется суммарным повышением температуры ( $\Delta t$ , °C) у трех кроликов (рис. 4).

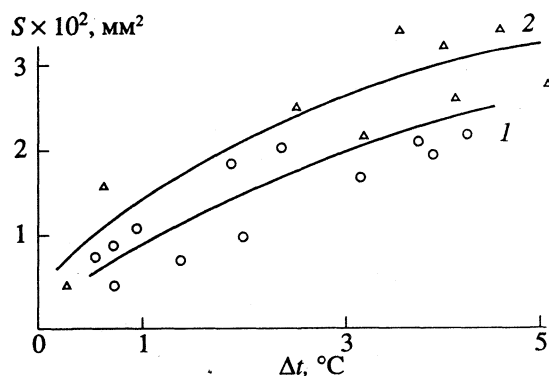


Рис. 4. Зависимости площади полисахаридного пика ( $S$ ) от суммарного повышения температуры у трех кроликов ( $\Delta t$ ) для РНК-азы (1) и флоримицина сульфата (2).

Статистический анализ зависимости  $S = f(\Delta t)$  показал (метод I), что данная функция соответствует зависимости второго порядка с коэффициентом корреляции  $R = 0.74$  для РНК-азы и  $R = 0.69$  для флоримицина сульфата (таблица). Чувствительность метода – от 1 мкг эндотоксинов в 1 мг препарата. Для сравнения в таблице представлены данные статистического анализа экспресс-метода для оценки пирогенности (метод II), разработанного нами ранее [1] по асимметрии гель-хроматографического пика  $B/A = f(\Delta t)$ .

Полученные данные позволяют рекомендовать разработанный метод для анализа эндотоксинов не только в готовых препаратах, но и на различных промежуточных стадиях технологического процесса.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глазова Н.В., Дмитриенко Л.В. и др. // Хим.-фармацевт. журн. 1991. № 12. С. 79.
2. Lowri O.H., Rosebrough N.J. et al. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265.
3. Dubois M., Gilles A., Hamilton S.R. et al. // Analyt. Chem. 1956. V. 28. P. 350.
4. Nandan R., Brown D.R. // J. Lab. Clin. Med. 1977. V. 89. P. 910.
5. Государственная фармакопея СССР. X изд. М.: Медицина, 1968. С. 953.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭНАНТИОМЕРОВ ПРОПРАНОЛОЛА  
В СЫВОРОТКЕ КРОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТВЕРДОФАЗНОЙ  
ЭКСТРАКЦИИ

© 1994 г. Т. В. Иванова, Е. В. Швачко, Д. О. Румянцев, В. Г. Белолипецкая  
Министерство здравоохранения России, Государственный научно-исследовательский центр  
профилактической медицины, Москва

Сопоставлены аналитические параметры методик анализа энантиомеров пропранолола с использованием твердофазной экстракции на Стиросорбе, на октадецильной обращенной фазе  $C_{18}$  и посредством экстракции органическим растворителем. Анализ энантиомеров проведен методом прямой стереоселективной высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке Chiralcel OD. Показана высокая степень извлечения и сохранение энантиомерного отношения пропранолола при использовании всех трех методик экстракции.

Пропранолол [1-изопропиламино-3(1-нафтокси)-2-пропанол гидрохлорид] (П) – неселективный бета-адреноблокатор, широко применяемый в кардиологии. Для определения концентрации П в биологических жидкостях используют флуориметрический метод и методы газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ГЖХ и ВЭЖХ). Общим этапом этих методов является экстракция П из биологических жидкостей, которую можно осуществлять или органическими растворителями (в частности с добавлением ион-парных реагентов [1, 2]), или путем твердофазной экстракции (ТФЭ) на колонках с различными сорбентами (амберлит XAD-2, SEP-PAK  $C_{18}$  и др.) [3, 4]. При рутинных исследованиях ТФЭ является гораздо более удобным способом обработки проб, поскольку она менее трудоемка и легко поддается автоматизации.

В клинической практике используется П, представляющий собой рацемическую смесь двух энантиомеров, из которых только S(-)-П обладает бета-блокирующей активностью [5]. В связи с этим имеет значение раздельный анализ энантиомеров П в биологическом материале. Помимо фармакодинамических особенностей, энантиомеры П имеют различную степень связывания с белками плазмы и тканей, поэтому необходимо исключить сдвиг энантиомерного отношения П на этапе извлечения П из биологического материала.

В данной работе проведен сравнительный анализ степени извлечения П при трех различных методах экстракции П из сыворотки крови: жидкостной экстракции и ТФЭ на микроколонках с отечественной твердой фазой Стиросорб, представляющей собой сферические частицы сверхсшитого полистирола размером 10 - 50 мкм, под-

вергавшиеся специальной физико-химической обработке и ТФЭ на стандартных микроколонках SEP-PAK  $C_{18}$ , содержащих силикагель с химически пришитыми октадецильными группами. Кроме того, в данной работе определяли отношения энантиомеров П после экстракции тремя указанными способами. Стереоселективный анализ проводили методом ВЭЖХ на хиральной колонке Chiralcel OD [6].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

*Приборы.* Хроматографическая система состояла из насоса модели В-100-S-2 (Ellex Laboratory, США), инжектора модели 7125 (Reodine, США), флуориметрического детектора модели GM-970 (Kratos-Schoeffel, США), интегратора модели 3390-A (Hewlett-Packard, США).

*Колонки.* Нестереоселективная аналитическая, Силасорб  $NH_2$ , 9 мкм, 250 × 4.0 мм (фирма "Элсико", Россия) и стереоселективная Chiralcel OD, 10 мкм, 250 × 4.0 мм (Daicel Chemical Industries, Япония) с предколонкой 4.6 × 50 мм, заполненной тем же сорбентом. Микроколонки со Стиросорбом собственного изготовления и SEP-PAK  $C_{18}$  (Waters, США).

*Реактивы.* n-Гептан, метанол, изопропанол (BDH, Англия), диэтиламин (MERCK, Германия) использовали без дополнительной очистки, этилацетат (Черкасский 3-д химреактивов, Россия) очищали методом дистилляции. В качестве стандарта П использовали анаприлин (Харьковский ХФЗ, Украина). Внутренним стандартом служил метопролол (МПП) (SPOFA, Чехия). Стиросорб-П с диаметром гранул 10 - 50 мкм был предоставлен М.П. Цюрупой и В.А. Даванковым (ИНЭОС РАН, Москва).



**Условия хроматографирования.** Состав подвижной фазы ВЭЖХ при работе на нестереоселективной колонке – *n*-гептан : изопропанол : метанол = 20 : 3 : 0.1 (объемные отношения), скорость подачи – 2.5 мл/мин. Состав подвижной фазы при работе на стереоселективной колонке – *n*-гептан : метанол : изопропанол = 10 : 2 : 1 (объемные отношения), скорость подачи – 1.3 мл/мин. Детектирование в обоих случаях осуществляли при длине волны возбуждения 229 нм и эмиссии с 320 нм.

**Приготовление образцов сыворотки крови.** Брали сыворотку лиц, не получавших медикаментозного лечения, и готовили образцы с концентрациями П, равными 50, 200, 600 и 1000 нг/мл.

**Жидкостная экстракция.** Брали образцы сыворотки в объеме 1.0 мл, вводили внутренний стандарт (МПР), 100 мкл КОН (1 М) и 5 мл этилацетата. Встряхивали 40 с на встряхивателе типа "Вортекс", отбирали органическую фазу и упаривали в токе воздуха при 45°C.

**Твердофазная экстракция.** Микроколонки со Стиросорбom готовили по описанной ранее методике [7]. Микроколонки, заполненные Стиросорбom или обращенной фазой C<sub>18</sub>, промывали 3 мл метанола и 10 мл бидистиллированной воды, затем вносили в микроколонки по 1.0 мл сыворотки, содержащей П, добавляли в нее 2.5 мкг внутреннего стандарта (МПР) и центрифугировали 5 - 7 мин при 500g. Далее микроколонки дважды промывали водой методом центрифугирования. Пропранолол и метопролол элюировали с микроколонок 600 мкл метанола, содержащего 0.3% диэтиламина. Полученную пробу упаривали в токе воздуха при нагревании до 45°C. Сухой остаток растворяли в 50 мкл элюента, используемого для нестереоселективной ВЭЖХ и проводили хроматографический анализ пробы, осуществляя сбор фракции элюента, содержащего П. Полученную пробу упаривали досуха в токе воздуха при 45°C и растворяли в 20 мкл элюента, используемого в стереоселективной ВЭЖХ, и анализировали на хиральной колонке. Степень извлечения П определяли при его концентрации в сыворотке 200 нг/мл, МПР – при концентрации 2500 нг/мл. Энантиомерный состав П оценивали по отношению площадей пиков S(-)-П и R(+)-П.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА

При указанных условиях хроматографирования время удерживания П на нестереоселективной колонке составляло 3.4 мин, МПР – 4.1 мин; на стереоселективной колонке время удерживания R(+)-П составляло 7.5 мин, S(-)-П – 8.6 мин. По данным, полученным в результате нестереоселективного анализа, рассчитывали степень извлечения П и МПР из сыворотки крови при различных способах экстракции. Результаты пред-

**Таблица 1.** Степень извлечения (%) пропранолола и метопролола из сыворотки крови при жидкой экстракции и твердофазной экстракции

Вещество	Жидкостная экстракция (n = 13)	Твердофазная экстракция	
		Стиросорб (n = 10)	SEP-PAK C <sub>18</sub> (n = 10)
Пропранолол (200 нг/мл)	96 ± 2	99 ± 4	94 ± 7
Метопролол (2500 нг/мл)	98 ± 3	98 ± 6	95 ± 4

**Таблица 2.** Энантиомерные отношения пропранолола (S(-)/R(+)) при различных способах экстракции

c*, нг/мл	Жидкостная экстракция	Твердофазная экстракция	
		Стиросорб	SEP-PAK C <sub>18</sub>
50	1.00 ± 0.05	0.98 ± 0.06	0.99 ± 0.05
200	1.00 ± 0.02	0.96 ± 0.05	1.00 ± 0.04
600	0.99 ± 0.01	0.95 ± 0.02	0.97 ± 0.02
1000	0.99 ± 0.2	0.95 ± 0.01	0.97 ± 0.02

ставлены в табл. 1. Данные по энантиомерному отношению П (c\* – количество S(-)- и R(+)-пропранолола) при различных способах экстракции представлены в табл. 2. Энантиомерные отношения П при всех рассмотренных способах экстракции достоверно не отличались от единицы (p < 0.05). Минимальная детектируемая концентрация суммы энантиомеров в сыворотке крови, при которой можно было с достаточной точностью определить энантиомерное отношение, составляла ~14 нг/мл (отношение сигнал : шум равно 3 : 1). Стандартная ошибка анализа (при анализе в один день) при концентрации П в сыворотке 200 нг/мл для жидкостной экстракции составила около 1.0%, для ТФЭ на Стиросорбе – 1.7% и для ТФЭ на обращенной фазе C<sub>18</sub> – 1.2%.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Из данных табл. 1 следует, что степень извлечения П при всех рассмотренных методах экстракции высока и фаза Стиросорб обеспечивает проведение анализа с достаточной точностью. Анализ энантиомерного отношения П показал, что при рассмотренных методах экстракции не происходит сдвига энантиомерного отношения на этапе извлечения П из сыворотки крови. Таким образом, сравнение метода ТФЭ на Стиросорбе с традиционными методами экстракции продемонстрировало их взаимозаменяемость. Учитывая способность Стиросорба к регенерации и его дешевизну по сравнению с используемыми ранее сорбентами [3, 4], можно говорить о преимуществах ТФЭ на Стиросорбе для проведения рутинных анализов,

так как метод удобен, воспроизводим, доступен и может быть рекомендован для анализа других лекарственных веществ и их энантиомеров. В первую очередь его можно рекомендовать для использования в анализе гидрофобных соединений, поскольку по своим адсорбционным свойствам Стиросорб близок к обращенным фазам.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Piotrovskii V.K., Belolipetskaya V.G., El'man A.R., Metelitsa V.I.* // *J. Chromatogr.* 1983. V. 279. P. 469.
2. *Belolipetskaya V.G., Piotrovskii V.K., Metelitsa V.I., Pavlinov S.A.* // *Ibid.* 1989. V. 491. P. 507.
3. *McDowall R.D., Pearce J.C., Murkitt G.S.* // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1986. V. 4. № 1. P. 3.
4. *Musch G., Massart D.L.* // *J. Chromatogr.* 1988. V. 432. P. 209.
5. *Vermeulen A.M., Belpaire F.M., Moerman E. et al.* // *Chirality.* 1992. V. 4. P. 73.
6. *Francotte E., Junker-Buchheit A.* // *J. Chromatogr.* 1992. V. 576. P. 1.
7. *Павлинов С.А., Белолипецкая В.Г., Пиотровский В.К.* // *Хим.-фармацевт. журн.* 1990. Т. 24. № 2. С. 174.

**МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

УДК 578.85/86.083.3

**ПРИМЕНЕНИЕ ТИОФИЛЬНО-АДСОРБЦИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ  
ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ  
К ГРУППОСПЕЦИФИЧЕСКОМУ АНТИГЕНУ Н (ТИП I)**

© 1994 г. Е. М. Рапопорт\*, Л. С. Жигис\*, Е. В. Власова\*, В. Е. Пискарев\*\*,  
Л. С. Хральцова\*, М. М. Ворожайкина\*, В. П. Зубов\*

*Российская академия наук*

*\*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва*

*\*\*Институт пищевых веществ, Москва*

Разработана двухстадийная схема очистки моноклональных антител IgM к группоспецифическому антигену Н (тип I) из культуральной и асцитной жидкостей с применением тиофильно-адсорбционной хроматографии на Т-геле и гель-фильтрации на TSK-геле Toyopearl HW-50. Методами электрофореза и неконкурентного иммуноферментного анализа полученных препаратов показано, что достигается высокая степень очистки при полном сохранении активности.

Исследования антигенов клеточной поверхности с помощью моноклональных антител (МА) показали, что в многостадийных процессах клеточного узнавания, адгезии и миграции важную роль играют углеводные цепи гликопротеинов и гликолипидов. Изменения в экспрессии углеводных антигенов клеточной мембраны, особенно антигенов групп крови АВО (Н), сопутствуют нормальной и патологической дифференцировке клеток [1, 2]. Среди опухолевых маркеров ряда карцином особое место занимает трисахарид Н (тип I), который входит в семейство Н-антигенов, содержащихся в эритроцитах и в слюне доноров группы крови 0. Являясь маркером злокачественной опухоли дистального отдела прямой кишки [3, 4], антиген Н (тип I) присутствует в норме только в минорных количествах на поверхности клеток эпителия проксимальных отделов желудочно-кишечного тракта [5, 6], в гроздовых клетках поджелудочной железы [7], в плазме крови группы 0 [8, 9].

Синтетические антигены по ряду причин более удобны для генерирования МА. Так, МА были получены к трисахариду Н (тип I), конъюгированному с липофилизированным полиакриламидом [10]. При этом отдельной задачей является подбор оптимальных условий для выделения МА класса IgM с минимальной потерей активности в иммуноферментном анализе (ИФА) из культуральной жидкости, если гибридные клетки выращивают *in vitro*, и из асцитной жидкости при введении гибридом в перитонеальную полость мышам линии BALB/c.

Цель данной работы – разработка простой схемы очистки МА из культуральной и асцитной жидкостей.

Традиционные методы выделения МА основаны на применении аффинной хроматографии в

сочетании с гель-фильтрацией и ионообменной хроматографией (ИОХ). Аффинная хроматография на протеин-А-сефарозе, широко применяемая при очистке МА класса IgG не используется для выделения иммуноглобулинов класса IgM вследствие отсутствия сродства IgM к протеину А. В работе [11] иммуноглобулины класса М выделяют аффинной хроматографией, используя в качестве специфического лиганда козы антитела против IgM мыши, иммобилизованные на протеин-А-сефарозе. Данный метод является достаточно дорогим и трудоемким, так как требует сначала получения протеин-А-сефарозы и антител против IgM мыши с последующей их иммобилизацией на протеин-А-сефарозе. Кроме того, в ряде работ показано, что МА, полученные к углеводным антигенам, в большинстве случаев являются низкоаффинными [12, 13]. Для выделения иммуноглобулинов класса IgG широко используется ионообменная хроматография на диэтиламиноэтил (ДЭАЭ)-целлюлозе.

Эффективный при выделении иммуноглобулинов из сыворотки кролика, лошади, морской свинки, быка и птиц, этот метод мало пригоден для очистки МА из асцитной и культуральной жидкостей мыши. В этом случае IgG прочно связывается с ионнообменником и элюируется двумя фракциями: фракция, элюирующаяся при более низкой ионной силе, содержит значительное количество трансферрина, а при более высокой ионной силе IgG элюируется одновременно с другими белками сыворотки [14]. Для получения очищенных иммуноглобулинов класса IgM обычно применяется двухстадийная хроматография на сефадексах G-25 и G-200 с последующим ультрацентрифугированием в градиенте сахарозы [14], но данный метод является достаточно трудоемким. Для очистки иммуноглобулинов широко

применяется ИОХ на S-сефарозе [15]. Однако при попытке применить этот метод для очистки иммуноглобулинов класса IgM нам не удалось получить удовлетворительных результатов, так как фракция IgM содержала большое количество сывороточного альбумина.

В данной работе мы предлагаем простой метод получения иммуноглобулинов с помощью тифильно-адсорбционной хроматографии на синтезированном нами сорбенте (Т-геле). Этот вид хроматографии для очистки иммуноглобулинов был впервые описан Дж. Поратом и в настоящее время успешно применяется для получения МА высокой степени очистки [16 - 20]. В России этот вид хроматографии для получения МА мало распространен из-за отсутствия отечественного сорбента.

Сорбент Т-гель представляет собой агарозную матрицу, активированную дивинилсульфоном, с последующей иммобилизацией производных меркаптоэтанола



где А – агарозная матрица.

Механизм связывания иммуноглобулинов с Т-гелем недостаточно изучен. Предполагается, что происходит образование комплекса белка с лигандом по нуклеофильному механизму [20]. Различие в пространственном строении белков приводит к тому, что они по-разному связываются с нуклеофилом лиганда Т-геля. Сравнение результатов хроматографии на октил-сефарозе и Т-геле показало, что на октил-сефарозе адсорбируется сывороточный альбумин, в то время как на Т-геле происходит адсорбция иммуноглобулинов, что дает возможность, комбинируя эти два сорбента, получить иммуноглобулины достаточно высокой степени очистки [17 - 20]. Кроме того, следует отметить, что Т-гель обладает довольно большой емкостью, что позволяет работать с большими количествами культуральной и асцитной жидкостей.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Подготовка препарата антител.** Культуральную или асцитную жидкость центрифугировали при скорости перемешивания 4000 об/мин в течение 5 мин, супернатант диализовали при температуре 4°C против стартового буфера, используемого при хроматографии.

**Ионообменная хроматография.** Хроматографию проводили на аналитической колонке (размером 1.4 × 25 см). Препарат антител объемом 10 мл (асцитную жидкость с концентрацией белка 24 мг/мл или культуральную жидкость с концентрацией белка 10.4 мг/мл) наносили на колонку с S-сефарозой ("Pharmacia", Швеция), уравновешенную 0.01 М Na-цитратным буфером, pH 5.5. Колонку промывали пятью объемами исходного буфера. Элюцию проводили в градиенте концентрации хлористого натрия 0 - 0.4 М в этом же буфере (общий объем градиента 240 мл). Скорость элю-

ции составляла 60 мл/ч. Фракции объемом 2 мл анализировали электрофоретически, а также методом твердофазного неконкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) на наличие специфических антител, концентрацию белка определяли по методу Лоури.

**Тифильно-адсорбционная хроматография.** Хроматографию проводили на аналитической колонке (размером 1 × 9 см). Препарат антител (культуральную жидкость объемом 10 мл, содержащую 104 мг белка, или асцитную жидкость объемом 1.6 мл, содержащую 48 мг белка и предварительно разбавленную стартовым буфером до 10 мл) наносили на колонку с Т-гелем, уравновешенную 0.05 М Na-ацетатным буфером, содержащим 1.2 М сульфата аммония, pH 5.2. Колонку промывали пятью объемами исходного буфера. Хроматографию проводили в градиенте концентрации сульфата аммония 1.2 М–0 в этом же буфере (общий объем градиента 60 мл) с последующей элюцией 0.05 М трис-HCl, pH 9 (пять объемов колонки). Скорость элюции составляла 60 мл/ч. Анализ фракций (объемом 2 мл) проводили аналогичным образом (см. выше). Фракции 5 - 6, содержащие МА, объединяли и концентрировали на мембране УМ-10 до 0.5 мл.

**Гель-фильтрация.** Хроматографию проводили на колонке (размером 0.6 × 25 см) с TSK-гелем Тоуорpearl HW-50 ("Тоуа Soda", Япония). На колонку, уравновешенную 0.01 М Na-фосфатным буфером, содержащим 0.15 М хлористого натрия (ФСБ), pH 7.2, наносили 0.5 мл концентрата фракций 5 - 6, полученных после тифильно-адсорбционной хроматографии (концентрация белка 8 мг/мл). Колонку промывали тем же буфером. Скорость элюции составляла 6 мл/ч. Полученные фракции (объемом 1 мл) анализировали аналогично (см. выше). Фракции, содержащие МА, объединяли и хранили при -70°C.

**Электрофорез.** Электрофорез фракций (ЭФ), полученных после хроматографии на S-сефарозе и Т-геле проводили в блоке полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфата натрия (ЭФ в ПААГ-ДСН в градиенте концентрации акриламида (4 - 30%) [21].

**Определение концентрации белка.** Концентрацию белка определяли по методу Лоури [22].

**Твердофазный неконкурентный иммуноферментный анализ.** Для определения титра антител в исходных образцах и полученных после очистки фракциях лунки полистиролового планшета сенсibilizировали при 37°C в течение ~12 ч 100 мкл раствора, содержащего 1 мкг синтетического антигена Н (тип I) – ПАА, представляющего собой полиакриламид, 10% амидных групп которого содержат трисахарид Н (тип I). После часовой инкубации планшета с 1%-ным раствором желатина и трехкратной промывки фосфатно-солевым буфером (ФСБ), pH 7.4, содержащим 0.5% детергента Твин-20, в лунки планшета серией двухкрат-

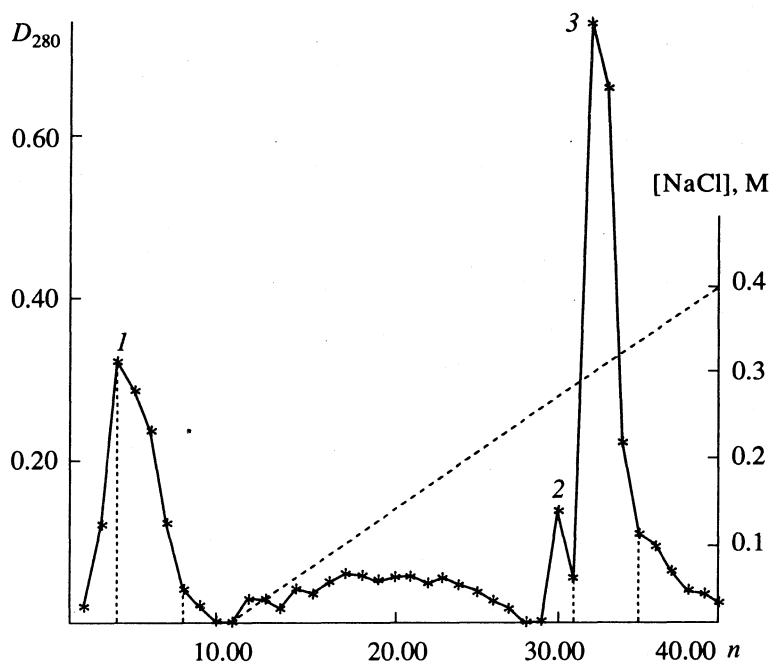
ных разведений вносили 100 мкл исследуемого раствора антител. Реакцию проводили в течение 30 мин при температуре 37°C. После второй промывки ФСБ в лунки планшета вносили 100 мкл конъюгата овечьих антител против иммуноглобулинов мыши с пероксидазой хрена. Планшет инкубировали 25 мин при той же температуре, промывали ФСБ, далее вносили раствор орто-фенилендиамина с концентрацией 4 мг/мл в 0.01 М фосфатно-цитратном буфере, рН 5.0, содержащего 0.25 об. % пероксида водорода (30%). Реакцию останавливали 50 мкл 50%-го раствора серной кислоты. Оптическую плотность опреде-

ляли при длине волны 492 нм. В качестве отрицательного контроля использовали результаты, полученные без добавления антигена и препарата антител.

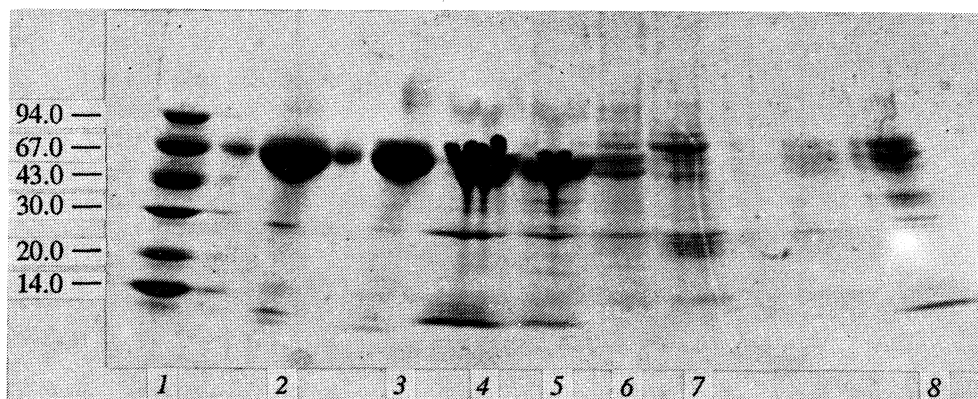
**Синтез Т-геля.** Синтез Т-геля производили по методике [16].

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На первом этапе работы нами была исследована возможность использования сочетания ИОХ на S-сефарозе и гель-фильтрации на сефакриле



**Рис. 1.** Ионобменная хроматография МА ( $n$  – номер фракции,  $D_{280}$  – оптическая плотность при 280 нм) из асцитной жидкости Н (тип I) В5 на S-сефарозе; хроматографию проводили на колонке (1.4 × 25 см) в градиенте концентрации NaCl (0 - 0.4 М) в 0.01 М Na-цитратном буфере (рН 5.5): 1 – фракция, содержащая примесные белки, 2 – фракция, содержащая сывороточный альбумин (СА), 3 – фракция, содержащая IgM и СА.



**Рис. 2.** ЭФ в ПААГ-ДСН в градиенте концентраций акриламида 4 - 30%: 1 – стандартная смесь белков с известной молекулярной массой (цифры слева); 2 – культуральная жидкость Н (тип I) С3 до хроматографии; 3 - 7 – фракции 1 - 5, полученные после хроматографии на Т-геле (рис. 3); 8 – фракция 3, полученная после хроматографии на S-сефарозе (рис. 1).

**Таблица 1.** Тиофильно-адсорбционная хроматография МА из культуральной жидкости, клон Н (тип I) С3 ( $V$  – объем фракции,  $\beta$  – выход по белку)

Образец	$V$ , мл	Концентрация белка		$\beta$ , %	Титр*
		мг/мл	мг		
Исходный	10.0	10.40	104.00	–	1 : 32
Фракция 1	30.0	2.35	70.50	67.8	–
Фракция 2	12.0	0.94	11.28	10.8	–
Фракция 3	8.0	0.72	5.76	5.5	1 : 2
Фракция 4	15.0	0.25	3.75	3.6	–
Фракция 5	4.0	0.54	2.16	2.1	1 : 32

\* Суммарный титр антител (титр антител  $\times$  объем).

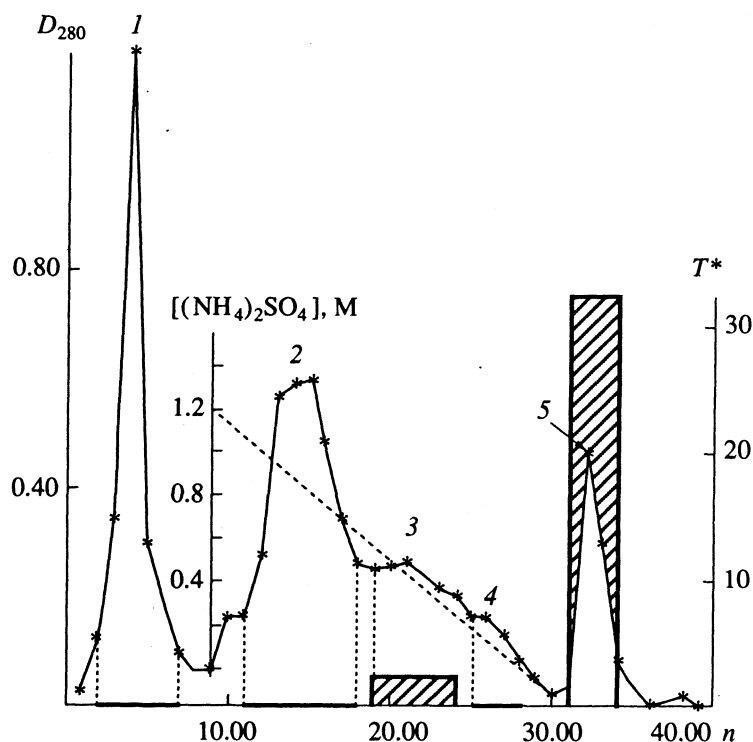
**Таблица 2.** Тиофильно-адсорбционная хроматография МА из асцитной жидкости, клон Н (тип I) В5

Образец	$V$ , мл	Концентрация белка		$\beta$ , %	Титр
		мг/мл	мг		
Исходный	1.6	30.00	48.00	–	1 : 5120
Фракция 1	43.0	0.14	6.02	12.5	–
Фракция 2	5.0	0.34	1.70	3.5	1 : 5
Фракция 3	22.0	0.15	3.30	6.8	–
Фракция 4	2.5	0.42	1.05	2.2	–
Фракция 5	2.0	0.22	1.10	2.3	1 : 250
Фракция 6	5.0	0.80	4.00	8.3	1 : 5000

S-200 для выделения МА класса IgM из асцитной и культуральной жидкостей мыши. Этот метод успешно применяется для аналитической и препаративной очистки МА класса IgG [15]. Хроматографию на S-сефарозе проводили в стандартных условиях (см. “Экспериментальную часть”). Профиль элюции приведен на рис. 1. По данным электрофореза (рис. 2) и твердофазного неконкурентного ИФА во фракции 3, содержащей IgM, наблюдается значительное количество сывороточного альбумина. Дальнейшая очистка фрак-

ции 3 гель-фильтрацией на сефакриле S-200 не привела к положительным результатам (данные не приводятся).

В связи с этим для дальнейшей очистки МА была исследована возможность применения метода тиофильно-адсорбционной хроматографии на T-геле. Этот вид хроматографии в настоящее время успешно применяется для получения МА различных классов с высокой степенью очистки [17 - 19], при этом выход IgG по иммунной активности составляет 80 - 90%, выход IgM – 60% [19].



**Рис. 3.** Тиофильно-адсорбционная хроматография МА из культуральной жидкости Н (тип I) С3 на T-геле; хроматографию проводили на колонке (1  $\times$  9 см) в градиенте концентрации сульфата аммония (1.2 М–О) в 0.05 М Na-ацетатном буфере (рН 5.2) с последующей элюцией 0.05 М трис-НСl, рН 9: 1 – фракция, содержащая СА; 2, 3, 4 – фракции, содержащие СА и примесные белки; 5 – фракция, содержащая IgM; заштрихованные области – суммарный титр в ИФА.

Хроматографию проводили в градиенте концентрации сульфата аммония 1.2 М–0 в Na-ацетатном буфере, pH 5.2, с последующей промывкой трис-НСl-буфером, pH 9, как указано в "Экспериментальной части". Результаты хроматографии представлены в табл. 1 и на рис. 3.

По данным электрофореза (рис. 2) и твердофазного неконкурентного ИФА фракция 1 содержит основное количество сывороточного альбумина, фракции 2 и 4 содержат сывороточный альбумин и примесные белки. Фракция 3 содержит альбумин, сывороточные белки, а также следовые количества иммуноглобулинов. Основное количество IgM элюируется во фракции 5. Полученные результаты свидетельствуют о том, что метод тиофильно-адсорбционной хроматографии позволяет отделить от целевого продукта 98% примесных белков при полном сохранении иммунной активности. Однако по данным ЭФ в полученном препарате иммуноглобулинов IgM (фракция 5) присутствуют низкомолекулярные примеси на уровне 16 кДа (рис. 2). Аналогичные результаты получены при очистке иммуноглобулинов класса IgM из асцитной жидкости (профиль элюции и результаты хроматографии представлены на рис. 4 и в табл. 2).

По данным ЭФ (рис. 5) и неконкурентного твердофазного ИФА (табл. 2) во фракции 1 содержится сывороточный альбумин, во фракции 2 –

Таблица 3. Выделение МА из культуральной и асцитной жидкостей (КЖ и АЖ)

Образец	V, мл	Концентрация белка		β, %	Титр
		мг/мл	мг		
метод I; КЖ; Н (тип I) С3					
Исходный	10.0	10.40	104.00	–	1 : 32
Фракция 5	4.0	0.54	2.16	2.07	1 : 32
метод II; КЖ; Н (тип I) С3					
Фракции 3 - 5	3.0	0.56	1.67	1.60	1 : 32
метод I; АЖ; Н (тип I) В5					
Исходный	1.6	30.00	48.00	–	1 : 5120
Фракции 5 - 6	10.0	0.55	5.50	10.60	1 : 5250
метод II; АЖ; Н (тип I) В5					
Фракции 3 - 5	3.0	1.28	3.85	8.00	1 : 5200

сывороточный альбумин с незначительным количеством IgM, во фракциях 3 и 4 – различные белковые примеси, во фракции 5 – IgM и IgG сыворотки мыши, в 6-ой фракции – IgM. Однако во фракциях 5 и 6 присутствуют примеси с молекулярным весом 16 кДа. Таким образом, использование тиофильно-адсорбционной хроматографии в одну стадию позволяет отделить от целевого

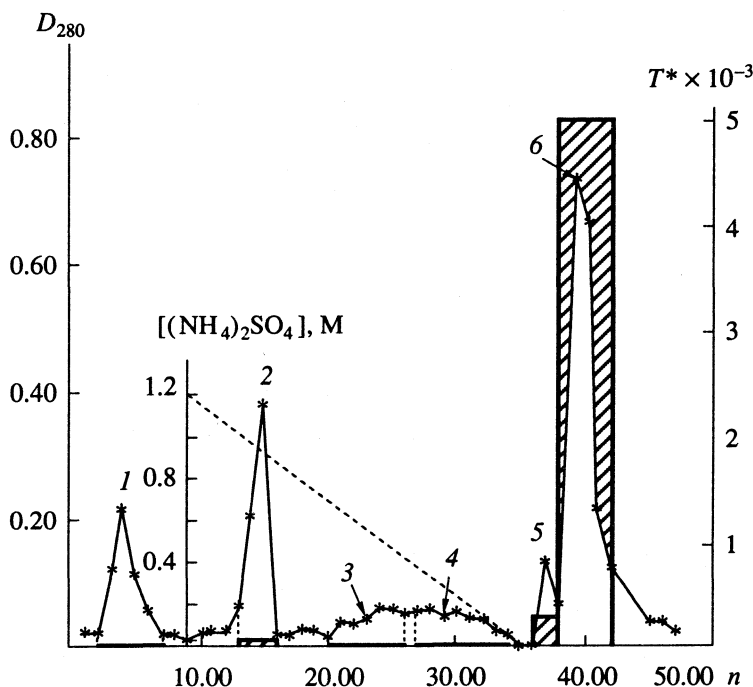


Рис. 4. Тиофильно-адсорбционная хроматография МА асцитной жидкости Н (тип I) В5 на Т-геле; хроматографию проводили на колонке (1 × 9 см) в градиенте концентрации сульфата аммония (1.2 М–0) в 0.05 М Na-ацетатном буфере (pH 5.2) с последующей элюцией 0.05 М трис-НСl, pH 9: 1, 2 – фракции, содержащие СА; 3, 4 – фракции, содержащие примесные белки; 5 – фракция, содержащая IgM и IgG сыворотки мыши; 6 – фракция, содержащая IgM; заштрихованные области – суммарный титр в ИФА.

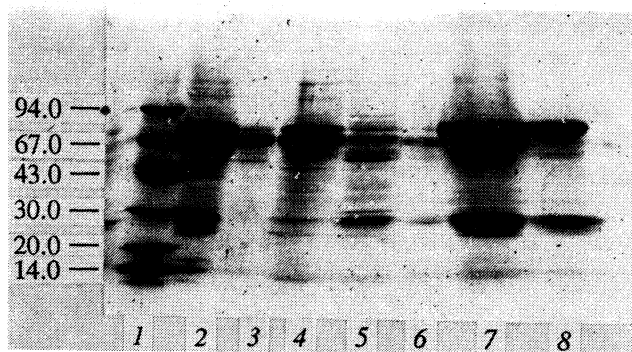


Рис. 5. ЭФ в ПААГ-ДСН в градиенте концентраций акриламида 4 - 30%: 1 - стандартная смесь белков с известной молекулярной массой (цифры слева); 2 - асцитная жидкость Н (тип I) В5 до хроматографии; 3 - 8 - фракции 1 - 6, полученные после хроматографии на Т-геле (рис. 4).

продукта 89% примесных белков при полном сохранении иммунной активности. При выделении МА из асцитной жидкости на Т-геле происходит необратимая сорбция белков (около 65% от общего количества белка, см. табл. 2). По-видимому, это можно объяснить тем, что в асцитной жидкости, в отличие от культуральной жидкости, содержится значительное количество белковых примесей, обладающих сродством к тиофильному сорбенту.

Для дальнейшей очистки полученных препаратов IgM мы проводили гель-фильтрацию на TSK-геле Тоуорепарл HW-50, как описано в "Экспериментальной части". Профиль элюции представлен на рис. 6. Результаты ЭФ приведены на

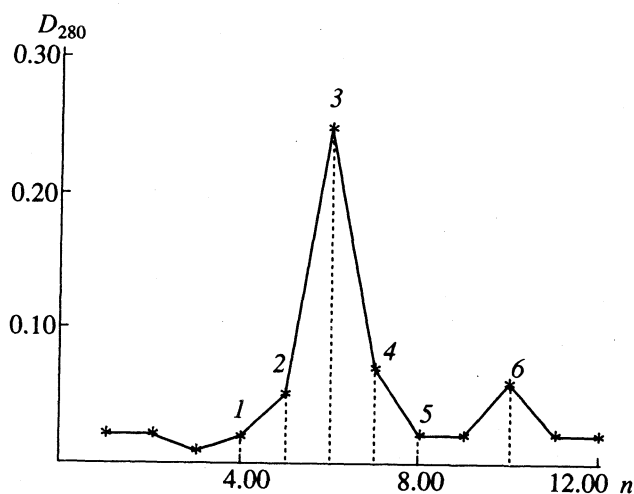


Рис. 6. Гель-фильтрация фракции, содержащей IgM (полученной при хроматографии на Т-геле) на TSK-геле Тоуорепарл HW-50; хроматографию проводили на колонке 0.6 × 25 см) в 0.01 М фосфатно-солевом буфере, рН 7.2: 3, 4, 5 - фракции, содержащие IgM, 6 - фракция, содержащая примесные белки.

рис. 7. По данным электрофореза во всех трех фракциях (фракции 3, 4, 5) наблюдается практически одинаковая картина: тяжелая (Н) и легкая (L) цепи IgM - 70 и 28 кДа и отсутствие низкомолекулярной примеси 16 кДа. Во всех трех фракциях также наблюдается еще две зоны в области 50 и 60 кДа, что можно рассматривать как агрегаты L-цепей IgM.

Сочетание тиофильно-адсорбционной хроматографии на Т-геле (метод I) и гель-фильтрации на TSK-геле Тоуорепарл HW-50 (метод II) позволяет получить МА класса IgM как из культуральной, так и из асцитной жидкостей, с высокой степенью очистки, при этом выход МА по белку из культуральной и асцитной жидкостей составляет 1.6 и 8% соответственно. Следует отметить, что полученный препарат МА характеризуется высокой иммунной активностью (по данным ИФА суммарный титр антител очищенного препарата не изменяется по сравнению с исходным, см. табл. 3).

Таким образом, были подобраны оптимальные условия очистки МА из культуральной и асцитной жидкостей, а именно, двухстадийный метод с применением: 1) тиофильно-адсорбционной хроматографии; 2) гель-фильтрации на TSK геле Тоуорепарл HW-50. Предложенный метод является достаточно простым и может быть использован для препаративного получения МА класса IgM как высокоспецифических агентов для выявления углеводных антигенов и для получения тест-систем на их основе.

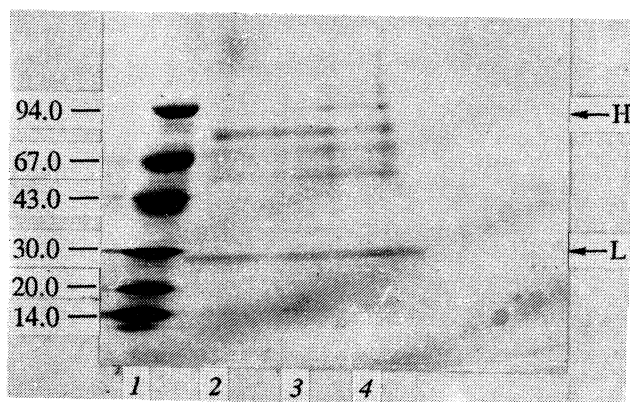


Рис. 7. ЭФ в ПААГ-ДСН в градиенте концентраций акриламида 4 - 30%: 1 - стандартная смесь белков с известной молекулярной массой (цифры слева); 2 - 4 - фракции 3 - 5, полученные после хроматографии на TSK-геле Тоуорепарл HW-50 (см. рис. 6).



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Feizi T.* // *Cancer Surv.* 1985. V. 4. № 1. P. 245.
2. *Hakomori S.* // *Annu. Rev. Immunol.* 1984. V. 2. P. 103.
3. *Косяков П.Н., Косякова Н.П.* Антигены опухолей человека. М.: Медицина, 1985. 282 с.
4. *Ruggiero F., Cooper H.S., Steplewski Z.* // *Laboratory Investigation*, 1988. V. 59. № 1. P. 96.
5. *Hakomori S.* // *Semin. Hamatol.* 1981. V. 18. P. 39.
6. *Дерюгина Е.И.* // *Успехи современной биологии.* 1990. Т. 109. № 1. С. 3.
7. *Ito N., Nisni K., Nakajima M. et al.* // *J. Histochem., Cytochem.* 1990. V. 38. № 9. P. 1331.
8. *Hanfland P., Graham H.A.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1981. V. 210. № 1. P. 383.
9. *Bernoco M., Danilovs J., Tersaki P.I. et al.* // *Vox Sang.* 1985. V. 49. P. 58 - 66.
10. *Vlasova E.V., Vorozhaykina M.M., Byramova N.E. et al.* // *Glycoconjugate J.* 1993. № 4. P. 300.
11. *Gouel S.A., Davis A.T., Arfman E. et al.* // *Hybridoma.* 1990. V. 9. № 6. P. 609.
12. *Glaudemans C.P.J., Kovac P., Rasmussen K.* // *Biochemistry.* 1984. V. 23. № 26. P. 6732.
13. *Glaudemans C.P.J., Kovac P.* // *Mol. Immunol.* 1985. V. 22. № 6. P. 651.
14. *Фримель Х.* Иммунологические методы. М.: Мир, 1979. 472 с.
15. *Separation News (Pharmacia, Sweden).* 1986. V. 13. № 5.
16. *Porath J., Maisano F., Belew M.* // *FEBS Lett.* 1985. V. 185. № 2. P. 306.
17. *Belew M., Juntti N., Larsson A., Parath J.* // *J. Immunol. Methods.* 1987. V. 102. № 1. P. 173.
18. *Hutchens T.W., Parath J.* // *Anal. Biochem.* 1986. V. 159. № 15. P. 217.
19. *Lihme A., Heegaard P.M.H.* // *Ibid.* 1991. V. 192. № 1. P. 64.
20. *Porath J., Belew M.* // *Trends Biotech.* 1987. August. V. 5. P. 225.
21. *Laemmli U.K.* // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680.
22. *Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Sarr N.J., Randall R.J.* // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. P. 265.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544.615.32+547.9

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСТРАКТОВ ПРОПОЛИСА И ПОЧЕК ТОПОЛЯ  
БАЛЬЗАМИЧЕСКОГО МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ  
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 1994 г. В. А. Куркин, В. Б. Браславский, Г. Г. Запесочная

Самарский государственный медицинский университет

Проведено сравнительное исследование компонентного состава прополиса и почек тополя бальзамического с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). На хроматограммах экстрактов данных образцов сырья идентифицированы 11 общих компонентов: пиноцембрин, пиностробин, хризин, тектохризин, апигенин, галангин, кемпферол, 2',6'-дигидрокси-4'-метоксихалкон (флавоноиды), кофейная кислота, феруловая кислота и изопентенилкофеат (гидроксикоричные кислоты). Разработана методика ВЭЖХ-анализа пиностробина в почках тополя и показана возможность использования данного метода для стандартизации прополиса.

Химический состав прополиса и почек тополя представлен богатым набором веществ – флавоноидами, гидроксикоричными кислотами, фенилпропаноидными конъюгатами и другими соединениями [1 - 13], причем оба вида лекарственного сырья близки по компонентному составу.

Широкий спектр биологической активности прополиса и почек тополя обусловлен наличием флавоноидов и гидроксикоричных кислот [12, 14, 15]. На основе этого нами были предложены спектрофотометрические методы количественного определения суммы флавоноидов и фенилпропаноидов в прополисе и почках тополя с использованием Государственного стандартного образца (ГСО) пиностробина [16, 17].

Цель данной работы – сравнительное исследование компонентного состава прополиса и почек тополя бальзамического с использованием (ВЭЖХ) высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В качестве объекта исследования служили почки тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L., семейство ивовых – Salicaceae), собранные в Самарском ботаническом саду в марте 1992 г., а также прополис, заготовленный в Оренбургской обл. (г. Сорочинск) в июне 1992 г.

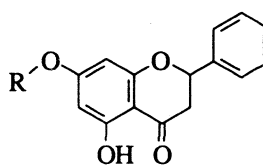
Анализ исследуемых образцов сырья проводили обращенно-фазовой ВЭЖХ на хроматографе “Милихром-4” (колонка 2 × 64 мм, “Сепарон С-18”) в градиентном и изократическом режимах. В качестве подвижной фазы использовали смесь растворителей ацетонитрил–вода (от 10 : 90 до 65 : 35) с добавлением 1%-ой уксусной кислоты. Скорость элюирования – 100 мкл/мин. Детектирование вещества осуществляли УФ-детектором при пяти длинах волн одновременно: 270, 290, 326, 340 и 360 нм. В качестве реперных веществ для иден-

тификации пиков на хроматограммах исследуемых экстрактов использовали индивидуальные соединения (I - XIV), выделенные нами ранее из почек тополя бальзамического и тополя канадского [1 - 3].

Навеску прополиса и воздушно-сухих почек тополя бальзамического экстрагировали 96%-ным этиловым спиртом в соотношении 1 : 40 при кипении в течение 45 мин и 2 мкл профильтрованного экстракта вводили в хроматограф.

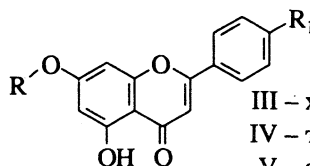
На хроматограммах ( $\tau$  – время удерживания,  $D$  – оптическая плотность) экстрактов почек тополя бальзамического (рис. 1) и прополиса (рис. 2) обнаружены 11 общих компонентов: соединения I - VIII (флавоноиды) и X - XII (гидроксикоричные кислоты). Кроме того, в почках тополя бальзамического (рис. 1) обнаружены *n*-кумаровая, изоферуловая и 3,4-диметоксихоричная кислоты (пики 1, 2 и 3 соответственно). Структурные формулы обнаруженных соединений приведены ниже:

флавононы



I – пиноцембрин: R = H,  
II – пиностробин: R = CH<sub>3</sub>;

флавоны



III – хризин: R = R<sub>1</sub> = H,  
IV – тектохризин: R<sub>1</sub> = H, R = CH<sub>3</sub>,  
V – апигенин: R = H; R<sub>1</sub> = OH;

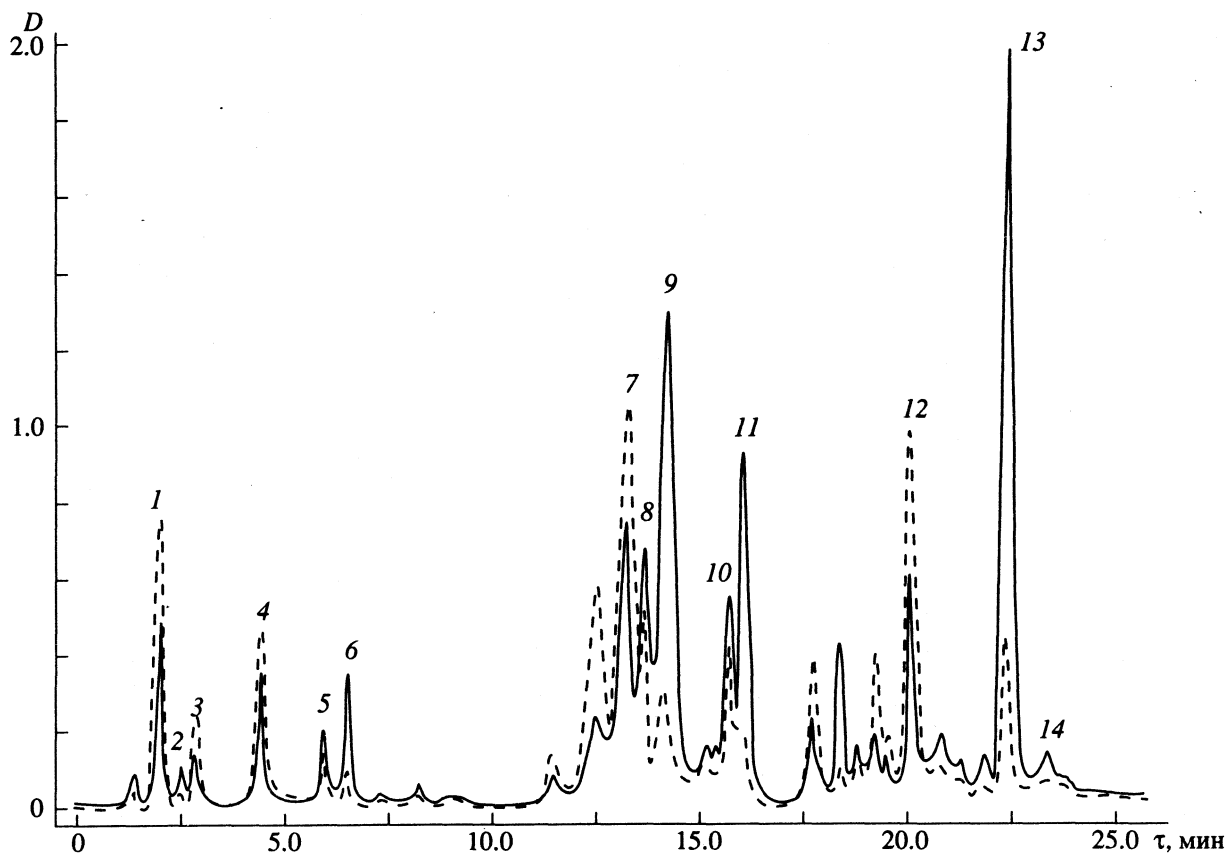
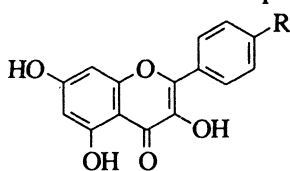


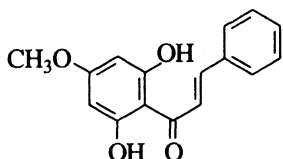
Рис. 1. ВЭЖХ-разделения компонентов экстракта почек тополя balsamicum в режимах детектирования при 290 (сплошные линии) и 326 нм (пунктирные линии): 1 - X, 2 - IX, 3 - XII + XIII, 4 - XIV, 5 - V, 6 - VII, 7 - XI, 8 - III, 9 - I, 10 - VI, 11 - неидентифицированное вещество, 12 - VIII, 13 - II, 14 - IV.

флавонолы



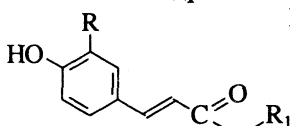
VI - галангин: R = H,  
VII - кемпферол: R = OH;

халконы

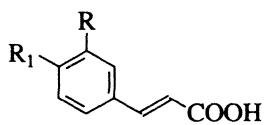


VIII - 2',6'-дигидрокси-4'-метоксихалкон;

гидроксикоричные кислоты



IX - *n*-кумаровая кислота:  
R = R<sub>1</sub> = H,  
X - кофейная кислота:  
R<sub>1</sub> = H, R = OH,  
XI - изопентенилкофеат:  
R = OH, R<sub>1</sub> = изопентенил;



XII - феруловая кислота:  
R<sub>1</sub> = OH, R = OCH<sub>3</sub>,  
XIII - изоферуловая кислота:  
R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>, R = OH,  
XIV - 3,4-диметоксикоричная кислота: R = R<sub>1</sub> = OCH<sub>3</sub>.

Следует отметить, что нами впервые обнаружены в прополисе кемпферол (VII), 2',6'-дигидрокси-4'-метоксихалкон (VIII) и изопентенилкофеат (XI). Наличие или отсутствие *n*-кумаровой и изоферуловой кислот в данном образце прополиса может быть уточнено только в результате дополнительных исследований с помощью препаративной хроматографии.

С целью разработки методики количественного определения пиностробина в почках тополя нами изучена возможность использования ВЭЖХ в изократическом режиме. При использовании элюентной смеси ацетонитрил-вода (5 : 5) с добавлением 1%-ной уксусной кислоты получено достаточное для количественного определения пиностробина разрешение пика этого компонента от других веществ. При калибровке прибора по ГСО пиностробина использовали детектирование при длине волны 290 нм. Содержание пиностробина в почках тополя balsamicum, определенное с помощью разработанной методики, составляет 5.30%.

Результаты данной работы свидетельствуют также о возможности и перспективности использования ВЭЖХ-анализа для стандартизации прополиса, однако указанная проблема требует

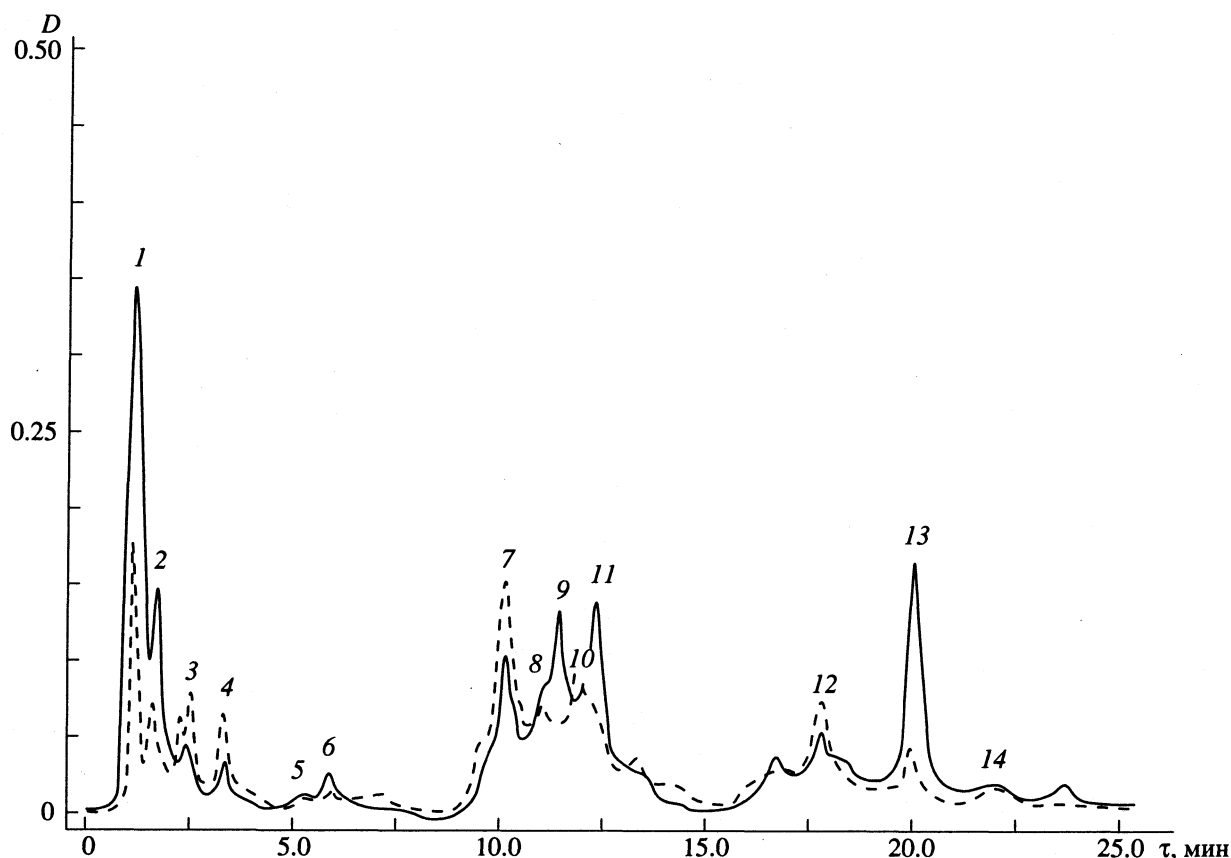


Рис. 2. ВЭЖХ-разделение компонентов экстракта прополиса в режимах детектирования при 290 (сплошные линии) и 326 нм (пунктирные линии): 1 и 2 – неидентифицированные вещества, 3 – X, 4 – XII, пики 5 – 14 – см. рис. 1.

дополнительных исследований. Это связано с тем, что химический состав прополиса как по литературным данным [6, 7 - 9, 12, 13, 15], так и по результатам собственных исследований [17] очень вариабелен и во многом определяется компонентным составом растительных источников (тополь, береза, ива).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Браславский В.Б. // Химия природных соединений. 1990. № 2. С. 272.
2. Куркин В.А., Браславский В.Б., Запесочная Г.Г., Толкачев В.О. // Там же. 1990. № 4. С. 694.
3. Куркин В.А., Браславский В.Б., Жданов И.П. // Тез. докл. республиканской научной конференции "Реализация научных достижений в практической фармации". Харьков, 1991. С. 190.
4. Левин Э.Д., Алаудинов Ш.Т., Черепанова В.Э. // Химия природных соединений. 1984. № 5. С. 567.
5. Левин Э.Д., Черепанова В.Э., Седлова Т.О. и др. // Там же. 1988. № 3. С. 351.
6. Поправко С.А., Гуревич А.И., Колосов М.Н. // Там же. 1969. № 6. С. 476.
7. Поправко С.А., Соколов И.В., Торгов И.В. // Там же. 1984. № 2. С. 152.
8. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование: Семейства Раеониaceae–Thymeliaceae. Л., 1985. 336 с.
9. Соколов И.В., Торгов И.В. // Химия природных соединений. 1989. № 3. С. 319.
10. Соколов И.В., Торгов И.В. // Там же. 1990. № 2. С. 261.
11. Соколов И.В., Торгов И.В. // Там же. 1990. № 4. С. 550.
12. Bankova V., Popov S., Mazekov N. // Intern. conf. on chemistry and biotechnology of biologically active natural products [Proc.] 1-st, Sofia. 1981. V. 3. № 1. P. 104 - 110.
13. Wollenwebez E., Asakawa Y., Schillo D. et al. // Z. Naturforsch. 1987. B. 42C. № 9/10. S. 1030.
14. Браславский В.Б., Куркин В.А., Жданов И.П. // Растительные ресурсы. 1991. Т. 27. Вып. 2. С. 77.
15. Поправко С.А., Тихомирова В.И., Вульфсон Н.С. // Ценный продукт пчеловодства – прополис. Бухарест, 1981. С. 35 - 37.
16. Браславский В.Б., Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Безрукова Н.А. // Растительные ресурсы. 1991. Т. 27. Вып. 3. С. 130.
17. Куркин В.А., Браславский В.Б., Запесочная Г.Г. // Фармация. 1992. Т. 41. № 1. С. 35.

**МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

УДК 543.544.42

**ОБРАЩЕННО-ФАЗОВАЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ  
ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ АНАЛОГОВ ЭНКЕФАЛИНА  
С ОГРАНИЧЕННОЙ КОНФОРМАЦИОННОЙ ПОДВИЖНОСТЬЮ**

© 1994 г. О. С. Веселкина, В. И. Корольков, Г. П. Власов

Российская академия наук, Институт высокомолекулярных соединений, Санкт-Петербург

Методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) исследованы сорбционные свойства циклических аналогов энкефалина с дисульфидным мостиком между вторым и пятым аминокислотными остатками, различающихся размером цикла, конфигурацией и местом положения аминокислотных остатков. При варьировании гидрофобности стационарной фазы, pH, ионной силы и количества органического модификатора в подвижной фазе, а также температуры процесса определены условия селективного разделения пептидов и термодинамические параметры сорбции. Установлена зависимость сорбционного поведения пептидов от размера цикла, изменения оптической природы аминокислотных остатков и их положения.

Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ) выступает одним из важнейших методов анализа и очистки пептидов. Обращенно-фазовые хроматографические системы включают стационарные фазы, в которых алкильные цепи различной длины химически связаны с пористой силикагелевой матрицей, и полярную водно-органическую подвижную фазу.

Сольвофобная теория разделения пептидов на неполярных фазах предполагает наличие обратимого гидрофобного взаимодействия сорбатов с сорбентом при помощи углеводородных радикалов (L) и отсутствие других видов взаимодействия. Такое сорбционное поведение может основываться как на распределительном, так и на адсорбционном процессе:

$$K = [\text{SiR-L}]/[\text{SiR}][\text{L}]. \quad (1)$$

Константа равновесия ( $K$ ) связана с термодинамическими параметрами сорбции

$$-RT \ln K = \Delta g^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ, \quad (2)$$

где  $\Delta H^\circ$  – энтальпия,  $\Delta g^\circ$  – свободная энергия,  $\Delta S^\circ$  – энтропия переноса сорбата из подвижной фазы в стационарную;  $R$  – универсальная газовая постоянная;  $T$  – температура.

Так как

$$k' = K\Phi, \quad (3)$$

где  $\Phi$  – соотношение фаз в хроматографической колонке;  $k'$  – коэффициент емкости сорбата, вычисляемый из экспериментальных данных

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

( $t_R$  и  $t_0$  – времена удерживания сорбата и несорбируемого вещества соответственно), то тогда

$$\ln k' = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \Phi. \quad (5)$$

Согласно сольвофобной теории [1 - 4], селективность разделения незащищенных пептидов на пористых алкилсиликагелях обусловлена различием площади эффективного гидрофобного контакта и может быть рассчитана на основании суммирования параметров гидрофобности боковых цепей аминокислотных остатков и концевых групп. Так, анализ более 50-ти пептидов методом ОФ ВЭЖХ подтвердил аддитивный эффект параметров гидрофобности и пропорциональное ему изменение сорбции [3].

В работе [2] отмечено, что для коротких линейных пептидов последовательность и конфигурация аминокислотных остатков слабо влияют на удерживание. Вместе с тем, в других работах [5 - 8] для пептидных позиционных изомеров и аналогов выявлены тонкие различия в селективности разделения, которые нельзя объяснить суммарным распределением гидрофобности. Подобные отклонения могут быть связаны с полярным взаимодействием между пептидом и остаточными силанольными группами сорбента, влиянием кислотного или ион-парного равновесия, изменением конформации пептида. Следовательно, закономерности сорбции пептидов на неполярных стационарных фазах могут представить информацию об изменении свойств пептидов в зависимости от изменения их строения. Такое исследование циклических аналогов энкефалина представлено в данной работе.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали хроматографическую систему фирмы "Дю-Пон" (США), включающую градиентный контролер серии 8800, дифференциальный сканирующий спектрофотометр, термостатируемый блок для хроматографической колонки и инжектора Реодайн 7125 (объем петли 20 мкл) и насос высокого давления. Регистрацию хроматограмм осуществляли компьютерным интегратором SP 4100 фирмы "Спектра-Физик" (США). Детектирование проводили при длине волны 230 нм. Скорость потока подвижной фазы составляла 1.5 мл/мин, концентрация пептидов 0.25 - 0.35 мг/мл. Для исследований использовали хроматографические колонки Зорбакс-С<sub>8</sub> и Зорбакс-С<sub>18</sub>, обе с частицами диаметром 6 мкм и размером 4.6 × 250 мм, а также колонка  $\mu$ -Бондапак-С<sub>18</sub> с диаметром частиц 5 мкм и размером 3.9 × 300 мм.

Для приготовления подвижной фазы применяли воду и ацетонитрил квалификации "для жидкостной хроматографии", ацетат аммония и уксусную кислоту марки "х. ч.". Водный буфер и ацетонитрил предварительно фильтровали через пористый мембранный фильтр (диаметр пор 0.45 мкм), продували гелием, взвешивали и затем перемешивали. Точность приготовления водно-органической подвижной фазы составляла  $\pm 0.1$  об. %.

При изучении температурной зависимости сорбции продолжительность термостатирования системы была не менее 45 мин, а точность регулируемой температуры составляла  $\pm 1$  К. В качестве  $t_0$ -маркера использовали уридинтрифосфат.

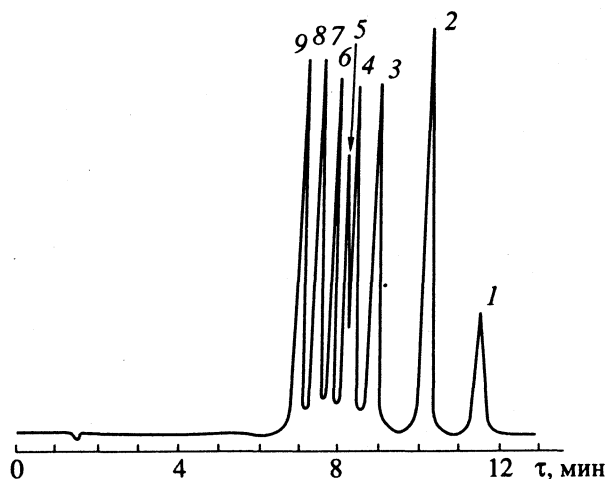
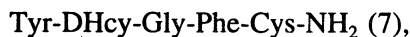
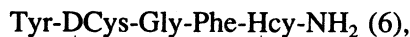
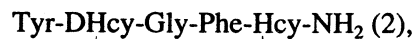


Рис. 1. Обращенно-фазовая ВЭЖХ циклических аналогов энкефалина на колонке  $\mu$ -Бондапак-С<sub>18</sub>, элюент 0.05 М ацетат аммония (рН 4.75) : ацетонитрил (87.5 : 12.5 по объему). Номера пиков соответствуют номерам пептидов, детектирование проводили при длине волны 230 нм.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе исследованы синтезированные нами ранее [9] циклические аналоги энкефалина:



Анализ зависимости величины  $k'$  и профиля элюции пептидов от концентрации ацетатаммонийного буфера в диапазоне концентраций 0.02 - 0.15 М, его рН от 3.7 до 6.0 показал, что оптимальным для достижения селективности служит 0.05 М ацетат аммония с рН  $4.75 \pm 0.25$ . Обращенно-фазовая ВЭЖХ пептидов на колонках различной гидрофобности и полноты покрытия стационарной фазы свидетельствует о лучшей селективности разделения на колонке с более гидрофобной фазой. Максимальная степень покрытия силикагелевой матрицы в колонке  $\mu$ -Бондапак-С<sub>18</sub> позволяет к тому же получить симметричные пики на хроматограмме (рис. 1).

Зависимость  $\ln k'$  от объемной доли ( $\phi$ ) ацетонитрила в подвижной фазе в диапазоне  $\phi$  от 12 до 18 об. % имеет линейный характер, который не сохраняется при  $\phi > 19$  об. % (рис. 2). Последнее отражает изменение механизма сорбции, появление наряду с гидрофобным других видов взаимодействия [10]. В интервале  $\phi$  от 12 до 17.5 об. % изучена зависимость удерживания пептидов от температуры. Такая зависимость, представленная в координатах уравнения (5), линейна (рис. 3) и показывает малую эффективность повышения температуры для увеличения селективности разделения. Изменение энтальпии при сорбции пептидов, вычисленное методом наименьших квадратов, приведено в таблице. Учитывая чрезвычайную сложность определения фазового отношения  $\Phi$  коммерческих колонок [11, 12], для расчета величин  $\Delta G^\circ$  и  $\Delta S^\circ$  мы использовали приведенное в литературе значение  $\Phi$  для колонок  $\mu$ -Бондапак-алкилфенил, равное  $\sim 0.1$  [11], далее полученные значения  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$  и  $T\Delta S^\circ$  применяли для сравнительных оценок.

Энтальпия  $\Delta H^\circ$  процесса сорбции циклических аналогов отрицательна и по абсолютной величине

превышает значение  $T\Delta S^\circ$ , что свидетельствует об определяющем влиянии изменения энтальпии при сорбции [12].

Зависимость  $\ln k'$  пептидов указанного выше строения от соответствующего для сорбции конкретного соединения значения  $\Delta H^\circ$  линейна (рис. 4). Коэффициент корреляции при этом составляет 0.961 ( $\phi = 12$  об. %), 0.922 ( $\phi = 15$  об. %) и 0.940 ( $\phi = 17.5$  об. %). Это позволяет обоснованно полагать, что механизм связывания циклических аналогов энкефалина со стационарной фазой одинаков [13].

Различия в степени гидрофобного связывания пептидов 1 - 3 и 4 - 9 может быть легко объяснено с позиций аддитивного вклада гидрофобности аминокислотных остатков, наличием в остатке гомоцистеина дополнительной  $\text{CH}_2$ -группы. Более интересен тот факт, что гидрофобное взаимодействие пептидов с сорбентом возрастает при введении в молекулу остатков D-аминокислот взамен соответствующих L-остатков. Это отчетливо видно из хроматографического поведения аналогов 3 и 1, 2, 5 и 6. Изменение конфигурации более значимо, чем изменение положения остатков в пептидной последовательности. Так, пептиды 7 и 8 практически неразличимы по сорбционным свойствам.

Изменение сорбции обычно связывают с особенностями изменения конформации молекулы пептида с изменением природы аминокислотных остатков, их конфигурации [6, 7, 14]. Автор [15] объясняет это тем, что в L-L- и D-D-изомерах остатки имеют "трансоидную" упорядоченность и "цисоидную" упорядоченность в L-D- и D-L-изомерах.

Увеличение гидрофобного связывания и, очевидно, изменение конформации наиболее значимо при замене обоих остатков в положениях 2 и 5 на соответствующие им оптические антиподы (ср. свойства пептидов 1 и 3, 4 и 8). При этом отметим, что более чувствительны замены L-аминокислот на D-аминокислоты в положении 2, со-

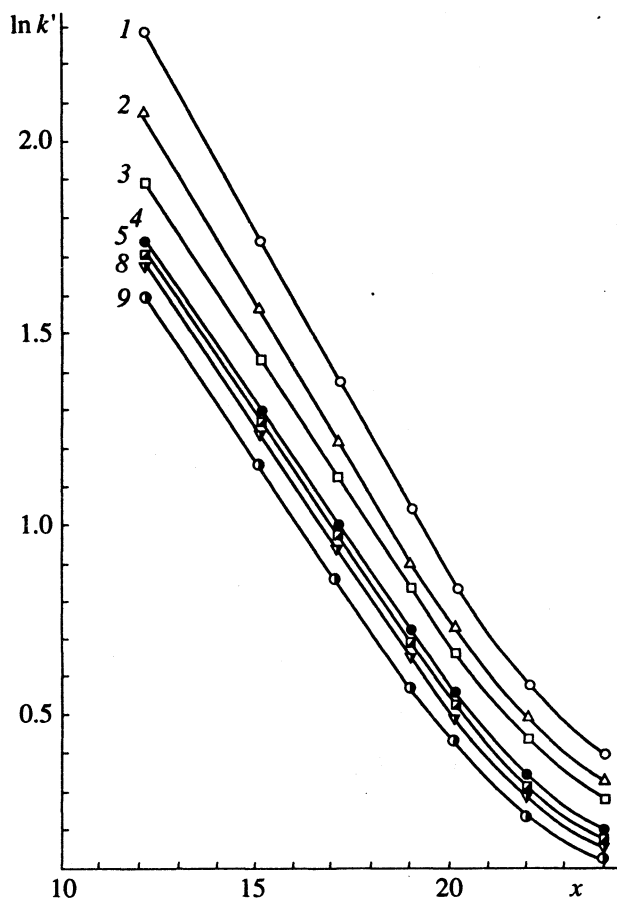


Рис. 2. Зависимости  $\ln k'$  от объемной доли ацетонитрила  $x$  в 0.05 М ацетате аммония (рН 4.75) при 298 К.

существующем с остатком тирозина. Это согласуется с опубликованным нами ранее [9] анализом спектром КД. Можно предположить, что замена L-конфигурации в положениях 2 и 5 на соответствующую D-конфигурацию снижает степень экранирования аминокислотных остатков цистеина или гомоцистеина находящимися в положениях 1 и 4 гидрофобными остатками тирозина и фенилаланина и увеличивает доступность к гидрофобному связыванию.

Термодинамические параметры процесса сорбции при 298 К ( $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta G^\circ$ ,  $T\Delta S$ , кДж/моль;  $\Delta S^\circ$ , Дж/(моль К))

Пептид	$-\Delta H^\circ$	$-\Delta G^\circ$	$-\Delta S^\circ$	$-T\Delta S^\circ$	$-\Delta H^\circ$	$-\Delta G^\circ$	$-\Delta S^\circ$	$-T\Delta S^\circ$	$-\Delta H^\circ$	$-\Delta G^\circ$	$-\Delta S^\circ$	$-T\Delta S^\circ$
	$\phi = 12$ об. %				$\phi = 15$ об. %				$\phi = 17.5$ об. %			
1	18.92	11.61	24.9	7.41	15.16	10.23	16.5	4.93	12.95	9.09	12.9	3.86
2	18.23	11.15	23.8	7.08	14.71	9.84	16.3	4.87	12.27	8.74	11.9	3.53
3	15.35	10.58	16.0	4.77	13.98	9.44	15.2	4.54	11.50	8.45	10.2	3.05
4	14.31	10.14	14.0	4.17	12.02	9.07	9.9	2.95	10.95	8.15	9.4	2.80
5	14.20	10.06	13.9	4.14	11.75	8.97	9.3	2.78	10.55	8.05	8.4	2.50
8	13.92	10.00	13.1	3.91	11.3	8.92	8.0	2.38	10.50	7.98	8.5	2.52
9	13.15	9.83	11.1	3.31	10.85	8.67	7.3	2.18	9.96	7.83	7.1	2.13

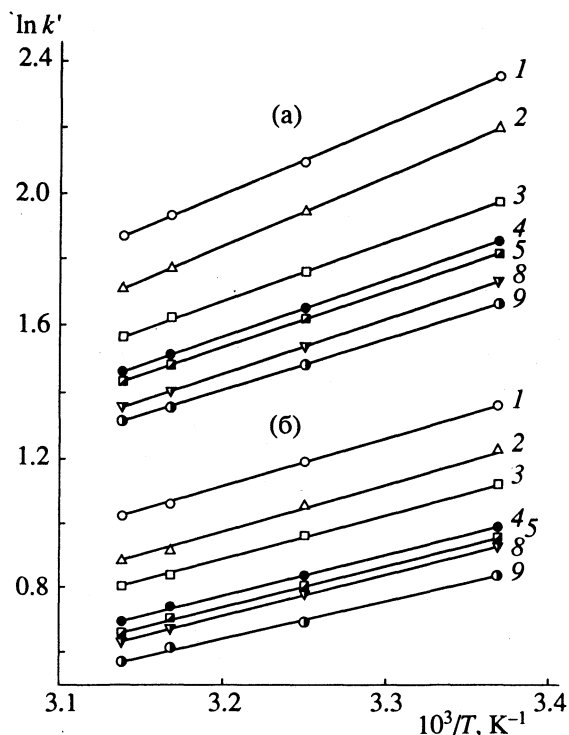


Рис. 3. Зависимости  $\ln k'$  от  $1/T$  при ОФ ВЭЖХ аналогов энкефалина при  $\phi = 12$  об. % (а) и  $\phi = 17.5$  об. % (б). Другие условия аналогичны приведенным к рис. 1.

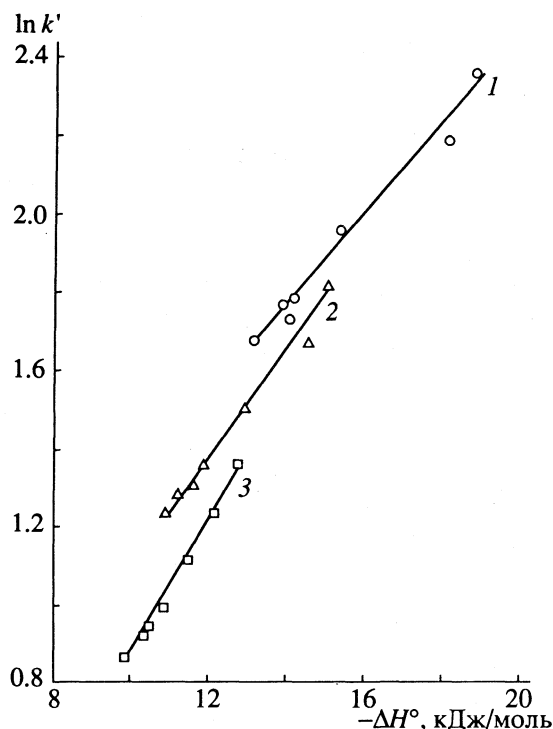


Рис. 4. Взаимосвязь величин  $\ln k'$  и  $\Delta H^\circ$  при различном содержании ацетонитрила в 0.05 М ацетатаммонийном буфере при 298 К: 1 –  $\phi = 12$ , 2 –  $\phi = 15$ , 3 –  $\phi = 17.5$  об. %.

В целом отметим, что селективность разделения изомеров положения составляет 1.1 - 1.3, диастереомеров – 1.15 - 1.33. Полученные закономерности использованы при интерпретации данных по биологической активности пептидов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Horvath Cs., Melander M., Molnar I. // J. Chromatogr. 1976. V. 125. № 1. P. 129.
2. Meek J.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 3. P. 1632.
3. Su S.-J., Grego B., Niven B., Hearn M.T.W. // J. Liq. Chromatogr. 1981. V. 4. № 10. P. 1745.
4. Hearn M.T.W., Grego B. // J. Chromatogr. 1981. V. 282. № 2. P. 541.
5. Larsen B., Viswanatha V., Cheng S.J., Hruby V.J. // J. Chromatogr. Sci. 1978. V. 16. № 1. P. 207.
6. Blevins D.D., Burke M.F., Hruby V.J., Larsen B.R. // J. Liq. Chromatogr. 1980. V. 3. № 9. P. 1299.
7. Larsen B.R., Fox B.L., Burke M.F., Hruby V.J. // Int. J. Pept. Prot. Res. 1979. V. 13. № 1. P. 12.
8. Steinauer R., Chen F.M.F., Benoiton N.L. // J. Chromatogr. 1985. V. 325. № 1. P. 111.
9. Корольков В.И., Власов Г.П., Королькова С.В. и др. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 3. С. 313.
10. Nahum A., Horvath Cs. // J. Chromatogr. 1981. V. 203. № 1. P. 53.
11. Hancock W.S., Knighton D.R., Napier Y., Harding D.R.K. // Ibid. 1986. V. 367. № 1. P. 1.
12. Cole L.A., Dorsey J.R. // Anal. Chem. 1991. V. 64. № 13. P. 1377.
13. Melander W., Campbell D.E., Horvaatj Cs. // J. Chromatogr. 1978. V. 158. № 1. P. 215.
14. Hruby V.J., Deb K.K., Spatola A.F., Upson D.A. // J. Amer. Chem. Soc. 1979. V. 101. № 1. P. 202.
15. Hearn M.T.W. // High Performance Liquid Chromatography. Advances and Perspectives / Ed by Cs. Horvath. Academic Press. N.Y.; L., 1983. P. 320.



МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 615.210.017:547.94

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ АЛКАЛОИДОВ  
ГРУППЫ ТРОПАНА

© 1994 г. Е. В. Серегина, А. Х. Лайпанов, В. Э. Сланский, И. А. Воронин

Ярославский медицинский институт

Изучено хроматографическое поведение основных алкалоидов группы тропана и экгонина в системах обращенных фаз. Определена оптимальная хроматографическая система на основе времен удерживания, коэффициентов емкости веществ и эффективности колонки. Разработана методика качественного анализа исследуемых веществ, основанная на определении основных хроматографических параметров: времени удерживания, относительного времени удерживания и интегральных спектральных отношений. Показано, что предлагаемая методика высокоселективна и может быть использована в фармацевтическом и химико-токсикологическом анализе.

К алкалоидам группы тропана относятся тропиногового эфира *d,L*-троповой кислоты сульфат (атропин, I), тропиногового эфира миндальной кислоты гидробромид (гоматропин, II), тропиногового эфира дифенилуксусной кислоты гидрохлорид (тропацин, III), скопиногового эфира *L*-троповой кислоты гидробромид (скополамин, IV), тропиногового эфира  $\alpha$ -фенил- $\beta$ -(*n*-ацетоксифенил)пропионовой кислоты гидрохлорид (тропафен, V); к группе экгонина – метилового эфира бензоилэксгонина гидрохлорид (кокаин, VI).

Актуальной задачей является дальнейшее совершенствование методов качественного и количественного анализа указанных выше лекарственных веществ как в субстанции, так и в объектах химико-токсикологического характера. Известны работы по применению метода ион-парной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании с переключением колонок и использованием системы с тремя насосами для разделения алкалоидов тропана [1]. Показана эффективность введения алкилсульфонатов в подвижную фазу при хроматографировании алкалоидов как в нормально-, так и в обращенно-фазовом варианте [2, 3].

В последнее время многие исследования посвящены оптимизации хроматографических процессов. Предложен метод оптимизации разделения производных троповой кислоты на силикагеле, ковалентно связанном с (R)-N-(3,5-динитробензил)-фенил-глицином (5 мкм) [4]. Областью интенсивных исследований является разработка унифицированных методик анализа различных групп фармацевтических препаратов, в число которых входят и изучаемые вещества [5, 6]. Как показано в ранее опубликованных работах, оптимальные условия могут быть прогнозированы из информации о таких основных хроматографических параметрах как относительное время удерживания, коэффициент емкости и интегральные спектральные отношения по каждому веществу [7, 8].

Цель данной работы – изучение хроматографического поведения алкалоидных препаратов и разработка универсальной, чувствительной методики их идентификации при совместном присутствии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работу выполняли на жидкостном микроколочном хроматографе отечественного производства “Милихром-4”, оснащенном УФ-спектрофотометрическим детектором с переменной длиной волны. Аналитическая система включала использование стальной колонки размером

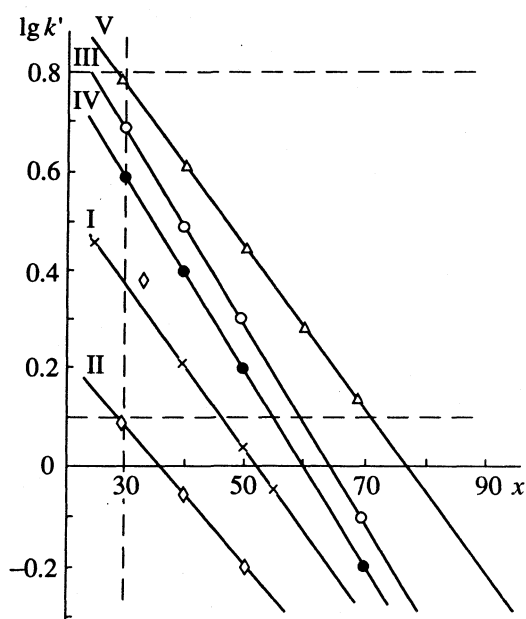


Рис. 1. Зависимости коэффициента емкости от содержания органического модификатора в системе (x, мол. % – содержание ацетонитрила в подвижной фазе).

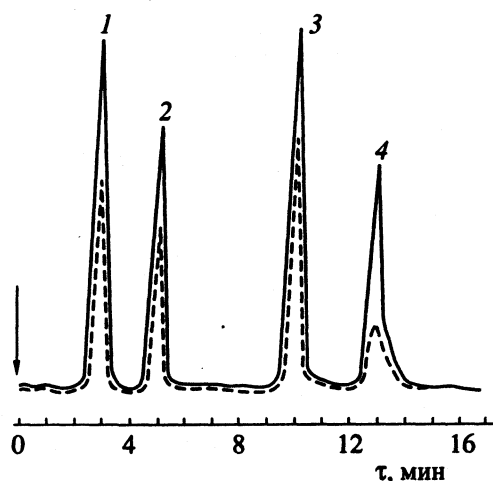


Рис. 2. Хроматограмма модельной смеси алкалоидов, производных тропана, в режиме изократического элюирования и двухканальной регистрации пиков: 1 - II, 2 - I, 3 - III, 4 - VI.

80 × 2 мм, заполненной обращенно-фазовым сорбентом "Сепарон C<sub>18</sub>" (5 мкм). С целью повышения воспроизводимости результатов и снижения вязкости растворителя использовали термостатирование колонки при 35°C. Обработку результатов анализа проводили с помощью IBM "Pyramid systems", с использованием программы "Chrom" и "SuperCalc4 (tm)".

В эксперименте использовали препараты I - VI, соответствующие Государственной фармакопее X издания, ацетонитрил квалификации "для хроматографии", калия дегидрофосфат (KН<sub>2</sub>РO<sub>4</sub>) и фосфорную кислоту марки "х. ч.". Растворы готовили в фосфатном буфере с рН 3.5 до получения

концентраций 4 мг/мл для соединений I, VI и 2.5 мг/мл для соединений II, III, IV. Детектирование проводили при длине волны 220 нм.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

С целью выявления закономерностей хроматографического поведения алкалоидов группы тропана и экгонины изучали влияние изменения состава подвижной фазы на величину параметров: коэффициента емкости и эффективность по каждому веществу. График зависимости коэффициента емкости ( $k'$ ) соединений от содержания органического модификатора в подвижной фазе (в логарифмическом виде) представлен на рис. 1. Как следует из графика, оптимальное разделение исследуемых веществ можно прогнозировать в подвижной фазе ацетонитрил-фосфатный буфер с рН 3.5 (25 : 75).

На рис. 2 показано разделение модельной смеси алкалоидов (I, II, III, VI) с использованием оптимальной подвижной фазы в режиме двухволновой детекции при 196 и 220 нм с опорной длиной волны 220 нм.

Сокращение времени анализа достигнуто при использовании режима ступенчатого градиента, создаваемого путем последовательного элюирования пробы приведенной выше системой с содержанием ацетонитрила 20 об. % (900 мкл) и 35 об. % (600 мкл). В результате оптимизации получили разделение модельной смеси, представленное на рис. 3. Из рисунка видно, что разделение всех пар пиков вполне удовлетворительное, это позволяет проводить качественный и количественный анализ исследуемых соединений.

Идентификацию изучаемых соединений проводили на основе сочетания хроматографических

Результаты идентификации исследуемых препаратов ( $X$ ,  $S$ ,  $S_x$  - метрологические характеристики: среднее значение, стандартное отклонение, стандартное отклонение среднего значения)

Препарат	$T$			$k$			$D_{220}/D_{196}$		
	$X$	$S$	$S_x$	$X$	$S$	$S_x$	$X$	$S$	$S_x$
Изократическое элюирование									
Атропин	5.154	0.049	0.022	2.607	0.034	0.015	0.036	0.001	0.0003
Гоматропин	2.578	0.030	0.014	0.804	0.021	0.009	0.395	0.005	0.003
Скополамин	2.422	0.030	0.013	0.697	0.021	0.010	0.386	0.002	0.001
Тропацин	10.038	0.085	0.038	6.025	0.059	0.027	0.438	0.004	0.002
Кокаин	12.997	0.101	0.045	7.955	2.285	0.127	0.468	0.007	0.003
Градиентное элюирование									
Атропин	5.384	0.068	0.030	2.767	0.047	0.021	0.047	0.001	0.001
Гоматропин	2.833	0.066	0.030	0.983	0.046	0.021	0.419	0.008	0.004
Скополамин	2.747	0.034	0.015	0.922	0.024	0.011	0.402	0.008	0.003
Тропацин	7.582	0.119	0.053	4.306	0.086	0.037	0.455	0.005	0.002
Кокаин	11.660	0.119	0.089	7.160	0.140	0.062	0.540	0.008	0.004

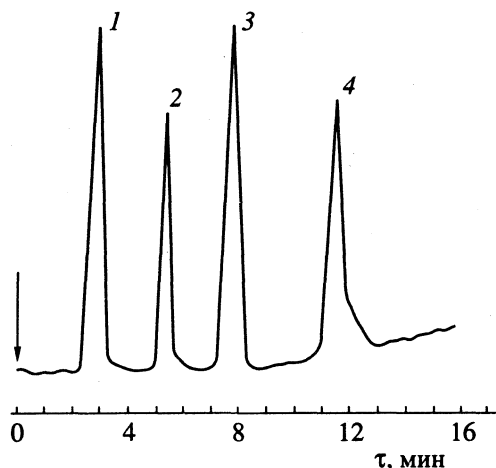


Рис. 3. Хроматограмма модельной смеси в режиме ступенчатого градиента: 1 – II, 2 – I, 3 – III, 4 – VI.

и оптических параметров (время удерживания, коэффициент емкости и спектральные отношения), что обеспечивает высокую точность и достоверность результатов. Использовался режим двухволновой детекции при 220 и 196 нм с опорной длиной волны 220 нм. Как видно из приведенных в таблице результатов, воспроизводимость определения качественных параметров в градиентном режиме ниже, чем в изократическом (ошибка не превышает 3.0 и 2.0% соответствен-

но), что связано с повышенной неустойчивостью базовой линии.

Результаты идентификации препаратов в субстанции и модельных смесях в указанных выше условиях находятся в пределах стандартных отклонений параметров (времени удерживания, коэффициента емкости, спектральных характеристик). Таким образом, применение совокупности основных хроматографических критериев значительно повышает достоверность идентификации изучаемых препаратов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Toshiyuki I., Kazuhiko S., Fusayoshi H. et al. // J. Chromatogr. 1991. V. 547. № 1/2. P. 175.
2. He Li-Yi, Zhang Guan-De, Tong Yu-Yi et al. // Ibid. 1989. V. 481. № 4. P. 428.
3. Toshiyuki O., Kazuhiko S., Tong Yu-Yi et al. // Chem. and Pharm. Bull. 1989. V. 37. № 9. P. 2456.
4. Арзамасцев А.В., Никуличев Д.Б., Попов Д.М., Соколов А.В. // Хим.-фармацевт. журн. 1989. Т. 23. № 4. С. 486.
5. Eigendorf H.G., Budde R., Moschwitz G., Konig H. // Pharmazie. 1990. V. 45. № 3. P. 219.
6. Mandal S., Nagvi A.A., Thakur R.S. // J. Chromatogr. 1991. V. 547. № 1/2. P. 468.
7. Baker J.K., Skelton R.E., Ma Ch-Y. // Ibid. 1979. V. 168. № 2. P. 417.
8. Лайпанов А.Х., Сланский В.Э. // Фармация. 1991. № 1. С. 28.

## МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544

### БЫСТРЫЙ СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЖИРОРАСТВОРИМЫХ ВИТАМИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

© 1994 г. Л. М. Якушина, А. Г. Таранова

Российская академия медицинских наук, Институт питания, Москва

Предложен быстрый способ одновременного определения ряда жирорастворимых витаминов в сыворотке крови человека с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Используются последовательно соединенные два детектора – спектрофотометр для определения каротина и каротиноидов и спектрофлуориметр с программируемой сменой длин волн для определения ретинола, токоферолов и их эфиров.

Для оценки обеспеченности человека необходимыми витаминами, а также их биологической усвояемости необходимы надежные, чувствительные и быстрые методы определения витаминов в биологических жидкостях. В связи с этим весьма заманчивой является возможность одновременного определения в одной пробе крови таких витаминов, как ретинол, токоферолы, их эфиры, каротин и каротиноиды. Сложность одновременного определения этих жирорастворимых витаминов определяется с одной стороны различием их спектральных свойств (необходимостью детектировать их при различных длинах волн – от 292 до 450 нм), с другой – селективностью разделяющей системы. Например, ретинилпальмитат элюируется одновременно с  $\beta$ -каротином, ряд каротиноидов – одновременно с ретинолом, токоферолами и их эфирами.

Для решения указанной проблемы предлагается использование нескольких параллельно соединенных колонок, работающих в различных режимах – оптимальных для каждого определяемого витамина, и нескольких детекторов [1, 2]. Другой способ, описанный нами ранее [3, 4], предполагает наличие одного детектора с программируемой сменой длин волн и одной колонки. Однако пробу необходимо было анализировать дважды – один раз для определения каротина и каротиноидов при 450 нм, второй раз – для определения остальных жирорастворимых витаминов при программируемой смене длин волн.

В данной работе усовершенствован предложенный нами ранее метод, что позволяет проводить одновременное определение ретинола, токоферолов, их эфиров, а также  $\beta$ -каротина и каротиноидов из одного образца сыворотки крови за один прием и намного увеличивает производительность анализов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

*Приготовление проб.* К 200 мкл сыворотки в стеклянной пробирке с пробкой добавляли 200 мкл спиртового раствора токоферилацетата (внутренний стандарт), встряхивали в течение 30 с и добавляли 200 мкл гексана. Пробирки встряхивали на встряхивателе типа “Вортекс” в течение 15 мин и центрифугировали 10 мин со скоростью вращения 3000 об/мин. Гексановый экстракт в количестве 120 мкл переносили в пробирку Эппендорфа емкостью 1.5 мл и упаривали досуха в токе азота.

Время удерживания витаминов ( $t$ , мин) в зависимости от состава элюента и типа колонки

Витамины	I	II	III
Ретинол	3.2	4.5	3.8
$\gamma$ -Токоферол	4.9	8.6	6.8
$\beta$ -Токоферол	5.7	9.4	7.5
$\alpha$ -Токоферол	6.6	10.5	8.4
Токоферилацетат	8.9	12.6	9.4
Ретинилпальмитат	–	–	20.6
Лютеин	4.1	5.5	4.7
Зеаксантин	4.6	5.7	5.0
Криптоксантин	9.0	10.8	9.0
Ликопин	20.0	14.0	12.5
$\alpha$ -Каротин	21.3	21.5	16.7
$\beta$ -Каротин	22.7	23.0	18.0

Примечание. I – стеклянная колонка (300 × 3 мм), SEPARON SGX C 18 (TESSEK Ltd., Прага), 7 мкм; элюент –  $\text{CH}_3\text{OH} : \text{CHCl}_3$  (95 : 5); II – стальная колонка (250 × 4.6 мм), SEPARON SGX C 18 (TESSEK Ltd., Прага), 5 мкм; элюент –  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{CH}_3\text{OH} : \text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 : 40 : 10); III – стальная колонка (150 × 4 мм), Nucleosil C 18, 5 мкм (фирма “ЭЛСИКО”); элюент –  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{CH}_3\text{OH} : \text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 : 45 : 5). Указаны объемные соотношения компонентов в элюентах.

Остаток перерастворяли в 20 мкл хлористого метилена и затем добавляли 100 мкл смеси метанол : ацетонитрил (1 : 1), 50 мкл раствора вводили на колонку хроматографа.

**Хроматографические условия.** Для анализа использовали хроматографическую систему (фирма "JASCO", Япония), включающую насос 880-PU; спектрофотометр 870-UV и спектрофлуориметр 821-FP с программируемой сменой длин волн; металлическую колонку (150 × 4 мм) с сорбентом Nucleosil C 18, 5 мкм (фирма "ЭЛСИКО"); элюент – ацетонитрил : метанол : хлористый метилен (50 : 45 : 5), расход элюента 0.6 мл/мин; два интегратора (Shimadzu C-R6A); объем дозирующей петли 50 мкл. Детектирование проводили при следующих условиях: спектрофотометр 870-UV –  $\lambda = 450$  нм (определение каротиноидов); спектрофлуориметр 821-FP – начальные длины волн  $\lambda_{ex} = 325$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм (определение ретинола), через 5 мин смена длин волн на  $\lambda_{ex} = 295$  нм,  $\lambda_{em} = 330$  нм (определение  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -токоферолов и токоферилацетата), через 15 мин после начала анализа следующая смена длин волн на  $\lambda_{ex} = 325$  нм,  $\lambda_{em} = 480$  нм (определение ретинилпальмитата).

Идентификацию пиков проводили, сравнивая времена их удерживания и спектральные отношения с временами удерживания и спектральными отношениями растворов соответствующих стандартов (фирмы – "Serva", "Hoffman-La Roche", "Sigma"). Количественный расчет проводили с помощью внутреннего стандарта.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Одновременное определение жирорастворимых витаминов можно проводить как в нормально-, так и обращенно-фазовых условиях [1 - 5]. Использование нормально-фазовых условий анализа может привести к завышению значений концентрации  $\beta$ -каротина, так как он в этих условиях элюируется с колонки близко к мертвому объему. Однако в этих условиях достаточно проста процедура подготовки образца к анализу, которая сводится к депротейнизации метанолом и экстракции жирорастворимых витаминов гексаном. Использование нормально-фазовых условий позволяет вводить гексановый экстракт непосредственно на хроматографическую колонку.

В данной работе для количественного определения каротина и определения остальных жирорастворимых витаминов были выбраны условия неводной обращенно-фазовой хроматографии. В таблице приведены времена удерживания жирорастворимых витаминов в зависимости от состава элюента и типа колонки. В обращенно-фазовых условиях порядок выхода витаминов с колонки меняется в зависимости от используемого элюента и от типа колонки; время удерживания

$\beta$ -каротина составляет 16 - 23 мин. Однако в этих условиях, как указывалось выше, после экстракции жирорастворимых витаминов гексаном, экстракт необходимо упарить в токе азота полностью и перерастворить в элюенте для проведения хроматографического анализа. Для получения количественных результатов в этом случае необходимо использовать внутренний стандарт для

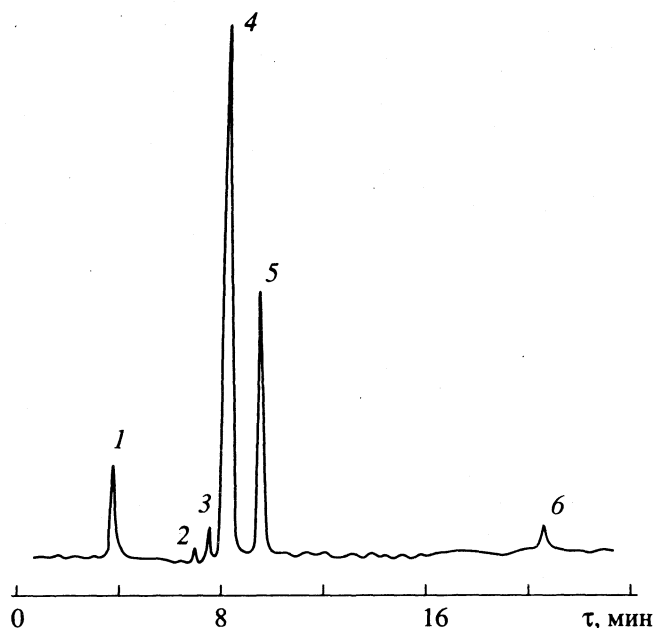


Рис. 1. Хроматограмма жирорастворимых витаминов сыворотки крови человека: 1 – ретинол, 2 –  $\gamma$ -токоферол, 3 –  $\beta$ -токоферол, 4 –  $\alpha$ -токоферол, 5 – токоферилацетат, 6 – ретинилпальмитат.

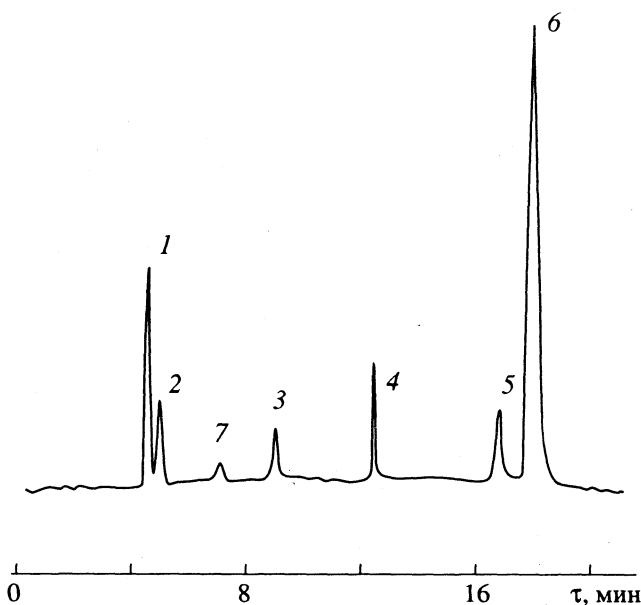


Рис. 2. Хроматограмма каротиноидов сыворотки крови человека: 1 – лютеин, 2 – зеаксантин, 3 – криптоксантин, 4 – ликопин, 5 –  $\alpha$ -каротин, 6 –  $\beta$ -каротин, 7 – неидентифицированный каротиноид.

коррекции потерь, неизбежных при такой обработке пробы.

Были проведены исследования по подбору внутреннего стандарта и оптимальных условий, позволяющих разделять все анализируемые компоненты. В качестве внутреннего стандарта был использован токоферилацетат. На рис. 1 и 2 приведены типичные хроматограммы жирорастворимых витаминов сыворотки крови человека. Видно, что нам удалось получить хорошее разделение ряда основных каротиноидов, а также ретинола, токоферолов и их эфиров. Метод был использован при проведении массовых обследований витаминного статуса населения и при оценке биодоступности различных препаратов  $\beta$ -каротина.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vuilleumier J.-P., Keller H.E. Gysel D. et al. // Internat. J. Vit. Nutr. Res. 1983. V. 53. P. 265.*
2. *Abe K., Kusuba K., Mukasa K. et al. // Bunseki Kagaku. 1984. V. 33. P. E309.*
3. *Якушина Л.М., Бекетова Н.А., Бендер Е.Д., Харитончик Л.А. // Вопросы питания. 1993. № 1. С. 43.*
4. *Якушина Л.М., Харитончик Л.А., Бендер Е.Д. // Там же. 1993. № 3. С. 51.*
5. *Khachik F., Beecher G.R., Goli M.B. et al. // Pure & Appl. Chem. 1991. V. 63. P. 71.*

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

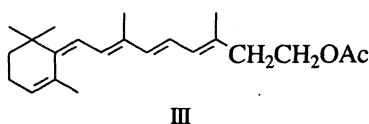
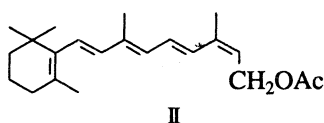
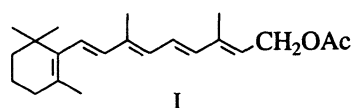
УДК 543.544

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗОМЕРОВ РЕТИНИЛАЦЕТАТА  
ПРИ МНГОВОЛНОВОМ РЕЖИМЕ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ

© 1994 г. Е. И. Финкельштейн, С. Н. Морев, М. Н. Ефремова, И. С. Краснокутская  
Научно-производственное объединение "Витамины", Москва

Показана возможность идентификации и количественного определения компонентов анализируемого образца методом компьютерной обработки хроматограмм, снятых в режиме детектирования при нескольких длинах волн. На примере анализа технического ретинилацетата продемонстрирована высокая надежность получаемых результатов.

Технический ретинилацетат (ацетат витамина А), выпускаемый промышленностью и используемый при получении витаминных препаратов для животноводства, помимо основного компонента – полностью *транс*-изомера (I) – может содержать также заметные количества других изомеров, в частности, 13-*цис*- (II) и ретроретинилацетата (III):



В соответствии с существующими стандартами, анализ этого технического продукта проводится спектрофотометрическим методом, который не позволяет определять соотношение изомеров в их смеси и, как правило, приводит к получению завышенных данных о содержании наиболее физиологически активного полностью *транс*-изомера.

В данной работе проведены хроматографическое разделение перечисленных изомеров ретинилацетата, содержащихся в техническом витамине А, их идентификация и количественное определение как в техническом продукте, так и в его масляных растворах. Хроматографическое разделение проводили на приборах "Миличром-1" и "Бекман 344" на колонках с SiO<sub>2</sub>. Детектирование осуществляли при различных длинах волн в диапазоне от 250 до 390 нм. Для регистрации и количественной обработки хроматограмм, получаемых на "Миличроме-1", использовали про-

граммное обеспечение "МультиХром". Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре "Specord M40", управляемом компьютером типа IBM AT 286 по программе "Specord".

Идентификацию изомеров проводили по их спектрам поглощения, построенным по хроматографическим данным с помощью специальной компьютерной программы. Эта программа с высокой точностью реконструирует непрерывный спектр по нескольким экспериментальным точкам. В качестве таких точек использовали значения площадей (или высот) пиков, полученных в режиме детектирования при различных длинах волн. На рис. 1 приведены полученные таким образом спектры изомеров I - III, а на рис. 2 рассчитанный спектр изомера I сопоставлен с его спектром, снятым на спектрофотометре. Данные,

Таблица 1. Значения максимумов в электронных спектрах поглощения, нм

Изомер	Расчет	Эксперимент
I	327	326 [1]
II	329	328 [1]
III	333 (плечо); 348.6; 367.7	333; 348; 367 [2]

Таблица 2. Содержание геометрических изомеров ретинилацетата (мг/м) в образцах масляного концентрата витамина А

ВЭЖХ			Спектрофотометрия
I	II	III	I
70.4 ± 3.4	18.9 ± 0.8	14.9 ± 1.0	80.5
80.8 ± 1.2	16.0 ± 0.4	16.0 ± 0.2	90.1
78.0 ± 3.5	13.0 ± 0.9	7.8 ± 0.5	82.2
77.4 ± 3.6	15.1 ± 0.7	15.5 ± 0.7	81.9

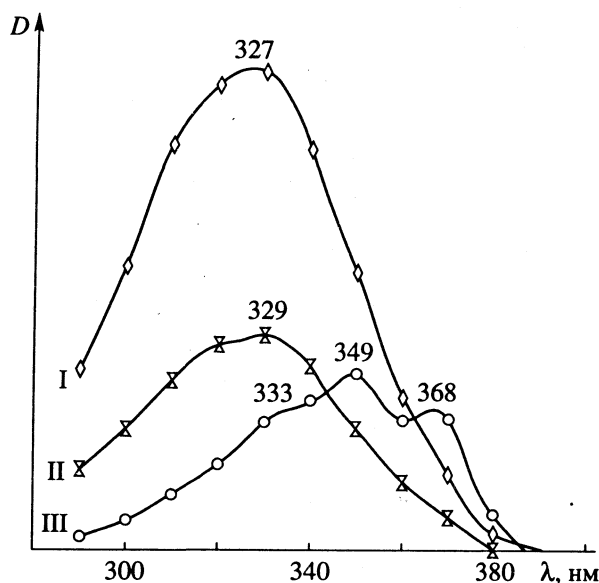


Рис. 1. Спектры изомеров I - III, построенные по хроматографическим данным: точки - экспериментальные данные (площади пиков), кривые - расчет. Масштаб по оси ординат - произвольный.

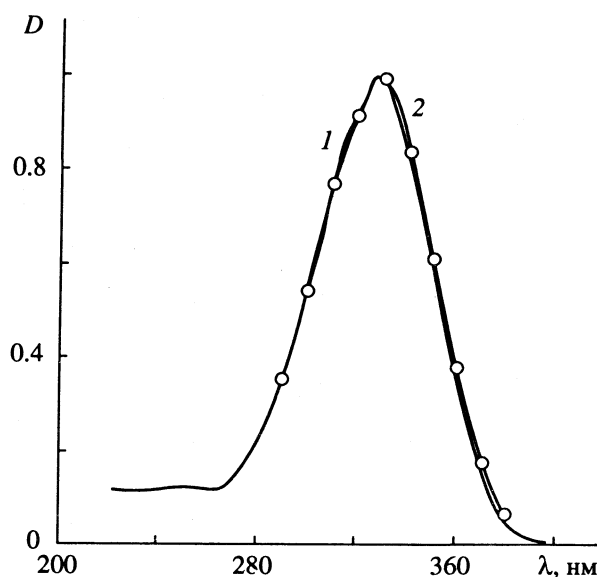


Рис. 2. Нормированные спектры изомера I: 1 - снят на спектрофотометре; 2 - рассчитан по хроматографическим данным (точки).

приведенные на рис. 1 и 2, а также в табл. 1, свидетельствуют о высокой надежности использованного метода. Незначительное (1 - 2 нм) расхождение расчетной и экспериментальной спектральных линий (рис. 2) может быть обусловлено погрешностью установки длины волны на детекторе хроматографа.

Для количественного определения изомеров использовали сочетание методов абсолютной калибровки и внутреннего стандарта.

Абсолютную калибровку проводили по полностью *транс*-изомеру I, который служил внутренним стандартом для расчета концентраций изомеров II и III. Детектирование осуществляли при 350 нм. Коэффициенты экстинкции всех изомеров при этой длине волны находили по их нормированным спектрам. Расчет концентрации изомеров II и III проводили по формуле

$$c_{ii} = KPa\alpha, \quad (1)$$

где  $c_{ii}$  - концентрация изомера в анализируемом растворе, М;  $K$  - калибровочный коэффициент для изомера I;  $P$  - среднее значение площади или высоты пика определяемого изомера;  $\alpha$  - отношение экстинкции изомера I к экстинкции определяемого изомера при 350 нм.

Типичная хроматограмма масляного раствора технического витамина А, полученная при детектировании при пяти различных длинах волн на "Милихроме" со стандартной колонкой 120 × 2.0 мм, приведена на рис. 3. Очевидна достаточно высокая эффективность разделения.

Полученные данные (табл. 2) демонстрируют как неточность спектрофотометрического метода, так и необходимость использования метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) для анализа витамина А. На рис. 4

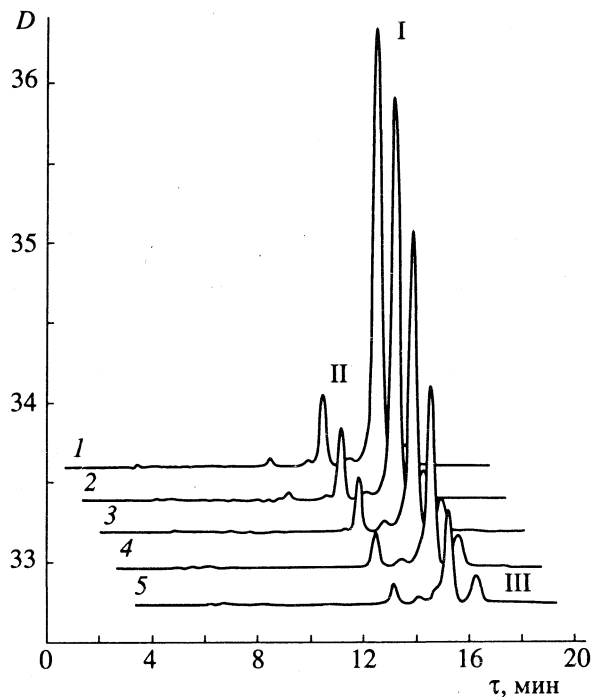


Рис. 3. Хроматограммы масляного раствора технического витамина А, снятые в режиме детектирования при различных длинах волн (колонка 120 × 2 мм с сорбентом "Силасорб 600", 7 мкм; элюент изооктан : диоксан (99 : 1); расход элюента 100 мкл/мин; комнатная температура): 1 - 320, 2 - 330, 3 - 340, 4 - 350, 5 - 360 нм.



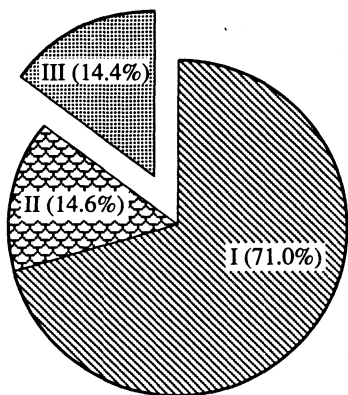


Рис. 4. Процентное соотношение изомеров в техническом ацетате витамина А.

представлена диаграмма изомерного состава технического ретинилацетата. Видно, что содержание менее активных изомеров достигает почти 30% (активность 13-*цис*-изомера (II) составля-

ет 75.3%, а активность ретро-изомера (III) – только 10% от активности полностью *транс*-изомера (I) [1]).

Таким образом, предложенный метод обработки хроматографических данных позволяет идентифицировать неизвестные компоненты анализируемых образцов по их спектрам поглощения. Этот метод широко используется нами для анализа витаминов, для контроля качества витаминных препаратов, витаминных концентратов, премиксов и кормов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березовский В.М. Химия витаминов. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Пищевая пром-сть, 1973. С. 144, 152.
2. Beutel B.H., Hinkley D.F., Pollak P.I. // J. Amer. Chem. Soc. 1955. V. 77. № 19. P. 5166.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544:867

РАЗДЕЛЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В  
МЕТОДОМ ИОН-ПАРНОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ  
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 1994 г. И. Ф. Колосова\*, В. Н. Филимонов\*\*, Л. Н. Балятинская\*\*\*

\*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

\*\*Новомосковский филиал Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева

\*\*\*Белгородский технологический институт строительных материалов им. И.А. Гришманова

Изучена возможность разделения синтетических водорастворимых витаминов С, РР, В<sub>с</sub>, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub> и В<sub>6</sub> методом ион-парной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. При оптимизации условий хроматографирования рассмотрено влияние на удерживание витаминов длины привитой углеводородной цепи сорбента, природы и концентрации ион-парного реагента, кислотности водной подвижной фазы, концентрации органического растворителя. Выбран режим хроматографирования, обеспечивающий эффективное разделение смеси синтетических водорастворимых витаминов группы В.

Среди существующих способов определения водорастворимых витаминов С, РР, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>с</sub> в различных объектах (пищевые, лекарственные препараты, корма) наиболее широкое применение находит высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [1 - 3]. Водорастворимые витамины, являясь соединениями с явно выраженным полярным характером, чувствительны к кислороду воздуха, свету, активным сорбентам, повышенным температурам. Хроматографическое разделение их смесей и определение осуществляют в основном методами обращенно-фазовой [4, 5], ионообменной [6, 7] и ион-парной ВЭЖХ [8, 9]. Литературные данные свидетельствуют, с одной стороны, о больших возможностях различных вариантов ВЭЖХ при определении витаминов, а с другой стороны, – о наличии разнообразных методик, связанных со спецификой исследуемых соединений и объектов анализа.

В настоящей работе предпринята попытка выбора условий разделения смеси синтетических водорастворимых витаминов группы В методом ион-парной ВЭЖХ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследование хроматографического поведения витаминов выполняли на жидкостном хроматографе "Цвет-304" (ОКБА, Дзержинск) с фотометрическим детектором ( $\lambda = 254$  нм). В качестве объектов исследования использовали фармакопейные витамины: аскорбиновую (С), никотиновую (РР), фолиевую (В<sub>с</sub>) кислоты, тиаминбромид (В<sub>1</sub>), рибофлавин (В<sub>2</sub>), гидрохлорид пиридоксина (В<sub>6</sub>). Для работы готовили растворы в диапазоне концент-

раций 0.246 - 4.086 мг/мл, хранившиеся не более 6 дней при температуре не выше 5°C. Подвижные фазы готовили на основе водного фосфатного буфера. В роли ион-парных реагентов исследовали четвертичные аммониевые соли: хлориды тетраметил- (ТМА), тетраэтил- (ТЭА), тетрабутил- (ТБА), цетилтриметиламмония (ЦТМА) и

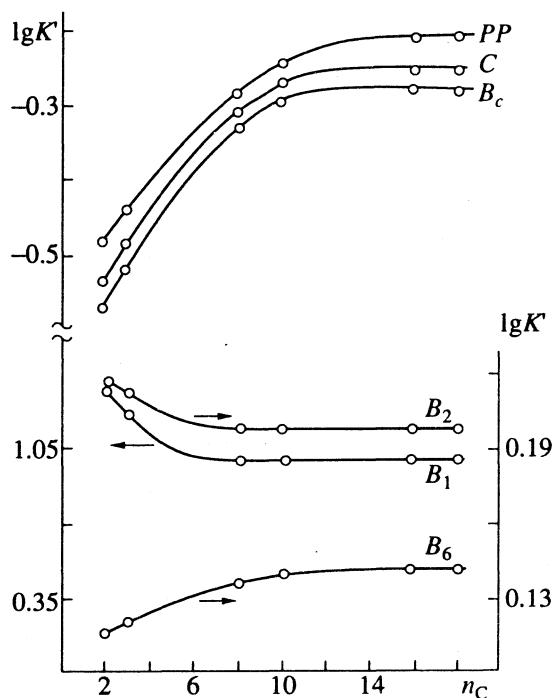


Рис. 1. Зависимости удерживания витаминов С, РР, В<sub>с</sub>, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub> и В<sub>6</sub> на модифицированных кремнеземах от длины привитых углеводородных цепей.

додецилсульфат натрия. Использованы колонки 100 × 4.0 мм из нержавеющей стали, заполненные сорбентами Силасорб С<sub>2</sub>–С<sub>22</sub> зернением 7.5 мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Группа водорастворимых витаминов характеризуется максимумами поглощения в области 250 - 270 нм. Ввиду близости длин волн в максимумах поглощения предъявляются повышенные требования к качеству хроматографического разделения.

В обращенно-фазовой ВЭЖХ применяют сорбенты с химически привитыми к их поверхности алкильными группами, содержащими от 1 до 22 метиленовых звена в углеводородной цепи. Хотя механизм взаимодействия подобных сорбентов еще не полностью ясен, можно сделать ряд предположений о влиянии длины присоединенной углеводородной цепи на удерживание витаминов: должна существовать некая критическая длина цепи, после которой удерживание остается постоянным. Критическая длина цепи обеспечивает возможность полного проникновения молекул сорбата в слой присоединенных углеводородных цепей. В зависимости от удерживания на исследуемых сорбентах происходит разделение водорастворимых витаминов на две подгруппы с  $K' < 1$  и  $K' > 1$  (рис. 1). В пределах каждой подгруппы с увеличением молярной массы витамина наблюдается уменьшение критической длины присоединенной цепи, которая практически не зависит от состава подвижной фазы.

Из рис. 1 видно, что не все метиленовые группы углеводородной цепи участвуют в удерживании: их количество не превышает 14. Для витаминов В<sub>с</sub>, С, РР, В<sub>6</sub> рост длины цепи приводит к увеличению емкости сорбентов. Для витаминов В<sub>1</sub> и В<sub>2</sub> зафиксирован противоположный эффект, что, вероятно, связано с доступностью силанольных групп кремнезема (на сорбентах с короткой углеводородной цепью), специфическое взаимодействие с которыми влияет на параметры их удерживания. Применение же сорбентов с длинной цепью ( $n_c > 8$ ) обеспечивает экранирование сила-

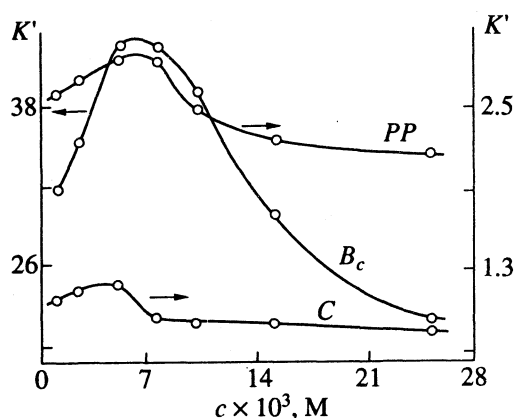


Рис. 2. Зависимость удерживания витаминов С, РР, В<sub>с</sub> от концентрации противоиона (тетрабутиламмония) в подвижной фазе.

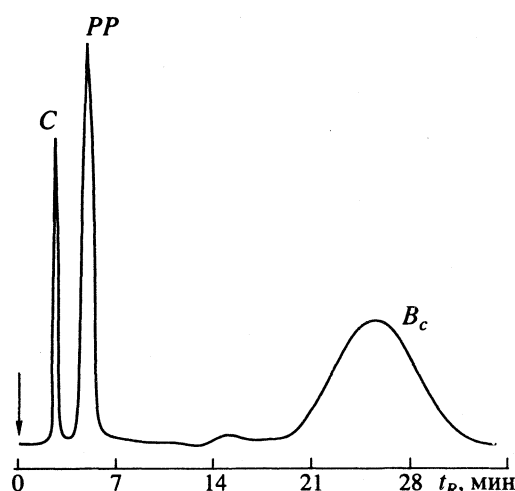


Рис. 3. Хроматограмма смеси витаминов С, РР, В<sub>с</sub> в режиме ион-парной обращенно-фазовой ВЭЖХ при оптимальных условиях хроматографирования.

нольных групп, что сопровождается уменьшением  $K'$ . Сравнение селективности разделения витаминов на неспецифических сорбентах позволило рекомендовать для работы неподвижную фазу Силасорб С<sub>18</sub>. На этой фазе наблюдается

Коэффициенты емкости и степень разделения витаминов С, РР, В<sub>с</sub> в системе ион-парной обращенно-фазовой ВЭЖХ

Витамин	I		II		III		IV		V	
	$K'$	$\alpha$	$K'$	$\alpha$	$K'$	$\alpha$	$K'$	$\alpha$	$K'$	$\alpha$
Аскорбиновая кислота (С)	0.32	—	0.48	—	0.72	—	1.26	—	2.00	—
Никотиновая кислота (РР)	0.34	—	0.53	—	0.87	—	7.07	—	11.1	—
		1.1		1.2		1.3		5.6		5.5
Фолиевая кислота (В <sub>с</sub> )	0.35	—	0.67	—	1.73	—	—	—	—	—
		1.0		1.3		2.0		—		—

Обозначения: I – в отсутствие, II - V – в присутствии противоиона подвижной фазы (II – ТМА, III – ТЭА, IV – ТБА, V – ЦТМА).

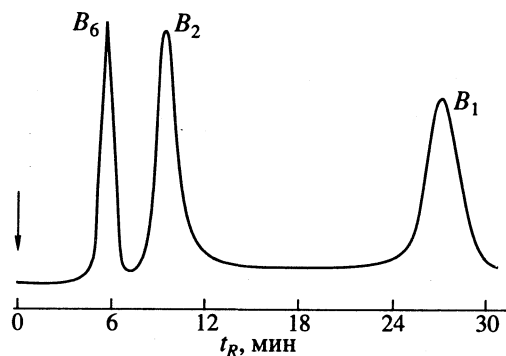


Рис. 4. Хроматограмма смеси витаминов  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_6$  в условиях ион-парной ВЭЖХ при оптимальных параметрах хроматографирования.

эффективное отделение хроматографических зон витаминов разных подгрупп, а также частичное разделение витаминов  $B_1$ ,  $B_2$  и  $B_6$  при абсолютных значениях  $K'$   $> 20$ .

Эффективным способом увеличения удерживания витаминов кислотного характера ( $B_c$ ,  $PP$ ,  $C$ ) в обращенно-фазовой ВЭЖХ является введение в элюент ион-парного реагента и реализация ион-парной ВЭЖХ. В качестве ион-парного реагента исследовали четвертичные аммониевые соли  $R_4N^+X^-$ , где  $X^-$  —  $Cl^-$  или  $Bg^-$ . Эти соли с витаминами образуют различные по устойчивости ионные пары, по-разному сорбирующиеся на сорбенте за счет гидрофобного алкильного фрагмента четвертичной аммониевой соли. Изучено влияние длины алкильной цепи противоиона на величину  $K'$  сорбатов. Установлено, что в ряду  $MTA < TЭА < ТБА < ЦТМА$  повышается селективность разделения витаминов и увеличиваются значения  $K'$  и коэффициента разделения (таблица). Наиболее перспективными для разделения витаминов  $C$ ,  $PP$ ,  $B_c$  являются ТБА и ЦТМА (максимальное различие в удерживании сорбатов), но, принимая во внимание доступность ТБА по сравнению с ЦТМА, дальнейшие исследования проводили с ТБА.

Выбраны значения pH водной фазы (9.6 - 9.7) и концентрация ион-парного реагента в подвижной фазе (рис. 2). Характер кривых объясняется, по видимому, ассоциативными процессами, в которые может вступать ион тетрабутиламмония, а также взаимодействием ионизированных частиц молекул витаминов с ассоциатами катионов ТБА. Эти процессы приводят к уменьшению удерживания витаминов. При концентрации ТБА в по-

движной фазе 5 - 10 ммоль/л разрешающая способность хроматографической системы максимальна. Наличие органического растворителя в подвижной фазе оказывает сильное влияние на параметры удерживания витаминов в ион-парной хроматографии, что связано с изменением значения  $pK_a$  кислот, а также со взаимодействием их с компонентами подвижной фазы. Исследованы влияние на разделение витаминов природы органической добавки (ацетонитрил, изопропиловый спирт) и ее концентрации. Показано, что оптимальным является содержание 3.5 об. % изопропилового спирта в подвижной фазе (рис. 3).

Улучшение качества разделения смеси витаминов подгруппы  $B_1$ ,  $B_2$  и  $B_6$  достигается введением в подвижную фазу додецилсульфата натрия (12 ммоль/л). Полное разделение смеси с  $R_s > 1.0$  зафиксировано при pH элюента 5.4 и содержании изопропилового спирта 3.5 об. %. Хроматограмма разделения витаминов  $B_1$ ,  $B_2$  и  $B_6$  приведена на рис. 4.

Таким образом, выполненные исследования позволили подобрать оптимальные условия ион-парного хроматографического разделения водорастворимых синтетических витаминов группы В.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии / Под ред. А. Хеншена, К.П. Хупе. Пер. с англ. М.: Мир, 1988. 688 с.
2. Ichinose N., Adachi K., Swedt G. // *Analyst*. 1985. V. 110. № 12. P. 1505.
3. Vanderslice J.T., Brown Lee S.R., Cortisoz M.E. // *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 1984. V. 67. № 5. P. 999.
4. Stillman R., Ma T.S. // *Mikrochim. Acta*. 1974. № 4. P. 611.
5. Amin M., Reusch J. // *J. Chromatogr.* 1987. V. 390. № 2. P. 448.
6. Callaner K., Davies L. // *Chromatographia*. 1974. V. 7. № 11. P. 644.
7. Williams R.C., Baker D.R. // *J. Chromatogr. Sci.* 1973. V. 11. № 12. P. 618.
8. Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М.: Химия, 1986. 288 с.
9. Wodlard D.C. // *J. Chromotogr.* 1984. V. 301. № 2. P. 470.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544:867

РАЗДЕЛЕНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ЖИРОРАСТВОРИМЫХ  
ВИТАМИНОВ С ПОМОЩЬЮ МНОГОКОЛОНОЧНОЙ  
НОРМАЛЬНО-ФАЗОВОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ  
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 1994 г. В. Н. Филимонов\*, И. Ф. Колосова\*\*, Л. Н. Балятинская\*\*\*

\*Новомосковский филиал Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева

\*\*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

\*\*\*Белгородский технологический институт строительных материалов им. И.А. Гришманова

Исследованы закономерности удерживания синтетических жирорастворимых витаминов в условиях нормально-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Установлено существование корреляционных зависимостей между параметрами удерживания сорбатов и составом бинарных подвижных фаз. Обсуждены некоторые вопросы возможных механизмов удерживания жирорастворимых витаминов в режиме нормально-фазовой ВЭЖХ. Полученные результаты использованы для хроматографического разделения смеси витаминов с переключением колонок при изократическом элюировании.

Современные достижения в развитии жидкостной хроматографии продемонстрировали эффективное ее применение для разделения и анализа сложных многокомпонентных смесей [1]. Особый интерес представляет использование высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в исследовании термически и химически нестойких биологически активных соединений, к которым относятся витамины. Хроматографическое разделение синтетических жирорастворимых витаминов осуществляется, как правило, в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ [2, 3]. Применение для решения этой задачи нормально-фазовой жидкостной хроматографии (НФЖХ) сдерживается отсутствием данных об их поведении в различных условиях данного метода.

В данной работе приведены результаты исследования удерживания сорбатов в зависимости от состава и свойств неподвижных и подвижных фаз с целью подбора оптимальных условий НФЖХ, обеспечивающих эффективное разделение смеси жирорастворимых витаминов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследование хроматографического поведения витаминов выполняли на жидкостном хроматографе "Цвет-304" (ОКБА, Дзержинск) с фотометрическим детектором ( $\lambda = 254$  нм). В качестве объектов использовали фармакопейные витамины:  $\alpha$ -ретинилацетат (А),  $\alpha$ -токоферилацетат (Е), эргокальциферол ( $D_2$ ), 2-метил-1,4-нафтохинон ( $K_3$  или менадион). Гексановые растворы витаминов готовили с концентрациями 0.04 - 2.4 мг/мл.

Колонки  $20 \times 0.4$  см и  $10 \times 0.4$  см из нержавеющей стали заполняли сорбентами Силасорб-600, Силасорб-амин, Силасорб-нитрил (7.5 мкм) в лабораторных условиях суспензионным методом под давлением 16 - 24 МПа. В качестве элюента применяли бинарные подвижные фазы на основе гексана с добавками хлороформа, изопропилового спирта, метилхлорида, диэтилового эфира. Растворители, применяемые для приготовления подвижных фаз, предварительно очищали по методике [4]. Удерживание витаминов характеризовали коэффициентом емкости  $K'$ , для расчета которого время удерживания несорбируемого компонента измеряли по  $CCl_4$ . Параметры удерживания рассчитывали в виде среднего из результатов не менее пяти измерений. Полноту разрешения хроматографируемых компонентов смеси оценивали по критерию разделения  $R_s$ . Модельную хроматографируемую смесь жирорастворимых витаминов составляли на основе рецептур наиболее распространенных кормовых препаратов, выпускаемых микробиологической промышленностью для животноводства.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Значительная адсорбция жирорастворимых витаминов из гексана на полярных сорбентах, приводящая к искажению хроматографического сигнала и высоким значениям емкостных коэффициентов ( $K' > 20$ ), не позволяет корректно исследовать пути достижения эффективного разделения смеси витаминов. Уменьшение общего удерживания сорбатов на изучаемых адсорбентах

осуществляется [5] изменением характера взаимодействия в объеме подвижной фазы. Направленное изменение селективности подвижной фазы выполняется введением в состав элюента добавок полярных сорбителей из крайних групп (I, II, V, VIII) по классификации Снайдера, обладающих ярко выраженной селективностью [6, 7]. Конкретный выбор сорбителя (I – диэтиловый эфир, II – изопропиловый спирт, V – метиленхлорид, VIII – хлороформ) обусловлен основным требованием детектирующей системы хроматографа к свойствам подвижной фазы: оптическая прозрачность элюента при 254 нм.

Интерпретация полученных данных проведена по корреляционным зависимостям между параметрами удерживания витаминов и составом по-

**Таблица 1.** Преобразования, сводящие нелинейную регрессию к линейной ( $Y'$ )

$Y$	$Y'$
$aX + b$	$Y$
$aX^b$	$\lg Y$
$ab^X$	$\lg Y$
$a + b/X$	$Y$
$1/(aX + b)$	$1/Y$
$X/(aX + b)$	$X/Y$
$a \lg X + b$	$Y$

**Таблица 2.** Минимальные дисперсии нелинейных математических регрессий, описывающих совокупность чисел  $X$  и  $Y$

Вита-мин	$s_1$	$s_2$	$s_3$	$s_4$
Силасорб-600				
A	$5.60 \times 10^{-4}$	$5.72 \times 10^{-6}$	$2.93 \times 10^{-4}$	$1.90 \times 10^{-5}$
E	$4.97 \times 10^{-4}$	$2.02 \times 10^{-6}$	$3.38 \times 10^{-3}$	$8.14 \times 10^{-5}$
$K_3$	$7.92 \times 10^{-4}$	$2.63 \times 10^{-6}$	$7.68 \times 10^{-4}$	$2.99 \times 10^{-4}$
$D_2$	$5.91 \times 10^{-5}$	$3.43 \times 10^{-4}$	$1.18 \times 10^{-5}$	$1.06 \times 10^{-6}$
Силасорб-амин				
A	–	$5.47 \times 10^{-9}$	$9.71 \times 10^{-3}$	$2.53 \times 10^{-4}$
E	–	$2.78 \times 10^{-5}$	$1.08 \times 10^{-3}$	$5.65 \times 10^{-3}$
$D_2$	–	$7.09 \times 10^{-3}$	$8.80 \times 10^{-4}$	$6.32 \times 10^{-4}$
Силасорб-нитрил				
A + E	$9.40 \times 10^{-6}$	$7.25 \times 10^{-4}$	$6.60 \times 10^{-6}$	$1.22 \times 10^{-3}$
$K_3$	$6.19 \times 10^{-5}$	$3.73 \times 10^{-5}$	$1.31 \times 10^{-7}$	$2.65 \times 10^{-7}$
$D_2$	$8.20 \times 10^{-7}$	$1.59 \times 10^{-5}$	$2.14 \times 10^{-8}$	$7.07 \times 10^{-9}$

Примечание. Для Силасорб-нитрила и полярных сорбителей: диэтилового эфира, хлороформа и метиленхлорида  $Y = aX^b$ , в остальных случаях –  $Y = 1/(aX + b)$ ;  $s_1, s_2, s_3$  и  $s_4$  – соответственно дисперсии в системах с диэтиловым эфиром, изопропиловым спиртом, хлороформом и метиленхлоридом.

движной фазы. Для выбора уравнения удерживания, связывающего коэффициент емкости витаминов ( $Y$ ) с составом подвижной фазы ( $X$  – концентрация добавки полярного сорбителя к гексану, моль/л), использована следующая схема: выбор нелинейной математической функции  $Y = f(X)$ , приближающей совокупность чисел  $X$  и  $Y$  с наименьшей среднеквадратичной погрешностью, осуществляется на ЭВМ по составленной программе; сведение нелинейной регрессии к линейной выполняется с использованием линеаризующих преобразований в ходе ввода  $X'$  и  $Y'$  (табл. 1). Обработка данных методами корреляционного анализа по семи нелинейным регрессиям позволила установить наличие математической зависимости между величинами  $K'$  витаминов и содержанием полярного компонента бинарной подвижной фазы (табл. 2).

Добавление в подвижную фазу растворителей с ярко выраженными протооакцепторными (диэтиловый эфир) и амфиотными (изопропиловый спирт) свойствами создает условия для динамического адсорбционного модифицирования поверхности сильнополярных адсорбентов за счет образования прочных водородных связей с силовыми и аминными функциональными группами. При этих условиях молекулы адсорбата взаимодействуют с поверхностью модифицированных сорбентов в основном благодаря электростатическим силам. Справедливость подобного предположения подтверждается сохранением линейной корреляции вида  $1/K' = f(c_{\text{доб}})$  на сорбентах Силасорб-600 и Силасорб-амин, полученной с помощью линеаризующих преобразований нелинейной математической регрессии  $Y = 1/(aX + b)$ . На среднеполярном адсорбенте Силасорб-нитрил стабильный модифицирующий слой создается только при использовании подвижных фаз с добавками изопропилового спирта (табл. 2). Обращает на себя внимание, что для элюентов с добавками диэтилового эфира, хлороформа, метиленхлорида определяющей является нелинейная регрессия  $Y = aX^b$ , линеаризация которой приводит к корреляционному уравнению вида  $\lg K' = f(\lg c_{\text{доб}})$ . Такая билогарифмическая зависимость согласуется с представлениями о конкурентной сорбции Снайдера и Сочевинского [8, 9].

Таким образом, исходя из результатов математической обработки и вида корреляционных уравнений выявлены две, по-видимому, взаимосвязанные причины изменения (уменьшения) интегрального удерживания жирорастворимых витаминов на специфических адсорбентах в зависимости от состава подвижной фазы. По мере изменения свойств полярной добавки элюента и природы стационарной фазы проявляется доминирующая роль одной из причин. Элюирование жирорастворимых витаминов бинарными подвижными фазами со специфических сорбентов,

сопровождающееся оптимальными значениями коэффициентов емкости (в пределах 0.5 - 20), обеспечивает следующие разделения.

1. На Силасорб-600 частичное разделение витаминов А, Е, К<sub>3</sub>, D<sub>2</sub> при использовании в качестве подвижных фаз смесей гексана с изопропиловым спиртом при малой концентрации полярного компонента (≤0.03 моль/л). Критерии разделения (R<sub>s</sub>) составляют:

пара	E/A	A/K <sub>3</sub>	D <sub>2</sub> /K <sub>3</sub>
R <sub>s</sub>	2.10	0.34	10.2

Применение в качестве добавок растворителей других групп обеспечивает эффективное отделение с R<sub>s</sub> > 1.5 витаминов Е и D<sub>2</sub> от А и К<sub>3</sub>, параметры удерживания которых близки, независимо от вида и концентрации полярных добавок.

2. В хроматографических системах, сочетающих аминную стационарную фазу и смешанный элюент, регистрируется разделение витаминов А и Е при малых концентрациях добавки и отделение витамина D<sub>2</sub> от суммарного пика витаминов А + Е при концентрации полярного растворителя в элюенте более 1.5 моль/л.

3. На колонке с сорбентом Силасорб-нитрил сохраняется ранее отмеченная потеря селективности разделения витаминов А и Е, частичное отделение зоны витамина К<sub>3</sub> от объединенного пика А + Е при R<sub>s</sub> = 0.4 - 0.8, эффективное отделение витамина D<sub>2</sub> от витаминов А, Е, К<sub>3</sub> при более низких значениях K'.

Следовательно, при изократическом нормально-фазовом элюировании полное разделение смеси синтетических жирорастворимых витаминов не достигается. Для разделения витаминов А, Е, К, D необходим градиентный режим элюирования, реализация которого на отечественных приборах нереальна. Поэтому более целесообразно хроматографическое разделение смеси с переключением колонок, упакованных полярными сорбентами различной природы при сохранении изократического элюирования. Вариант принципиальной схемы, обеспечивающий разделение смеси жирорастворимых витаминов с R<sub>s</sub> ≥ 1.0, приведен на рис. 1.

Хроматограмма разделения (рис. 2) получена при следующем режиме работы: после инъектирования пробы витаминов в поток подвижной фазы (0.0262 М раствор изопропилового спирта в гексане) вещества направляются в колонку 4 с Силасорб-нитрилом, где происходят отделение витамина D<sub>2</sub> и частичное разделение зоны витамина К<sub>3</sub> от объединенного пика витаминов А и Е. Через 4 мин (положение П-1 на рис. 2) от ввода пробы, переключают кран 8. Этого времени достаточно для элюирования витаминов А, Е, К<sub>3</sub> по колонке 4 и транспортирования их в колонку 5, за-

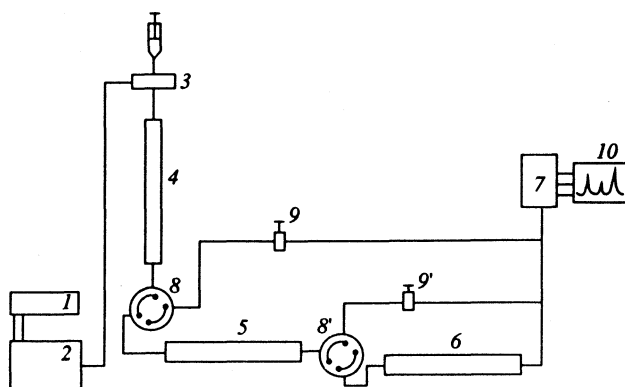


Рис. 1. Принципиальная схема для хроматографирования с переключением колонок: 1 – резервуар для элюента, 2 – насос высокого давления, 3 – устройство ввода пробы, 4, 5 и 6 – колонки с сорбентами Силасорб-нитрил, Силасорб-600 и Силасорб-амин соответственно, 7 – УФ-детектор, 8 и 8' – краны-переключатели, 9 и 9' – игольчатые вентили, 10 – самописец.

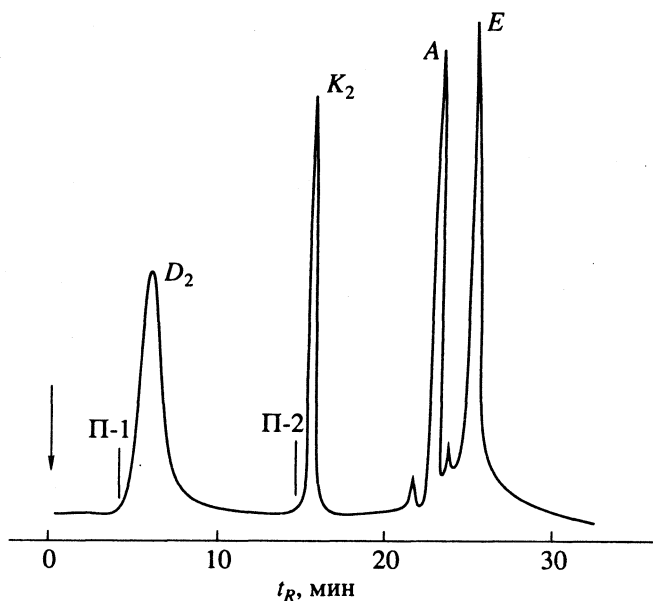


Рис. 2. Хроматограмма смеси жирорастворимых витаминов с переключением колонок. Расход элюента (0.0262 М раствор изопропилового спирта в гексане) 2.0 см<sup>3</sup>/мин.

полненную сорбентом Силасорб-600. После переключения крана 8 поток подвижной фазы с десорбированным витамином D<sub>2</sub> направляется в УФ-детектор, информация с которого регистрируется самописцем. На колонке с гидроксигированным силикагелем фиксируется полное отделение витамина К<sub>3</sub> от А и Е, характеризуемое R<sub>s</sub> = 1.55. Элюат с витаминами А и Е потоком подвижной фазы направляется в колонку 6. По истечении 14.5 мин от начала анализа (положение П-2, рис. 2) переключают кран 8', соединяя выход колонки 5 с детектором для фиксирования содержания витамина К<sub>3</sub>. Хроматографический анализ смеси

витаминов завершается эффективным разделением  $\alpha$ -токоферилацетата и  $\alpha$ -ретинилацетата на Силасорб-амине (колонка б). Для поддержания постоянной скорости элюирования в любом направлении движения подвижной фазы в схеме (рис. 1) применены игольчатые вентили 9 и 9'. Для уменьшения влияния внеколоночных размываний на хроматографический профиль пиков необходимо сократить протяженность соединительных линий.

Таким образом, проведенное исследование показало возможность разделения смеси синтетических жирорастворимых витаминов в режиме нормально-фазовой ВЭЖХ с переключением колонок.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яшин Я.И. // Журн. аналит. химии. 1993. Т. 48. № 3. С. 415.
2. Thompson J.N., Natina G., Maxwell W.B. // J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 1980. V. 63. № 4. P. 894.
3. Elton-Bott R.R., Stacey C.J. // Anal. Chem. Acta. 1981. V. 127. P. 213.
4. Гордон А., Форд Р. Спутник химика. М.: Мир, 1976. С. 437.
5. Киселев А.В., Пошкус Д.П., Яшин Я.И. Молекулярные основы адсорбционной хроматографии. М.: Химия, 1986. С. 205.
6. Snyder L.R. // J. Chromatogr. 1974. V. 92. № 2. P. 223.
7. Snyder L.R. // J. Chromatogr. Sci. 1978. V. 16. № 6. P. 223.
8. Snyder L.R. // Anal. Chem. 1974. V. 46. № 11. P. 1384.
9. Soczewinski E. // Ibid. 1969. V. 41. № 1. P. 179.



МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544.45.867

ПРИМЕНЕНИЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ  
ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ АНАЛИТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ  
ПРОДУКТОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА ЛИМОННОЙ  
КИСЛОТЫ И ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В

© 1994 г. Л. Н. Балятинская\*, Н. В. Ключникова\*, С. В. Свергузова\*,  
В. Н. Филимонов\*\*, И. Ф. Колосова\*\*\*

\*Белгородский технологический институт строительных материалов им. И.А. Гришманова

\*\*Новомосковский филиал Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева

\*\*\*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

На основе метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) разработаны методики, позволяющие определять концентрации продуктов и полупродуктов микробиологического синтеза – водорастворимых витаминов группы В. Подобран оптимальный состав подвижной фазы, обеспечивающей при изократическом элюировании эффективное разделение анализируемых веществ (гексан : хлороформ = 88 : 12). Для разделения смеси физиологически активных кислот разработан обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ на хроматографе НРР-4001 со спектрофотометрическим детектированием ( $\lambda = 254$  нм). Разработанные методики охарактеризованы простым алгоритмом выполнения анализа и рекомендованы для практического применения, проведена их промышленная апробация.

Анализ малолетучих, термически и химически неустойчивых соединений биологического происхождения – весьма трудная задача. Только метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) позволяет обеспечить селективность и мягкие условия разделения физиологически активных веществ без предварительного гидролитического расщепления, изменяющего активность и состав основных компонентов пробы.

Цель данной работы – поиск оптимальных условий определения двух различных групп биологически активных соединений: 1) полупродуктов синтеза витаминов группы В, 2) продуктов и примесей микробиологического синтеза лимонной кислоты.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для исследования и анализа использовали фармакопейные образцы и пробы соответствующих стадий синтезов. Полупродукты синтеза витаминов группы В исследовали в нормально-фазовом проявительном варианте жидкостной хроматографии на микроколоночном хроматографе Милихром-1 со шприцевым насосом (регулировка скорости подвижной фазы в интервале 2 - 600 мкл/мин) и спектрофотометрическим детектором (190 - 360 нм). Стальную колонку 62 × 2 мм заполняли гидроксигированным сили-

кагелем Силасорб-600 с удельной поверхностью 600 м<sup>2</sup>/г и средним диаметром частиц 5 мкм. В качестве элюента использовали смеси гексана с 5 - 20% полярного соразтворителя (изопропанола, хлороформа, метилхлорида). Условия эксперимента: скорость элюента 120 мкл/мин, длина волны детектора 240 нм.

Продукты синтеза лимонной кислоты исследовали в обращенно-фазовом режиме на хроматографе НРР-4000 с колонкой, заполненной Сепароном-С18 с химически привитыми *n*-алкильными группами, спектрофотометрическим детектором (254 нм); элюентом служили бидистиллат и его смеси с этанолом.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Качество водорастворимого витамина В<sub>2</sub> определяется чистотой полупродукта 3,4-ксилил-6-фенил-азо-D-рибетиламина (АРА-6), в котором могут присутствовать непрореагировавшие вещества: рибетиламин (РА), 3,4-ксилидин и изомер АРА-6 – 3,4-ксилил-2-фенил-азо-D-рибетиламин (АРА-2). На рис. 1 приведены спектры поглощения этих соединений в диапазоне 200 - 300 нм. Основной полупродукт АРА-6 и его изомер АРА-2 характеризуется максимумом (325 нм), который можно использовать для определения суммы изомеров; растворы РА и ксилидина прозрачны для УФ-излучения в области длин волн более 300 нм.

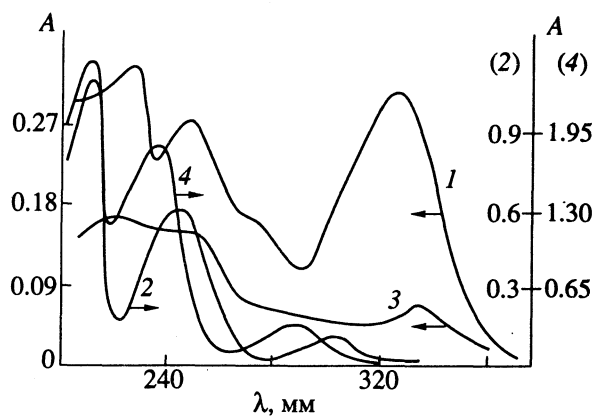


Рис. 1. УФ-спектры поглощения изопропиловых растворов АРА-6 (1), РА (2), АРА-2 (3) и 3,4-ксилидина (4).

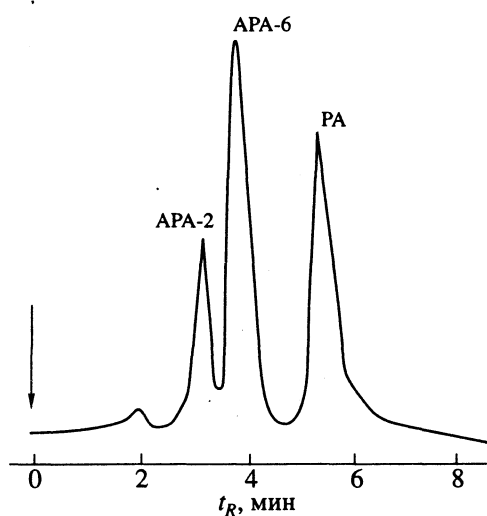


Рис. 2. Хроматограммы смеси веществ при элюировании подвижной фазой оптимального состава.

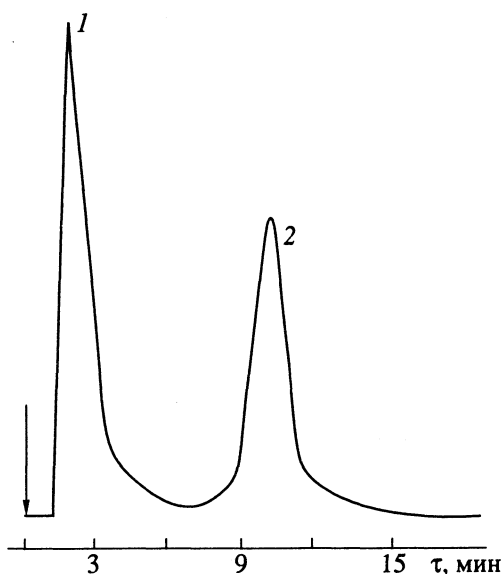


Рис. 3. Хроматограмма сброженного раствора: 1 – лимонная, 2 – щавелевая кислоты.

ВЭЖХ полупродуктов синтеза витамина  $B_2$  характеризуется высокой селективностью разделения (рис. 2). Обработка параметров удерживания сорбатов и регистрируемых критериев разделения методом корреляционного анализа позволила выбрать оптимальный состав подвижной фазы – гексан/хлороформ (88 : 12), обеспечивающий эффективное разделение при изократическом элюировании [1 - 4]. Доля основного вещества в продукте, выпускаемом химпромкомбинатом п. Шварц (Тульской обл.), составляет 97.8%.

Примеси в основном продукте синтеза витамина  $B_1$  определены методом ВЭЖХ без предварительного разделения; время выхода тиазола, аминопиримидина и метилвинилкетона составляет 2 мин 37 с; 3 мин 50 с и 10 мин 50 с соответственно.

Определение лимонной кислоты в присутствии примесей щавелевой и глюконовой кислот проведено в режиме обращенно-фазовой хроматографии; введение этанола в элюент сокращает время анализа, но приводит к осаждению глюконовой кислоты. Изотерма адсорбции лимонной кислоты соответствует монослойной сорбции Ленгмюра; рассчитанная посадочная площадка  $A_m$  молекулы составляет  $2.84 \times 10^{-19} \text{ м}^2$ . Обращенно-фазовые системы с использованием бидистиллата как элюента оказались достаточно эффективными для анализа высокополярных соединений: время выхода лимонной кислоты 2.5, щавелевой – 9 мин (рис. 3). Чистота продукта, выпускаемого ЗЛК (г. Белгород), составляет 99.2%.

Таким образом, метод ВЭЖХ позволяет без предварительного разделения определить содержание основного продукта и примесей биологически активных соединений в продуктах химического и микробиологического синтеза.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жидкостная колоночная хроматография. Ч. 3 / Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака. Пер. с англ. М.: Мир, 1979. С. 246.
2. Vanderslice J.T., Brown Lee S.R., Cortisoz M.E. // J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 1984. V. 67. № 5. P. 999.
3. Amin M., Reusch J. // J. Chromatogr. 1987. V. 390. № 2. P. 448.
4. Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М.: Химия, 1986. 288 с.

**МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

УДК 543.544

**РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ МЕТОДАМИ  
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И НЕСТАЦИОНАРНОГО  
КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА**

© 1994 г. Д. М. Кулиш, В. Е. Ключниченко, А. Н. Вульфсон

*Российская академия наук, Институт биоорганической химии  
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва*

Обсуждены факторы, влияющие на параметры разделения белков с помощью современных инструментальных методов – высокоэффективной жидкостной хроматографии и нестационарного высокоэффективного капиллярного электрофореза. Приведены примеры оптимизаций различных параметров. Показана близость оптимизации параметров разделения обоими методами. Предложен подход к созданию системы многофакторного управления параметрами разделения.

Нестационарный высокоэффективный капиллярный электрофорез (ВЭКЭ) [1 - 3] и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [4] – современные автоматизированные методы, показывающие хорошие результаты при анализе белков. Наиболее широко распространены такие варианты ВЭЖХ, как обращенно-фазовая, ионообменная и эксклюзионная, и такие варианты ВЭКЭ как капиллярный зонный электрофорез (КЗЭ) [5] и мицеллярная электрокинетическая капиллярная хроматография (МЭКХ) [3]. Стационарные варианты ВЭКЭ [3] также применимы для разделения белков, но менее распространены, так как имеют ряд ограничений и усложненные процедуры выполнения.

При использовании этих методов основной проблемой является оптимизация условий разделения с целью достижения наилучших значений важнейших параметров разделения – эффективности, селективности и чувствительности, однозначно определяющих применимость и информативность методики.

До создания ВЭКЭ параметры разделения, демонстрируемые ВЭЖХ, не имели себе равных. Большинство тонких и точных разделений были ориентированы на ВЭЖХ. В настоящее время доказан высокий потенциал ВЭКЭ в этой области и показано, что его совместное использование с ВЭЖХ значительно расширяет возможности исследователя [6]. Такой подход облегчен тем, что основные теоретические закономерности и аппаратное оформление обоих методов близки.

Данная работа посвящена анализу общих закономерностей разделения белков методами ВЭЖХ и ВЭКЭ с целью создания системы многофакторного управления параметрами разделения. Не пытаясь охватить все детали сложного физико-химического процесса разделения, мы рассматривали лишь те, на которые легко может воздействовать исследователь в лабораторных условиях. Именно

эти закономерности сближают методы ВЭЖХ и ВЭКЭ, делая их в некоторых случаях взаимозаменяемыми, чаще – взаимодополняющими.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

В работе были использованы реактивы: ацетонитрил марки “ос. ч.”, вода, очищенная на установке Milli-Q (“Waters”, США), NaOH, NH<sub>4</sub>OAc, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, CH<sub>3</sub>COOH марки “ос. ч.”, CF<sub>3</sub>COOH, додецилсульфат натрия (SDS), N-[трис-(гидроксиметил)метил]глицин(трицин), 3-[циклогексиламино]-1-пропансульфоуксусной кислоты (CAPS) (“Fluka”, Германия). Остальные реактивы отечественно производства также квалификации “ос. ч.”. Белковые препараты получены в лаборатории биотехнологии ИБХ РАН.

Высокоэффективный капиллярный электрофорез проводили на приборе 270А со встроенным спектрофотометром (“Эпплайд Биосистемс”, США) в немодифицированных кварцевых капиллярах, внутренний диаметр 100 мкм, длина от 30 до 80 см. Использовали ионные и цвиттер-ионные буферные растворы с концентрациями 10 - 200 мМ, профильтрованные и дегазированные перед проведением анализа. Рабочее напряжение 3 - 25 кВ. Перед каждым анализом капилляр регенерировали 0.1 М гидроксидом натрия.

Для эксклюзионной ВЭЖХ использовали колонки TSK G 3000 SW (0.75 × 30 см) (“TOSOH”, Япония); элюирование проводили со скоростью 0.5 мл/мин. Хроматографию проводили на приборе Varian 8500 со спектрофотометром Du Pont 852001-902, интегратор Waters 740 (США). Для обращенно-фазовой хроматографии использовали колонку Армсорб-Cu-300-C8(П)ДМ (150 × 4 мм) (ЕрОНЕМ “Армхром”), элюирование проводили со скоростью 0.8 мл/мин. Хроматографию проводили на приборе модель 510, спектрофотометр 490Е,

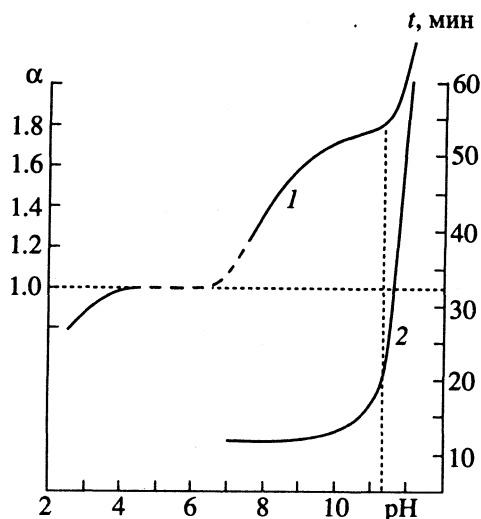


Рис. 1. Влияние pH буферного раствора на селективность КЗЭ разделения инсулина и проинсулина (1) и время миграции инсулина (2). Условия: немодифицированный капилляр, внутренний диаметр 100 мкм, расстояние до детектора 40 см, 28°C, напряжение +10 кВ, проводимость буферных растворов 4 мСм/см, концентрация образца 0.1 мг/мл, инъекция 0.1 с напряжением +5 кВ.

контроллер 680, интегратор 740 ("Waters", США). Перед хроматографией элюенты фильтровали через нитроцеллюлозные и GVWP-фильтры (диаметр пор 0.45 мкм; "Waters", США) и дегазировали в течение 20 мин.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### Факторы, определяющие селективность

Каждая из методик ВЭКЭ и ВЭЖХ реализует разделение, основанное на различии каких-либо свойств молекул. Основной задачей исследователя является поиск условий, в которых эти различия максимальны. К сожалению, сложность как самих разделяемых белковых молекул, так и процессов, происходящих при разделении, не позволяет строго описать разделение теоретически. Таким образом, оптимизация селективности разделения сводится к экспериментальному испытанию различных условий. Ниже приведен ряд примеров, иллюстрирующих это. Как модельные объекты использованы инсулинсодержащие белки, отличающиеся лишь по одному параметру [7].

**Зонный электрофорез** разделяет частицы по отношению стока радиуса к заряду. Стандартными подходами к оптимизации селективности разделения в зонном электрофорезе является подбор значения pH буферного раствора, при котором заряды разделяемых веществ будут различаться максимально, и добавление в него денатурирующих или сольватирующих агентов до концентрации, при которой будут максимально различаться стока радиусы [8].

На рис. 1а показана зависимость селективности КЗЭ разделения смеси инсулина и проинсулина от pH буферного раствора, не содержащего реагентов, повышающих селективность. Лучшее разделение достигается в щелочной области.

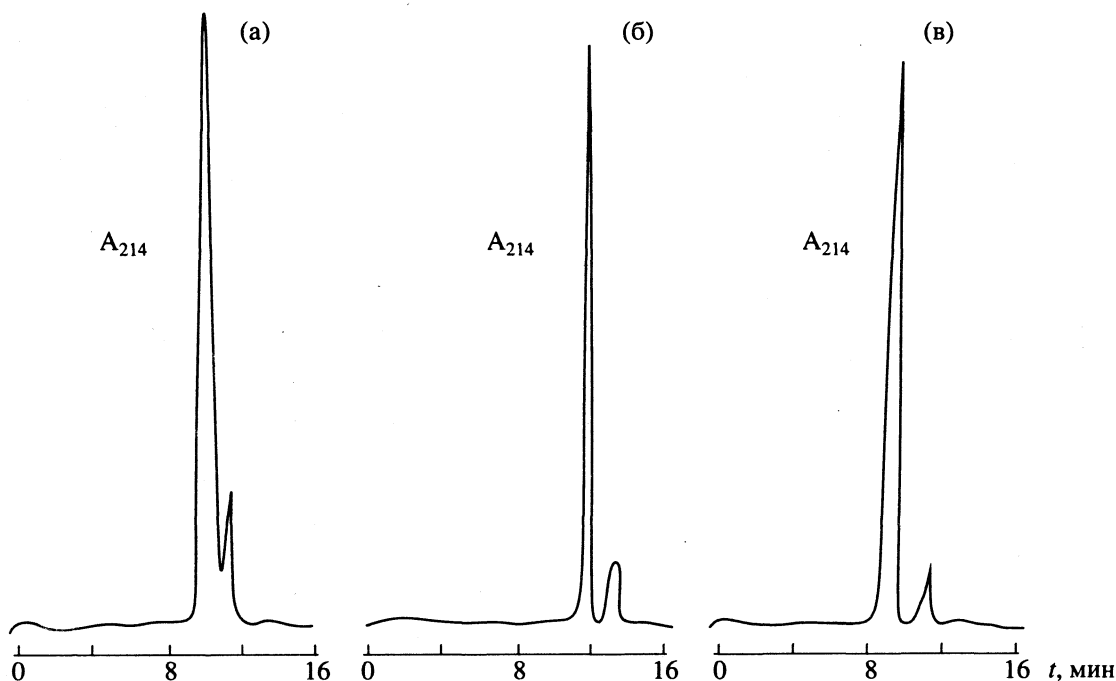


Рис. 2. КЗЭ разделение инсулина и дезамидоинсулина в боратном буферном растворе 100 мМ, pH 9.2 в отсутствие (а) и в присутствии 3% метанола (б), в трициновом буферном растворе 20 мМ, 20 мМ  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , pH 9.0 (в). Условия: немодифицированный капилляр, внутренний диаметр 100 мкм, расстояние до детектора 40 см, 28°C, напряжение +10 кВ, концентрация образца 0.1 мг/мл, инъекция 0.1 с напряжением +5 кВ.

Воздействие рН буферного раствора на электрофоретическую подвижность белков и осмотический поток в капилляре приводит к изменению времени миграции компонентов (рис. 1б) – немаловажной характеристики разделения.

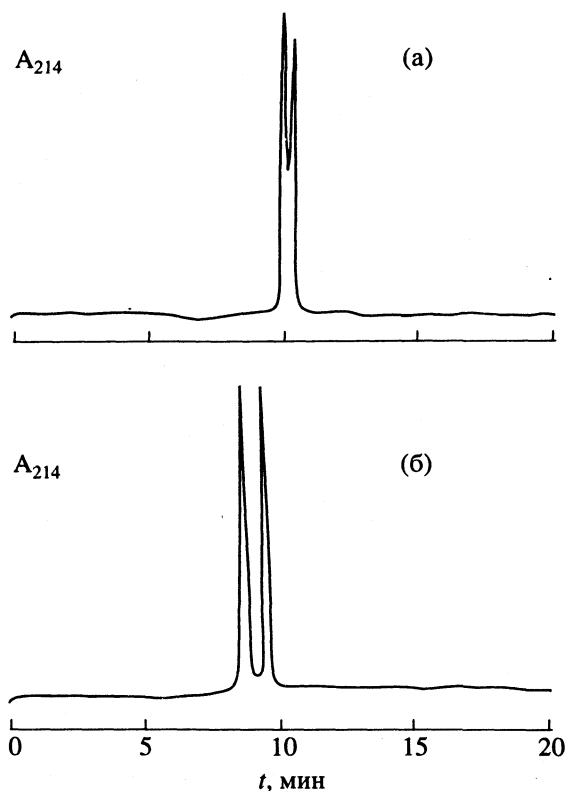
Основными сольватирующими и денатурирующими агентами являются органические растворители, цвиттер-ионные соединения и специфические денатуранты белков (например, мочевины). Их влияние на селективность также не имеет строгих закономерностей. Так, для смеси инсулина с дезамидоинсулином добавление цвиттер-ионов и органических растворителей заметно увеличивает селективность (рис. 2) [9].

**МЭКХ** реализуется добавлением в буферный раствор поверхностно-активного вещества в концентрации выше критической концентрации мицеллообразования. Возникающая мицеллярная фаза движется со скоростью, отличной от скорости основного буферного раствора, и вещества разделяются по коэффициенту распределения между этими фазами. Для белков он в основном определяется способностью встраиваться в мицеллы гидрофобными доменами. Так, гибридный белок состоит из проинсулина и фрагмента белка А из *Staph. Aureus*. Смесь проинсулина и ренатурата гибридного белка не поддается разделению методом КЗЭ, но успешно делится в условиях МЭКХ (рис. 3). В то же время белки, различающиеся лишь по заряду, например, инсулин и дезамидоинсулин, не разделяются методом МЭКХ.

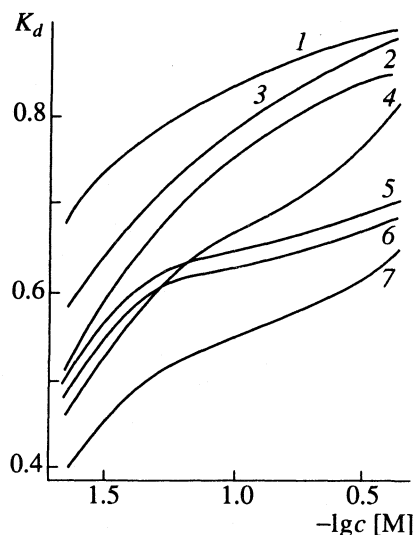
Важнейшим методом управления селективностью МЭКХ является воздействие на взаимодействие разделяемых веществ с мицеллой с помощью изменения полярности среды разделения (например, при добавлении органического растворителя).

**В эксклюзионной хроматографии** происходит разделение молекул образца по размеру на основе эффекта исключения из пор сорбента. Не касаясь оптимизации селективности методом воздействия на размер белковых молекул [4], мы опишем некоторые нестандартные варианты оптимизации эффективности. Классический механизм разделения реализуется при отсутствии сорбционных взаимодействий белков с насадкой колонки. Однако слабые сорбционные взаимодействия белка с поверхностью модифицированного силикагеля, имеющие ионный, электростатический, гидрофобный или смешанный характер, все же возникают [10, 11]. Специфичная сорбция может быть использована для оптимизации селективности. Рассмотрим это на примере инсулинсодержащих белков [12].

Конформация и химическая модификация белков вносят существенные различия в удерживание белков (рис. 4). Линейные проинсулин (3) и гибридный белок (5) элюируются позднее, чем их ренатурированные (т.е. “свернутые”) аналоги (2) и (6), имеющие меньший размер, что является



**Рис. 3.** Разделение проинсулина и гибридного белка ренатурата методами: а – КЗЭ, боратный буфер 100 мМ, рН 9,2, +10 кВ; б – МЭКХ, боратный буфер 50 мМ, рН 9,2, +20 кВ. Условия: немодифицированный капилляр, внутренний диаметр 100 мкм, длина до детектора 50 см, 30°C, концентрация образца 0.1 мг/мл, инжекция 0.1 с напряжением +5 кВ.



**Рис. 4.** Зависимость  $K_d$  инсулинсодержащих белков от концентрации Na-фосфатного буфера в качестве подвижной фазы. Колонка TSK G 3000 SW (0.75 × 30 см), скорость потока 0.5 мл/мин; 1 – инсулин, 2 – проинсулин, 3 – денатурированный проинсулин, 4 – проинсулин-S-сульфонат, 5 – линейный гибридный белок, 6 – ренатурированный гибридный белок, 7 – гибридный белок-S-сульфонат.

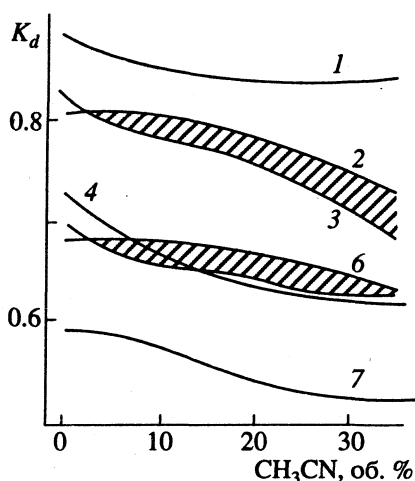


Рис. 5. Зависимость  $K_d$  инсулинсодержащих белков от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе (0.1 М Na-фосфат, pH 7.0). Условия и обозначения см. рис. 4.

артефактом в эксклюзионной хроматографии. После сульфитолиза этих белков наблюдается обратная картина: проинсулин-S-сульфонат (4) и гибридный белок-S-сульфонат (7) элюируются раньше своих не только линейных, но и ренатурированных аналогов.

Подобные превращения легко объясняются ионной эксклюзией – взаимодействием слабо

анионного сорбента с отрицательно заряженными молекулами белков. Этот эффект сильно выражен при малых значениях ионной силы  $\mu$  (0.04 - 0.2). Так, время удерживания  $t_i$  для гибридного белка при  $\mu = 0.04 - 0.1$ . При увеличении  $\mu$  до 0.8 различие времен выхода соответствующих сульфированных, линейных и свернутых белков и их разрешение существенно уменьшаются вследствие проявления общих гидрофобных взаимодействий. Сигмовидная форма кривых на рис. 4 показывает, что удерживание белков сильно зависит от концентрации электролита в элюенте как при малых значениях  $\mu$  (0.02 - 0.1), так и при больших (0.4 - 1). Для каждой пары белков может быть выбрано значение ионной силы элюента, при котором селективность разделения будет максимальной.

Для ослабления взаимодействия инсулинсодержащих белков с сорбентом в подвижную фазу добавляли органические модификаторы. На фоне слабого уменьшения времени элюции образцов происходили относительные изменения времен выхода свернутых и линейных проинсулинов и гибридных белков (рис. 5). В этом случае свернутые белки (2, 6) элюировались позднее их линейных аналогов, т.е. согласно классическому механизму разделения (3, 5). На рис. 5 эти различия обозначены заштрихованными участками. Видно,

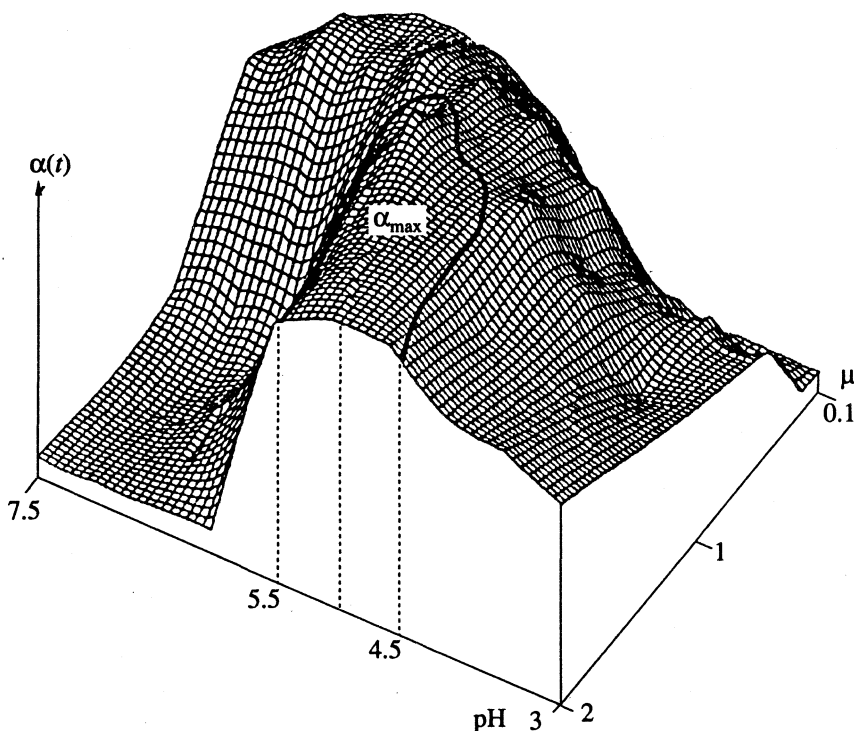


Рис. 6. Зависимость селективности разделения пиков инсулина и проинсулина от pH и  $\mu$  подвижной фазы в виде трехмерной поверхности. Зона максимального значения  $\alpha$  дополнительно выделена. Условия проведения хроматографии: колонка Армсорб-Cu-300-C<sub>8</sub>П(ДМ). Элюенты: 10% CH<sub>3</sub>CN 0.1 - 2 М AcONH<sub>4</sub> (А), 50% CH<sub>3</sub>CN 0.1 - 2 М AcONH<sub>4</sub>, pH 3 - 7.5 (В), начальная концентрация буфера В – 15%, скорость градиента – 2%/мин, скорость потока 0.8 мл/мин.

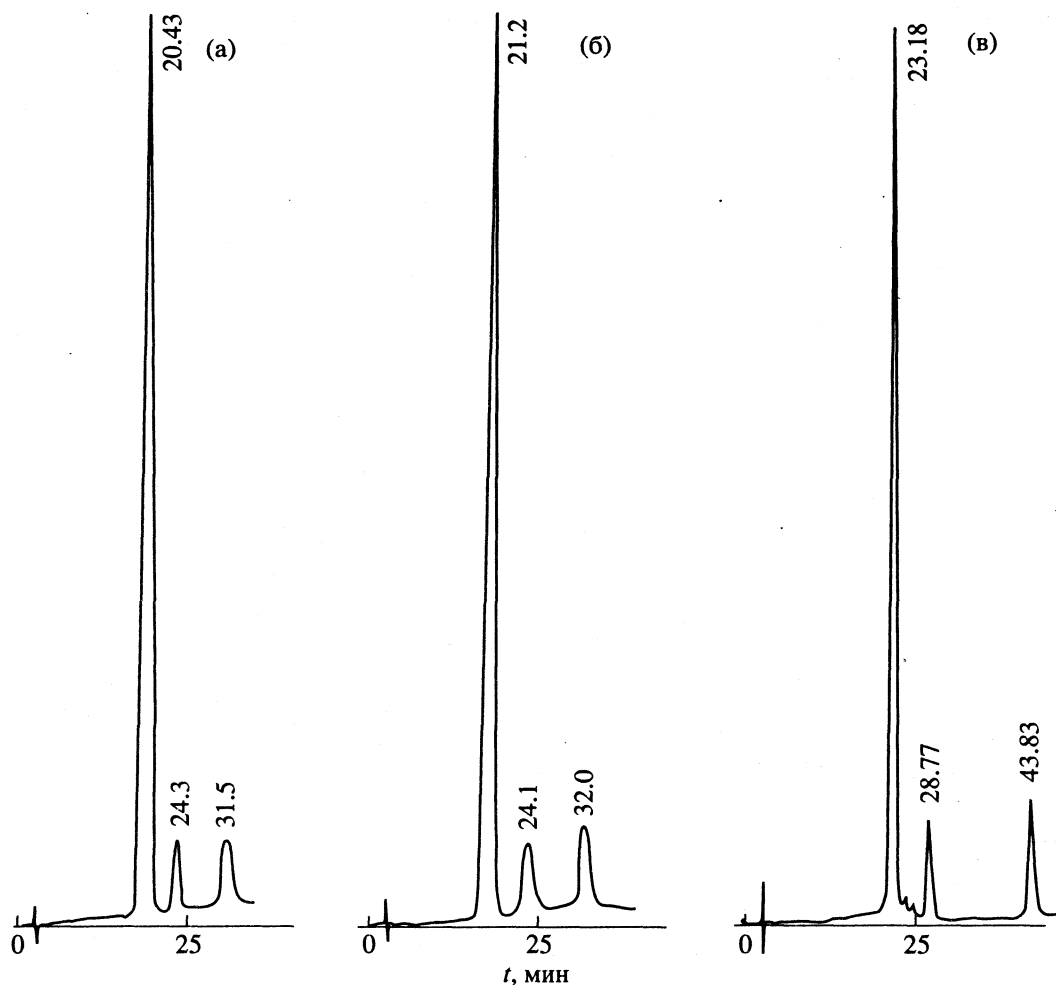


Рис. 7. Хроматографическое разделение инсулина, дезамидоинсулина и проинсулина на колонке Армсорб-Si-300- $C_8$ П(ДМ). Подвижная фаза (рН 3): А – 10%, В – 50%  $CH_3CN$ ; а, в – 0.1 М, б – 0.5 М Na-фосфат, в – в элюент А добавлено 0.5 М  $Na_2SO_4$ . Скорость потока 0.8 мл/мин,  $\lambda = 280$  нм.

что удерживание линейных проинсулина (3) и гибридного белка (5) уменьшается уже при нескольких процентах ацетонитрила в подвижной фазе, в то время как у их свернутых аналогов (2, 6) остается практически неизменным. При больших концентрациях  $CH_3CN$  ( $>30\%$ ) в условиях гидратации молекул органического модификатора происходят нарушения процессов сольubilизации белков и их конформационные изменения, иногда приводящие к денатурации, что вызывает неспецифическую адсорбцию молекул белка на носителе, уширение пиков и понижение селективности их разделения [13].

**Адсорбционная ВЭЖХ** реализует разделение веществ по их связыванию с неподвижной фазой. Ионная сила, рН и температура элюента и колонки влияют на поляризацию и ионизацию функциональных групп как белка, так и сорбента и определяют селективность наравне с многими другими параметрами. Так, при разделении инсулина и проинсулина с помощью обращенно-фазовой хроматографии на колонке Армсорб-Si-300- $C_8$ П

(ДМ) было выявлено большое влияние на селективность разделения значений рН и ионной силы элюента. После проведения многочисленных опытов была выполнена многофакторная оптимизация (рис. 6) и выявлена зона максимального значения селективности разделения инсулина и проинсулина [14].

Селективность разделения белков может существенно зависеть также от природы ионов, содержащихся в подвижной фазе. Так, при изменении концентрации фосфатного буфера от 0.1 до 0.5 М селективность разделения инсулина, дезамидоинсулина и проинсулина увеличивается незначительно (рис. 7а, 7б). Однако в присутствии сульфат-ионов происходит ее резкое увеличение (рис. 7в).

В случае ионообменной хроматографии такие параметры, как рН, ионная сила и природа противоиона, являются основными факторами управления не просто селективностью, а механизмом разделения.

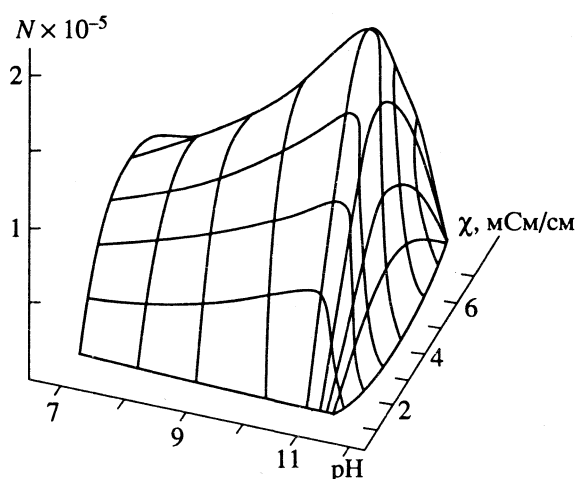
### Факторы, определяющие эффективность

Эффективность разделения зависит от степени размывания пика, которая, в свою очередь, определяется выходом вещества из зоны за счет диффузии либо неспецифической сорбции. Виды диффузии и адсорбции отличаются для разных методов, однако цель оптимизации эффективности одинакова – найти условия разделения, при которых влияние размывающих факторов минимально. Рассмотрим эти факторы для разных методов.

**Эффективность нестационарных электрофоретических разделений.** Для нестационарных электрофоретических разделений эффективность прямо пропорциональна квадрату рабочего напряжения [10, 15]. Однако прямое увеличение напряжения редко позволяет увеличить эффективность, так как приводит к увеличению тейлоровой диффузии (см. ниже).

Другим параметром разделения, значительно влияющим на эффективность нестационарного электрофореза, является ширина зоны инъекции. Для сужения зоны инъекции в КЗЭ предлагается использовать методику, известную из гель-электрофореза, – стэкинг [16]. Кроме того, инъекция образца в капилляр напряжением дает меньшую зону инъекции, чем инъекция давлением.

Среди процессов, сопутствующих разделению методами нестационарного ВЭКЭ и понижающих эффективность, необходимо выделить адсорбцию белков на стенках капилляра [15, 17] и тейлорову диффузию [15, 18]. Первая проходит по ионному механизму и обусловлена катионообменными свойствами плавленого кварца, вторая – искривлением профиля электроосмотического



**Рис. 8.** Влияние проводимости  $\chi$  и pH буферного раствора на эффективность КЗЭ проинсулина. Условия: немодифицированный капилляр, внутренний диаметр 100 мкм, расстояние до детектора 40 см, 20°C, напряжение +10 кВ, концентрация образца 0.1 мг/мл, инъекция 0.1 с напряжением +5 кВ,  $N$  – число теоретических тарелок.

потока вследствие нагревания раствора внутри капилляра под действием электрического тока. Адсорбция проявляется размыванием “хвостовой” части пика (рис. 1а), а тейлорова диффузия – размыванием фронта (рис. 1б).

Для подавления адсорбции белков на стенках капилляра применялись следующие методы: 1) разделение в сильнощелочных и сильнокислых буферных растворах, где белки и поверхность капилляра несут одноименный заряд и отталкиваются; 2) разделение в буферных растворах с высокой ионной силой, где низкомолекулярные ионы блокируют заряженные группы белка и кварца; 3) разделение в капиллярах с модифицированной внутренней поверхностью [19]. Этот метод незначительно улучшает разделение, но приводит к потере одного из важных достоинств КЗЭ – практичности и экономичности. Поэтому мы не используем его в наших работах.

В МЭКХ-анализах проблема диффузии отсутствует вследствие блокирования заряженных центров белка и стенок капилляра ПАВ. Для подавления тейлоровой диффузии рекомендовалось использование буферных растворов, имеющих низкую проводимость, например, цвиттер-ионных. Однако, если белок проявляет склонность к адсорбции, приходится повышать ионную силу буфера добавлением соли, и указанное преимущество цвиттер-ионов исчезает.

На рис. 8 представлена трехмерная зависимость эффективности КЗЭ-анализа проинсулина от pH и ионной силы раствора<sup>1</sup> (эффективность КЗЭ инсулина незначительно меньше). В области низких pH сильна адсорбция, высоких – тейлорова диффузия. То же относится и к ионной силе. Таким образом, имеются условия, где совместным влиянием pH и ионной силы адсорбция сведена до минимума, а тейлорова диффузия еще не достигла максимума. Эти условия оптимальны для достижения максимальной эффективности.

Следует подчеркнуть, что существование максимума эффективности предсказуемо в силу параболности зависимости эффективности от pH и ионной силы буферного раствора (рис. 8), но точные его характеристики зависят от физико-химических особенностей белков и определяются лишь эмпирически. В случае, если оптимумы эффективности и селективности совпадают, можно уверенно считать, что метод КЗЭ имеет высокий потенциал для данной пары белков. Так и происходит в случае смеси инсулин–проинсулин (рис. 1а и 8).

Особое внимание необходимо обращать на регенерацию капилляра. Нерегенерированная поверхность приводит к аномальной адсорбции и шумам детектора. Кварц весьма устойчив, поэтому, кроме рекомендованных повсеместно

<sup>1</sup> Ионную силу выражали через проводимость  $\chi$ , непосредственно измеряемую в эксперименте.



промывок кислотой и щелочью, возможна промывка капилляра раствором бихромата калия.

**ВЭЖХ.** Для этого метода примеры подавления неспецифической сорбции и диффузии многочисленны [4]. Во многом они определяются характеристиками сорбента, но и характеристики элюента играют свою роль. Так, добавление в подвижную фазу сольватирующих или денатурирующих агентов (органических модификаторов, детергентов, мочевины и т.д.) является распространенным методом снижения неспецифической сорбции в эксклюзионной ВЭЖХ [11].

При обращенно-фазовом ВЭЖХ-разделении смеси инсулина и проинсулина эффективность падает при повышении рН Na-фосфатного буферного раствора от 3 до 7, но имеет оптимум при рН 4.5 - 5.5 в Na-ацетатном буферном растворе [12].

Легко сопоставить такие важные параметры процесса, как скорость потока в ВЭЖХ и напряжение в ВЭКЭ. Теория обоих методов предсказывала увеличение эффективности разделения при повышении значения этих параметров, но была опровергнута практикой. Для ВЭЖХ при высоких скоростях потока недостаточным становится массообмен (кривая Ван-Деемтера), для ВЭКЭ высокое напряжение приводит к сильной тейлоровой диффузии. Необходимо отметить, что ВЭКЭ имеет принципиально большую эффективность, чем ВЭЖХ, по причине лучшего подавления диффузии в капилляре, чем в порах сорбента.

#### Факторы, определяющие чувствительность

Факторы, определяющие чувствительность, близки для ВЭЖХ и ВЭКЭ вследствие близости систем детекции. Малый объем капилляра приводит к превосходству ВЭКЭ над ВЭЖХ по массовой чувствительности, а малый оптический путь детектора объясняет проигрыш ВЭКЭ по отношению к ВЭЖХ в удельной чувствительности. Поэтому значительно более строгие требования, чем в хроматографии, предъявляются к выбору

рабочей длины волны; оптимальной для большинства белковых смесей является  $\lambda = 205 - 214$  нм.

Авторы благодарят К.В. Мальцева за любезно предоставленные им образцы инсулинсодержащих белков.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Li S.F.Y.* Capillary Electrophoresis. Principles, practice and application. J. Chromatographia Library. Elsevier Science Publishers, 1992. V. 52.
2. *Kuhr W.G.* // Anal. Chem. 1990. V. 62. P. 403R.
3. *Karger B.L., Cohen A.S., Guttman A.* // J. Chromatogr. 1989. V. 492. P. 585.
4. Хроматография. Практическое приложение метода / Под. ред. Э. Хефтмана. Т. 1. М.: Мир.: 1986.
5. *Deyl Z., Struzinsky R.* // J. Chromatogr. 1991. V. 569. P. 63.
6. *Klyushnichenko V.E., Koulich D.M., Yakimov S.A. et al.* // Ibid. 1994. V. 661. P. 83.
7. *Клюшниченко В.Е., Якимов С.А. Мальцев К.В. и др.* // Биооргани. химия. 1992. Т. 18. № 12. С. 1478.
8. *Гааль Э., Медьешу Г., Верецкеи Л.* Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982.
9. *Nielsen R., Sittampalam G.S., Rickard E.C.* // Anal. Biochem. 1989. V. 177. P. 20.
10. *Barth H.G.* // J. Chromatogr. Sci. 1980. V. 18. № 9. P. 409.
11. *Prannkoch E., Lu K.C., Barth G.H.* // Ibid. 1980. V. 18. № 9. P. 430.
12. *Клюшниченко В.Е., Вульфсон А.Н.* // Биооргани. химия. 1993. Т. 19. № 2. 1993. С. 174.
13. *Rivier J.E.* // J. Chromatogr. 1980. V. 202. № 1. P. 211.
14. *Клюшниченко В.Е., Якимов С.А., Арутюнян А.М. и др.* // Биооргани. химия. В печати.
15. *Roberts G.O., Rhodes R.H., Shyder R.S.* // Ibid. 1989. V. 480. P. 35.
16. *Vinther A., Soeberg H.* // J. Chromatogr. 1991. V. 559. P. 3.
17. *Green J.S., Jorgenson J.W.* // Ibid. 1989. V. 478. P. 63.
18. *Goble W.A., Ivory C.F.* // Ibid. 1990. V. 516. P. 191.
19. *Wehr T.* // LC-GC Int. 1993. V. 6. № 2. P. 70.

## МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 66.081+577.15

### ПРИМЕНЕНИЕ СОРБЦИОННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ОЧИСТКИ И АНАЛИЗА ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

© 1994 г. Н. В. Рудометова, Н. В. Глазова, Л. В. Дмитренко

Санкт-Петербургский химико-фармацевтический институт

Исследован изотермический процесс сорбции рибонуклеазы макропористыми молекулярными сорбентами на основе глицидилметакрилата. Установлено влияние структуры сорбентов (соотношения сшивающего агента и стирола) на избирательность сорбции рибонуклеазы. Описаны факторы, влияющие на сорбцию белка неиногенными сорбентами. Показана возможность использования данных сорбентов для очистки ферментов от бактериальных пирогенов.

Панкреатические ферменты – рибонуклеаза, дезоксирибонуклеаза, трипсин, химотрипсин, получаемые из поджелудочной железы скота, широко используются в медицине для лечения различных заболеваний. Однако нуклеазы из животного сырья часто содержат до 50% примесей различной природы: фенол, бактериальные пирогены, балластные белки, так как известная схема получения панкреатических ферментов включает их высаливание из экстракта поджелудочной железы сернокислым аммонием с последующим многократным переосаждением.

Цель данной работы – изучение сорбции панкреатической рибонуклеазы (РНКаза) на молекулярных сорбентах как одного из вариантов выделения и очистки ферментов.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для разработки методов очистки ферментов использовали молекулярные сорбенты на основе глицидилметакрилата (G и GS) (таблица) с раз-

личным содержанием сшивающего агента и стирола в матрице сорбента [1], синтезированные в Институте макромолекулярной химии Чехии и предоставленные нам ИВС РАН. Изучение изотермического процесса сорбции проводили в статических условиях при варьировании температуры (278 и 308 К), значений pH 2.4 и постоянном перемешивании. Продолжительность установления равновесия определялась по проведенным предварительно кинетическим экспериментам и подтверждалась проведением концентрационного сдвига для нескольких произвольно выбранных точек способом, описанным ранее [2].

На основании полученных экспериментальных данных рассчитывали константы сорбции и термодинамические параметры сорбции РНКаза сорбентами G и GS (таблица).

Эффективность очистки белковых растворов определяли гель-хроматографическим способом на препаративной колонке 1.6 × 56 см с сефадексом G-75 на денситометре с проточной кюветой

Термодинамические функции сорбции рибонуклеазы неиногенными макропористыми сорбентами на основе глицидилметакрилата

Сорбент	$c_1, \%$	$c_2, \%$	T, K	$K \times 10^{-6}, \text{мл/моль}$	$-\Delta G$	$\Delta H$	$T\Delta S$
					кДж/моль		
G-5	95	0	278	$21 \pm 7$	$39.0 \pm 0.4$	$-39.9 \pm 0.4$	$-0.9 \pm 0.4$
			308	$27 \pm 9$	$43.8 \pm 0.6$	$105.8 \pm 0.6$	$149.6 \pm 0.6$
G-60	40	0	278	–	–	–	–
			308	$12 \pm 4$	$41.7 \pm 0.5$	–	–
GS-50	40	10	278	$2.4 \pm 0.4$	$34.0 \pm 0.3$	$45.0 \pm 0.3$	$79.0 \pm 0.3$
			308	$8.0 \pm 0.7$	$40.7 \pm 0.1$	$-9.8 \pm 0.3$	$30.9 \pm 0.1$
GS-10	40	50	278	$17 \pm 4$	$38.3 \pm 0.2$	$62.0 \pm 0.2$	$100.3 \pm 0.2$
			308	$6.1 \pm 0.9$	$39.9 \pm 0.2$	$-238 \pm 0.2$	$-198.1 \pm 0.2$

Обозначения:  $c_1$  и  $c_2$  – концентрации сшивающего агента и стирола соответственно.

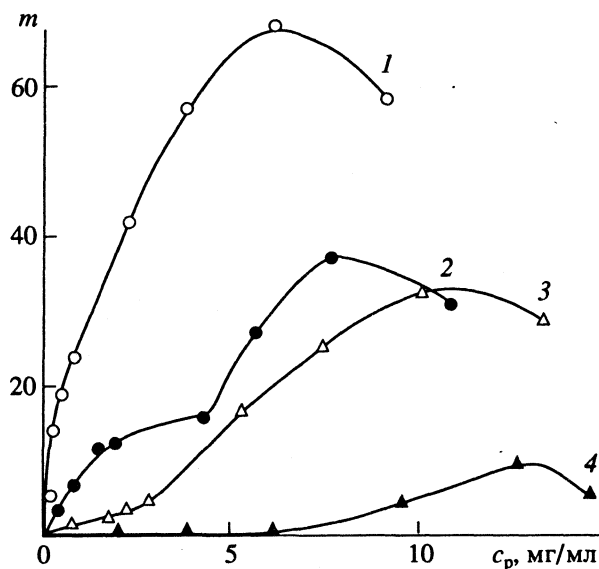


Рис. 1. Изотермы сорбции РНКазы макропористыми неионогенными сорбентами G-5 (1, 2) и G-60 (3, 4) при 278 (2, 4) и 308 К (1, 3); рН 2.4;  $m$ , мг/г влажной смолы.

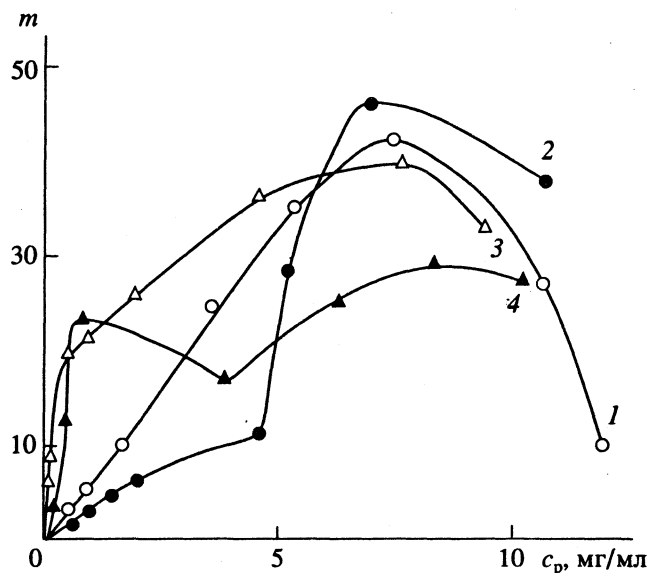


Рис. 2. Изотермы сорбции РНКазы макропористыми неионогенными сорбентами GS-50 (1, 2) и GS-10 (3, 4) при 278 К (2, 4) и 308 К (1, 3); рН 2.4.

типа “Увикорд” при длине волны  $\lambda = 180$  нм. Содержание белка в растворах определяли по методу Лоури.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На рис. 1, 2 представлены изотермы сорбции РНКазы на макропористых глицидилметакрилатных сорбентах, которые отличаются от изотерм Ленгмюра. Необычный ступенчатый вид изотерм хорошо согласуется с моделями многослойной сорбции, переориентации молекул в сорбционном слое и энергетической неоднородности поверхности, а также склонностью макромолекул к ассоциации [3, 4]. Эти экспериментальные данные, а также термодинамические функции процесса сорбции (таблица) свидетельствуют о том, что взаимодействие молекулы фермента с неионогенной матрицей сорбента определяется рядом факторов:

- 1) поверхностью матрицы сорбента (увеличение содержания гидрофобных стирольных групп от 0 (рис. 1, кривые 3 и 4) до 10% (рис. 2, кривые 1 и 2) и до 50% (рис. 2, кривые 3 и 4), а также увеличение количества сшивающего агента от 40 до 95% (ср. кривые 3, 4 и 1, 2 рис. 1) приводит к росту избирательности сорбции);
- 2) характером взаимодействия молекул белка в сорбированном состоянии (изотермы имеют ступенчатый вид, рис. 1, 2);
- 3) влиянием ассоциации белковых молекул в растворе (изотермы имеют максимум, рис. 1, 2);
- 4) сменой механизма сорбции и, возможно, переориентацией молекул,

о чем свидетельствуют разные знаки энтропийной и энтальпийной составляющих при различных температурах (таблица); 5) сильным влиянием температуры на механизм сорбции – изменяется вид изотерм (ср. кривые 1, 3 и 2, 4 рис. 1, 2).

Гель-хроматографический анализ равновесных растворов РНКазы выявил влияние структуры сорбента на сорбцию примесных компонентов, часто являющихся бактериальными пирогенами (эндотоксинами). Ранее была показана взаимосвязь асимметрии гель-хроматографического пика в аналогичных условиях эксперимента с концентрацией бактериальных пирогенов в растворах РНКазы [5]. На рис. 3 представлены гель-хроматограммы растворов пирогенной РНКазы до и после сорбции глицидилметакрилатными

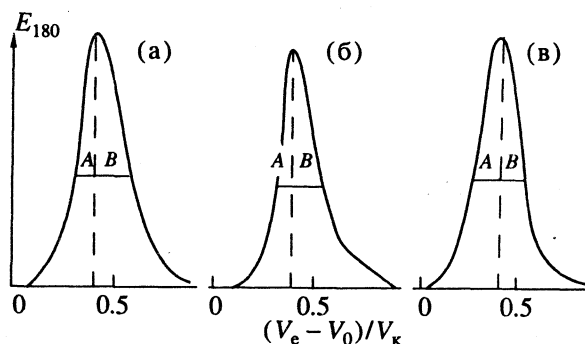


Рис. 3. Гель-хроматограммы растворов РНКазы до сорбции (а) и после сорбции сорбентами G-5 (б) и GS-50 (в).

сорбентами: G-5, не содержащим стирола, и GS-50 с 10% стирола в матрице сорбента. Как видно, присутствие даже небольшого (10%) количества стирола приводит к сорбции эндотоксинов, что проявляется в уменьшении асимметрии гель-хроматографического пика ( $B/A = 1$ , рис. 3в) по сравнению с гель-хроматограммами рис. 3а, 3б:  $B/A = 1.5$  и  $1.44$  соответственно.

Полученные результаты могут послужить основой для разработки сорбционно-хроматографических методов очистки и анализа чистоты ферментных препаратов (присутствие бактериальных пирогенов).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pelsbauer Z., Lukas J., Svec F., Kadal J. // J. Chromatogr. 1979. U. 171. P. 101.
2. Глазова Н.В., Тищенко Г.А., Муравьева Т.Д. и др. // Прикл. биохимия и микробиология. 1987. Т. 23. № 5. С. 542.
3. Рудометова Н.В., Ефимова Т.Б., Глазова Н.В., Дмитренко Л.В. // Там же. 1992. Т. 28. № 5. С. 694.
4. Дмитренко Л.В., Скворцов А.М., Горбунов А.А. // Журн. прикл. химии. 1990. № 12. С. 2725.
5. Глазова Н.В., Дмитренко Л.В., Винарская В.А. и др. // Хим.-фарм. журн. 1991. № 12. С. 79.

**МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

УДК 543.544:681.2

**ГРАДИЕНТНЫЙ НАСОС ДЛЯ МИКРОКОЛОНОЧНОЙ  
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

© 1994 г. Ю. А. Болванов\*, С. В. Власов\*, А. В. Гельфанд\*,  
Л. А. Кожанова\*\*, Г. Г. Шамовский\*

*Российская академия наук, Сибирское отделение*

*\*Конструкторско-технологический институт прикладной микроэлектроники, Новосибирск*

*\*\*Новосибирский институт биорганической химии*

Разработан градиентный насос, предназначенный для формирования градиентов концентраций бинарных элюентов или проведения постколоночной дериватизации при микроколоночной жидкостной хроматографии с использованием детектора с малообъемной проточной кюветой типа детектора микроколоночного жидкостного хроматографа "Милихром". Оригинальным элементом конструкции градиентного насоса является пассивный смеситель, обеспечивающий эффективное перемешивание жидкостей при минимальном искажении формируемого градиента.

При работе на серийно выпускаемых отечественных хроматографах "Милихром 1", "Милихром 2" и "Милихром 4" градиентный режим элюции осуществляется с помощью преформированного градиента – последовательного набора в шприцевой насос определенных объемов растворов различного состава при суммарном объеме градиента 2.5 мл. За счет диффузионных и конвекционных процессов ступенчатый профиль сглаживается, что позволяет добиваться удовлетворительной воспроизводимости времен удерживания [1].

При практическом использовании такого способа возникают затруднения, связанные с необходимостью точного приготовления нескольких (до десяти) растворов и с изменением состава растворов элюентов в автоматизированных хроматографах за счет испарения. Кроме того, ограниченный объем стандартного шприцевого насоса не позволяет полностью реализовать эффективность хроматографических колонок длиной 80 - 120 мм, которые иногда приходится использовать при анализе сложных смесей. Для преодоления указанных затруднений разработан, в качестве автономного устройства, градиентный насос для микроколоночной жидкостной хроматографии.

Прибор состоит из микропроцессорного электронного блока управления (контроллера), двух шприцевых насосов, поворотного крана-гидрораспределителя и планшетного пассивного цельностеклянного смесителя с волновым каналом. Гидравлическая схема градиентного насоса представлена на рис. 1. В приборе используются стандартные шприцевые насосы хроматографа "Милихром" и модифицированный инъекционный кран И-025 (АО "ДИА-М", г. Москва) для переаполнения насосов.

Оригинальным элементом конструкции градиентного насоса является статический смеситель, выполненный в виде цельностеклянной пластины размером 30 × 30 × 4 мм с вытравленными внутри каналами круглого сечения до точки смешивания и волновым каналом от точки смешивания до выхода. Волновой канал, профиль которого приведен на рис. 2, представляет собой последовательность перекрывающихся основаниями полушфер диаметром 0.3 мм со смещением 0.15 мм; общая длина волнового канала – 40 см, объем – около 20 мкл. Волновой профиль канала обеспечивает высокоэффективное перемешивание жидкостей с различными физическими свойствами (за счет создаваемого вторичными потоками радиального массопереноса) при минимальном искажении формируемого градиента. Каналы выведены на полированную торцевую поверхность пластины и соединяются с остальными элементами гидравлической системы посредством прижима развальцованного толстостенного фторопластового капилляра с внутренним диаметром 0.3 мм. Вся система выдерживает давление не менее 60 атм. Гидродинамическое сопротивление смесителя не превышает 2 - 3 атм при расходах элюента (вода, метанол) до 200 мкл/мин.

Микропроцессорный блок управления, имеющий на лицевой панели клавиатуру и жидкокристаллический индикатор, обеспечивает программирование и запоминание до десяти градиентных профилей, каждый из которых моделируется кусочно-линейной функцией с количеством линейных участков до девяти. При программировании каждого участка вводятся: содержание второго компонента в элюенте (В, %) в начале и на конце участка, объем участка, суммарная объемная скорость подачи элюента. Алгоритм управления

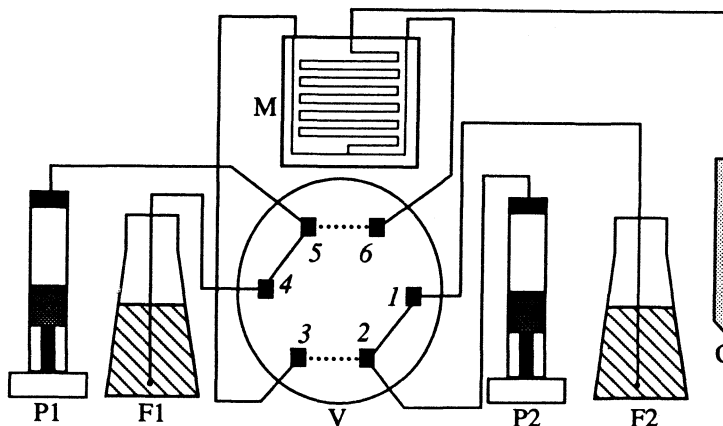


Рис. 1. Схема градиентного насоса: P1, P2 – насосы; F1, F2 – сосуды с элюентами; V – клапан; M – смеситель; C – колонка; — — — набор; ..... — подача.

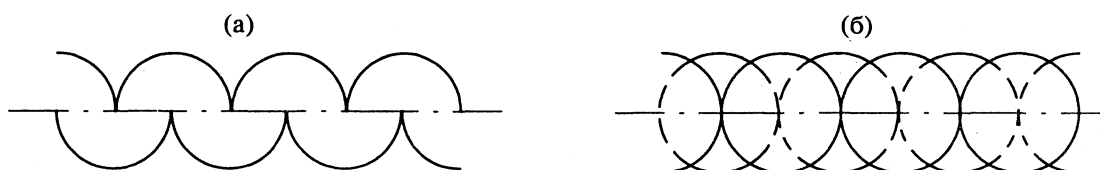


Рис. 2. Профиль канала волнового реактора: а – вид сбоку, б – вид сверху.

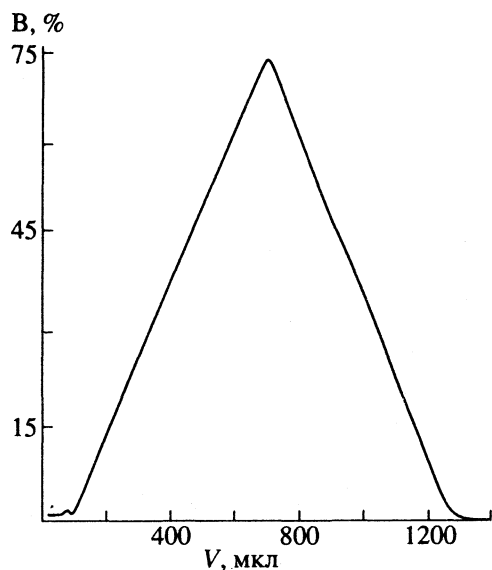


Рис. 3. Пример отработки градиента треугольной формы. Скорость подачи – 100 мкл/мин.

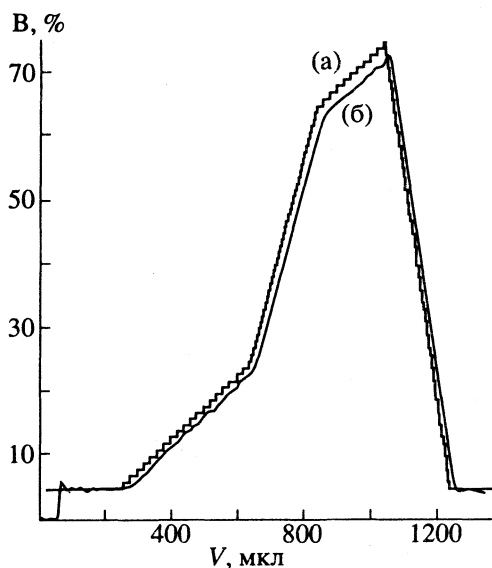


Рис. 4. Сопоставление задаваемого (а) и отработываемого (б) градиента.

работой насосов при отработке градиента основан на вычислении среднего значения  $B$  на каждом текущем микроучастке объемом 5 мкл (100 шагов шагового двигателя насоса) и расчете оптимальной последовательности (наиболее равномерного чередования) шагов двигателей обоих насосов в пределах этих 100 шагов. При отработке градиента текущее значение  $B$  выводится на индикатор и в виде аналогового сигнала выдается на самописец; последнее удобно при использовании двухка-

нального самописца для одновременной регистрации хроматографического и градиентного профилей. Отдельной программой в контроллере задаются объем и скорость набора пробы для работы в стандартном для “Миличромов” режиме (набор пробы через иглу).

Известно [2, 3], что все градиентные насосы со смесителем в линии высокого давления в той или иной степени искажают задаваемый контроллером градиент. Главный источник этих искажений –

конечный объем смесителя и коммуникаций его с колонкой. Для количественной оценки величины этого эффекта в качестве второго компонента использовали раствор уридина в воде, выходной капилляр смесителя соединяли непосредственно с кюветой детектора "Милихром 4" и сопоставляли обрабатываемый градиент с задаваемым регистрацией оптической плотности при 260 нм. Представленный на рис. 3 измеренный градиент (задано: 0 - 100 мкл - 2% В, 700 мкл - 75% В, 1300 мкл - 0% В) имеет близкую к заданной форму с максимумом 73.5%; с учетом большой крутизны градиента это свидетельствует о незначительном искажении заданного профиля. Аналогичный вывод следует и из данных рис. 4, на котором приведены зарегистрированные на двухканальном самописце заданный и измеренный градиентные профили. Максимальное значение измеренного профиля составляет 73.0% вместо 75%; увеличение расхождения обусловлено большей крутизной ниспадающего участка.

Как видно из рис. 3 и 4, обрабатываемые градиентным насосом линейные участки имеют соответствующие заданным наклоны, но на них просматриваются заметные волнообразные отклонения от линейности. Это обусловлено тем, что серийно выпускаемые насосы к хроматографу "Милихром" обнаруживают значительные пульсации; пиковая амплитуда этих пульсаций, оцененная по специально разработанной нами методике, может достигать у отдельных насосов 15 - 20%. Использованные нами насосы характеризовались амплитудой пульсаций ~6%. Эти оценки, как и приведенные на рис. 3 и 4 данные,

получены при работе насосов без заметного гидродинамического сопротивления.

В реальных условиях гидродинамическое сопротивление хроматографических колонок составляет 30 - 40 атм, вследствие чего результирующая амплитуда пульсаций уменьшается в 5 - 7 раз (за счет демпфирующего влияния сжимаемости жидкостей и эластичности фторопластового капилляра). При хроматографии модельных смесей полиароматических веществ на колонке с Lichrosorb-C18 (5 мкм) в градиенте водного ацетонитрила (10 - 90%) получена удовлетворительная воспроизводимость времен удерживания - ~0.2 мин при скорости элюции 100 мкл/мин.

Разработанный градиентный насос позволяет проводить как градиентную, так и изократическую хроматографию с суммарным объемом элюента до 5 мл. Кроме того, после изготовления реактора-смесителя с волновым каналом оптимальной топологии появится реальная возможность реализации постколоночной дериватизации в микромасштабе; при этом насос будет использоваться для подачи реагента.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Baram G.I., Grachev M.A., Komarova N.I. et al. // J. Chromatogr. 1983. V. 264. № 1. P. 69.*
2. *Powley C.R., Howard W.A., Rogers L.B. // Ibid. 1984. V. 299. № 1. P. 43.*
3. *Беленький Б.Г., Ганкина Э.С., Мальцев В.Г. Капиллярная жидкостная хроматография. Л.: Наука, 1987.*

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 536.522.3:543.422

ДВУХВОЛНОВАЯ ФОТОМЕТРИЧЕСКАЯ ТЕРМОХРОМОМЕТРИЯ

© 1994 г. Л. А. Кожанова, Г. Г. Шамовский

Российская академия наук, Сибирское отделение, Новосибирский институт биоорганической химии  
Конструкторско-технологический институт прикладной микроэлектроники, Новосибирск

Предложен метод определения температуры в кюветах спектрофотометрических устройств с помощью термохромных растворов, основанный на температурной зависимости степени ионизации кислотно-основного индикатора (за счет температурной зависимости константы ионизации буферного компонента – *трис*-(гидроксиметил)-аминометана). Теоретически выведен алгоритм оптимизации метода, обеспечивающий количественное сопоставление потенциальной чувствительности термохромных растворов с различными индикаторами и логически обоснованный выбор оптимального состава раствора (рН, суммарная концентрация индикатора). Погрешность измерения температуры с некоторыми из исследованных индикаторов составляет менее 0.2 К.

При решении многих исследовательских и аналитических задач спектрофотометрическим или фотоколориметрическим методом необходимо обеспечить надежное термостатирование кюветы фотомера и количественно охарактеризовать динамику установления теплового равновесия в кювете. В некоторых случаях (например, в дискретных фотометрических центрифужных анализаторах или в фотометрах с малообъемной проточной кюветой) непосредственное измерение температуры раствора в кювете с использованием датчиков типа термомпары или термистора невозможно. Для разрешения подобных вопросов могут использоваться термохромные растворы – растворы, оптическая плотность (при характеристических длинах волн) или спектры поглощения которых обратимо изменяются при изменении температуры.

Предложены разнообразные принципы обеспечения термохромного поведения растворов на основе различных физических и физико-химических равновесий [1 - 9], среди которых наиболее простым и доступным представляется сочетание температурной зависимости константы ионизации буферного компонента раствора с зависимостью от рН спектра поглощения кислотно-основного индикатора [10 - 13]. Термохромные растворы такого типа использовались в работах [14, 15] для проверки точности термостатирования кювет и оценки времени установления теплового равновесия в кюветах фотометрических биохимических анализаторов. В обеих работах в качестве буферного компонента использовался *трис*-(гидроксиметил)-аминометан (Трис) – основание с высоким температурным инкрементом рК; в качестве индикатора использовался фенолфталеин [14] и крезоловый красный [15].

Во всех опубликованных работах с применением термохромных растворов указанного типа для определения неизвестной температуры в

кювете фотометра проводились измерения при одной длине волны оптической плотности нескольких растворов с идентичной концентрацией индикатора. Такая методология, очевидно, не позволяет реализовать в полном объеме возможности системы, так как “кюветная” погрешность (при перезаполнении кювет) и погрешности приготовления растворов идентичной концентрации неизбежно ограничивают точность измерения температуры. Кроме того, необходимость перезаполнения кювет затрудняет исследование быстрых процессов.

В данной работе предлагается способ термохромных измерений, основанный на измерениях оптической плотности одного раствора при двух длинах волн и позволяющий обеспечить максимально возможную (на конкретном фотометре) точность измерения температуры и исследовать быстрые процессы.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ  
СПОСОБА И ЕГО ОПИСАНИЕ

Предлагаемый способ измерения температуры с помощью термохромного раствора буфер-индикатор основан на двухволновой регистрации спектральных изменений, обусловленных зависимостью от температуры отношения концентраций двух форм (протонированной и непротонированной) кислотно-основного индикатора (за счет зависимости от температуры константы ионизации буферного компонента, а следовательно, и рН раствора). Термодинамическое поведение таких растворов хорошо изучено (см., например, [12, 13]). В частности, показано, что обычно они подчиняются закону Вант-Гоффа, и при использовании достаточно низких концентраций индикатора коэффициенты активности обеих его форм практически не отличаются от единицы и не зависят от температуры. Для таких



растворов уравнение Вант-Гоффа можно записать в виде:

$$\lg[I]/[HI] = a + b/T, \quad (1)$$

где  $[I]$  и  $[HI]$  – концентрации непротонированной и протонированной форм индикатора соответственно;  $a$  и  $b$  – константы, включающие разности мольных энтропий и энтальпий ионизации буферного компонента и индикатора;  $T$  – абсолютная температура. Комбинация уравнения (1) с законом Ламберта–Бугера–Бера приводит к следующим, характеризующим связь определяемой температуры с экспериментально измеряемыми оптическими плотностями, уравнениям:

$$T = b / [\lg(A - \epsilon_1^I c) / (\epsilon_1^I c - A) - a] \quad (2)$$

для одноволнового режима регистрации и

$$T = b / [\lg(\epsilon_2^{HI} - R\epsilon_1^{HI}) / (R\epsilon_1^I - \epsilon_2^I) - a] \quad (3)$$

для двухволнового режима. Здесь  $\epsilon_1^I, \epsilon_2^I, \epsilon_1^{HI}, \epsilon_2^{HI}$  – коэффициенты экстинкции соответствующих форм индикатора при выбранных длинах волн (которые индицируются нижними индексами);  $R = A_2/A_1$  – спектральное отношение;  $A$  – оптическая плотность;  $c$  – общая концентрация индикатора в растворе. Длина оптического пути предполагается равной 1 см.

Из сопоставления уравнений (1) и (2) видно, что при двухволновой регистрации результат измерения температуры явно не зависит от суммарной концентрации индикатора в термохромном растворе, в то время как при одноволновой регистрации эта концентрация непосредственно используется в расчете. При практической реализации одноволнового способа возможно исключение из расчетного уравнения концентрации заменой произведений  $\epsilon c$  на оптические плотности растворов с идентичными термохромному раствору концентрациями индикатора, но значение рН каждого из которых соответствует только одной из крайних форм индикатора. Поскольку хорошо известно, что кюветные погрешности фотометрических измерений, связанные с процедурой перезаполнения или замены кювет, и погрешности приготовления растворов неизбежны и вносят значительный вклад в полную погрешность измерений [16, с. 82], представляются очевидными преимущества двухволновой регистрации, где эти погрешности исключаются. Подробный анализ повышения точности фотометрических измерений при использовании спектральных отношений по сравнению с абсолютными измерениями в одноволновом режиме приведен в работе [17].

Для обеспечения полной реализации возможностей двухволновой термохромометрии необходим алгоритм оптимизации метода, включающий: 1) количественное сопоставление потенциальной чувствительности термохромных растворов с различными индикаторами; 2) логически обоснованный выбор оптимального состава термохромного

раствора (рН, суммарная концентрация индикатора), обеспечивающего максимальную точность измерения температуры в наперед заданном диапазоне температур с учетом метрологических характеристик фотометра. Обе задачи легко решаются при использовании в качестве количественной меры чувствительности метода полной случайной погрешности измерения температуры ( $\Delta T$ ).

Из уравнения (3) видно, что полная погрешность измерения должна содержать два типа частных составляющих: 1) погрешности измерения оптической плотности; 2) погрешности определения калибровочных коэффициентов  $a$  и  $b$  и коэффициентов экстинкции двух форм индикатора. Полагая, что все калибровочные коэффициенты можно определить достаточно точно в предварительных экспериментах (за счет множественности параллельных измерений), частные составляющие второго типа можно не учитывать.

В соответствии с законом накопления погрешностей при косвенных измерениях [16, 18] дисперсия измерения температуры при двухволновой регистрации ( $\sigma_T$ ) определяется выражением:

$$\begin{aligned} \sigma_T^2 &= \left(\frac{\partial T}{\partial A_1}\right)^2 \sigma_{A_1}^2 + \left(\frac{\partial T}{\partial A_2}\right)^2 \sigma_{A_2}^2 = \\ &= \left(\frac{\partial T}{\partial R}\right)^2 \left[ \left(\frac{\partial R}{\partial A_1}\right)^2 \sigma_{A_1}^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial A_2}\right)^2 \sigma_{A_2}^2 \right], \end{aligned} \quad (4)$$

где  $\sigma_{A_1}$  и  $\sigma_{A_2}$  – дисперсии измерения оптических плотностей. Дифференцирование уравнения (3) с использованием известного соотношения для относительной погрешности измерения оптической плотности  $S_A/A = 0.434 S_T/A \times 10^{-A}$  (где  $S_A$  и  $S_T$  – предельные погрешности измерения оптической плотности и пропускания соответственно) [16, с. 78] с последующим переходом от дисперсий к предельным погрешностям приводит к уравнению

$$\begin{aligned} |\Delta T| &= \frac{(0.434)^2 T^2 S_T}{bc(\epsilon_2^I \epsilon_1^{HI} - \epsilon_1^I \epsilon_2^{HI})} \times \\ &\times \left\{ \left( \frac{\epsilon_2^I}{1-\alpha} + \frac{\epsilon_2^{HI}}{\alpha} \right)^2 \times 10^{2c[\epsilon_1^I \alpha + \epsilon_1^{HI}(1-\alpha)]} + \right. \\ &\left. + \left( \frac{\epsilon_1^I}{1-\alpha} + \frac{\epsilon_1^{HI}}{\alpha} \right)^2 \times 10^{2c[\epsilon_2^I \alpha + \epsilon_2^{HI}(1-\alpha)]} \right\}^{1/2}, \end{aligned} \quad (5)$$

где  $\Delta T$  – предельная абсолютная погрешность измерения температуры двухволновым способом;  $\alpha = [I]/([I] + [HI]) = [I]/c$  – степень ионизации индикатора; остальные обозначения приведены ранее.

Полученное аналитическое выражение (5) содержит параметры различной природы. Приборная характеристика  $S_T$  для качественных приборов составляет  $\sim 0.002$  [18, с. 73]. Коэффициенты

экстинкции двух форм индикатора, а также угловой коэффициент  $b$  детерминированы его химической природой и для выбранной системы буфер-индикатор постоянны. Следовательно, оптимизация термохромного раствора, обеспечивающего максимальную точность измерения температуры в выбранном диапазоне, сводится к выбору индикатора с наибольшими относительными различиями коэффициентов экстинкции при каких-либо двух длинах волн (представляется очевидным, что желательно выбирать длины волн по разные стороны от изобестической точки, если она есть) и последующему нахождению значений концентрации и степени ионизации в уравнении (5), соответствующих минимуму функции. Это можно выполнить с помощью любой из многих доступных компьютерных программ, позволяющих минимизировать аналитические зависимости по двум параметрам численными методами; например, "EUREKA" фирмы "Borland".

Подбор и оптимизация состава термохромного раствора проводятся по следующей схеме.

1. Выбирается индикатор со значением  $pK'$  в рабочем диапазоне *трис*-HCl-буфера (7.1 - 9.3) и максимально различающимися спектрами поглощения двух форм в соответствующем конкретному прибору спектральном диапазоне. Выбираются две аналитические длины волн, где различия максимальны и определяются четыре значения коэффициентов экстинкции (для протонированной и непротонированной форм).

2. Вычисляются минимизацией уравнения (5) оптимальные значения  $c$  и  $\alpha$ ; на этом этапе, если неизвестны параметры  $b$  и  $S_T$ , им можно приписывать любые значения, но численное значение функции при этом теряет смысл абсолютной погрешности измерений температуры.

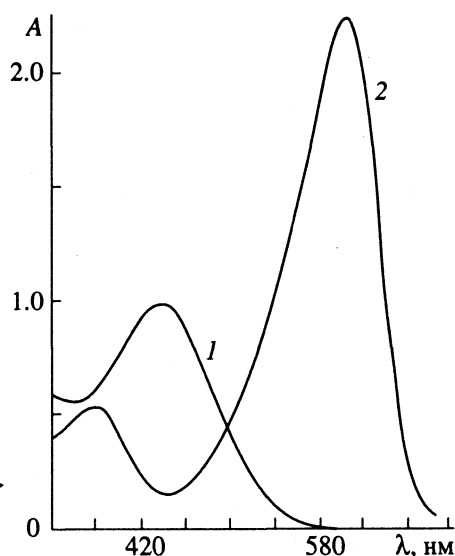


Рис. 1. Спектры поглощения протонированной (1) и непротонированной (2) форм индикатора тимолового синего.

3. Из величины оптимального значения степени ионизации и литературного (или экспериментально определенного) значения константы ионизации индикатора с использованием уравнения Гендерсона-Хассельбаха вычисляется "оптимальное" значение pH буферного раствора при температуре  $T$  (температура в уравнении (5), соответствующая середине интересующего температурного диапазона).

4. Готовится раствор с "оптимальными" значениями pH и концентрации индикатора. После этого на спектрофотометре, оснащенный надежным термостатированием и системой измерения температуры, проводятся измерения, необходимые для вычисления параметров  $a$  и  $b$  в уравнении (3).

5. С полученными в п. 4 параметрами  $a$  и  $b$  уточняется оптимальное значение pH, готовится оптимальный термохромный раствор и повторяются измерения по п. 4; полученные уточненные значения совместно с четырьмя коэффициентами экстинкции используются для вычисления определяемой температуры по уравнению (3) и оценки погрешности измерений по уравнению (5). Эти же результаты используются и для построения калибровочного графика (если необходимо).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали индикаторы и другие реактивы производства "Реахим" квалификации "ч." или "х. ч." без дополнительной очистки; *трис*-(гидроксиметил)-аминометан (Трис) фирмы "Sigma" (США); 0.1 М HCl готовили из фиксанала.

Спектрофотометрические измерения проводили на спектрофотометре "Ultrospec" фирмы "LKB" (Швеция), оснащенный термостатированным (с помощью водяного термостата МК 70 фирмы "MLW", Германия) кюветодержателем. Температуру в кювете контролировали помещаемой непосредственно в раствор заплавленной в стекло термопарой хромель-копель, которую предварительно калибровали по метрологически поверенному платиновому термометру сопротивления с точностью до 0.05 К.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Справедливость приведенного выше анализа проверяли с использованием 0.05 М *трис*-HCl-буфера и четырех кислотно-основных индикаторов сульфоталеинового ряда: тимоловый синий (ТС), крезоловый красный (КК), феноловый красный (ФК) и бромтимоловый синий (БТС). Логика оптимизации состава термохромного раствора будет подробно проиллюстрирована на примере ТС.

На рис. 1 представлены спектры поглощения двух форм индикатора, полученные при идентичных концентрациях растворов, приготовленных разбавлением в соотношении 100 : 1 исходного раствора ТС в метаноле (2.35 г/л) 0.05 М ацетат-

ным буфером (рН 4.5) для протонированной формы и 0.05 М КОН – для непротонированной формы. На основании анализа этих спектров выбраны длины волн 440 и 600 нм в качестве аналитических для работы в видимом диапазоне.

В таблице приведены значения коэффициентов экстинкции для обеих форм, нормированные на максимальное значение для непротонированной формы. Полагая, что середина представляющего интереса диапазона температур 300 К (27°C), по уравнению (5) находим  $\alpha_{\text{опт}} = 0.267$ ; оптимальное значение рН при 27°C находим по уравнению

$$pH_{\text{опт}} = pK' + \lg([I]/[HI])_{\text{опт}} = 9.01 - 0.44 = 8.57.$$

При этом расчете мы не учитываем температурную зависимость  $pK'$ , так как исходно эти данные отсутствуют. Используя литературные данные о зависимости рН *трис*-НСI-буфера от температуры  $-0.028 \text{ K}^{-1}$  [19], вычисляем “оптимальное” значение рН буфера при 20°C (8.77). По уравнению Гендерсона–Хассельбаха с использованием значения  $pK' = 8.18$  для Триса при 20°C [20] вычисляем степень ионизации такого буфера (3.9); следовательно, для приготовления 0.05М буфера необходимо ввести в состав буфера НСI до концентрации 0.0102 М (приготовление *трис*-НСI-буфера по расчету предпочтительнее, чем по рН-метрическому контролю, так как известны частые ошибки, обусловленные применением стеклянных электродов при работе именно с этим буфером [21]).

На основе приготовленного таким способом буфера готовим рабочий раствор индикатора с найденной по уравнению (5) концентрацией  $c_{\text{опт}} = 1.444$ ; концентрация забуференного раствора такая, при которой в 0.05 М КОН оптическая плотность при 600 нм составляла бы 1.444. Из экспериментально измеренных температурных зависимостей оптических плотностей этого раствора при выбранных длинах волн, по уравнениям (1) и (3) вычисляем значения  $a$  и  $b$  (6.31 и 1778 К соответственно). Найденное на данном этапе значение  $b$  позволяет рассчитать кажущийся температурный инкремент  $pK'$  Триса для данной системы по закону Вант-Гоффа:  $d(pK')/dT = b/T^2 = 0.020 \text{ K}^{-1}$ . Отличие полученного значения от литературного

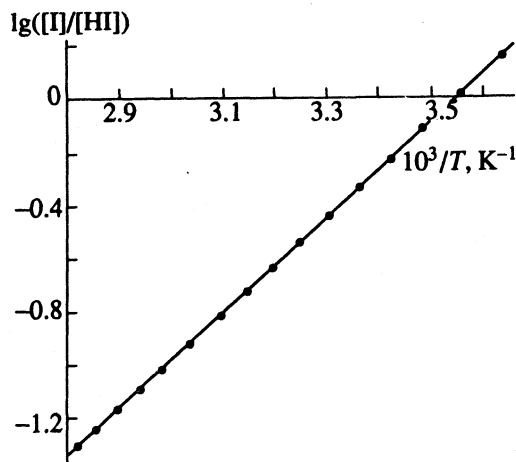


Рис. 2. Рассчитанная из экспериментальных данных зависимость в координатах уравнения (1) для тимолового синего.

обусловлено температурной зависимостью  $pK'$  индикатора.

С использованием полученного значения  $b$  находим, что при 20°C оптимальное значение рН составляет не 8.77, а 8.71. Уточненный состав буфера с таким рН вычисляем согласно изложенному выше. На рис. 2 представлена зависимость  $\lg([I]/[HI])$  от  $1/T$ , рассчитанная по уравнениям (1) и (3) из экспериментальных данных для оптимизированного термохромного раствора ТС-*трис*-НСI (в диапазоне от 0 до 80°C). Видно, что предсказываемая уравнением (1) линейная зависимость хорошо выполняется, т.е. предложенная модель адекватно описывает систему. При практическом использовании раствора расчет неизвестной измеряемой температуры проводится по уравнению (3). Погрешность измерения температуры с этим раствором, вычисленная по уравнению (5), составляет 0.18 К.

Результаты аналогичных экспериментальных и расчетных исследований с другими индикаторами суммированы в таблице. Во всех случаях строго соблюдалась линейная зависимость (как на рис. 2). На примере БТС, спектры поглощения обеих

Исходные, расчетные и экспериментальные данные для термохромных растворов

Индикатор	$pK'$	$c_{\text{опт}}$	$\alpha_{\text{опт}}$	$pH_{\text{опт}}$	$\lambda_1, \text{ нм}$	$\lambda_2, \text{ нм}$	$\epsilon_1^{\text{HI}}$	$\epsilon_1^{\text{I}}$	$\epsilon_2^{\text{HI}}$	$-a$	$b, \text{ К}$	$\Delta T, \text{ К}$
ТС	9.01	1.444	0.267	8.71	440	600	0.432	0.066	0	$6.37 \pm 0.02$	$1780 \pm 10$	0.18
КК	8.40	1.378	0.281	8.12	441	574	0.410	0.107	0.034	$6.02 \pm 0.07$	$1680 \pm 20$	0.22
ФК	7.92	1.360	0.286	7.65	436	559	0.411	0.109	0.039	$6.00 \pm 0.10$	$1680 \pm 30$	0.22
БТС1	7.19	1.424	0.266	6.91	432	617	0.438	0.081	0.002	$6.87 \pm 0.03$	$1930 \pm 10$	0.17
БТС2	7.19	0.764	0.445	7.23	340	306	0.553	0.323	0.437	$6.55 \pm 0.03$	$1930 \pm 10$	0.5
БТС3	7.19	0.668	0.415	7.20	277	306	0.671	0.571	0.437	$6.58 \pm 0.03$	$1930 \pm 10$	0.6

Примечание. Коэффициенты экстинкции нормированы на максимум в спектре поглощения непротонированной формы ( $\epsilon_2^{\text{I}}$ ); концентрация выражена в единицах оптической плотности (непротонированной формы в максимуме) на мл. Варьируемые параметры оптимизированы для 300 К; при расчете  $\Delta T$  полагали  $S_T = 0.002$ . Значения  $pK'$  приведены по [22] для 20°C и  $\mu = 0.01 - 0.05$ .

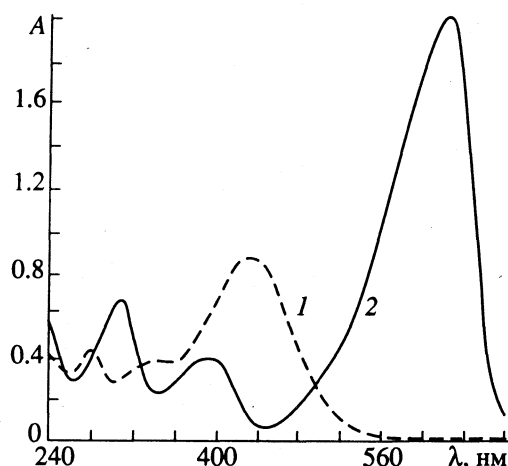


Рис. 3. Спектры поглощения протонированной (1) и непротонированной (2) форм индикатора бромтимолового синего.

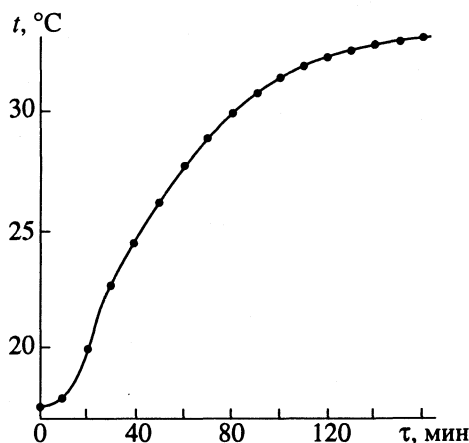


Рис. 4. Кинетика установления теплового равновесия в кювете детектора хроматографа "Миличром 4-ВУФ".

форм которого приведены на рис. 3, можно проиллюстрировать влияние соотношения коэффициентов экстинкции на чувствительность методики. Как видно из данных таблицы, этот индикатор можно использовать и при работе в ближней ультрафиолетовой области (ср. данные для БТС2 и БТС3), однако расчетная погрешность измерения температуры возрастает в ~3 раза. Следует отметить также, что небольшие отклонения значений рН и  $c$  от рассчитанных оптимальных не влияют существенно на чувствительность и точность метода; например, для БТС1 раствор с рН 7.2 (вместо 6.9) при 20°C характеризуется  $\Delta T = 0.20$  К.

Вопрос о стабильности оптимизированных термохромных растворов подробно не исследовался, однако накопленные в ходе работы наблюдения дают основания считать, что система с БТС наиболее стабильна – при хранении раствора в бытовом холодильнике его можно использовать в течение как минимум месяца без перекалибровки. В качестве примера практического использования предлагаемого способа на рис. 4 приведена

динамика установления теплового равновесия в кювете объемом 1.5 мкл микроколоночного жидкостного хроматографа "Миличром 4-ВУФ" со спектрофотометрическим детектором для видимого спектрального диапазона, полученная с системой БТС1. В этом эксперименте впервые удалось количественно оценить эффект разогрева оптического блока за счет источника излучения – галогеновой лампы КГМ 6.3-15.

Можно полагать, что аналогичный подход применим и к фотоколориметрам, у которых возможна быстрая смена светофильтров.

Авторы выражают благодарность М.П. Перельройзену за помощь в обсуждении результатов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sano S., Takaki R. // J. Phys. Soc. Japan. 1983. V. 52. № 5. P. 1549.
2. Langbein H., Noeske R., Roebisch G. // Z. Chem. 1983. V. 23. № 4. S. 149.
3. Валидуда Г.И., Липунова Г.Н., Дариенко Е.П. и др. // Журн. прикл. спектроскопии. 1983. Т. 38. № 3. С. 444.
4. Шведова Л.А., Татиколов А.С., Кузьмин В.А. и др. // Докл. АН СССР. 1984. Т. 276. № 3. С. 654.
5. Kawamura T., Ogawa T., Yamabe T. et al. // Inorg. Chem. 1987. V. 26. № 21. P. 3547.
6. Rauf M.A., Zaman M.Z. // Spectrochim. Acta. Pt A. 1987. V. 43A. № 9. P. 1171.
7. Lavabre D., Nichean J.C., Levy G. // J. Chem. Educ. 1988. V. 65. № 3. P. 274.
8. Kotowski M., Van Eldik R., Ali Kazak Bin et al. // Inorg. Chim. Acta. 1987. V. 131. № 2. P. 225.
9. Соложенкин П.М., Калонтаров И.Я., Семенов В.В. Термоиндикатор: А. с. 461318 СССР // Б. И. 1975. № 7. С. 102.
10. Шамовский Г.Г., Кожанова Л.А. Спектрофотометрический способ измерения температуры: А. с. 1515070 СССР // Б. И. 1989. № 38. С. 179.
11. Дузу П. Криобиохимия. М.: Мир, 1980. С. 53.
12. Jumean F.H., Khamis M.I., Salaita G.N. // J. Indian Chem. Soc. 1980. V. 57. P. 995.
13. Jumean F.H. // Ibid. 1986. V. 63. P. 967.
14. Blume P. Enzymology in the Practice of Laboratory Medicine. N.Y.: Acad. Press., 1974. P. 246.
15. Bowie L., Esters F., Gochman N. // Clin. Chem. 1976. V. 22. № 4. P. 449.
16. Булатов М.И., Калинин И.П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. Л.: Химия, 1986. С. 43.
17. Гудым В.К. // Журн. аналит. химии. 1988. Т. 43. № 4. С. 613.
18. Доерфел К. Статистика в аналитической химии. М.: Мир, 1969. С. 64.
19. Bates R.G., Bower V.E. // Anal. Chem. 1956. V. 28. № 8. P. 1322.
20. Альберт А., Сергент Е. Константы ионизации кислот и оснований. М.; Л.: Химия, 1964. С. 36.
21. Bauer J.D. Clinical Laboratory Methods. Ninth Edition. ST. Louis; Toronto; Princeton: The C.V. Mosby Company, 1982. P. 561.
22. Бишоп Э. Индикаторы. М.: Мир, 1976. Т. 1.

**МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

УДК 543.42+543.544

**ВЛИЯНИЕ ШИРИНЫ ЩЕЛИ МОНОХРОМАТОРА  
СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОГО ДЕТЕКТОРА  
НА ПАРАМЕТРЫ СПЕКТРА ПОГЛОЩАЮЩИХ ВЕЩЕСТВ**

© 1994 г. Л. А. Кожанова, Г. Г. Шамовский

*Российская академия наук, Сибирское отделение, Новосибирский институт биоорганической химии  
Конструкторско-технологический институт прикладной микроэлектроники, Новосибирск*

С точки зрения изучения возможности использования спектрофотометрических детекторов в хроматографическом анализе рассмотрено влияние ширины щели монохроматора и характеристик оптического тракта (суммарный спектр излучения монохроматора и чувствительности фотоприемника) на форму спектра поглощающего свет вещества и отклонения от закона Бера. Показано, что для узких полос в спектре поглощения вещества основной вклад в искажение формы спектра вносит ширина щели, в то время как для широкополосных спектров – крутизна оптического тракта. Установлено, что отклонение калибровочных кривых анализируемых веществ от линейности определяется в основном шириной щели монохроматора, в то время как их наклон значительно зависит также и от индивидуальной формы каждого оптического тракта.

Для решения многих практических задач методом жидкостной хроматографии широкое распространение получили спектрофотометрические детекторы для ультрафиолетовой и видимой областей спектра. Изучение возможности использования таких детекторов для проверки гомотенности и количественного разложения плохо разделенных хроматографических пиков, а также для идентификации индивидуальных веществ при хроматографии требует исследования влияния спектральной ширины щели монохроматора (аппаратной функции детектора) на сопоставимость спектральных данных, полученных на различных приборах, соблюдение закона Бера и решение ряда метрологических вопросов. Аналогичные проблемы возникают и при прямом спектрофотометрическом анализе многокомпонентных смесей.

Поскольку спектральная ширина щели спектрофотометрических детекторов может варьировать в широких пределах, достигая в отдельных случаях 10 - 20 нм, необходимо иметь четкое представление о характере ее влияния на величину измеряемой оптической плотности и форму спектра исследуемого вещества. Данному вопросу посвящено большое количество публикаций [1 - 8]. Предложенные методы позволяют оценить многие эффекты, обусловленные спектральной щелью конечной (ненулевой) ширины, и в некоторых случаях откорректировать результаты измерений; однако некоторые источники искажений результатов остались не рассмотренными, чем и можно объяснить недостаточно полное совпадение расчетных и экспериментальных данных.

Алгоритм расчета различий между измеряемой и истинной оптической плотностью в зависимости от ширины щели у большинства авторов сходный: задаются функция, описывающая форму щели (аппаратная функция), и другая функция для описания формы спектральной полосы поглощающего свет вещества (истинного спектра); ожидаемый инструментальный спектр рассчитывается с помощью компьютерного интегрирования сканированием истинного спектра щелью.

Так, в работе [1] проведен расчет для треугольной формы щели для монохроматоров с переменной по спектральному диапазону дисперсией (призмные монохроматоры). Форма истинного спектра вблизи максимума задавалась двумя различными функциями – параболической и двумя пересекающимися прямыми с противоположными наклонами. Авторы [2] предложили параболическую функцию и для щели, и для абсорбционной кривой. В [3] найдено, что наилучшим приближением спектра вещества является подходящая комбинация функций Гаусса и Лорентца. В [4] использованы треугольная форма для щели и функция Гаусса для спектра вещества. Авторы [5] провели расчет для прямоугольной щелевой функции, спектр вещества успешно описывали производными различных порядков в терминах приближений Тейлора.

Результаты таких расчетов позволили оценить погрешность измерения оптической плотности в зависимости от отношения полуширины щели монохроматора к полуширине спектральной полосы поглощения вещества для различных интервалов оптических плотностей [3, 4]; количественно описать отклонения от линейности, возникающие

при больших оптических плотностях за счет широкой щели [2, 4 - 6], и изменение наклона калибровочных кривых [5].

Авторы получили достаточно хорошее совпадение рассчитанных и экспериментальных данных для случая достаточно узких спектральных щелей [4, 5], однако совпадение было тем хуже, чем более широкие щели рассматривались, причем эти факты невозможно было объяснить простым приближением функций, описывающих форму щели монохроматора и спектра вещества. Авторы [5], например, анализируя полученные экспериментальные данные, отмечают, что для точки перегиба в спектре вещества совпадение между предсказанным и наблюдаемым отклонениями от линейности прекрасное, однако наклон калибровочной кривой предсказывается плохо и причина этого факта непонятна.

Общим для всех перечисленных подходов к расчету влияния ширины щели на форму спектра поглощения вещества является исключение из рассмотрения крутизны оптического тракта – зависимости от длины волны суммарной характеристики, включающей интенсивность источника света, спектральный коэффициент пропускания оптического канала, спектральную чувствительность фотоприемника. Поскольку учет этой составляющей привел бы к значительному усложнению всех расчетов, ее полагают постоянной в пределах щели. В работе [4] приведен даже вид оптического тракта, снятый для спектрофотометра "Spectronic 20" в видимом диапазоне, однако при расчетах он необоснованно игнорируется. Авторы [4] полагают, что, поскольку в пределах щели оптический тракт можно считать прямолинейным, то уменьшение вклада в поглощение с одной стороны от средней длины волны компенсируется увеличением вклада с другой стороны. Авторы [5] прямо указывают на то, что причиной плохого совпадения некоторых рассчитанных и экспериментальных результатов является неучтенная зависимость интенсивности падающего света и чувствительности фотоприемника от длины волны.

Цель настоящей работы – исследование совместного влияния ширины щели монохроматора и крутизны оптического тракта в пределах щели на форму спектра поглощающего вещества и отклонение от линейности калибровочных кривых, обсуждение в рамках предложенного подхода некоторых экспериментальных фактов и возможностей практического использования результатов расчетов.

## ТЕОРИЯ

Моделирование искажения спектров, вызываемого реальными спектрофотометрами, проводилось с помощью специально разработанной компьютерной программы, которая позволяет

рассчитать влияние спектральной ширины щели и формы оптического тракта на абсорбционный спектр вещества для приборов с линейной дисперсией.

Расчет проводился с учетом следующих допущений: а) однородное распределение поглощающего вещества в кювете спектрофотометра; б) соблюдение закона Бера для истинного спектра (фактически для спектра поглощения вещества, снятого на приборе с узкой щелью); в) отсутствие рассеянного света, а также влияния на поглощение других химических, фотохимических, температурных, оптических факторов.

Оптическая плотность в каждой точке спектра поглощения вещества в выбранном спектральном диапазоне рассчитывалась методом численного интегрирования с использованием 40 - 100 интервалов в пределах щели по следующей формуле:

$$A(\lambda_0) = \lg \left\{ \int_{-\Delta/2}^{+\Delta/2} h(\lambda - \lambda_0) I(\lambda) d\lambda \times \right. \\ \left. \times \left( \int_{-\Delta/2}^{+\Delta/2} h(\lambda - \lambda_0) I(\lambda) \times 10^{-\epsilon(\lambda)cl} d\lambda \right)^{-1} \right\},$$

где  $\lambda_0$  – центральная длина волны интервала интегрирования от  $-\Delta/2$  до  $+\Delta/2$  ( $\Delta$  – ширина щели, нм) для каждой точки спектра вещества;  $A(\lambda_0)$  – рассчитанная оптическая плотность для каждой (из ~100) точки абсорбционного спектра вещества в выбранном спектральном диапазоне;  $\lambda$  – текущая длина волны, нм;  $h(\lambda - \lambda_0)$  – функция, описывающая форму спектральной щели монохроматора и определяемая конструкцией монохроматора;  $I(\lambda)$  – комбинированная функция, описывающая оптический тракт и включающая зависимость от длины волны интенсивности источника света, потерь света на оптических элементах и спектральной чувствительности фотоприемника;  $\epsilon(\lambda)$  – коэффициент экстинкции вещества, полученный на спектрофотометре с узкой щелью (~0.1 нм), абсорбционный спектр с этими значениями  $\epsilon(\lambda)$  рассматривается как истинный;  $c$  – концентрация вещества, измеренная в единицах, согласованных с коэффициентом экстинкции;  $l$  – длина оптического пути, см.

Исходные функции  $h(\lambda - \lambda_0)$ ,  $I(\lambda)$ ,  $\epsilon(\lambda)$  необходимые для расчета оптической плотности по программе, могут быть заданы двумя способами: с помощью кусочно-линейных приближений с любой необходимой дискретностью (этот способ позволяет описать практически все обычно встречающиеся формы щели, абсорбционного спектра вещества и оптического тракта); а также в виде приближений этих функций функцией Гаусса, что позволяет быстро и просто варьировать различные параметры и предпочтительнее при модельных расчетах.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали хромат калия и гидроксид калия квалификации "х. ч." без дополнительной очистки. Спектр поглощения 0.04 М хромата калия в 0.05 н. КОН снимали по точкам с интервалом 5 нм относительно растворителя на спектрофотометре "Spekol 20" фирмы "Carl Zeiss" со спектральной щелью треугольной формы с шириной на полувысоте 15 нм. Измерение оптического тракта спектрофотометра в диапазоне 322 - 428 нм проводили по точкам с интервалом 1 нм при ширине щели монохроматора 15 нм. Сначала подбирали усиление при 428 нм так, чтобы измеряемое пропускание было 100%, а затем проводили измерения при других длинах волн без изменения коэффициента усиления.

Компьютерный расчет ожидаемых инструментальных спектров веществ проводили методом численного интегрирования на компьютерах IBM PC-XT(AT) с удвоенной точностью.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для качественной оценки совместного влияния спектральной щели монохроматора и крутизны оптического тракта проанализирована модельная система: истинный спектр вещества – функция Гаусса с максимумом при 375 нм и шириной на полувысоте 20 нм; спектральная щель имеет форму равнобедренного треугольника с шириной на полувысоте 10 нм; оптические тракты трех разных типов. На рис. 1 представлен исходный спектр и просканированные щелью спектры при соответствующих оптических трактах.

В полном соответствии с многочисленными литературными данными при нулевой крутизне оптического тракта влияние щели проявляется в "сглаживании" – уменьшении интенсивности поглощения в центральной части и повышении интенсивности поглощения на крыльях спектра с сохранением симметрии и положения максимума (кривые 3 и 3').

Спектр 4 соответствует линейно возрастающему по спектральному диапазону тракту 4'. Видно, что при таком тракте наряду со сглаживанием спектра появляется асимметрия и происходит смещение максимума в сторону меньших интенсивностей светового потока. Поскольку крутизна тракта 4' мала, величина эффектов невелика (максимум смещен всего на 0.4 нм), хотя из сопоставления спектров 3 и 4 видно, что смещение в коротковолновой части больше, чем в длинноволновой. Это обусловлено большим относительным изменением тракта в пределах щели в коротковолновой части диапазона по сравнению с длинноволновой.

Спектр 2 соответствует тракту 2' с нелинейно уменьшающейся по спектральному диапазону интенсивностью. Поскольку относительная кру-

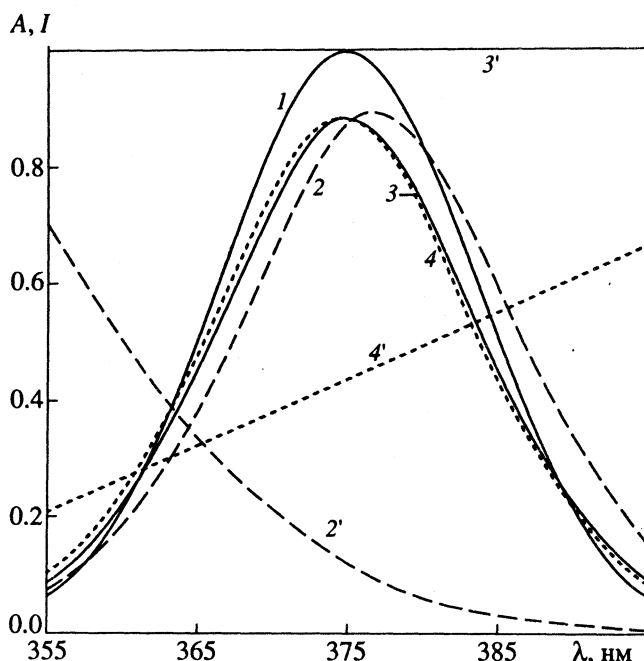


Рис. 1. Модельные исходный (1) и расчетные (2 - 4) спектры поглощения и соответствующие им оптические тракты (2' - 4'); спектры 2 - 4 получены сканированием исходного спектра треугольной щелью с шириной на полувысоте 10 нм.

тизна данного тракта больше, чем тракта 4' смещение максимума спектра 2 в направлении уменьшения интенсивности тракта (1.9 нм) и его асимметрия значительно больше, чем у спектра 4.

Для проверки справедливости изложенного выше был промерен оптический тракт спектрофотометра "Spekol 20" и на нем же получен спектр поглощения щелочного раствора хромата калия. Эти результаты приведены на рис. 2 – кривая 3 для тракта и точки 2' для экспериментального спектра. Резкий скачок на кривой 3 при 371 нм обусловлен автоматически вводимым в монохроматоре прибором светофильтром для подавления рассеянного света в коротковолновой области. На рис. 2 представлены также истинный спектр этого раствора (табличные данные [9]) и рассчитанный по программе спектр (кривые 1 и 2 соответственно). Практически полное совпадение экспериментально измеренного спектра с расчетным свидетельствует об адекватности предложенной модели.

Переходя к количественной оценке влияния ширины щели и крутизны оптического тракта на спектр вещества, мы предполагаем рассмотреть следующие вопросы: 1) характер отклонения формы спектра вещества от истинной, что позволит оценить возможность идентификации веществ по их спектральным характеристикам, а также сопоставления спектральных данных, полученных на различных приборах; 2) соблюдение закона Бугера–Ламберта–Бера, что позволит

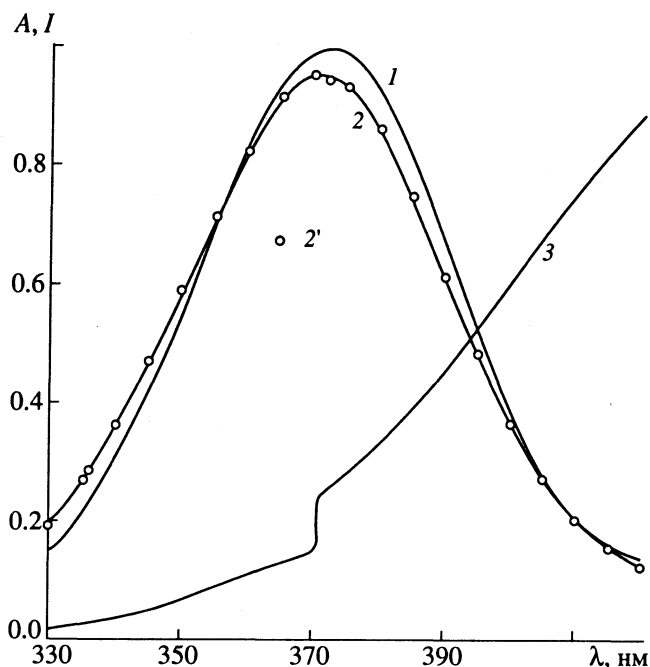


Рис. 2. Литературный (1), расчетный (2) и экспериментальный (2') спектры щелочного хромата калия, 3 – оптический тракт спектрофотометра "Spekol 20" (отн. ед.).

оценить гомогенность хроматографических пиков и возможность разложения плохо разделенных пиков на отдельные компоненты.

Все модельные расчеты проводились для трех длин волн симметричного спектра вещества гауссовой формы (кривая 1, рис. 1), выбранных по принципу наибольших различий в характере спектра: для точки спектрального максимума (375 нм) и двух длин волн вблизи точки перегиба, оптиче-

ская плотность в которых составляет половину от максимальной (для спектра с шириной на полувысоте 20 нм это соответствует длинам волн 365 и 385 нм, с изменением ширины спектра эти длины волн меняются).

Оптические тракты моделировались прямыми линиями с пропорционально меняющимися наклонами. Один из трактов с максимальным наклоном показан на рис. 1 (кривая 4'). Остальные используемые в расчетах тракты имеют наклоны меньше, чем у данного тракта, соответственно в 2, 4, 8 раз в спектральном диапазоне 340 - 410 нм. Хотя форма оптического тракта может быть произвольной, его модель в виде прямых линий выбрана для облегчения сопоставления результатов расчета, кроме того, на практике в пределах ширины щели форма тракта во многих случаях близка к линейной.

Иллюстрации приведены для случая достаточно широкой спектральной щели треугольной формы (ширина на полувысоте 10 нм) для наглядного представления обсуждаемых эффектов.

Данные рис. 3 и 4 иллюстрируют проблемы, связанные с идентификацией веществ по их спектрам, снятым на разных приборах. На рис. 3 представлена зависимость отношения рассчитанной оптической плотности при выбранной длине волны к оптической плотности для истинного спектра от ширины спектра вещества. Кривая 1 относится к длине волны слева от максимума, кривая 3 – к длине волны справа от него, 4 – к длине волны максимума поглощения. Эти кривые соответствуют линейному оптическому тракту с максимальным наклоном (рис. 1, кривая 4'). Кривая 2 соответствует оптическому тракту с постоянной интенсивностью (рис. 1, кривая 3'). В данном случае перекоса спектра не происходит, поэтому

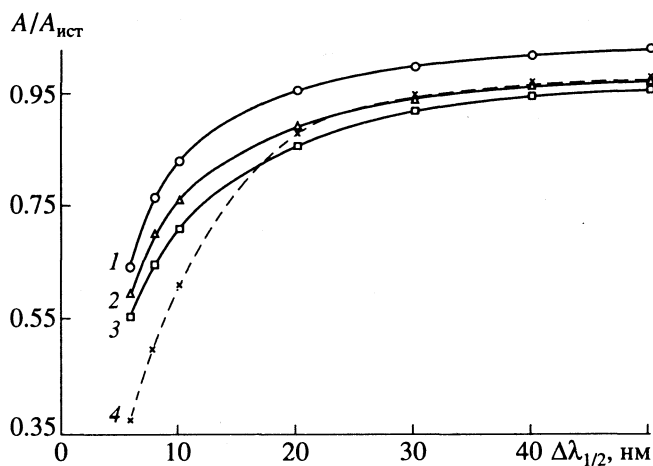


Рис. 3. Зависимости отношения рассчитанной оптической плотности к истинной от ширины спектра поглощения на полувысоте; кривые 1 - 3 относятся к длинам волн на крыльях спектра, 4 – к длине волны спектрального максимума. Подробные пояснения см. в тексте.

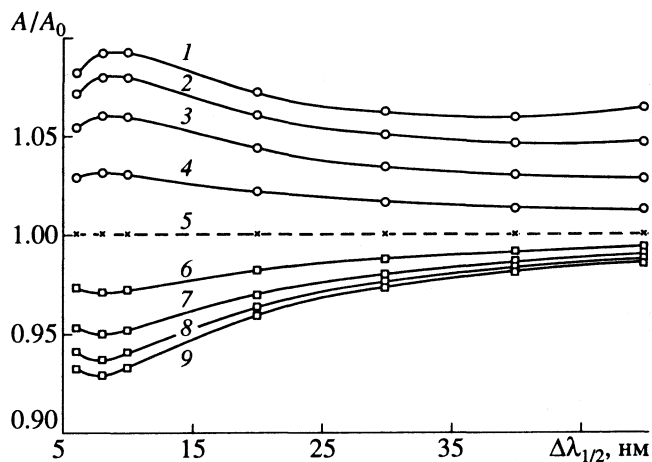


Рис. 4. Зависимости отношения оптической плотности, рассчитанной для наклонных трактов, к оптической плотности, рассчитанной для оптического тракта с постоянной интенсивностью света, от ширины спектра поглощения. Обозначения и подробные пояснения см. в тексте.



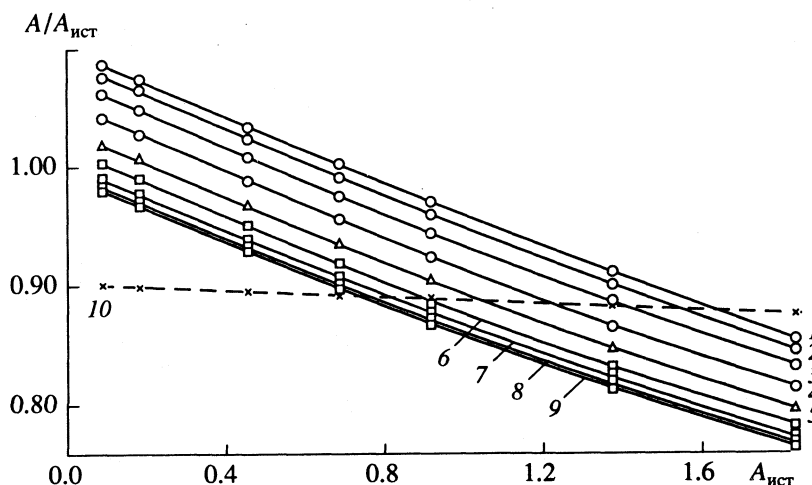


Рис. 5. Зависимости отношения оптической плотности, рассчитанной для наклонных трактов, к истинной от истинной оптической плотности. Кривые 1 - 9 относятся к длинам волн на крыльях спектра, 10 - к длине волны максимума спектра. Подробные пояснения см. в тексте.

оптические плотности для длин волн слева и справа от максимума, отображаемые кривой 2, одинаковы. Для максимума спектра (кривая 4), где спектр симметричен относительно центральной длины волны спектральной щели, оптическая плотность не зависит от крутизны прямолинейного тракта, ее величина такая же, как и для случая оптического тракта с постоянной интенсивностью света. В полном соответствии с литературными данными оптическая плотность меняется сильнее в максимуме спектра, чем на его крыльях.

Совместное влияние ширины щели и крутизны оптического тракта на оптическую плотность проиллюстрировано на рис. 3. Полезно выделить вклад, связанный непосредственно с крутизной оптического тракта. Это показано на рис. 4, где представлена зависимость оптической плотности, рассчитанной для наклонных трактов и отнесенной к оптической плотности, рассчитанной для той же щели, но для постоянной интенсивности светового потока ( $A_0$ ), от ширины спектра. Кривые 1 - 4 соответствуют длине волны слева от максимума спектра, кривые 6 - 9 - длине волны справа от него, кривая 5 - точке спектрального максимума, а также и кривой 2 на рис. 3. Наклон оптического тракта уменьшается каждый раз вдвое при переходе от кривой 1 к кривой 4 и от 9 к 6 соответственно (кривые 1 и 9 соответствуют оптическому тракту 4' на рис. 1). Данные рис. 4 демонстрируют несимметричный характер изменений для левого и правого крыльев спектра при линейном тракте. Для левого крыла эти изменения более значительны, причем, вопреки интуитивно ожидаемому, с увеличением ширины спектра влияние наклона может даже возрастать, в то время как для правого крыла спектра наблюдается тенденция полного нивелирования влияния наклона тракта. Все представленные кривые имеют

труднопредсказуемый экстремум при ширине спектра, примерно равной ширине щели.

Обобщая результаты, приведенные на рис. 3 и 4, можно сделать следующие заключения.

1. Влияние ширины щели как таковой сильнее проявляется в максимуме спектра, чем на его крыльях вблизи точки перегиба, в то время, как влияние крутизны оптического тракта в максимуме практически отсутствует.

2. Вклад, вносимый в сглаживание спектра щелью, является основным для узких полос в спектре поглощения вещества, в то время как для широкополосных спектров он сравним с влиянием крутизны оптического тракта.

3. Влияние крутизны оптического тракта приводит к несимметричным сдвигам в спектре поглощения вещества: при прямолинейных трактах оно сильнее проявляется при меньших значениях светового потока, так как относительное изменение интенсивности света внутри щели в этом случае больше.

Проблемы, связанные с нарушениями закона Бугера-Ламберта-Бера, вызванными влиянием ширины щели монохроматора и крутизны оптического тракта, проиллюстрированы на рис. 5. На рис. 5 представлена зависимость отношения рассчитанной оптической плотности к истинной оптической плотности от концентрации при трех выбранных ранее длинах волн (рис. 1, длины волн 365, 375, 385 нм). Кривые 1 - 5 относятся к длине волны 365 нм, 6 - 9 - к длине волны 385 нм, 10 - к длине волны максимума спектра 375 нм. Наклоны оптических трактов уменьшаются в 2 раза при переходе от кривой 1 к 4 и от 9 к 6 соответственно. Кривая 5 соответствует случаю с постоянным световым потоком по тракту, и оптические плотности при 365 и 385 нм равны. Для спектрального максимума (кривая 10) во всем рабочем диапазоне

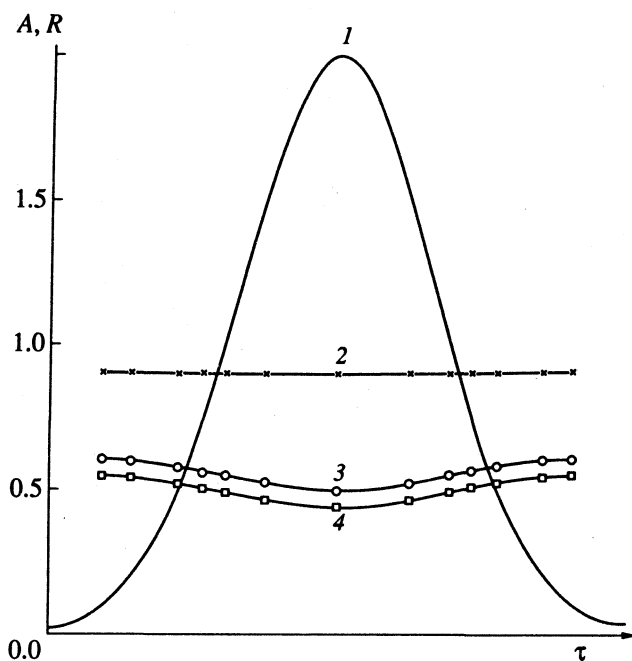


Рис. 6. Моделирование спектральных отношений для гомогенного хроматографического пика. Обозначения и подробные пояснения см. в тексте.

оптических плотностей не наблюдается зависимости от наклона оптического тракта и имеются лишь небольшие отклонения от закона Бера (кривая почти параллельна оси абсцисс), в то время как для длин волн на крыльях спектра отклонения от линейности значительны и наблюдается четко выраженная зависимость от наклона оптического тракта. Кривые 1 - 9 практически параллельны друг другу, что позволяет сделать заключение о том, что калибровочные зависимости оптической плотности от концентрации для разных оптических трактов отличаются только наклоном.

Таким образом, крутизна оптического тракта влияет только на коэффициент наклона калибровочной кривой, в то время как за отклонение калибровочной кривой от линейности отвечает ширина щели. Расчеты показывают, однако, что небольшой вклад в отклонение калибровочных кривых от линейности крутизна оптического тракта все же может вносить, и это необходимо учитывать там, где требуется особая точность. В остальных случаях отклонения от линейности можно рассчитывать с достаточной степенью надежности, используя алгоритмы, описанные ранее во многих работах, для случая постоянной интенсивности света по тракту. Это, однако, не относится к расчету изменения формы спектра: при неизвестной крутизне оптического тракта практически невозможно предсказать характер искажения спектра.

При хроматографии во многих случаях перво-степенным является вопрос о "гомогенности"

хроматографического пика. Все рассмотренные выше эффекты могут приводить к тому, что пик индивидуального вещества может не отвечать требованию постоянства спектральных отношений ( $R$ ). Однако, хорошо представляя характер искажений спектра, демонстрируемый нашими расчетами, эти трудности легко преодолеть просто правильным выбором длин волн для сбора спектральной информации. Это иллюстрирует рис. 6, на котором показан гипотетический гомогенный хроматографический пик (кривая 1) и три спектральных отношения (кривые 2 - 4). Спектральные отношения моделировались для детектора с шириной щели 10 нм и оптическим трактом, показанным кривой 4' на рис. 1. Истинный спектр вещества представлен кривой 1 на том же рисунке. Регистрируемые спектральные отношения  $R_1 = A(385 \text{ нм})/A(365 \text{ нм})$ ,  $R_2 = A(365 \text{ нм})/A(375 \text{ нм})$ ,  $R_3 = A(385 \text{ нм})/A(375 \text{ нм})$  равны для него 1.0, 0.5 и 0.5 соответственно. На рис. 6 соответствующие спектральные отношения представлены кривыми 2, 3 и 4. Поскольку характер изменения оптической плотности с концентрацией для максимума спектра и на его крыльях различен (рис. 5, кривые 10, 1, 9), а кроме того, из-за наклонного оптического тракта происходит несимметричное искажение спектра (рис. 1, кривая 4), то выбор спектральных отношений  $R_2$  и  $R_3$  может привести к неправильному заключению о негомогенности пика, в то время как для спектрального отношения  $R_1$  отклонения от закона Бера практически нивелируются, так как характер их одинаков для обеих длин волн. В то же время среднее значение спектрального отношения значительно отличается от истинного, что затрудняет идентификацию.

Таким образом, точное представление о характере влияния ширины щели детектора и характеристик оптического тракта на искажение спектра вещества и отклонения от закона Бера можно получить, проведя соответствующие расчеты, однако при качественной оценке можно руководствоваться следующими выводами общего плана.

1. Для узких полос в спектре поглощения вещества (отношение ширины спектра к ширине щели  $< 2$ ) основной вклад в искажение формы спектра вносит сглаживание его за счет широкой щели; крутизна оптического тракта не имеет большого значения. Это влияние сильнее всего проявляется в максимуме спектра. Для широкополосных спектров поглощения вещества (отношение ширины спектра к ширине щели  $\geq 2$ ) вклад, вносимый в искажение формы спектра крутизной оптического тракта, становится сравнимым с влиянием ширины щели. Это влияние проявляется в виде перекоса спектра в сторону меньших значений интенсивности света по тракту. Влияние крутизны оптического тракта максимально на крыльях спектра и практически отсутствует в точке его максимума.

2. Характер отклонения от закона Бера калибровочных кривых анализируемых веществ практически одинаков при любой форме оптического тракта и определяется только шириной щели монохроматора. Различие для крутых и пологих оптических трактов проявляется в виде изменения наклонов калибровочных кривых анализируемых веществ в зависимости от индивидуальной формы каждого оптического тракта и собственной крутизны спектра в каждой точке.

Авторы выражают благодарность М.П. Перельройзену и В.Н. Асадуллину за помощь в расчетах и обсуждение результатов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Eberhardt W.H.* // *J. Opt. Soc. Am.* 1950. V. 40. № 3. P. 172.
2. *Agterdenbos J., Vonk J.* // *Talanta.* 1971. V. 18. P. 467.
3. *Torgington P.* // *Appl. Spectrosc.* 1980. V. 34. № 2. P. 184.
4. *Strong F.C. (III)* // *Anal. Chem.* 1976. V. 48. № 14. P. 2155.
5. *Dose E.V., Guiochon G.J.* // *Ibid.* 1989. V. 61. P. 2571.
6. *Wenforth W.E.* // *J. Chem. Educ.* 1966. V. 43. № 5. P. 262.
7. *Nowicka-Jankowska T., Gorczynska K., Michalik A., Wieteska E.* *Analytical Visible and Ultraviolet Spectrometry.* V. 19. Amsterdam; Oxford; N.Y.; Tokyo: Elsevier, 1986. P. 184 - 186.
8. *Back E., Felicetta V.F., McCarthy J.L.* // *Anal. Chem.* 1958. V. 30. № 11. P. 1875.
9. *Бабко А.К., Пилипенко А.Т.* Фотометрический анализ. М.: Химия, 1968.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 535.243:543.426

ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ ДЕТЕКТОР ХРОМАТОГРАФА  
“МИЛИХРОМ-4М-F”

© 1994 г. Ю. А. Болванов\*, Л. А. Кожанова\*\*, С. В. Кузьмин\*, Г. Г. Шамовский\*

*Российская академия наук, Сибирское отделение*

*\*Конструкторско-технологический институт прикладной микроэлектроники, Новосибирск*

*\*\*Новосибирский институт биоорганической химии*

Описан флуориметрический детектор, предназначенный для работы в составе микроколоночного жидкостного хроматографа “Милихром-4”, позволяющий регистрировать интегральную интенсивность флуоресценции при любой фиксированной длине волны возбуждения в диапазоне 190 - 360 нм, использовать многоволновой режим регистрации при хроматографии, а также снимать УФ-спектры возбуждения веществ. Установлено, что полученные пределы обнаружения примерно в 50 раз ниже, чем при фотометрической детекции.

Флуориметрические детекторы являются в настоящее время одними из наиболее чувствительных и селективных из применяемых в жидкостной хроматографии, поэтому задача создания простых, надежных и недорогих флуориметрических детекторов остается актуальной.

Разработанный нами флуориметрический детектор предназначен для работы в составе микроколоночного жидкостного хроматографа “Милихром-4” и значительно расширяет области применения прибора. Флуориметрический детектор позволяет регистрировать интегральную интенсивность флуоресценции на любой фиксированной длине волны возбуждения в диапазоне 190 - 360 нм, модернизированный блок питания детектора обеспечивает возможность использования в качестве источника света как дейтериевой лампы ДДС-30 (штатный источник света хроматографа “Милихром”), так и ртутной лампы ДРГС-12, что позволяет увеличить чувствительность детекции при длине волны возбуждения 254 нм в 5 - 7 раз. Кроме того, флуориметрический детектор позволяет снимать УФ-спектры возбуждения веществ (только с ДДС-30) в диапазоне 190 - 360 нм, а также использовать многоволновой режим регистрации при хроматографии аналогично многоволновой фотометрии.

Основным элементом конструкции флуориметрического детектора является флуориметрическая кювета. Вогнутое зеркало с отверстием для возбуждающего света, расположенное сзади ячейки для анализируемых веществ, обеспечивает высокую эффективность сбора излучаемого света, который направляется на фотоприемник. (Аналогичная конструкция флуориметрической кюветы детектора “Kratos FS-970” приведена в [1].) Конструктивно флуориметрическая кювета полностью совместима с оптико-механиче-

ским блоком УФ-детектора хроматографа “Милихром” и взаимозаменяема с фотометрической кюветой без дополнительной юстировки. Геометрические размеры кюветы: длина – 1.8 мм, диаметр – 1.2 мм, объем – 3 мкл.

Модернизированная программа хроматографа обеспечивает как алгоритм измерения оптической плотности УФ-детектора с логарифмическим законом преобразования, так и алгоритм измерения флуоресценции с линейным законом преобразования. Результаты измерений отображаются на мониторе хроматографа и выводятся на самописец на любом из поддиапазонов от 0.05 до 10 относительных единиц. Возможна также и первичная математическая обработка хроматографических данных как при регистрации оптической плотности, так и при измерении флуоресценции.

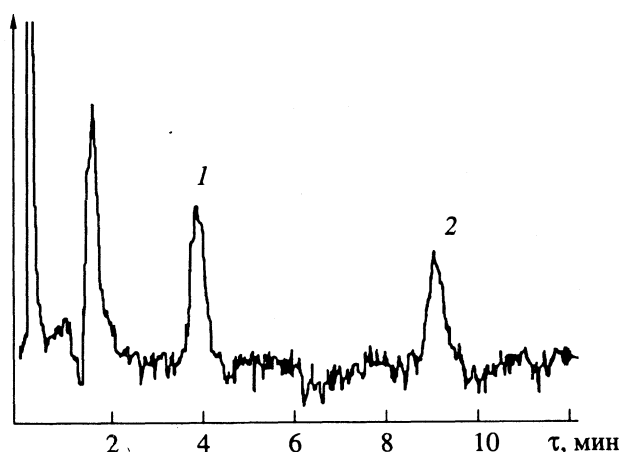


Рис. 1. Хроматограммы стандартных растворов антрацена (1) и бенз(а)пирена (2) на уровне пределов обнаружения (постоянная времени 2 с, остальные условия приведены в тексте).

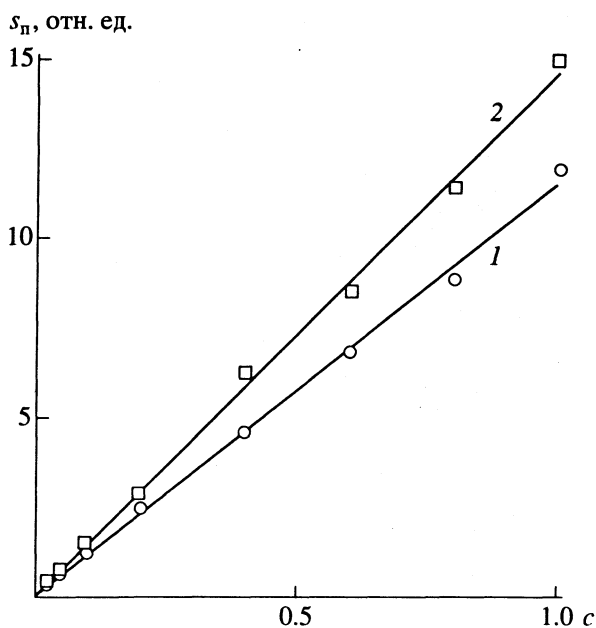


Рис. 2. Калибровочный график ( $c$  – концентрация,  $S_p$  – площадь пика) количественного хроматографического определения антрацена (1) и бенз(а)пирена (2) с флуориметрической детекцией. Диапазоны концентраций от 0 до 20 нг/мл для антрацена (1) и от 0 до 100 нг/мл для бенз(а)пирена (2).

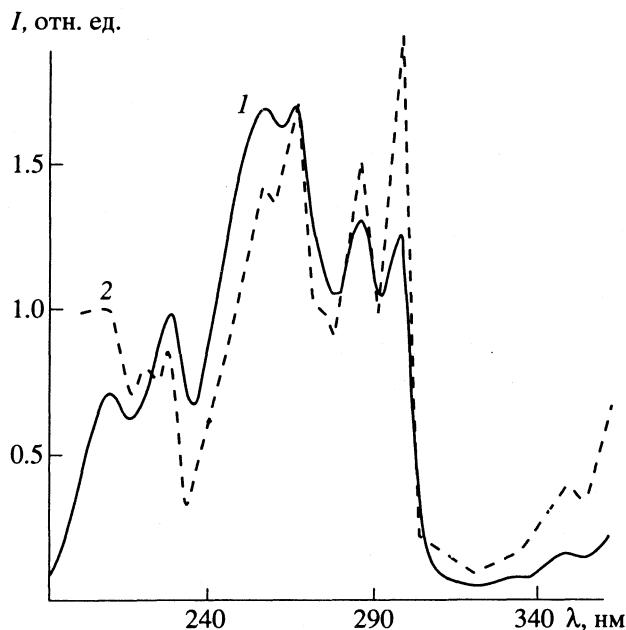


Рис. 3. Спектры возбуждения ( $I$  – интенсивность,  $\lambda$  – длина волны) бенз(а)пирена, снятые на флуориметрическом детекторе хроматографа "Милихром-4М-Ф" (1) и на флуориметре MPF-4 "Hitachi", Япония (2).

Одной из важнейших областей применения флуориметрических детекторов является анализ загрязнений окружающей среды. Наибольшее внимание исследователей привлекает определение полициклических ароматических углеводородов [2, 3]. Поэтому соединения именно этого

класса (антрацен и без(а)пирен) были выбраны для демонстрации возможностей флуориметрического детектора и сравнения его с фотометрическим детектором.

Использовали растворы без(а)пирена фирмы "Fluka AG, Buchs SG" и антрацена квалификации "ч." в очищенном ацетонитриле. Хроматографию проводили смесью ацетонитрил–вода (85 : 15) в качестве элюента на стандартных колонках "Милихром-4" (62 × 2 мм, наполненных Lichrosorb RP-18, 5 мкм, "Merck", Германия) со скоростью 100 мкл/мин. Объем пробы составлял 10 мкл. При фотометрическом определении регистрацию вели при 250 нм для антрацена и 296 нм для бензпирена; флуориметрическую регистрацию проводили с использованием ртутной лампы на длине волны возбуждения 254 нм. Пределы обнаружения, определенные как концентрация вещества в пробе, при которой амплитуда сигнала втрое превышает уровень шума, составили:

- для антрацена с УФ-детекцией – 25 нг/мл,
- для бенз(а)пирена с УФ-детекцией – 100 нг/мл,
- для антрацена с ФЛМ-детекцией – 0.5 нг/мл,
- для бенз(а)пирена с ФЛМ-детекцией – 2 нг/мл.

Пределы обнаружения, достигнутые при флуориметрической детекции, примерно в 50 раз ниже, чем при фотометрической детекции и сравнимы с аналогичными, описанными в работе [4] для флуориметрического детектора с двойным монохроматором и ртутно-ксеноновой лампой мощностью 200 Вт в качестве источника излучения. Пример хроматографического разделения стандартных растворов антрацена и бензпирена на уровне предела обнаружения показан на рис. 1. Типичные калибровочные графики для флуориметрического определения антрацена и бензпирена приведены на рис. 2. Относительное стандартное отклонение для середины приведенных диапазонов концентраций составляет ~0.06.

На рис. 3 для иллюстрации представлен спектр возбуждения раствора бенз(а)пирена в ацетонитриле (4.5 мкг/мл), снятый на описываемом детекторе; для сравнения представлен спектр возбуждения того же раствора, полученный на флуориметре MPF-4 ("Hitachi", Япония). Из приведенных данных следует, что детектор может позволить идентифицировать вещества по их спектрам при использовании соответствующих стандартов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беленький Б.Г., Ганкина Э.С., Мальцев В.Г. Капиллярная жидкостная хроматография. Л.: Наука, 1987. С. 64.
2. Richardson J.H., Larson K.M. // Anal. Chim. Acta. 1980. V. 116. № 2. P. 407.
3. Das B.S., Thomas G.H. // Ibid. 1978. V. 50. № 7. P. 967.
4. Cecil T.L., Rutan S.C. // J. Chromatogr. 1991. V. 556. № 3. P. 495.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544.08

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИАРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ  
С ПОМОЩЬЮ ЖИДКОСТНОГО ХРОМАТОГРАФА "ЦВЕТ-3110"  
С ЛАЗЕРНЫМ ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТОРОМ

© 1994 г. Г. Б. Владыкин, А. Ю. Радченко, И. И. Фролов, Я. И. Яшин

*Акционерное общество "Цвет", Дзержинск Нижегородской области*

Продемонстрирована возможность реализации высокой чувствительности детектирования лазерно-индуцированной флуоресценции полиароматических углеводородов при использовании низкоинтенсивного гелий-кадмиевого ионного лазера непрерывного действия и прямоочной оптической кюветы оригинальной конструкции.

Последнее время в жидкостной хроматографии все более широкое применение находят всевозможные лазерные источники излучения (полупроводниковые, газовые, ионные). Благодаря таким уникальным характеристикам, как высокая интенсивность излучения, монохроматичность, временная и пространственная когерентность, лазеры являются перспективными источниками излучения для флуоресцентного детектирования низких концентраций анализируемых веществ [1 - 9].

С целью максимального использования преимуществ лазерных источников разработано несколько конструкций детекторных ячеек, описание которых приводится в известных работах [2, 4, 7].

В работах [1 - 9] показана возможность детектирования низких концентраций производных аминокислот (на уровне менее фемтомоля) и полиароматических углеводородов (на уровне нескольких фемтомолей). Во всех работах использовалась оптическая схема детектирования лазерно-индуцированной флуоресценции (ЛИФ) с применением лазеров непрерывного действия с мощностью излучения от десятка милливатт до 17 Вт. Высокие результаты ЛИФ – детектирования ДНС – производных аминокислот [7] были реализованы при использовании гелий-кадмиевого ионного лазера непрерывного действия с линией 325 нм мощностью не менее 10 мВт типа ЛГН-504 и простейшей прямоочной кварцевой кюветы. Высокочувствительное ЛИФ – детектирование полиароматических углеводородов [9] было реализовано при использовании аргонового ионного лазера непрерывного действия с линиями 334 и 458 нм мощностью 17 Вт модели 171-17 фирмы "Spectra-Physiks".

В работах [1 - 9] эксперименты проводились на лабораторных установках. Отсутствие коммерческих лазерных флуориметрических детекторов связано с конструктивно несовместимой большой длиной (более 1 м) лазерных излучателей, применявшихся авторами рассмотренных работ. Проблема создания коммерческого лазерного флуориметрического детектора решается только в случае возможности использования более низкоинтенсивного лазерного излучателя длиной не более 600 мм.

Основной целью данной работы является демонстрация возможности реализации высокой чувствительности детектирования лазерно-индуцированной флуоресценции полиароматических углеводородов при использовании более низкоинтенсивного мощностью 3 мВт гелий-кадмиевого ионного лазера непрерывного действия с линией 325 нм и прямоочной оптической кюветы оригинальной конструкции [10]. Здесь же будет показана возможность хроматографического разделения и определения на уровне  $70 \times 10^{-18}$  моля бенз(а)- и бенз(е)пиренов с помощью лазерного флуориметрического детектора, серийно выпускаемого АО "Цвет" в составе жидкостного хроматографа "Цвет-3110".

*Особенности конструкции и принцип действия лазерного флуориметрического детектора.* Определение полиароматических углеводородов проводилось с помощью лазерного флуориметрического детектора жидкостного хроматографа "Цвет-3110". В состав хроматографа "Цвет-3110" входят: лазерный флуориметр Фл-00; блок измерения и питания БИП-06; два насоса БПЖ-71; блок автоматического дозирования БАД-38 с

термостатом колонок; компьютеризованный вычислительный интегратор типа САА-08.

Интегратор САА-08 служит для обчета результатов хроматографического анализа и управления режимами работы всех блоков хроматографа. Лазерный флуориметрический детектор хроматографа "Цвет-3110" функционально жестко связан с САА-08 и без интегратора работать не может. Поэтому к лазерному флуориметрическому детектору хроматографа "Цвет-3110" относятся: блок лазерного флуориметра Фл-00; блок измерения и питания БИП-06; интегратор САА-08.

На рис. 1 показана оптическая схема лазерного флуориметрического детектора. Лазерный флуориметрический детектор содержит: лазер 1, узел формирования лазерного излучения 2 в виде фокусирующей линзы, проточную кювету 3, каналы регистрации флуоресцентного излучения, включающие объектив сбора флуоресцентного излучения 4, интерференционный фильтровый монохроматор 5, фокусирующую линзу 6, полевую диафрагму 7, фотоприемник излучения флуоресценции 8, опорный канал 9, канал нормировки сигналов 10, включающий блок измерения и питания БИП-06 и интегратор САА-08.

Основными элементами оптической схемы детектора являются низкоинтенсивный гелий-кадмиевый ионный лазер непрерывного действия ЛГН-409 с мощностью излучения 3 мВт на линии 325 нм и проточная оптическая кювета [10], конструкция которой [10] показана на рис. 2.

При работе детектора излучение лазера 1 фокусируется линзой 2 в центр канала проточной кюветы 3. Проточный канал кюветы имеет в поперечном сечении прямоугольную форму 1 × 1 мм и длину 10 мм. В канале кюветы герметично установлены два металлических капилляра с зазором между торцами капилляров. Величина зазора определяется диаметром сфокусированного в кювете лазерного луча. При протекании элюента в зазоре между торцами капилляров формируется устойчивая струя элюента, не контактирующая со стенками кюветы. Лазерным лучом в канале кюветы индуцируется источник флуоресцентного излучения, длина которого определяется поперечным размером канала кюветы, а диаметр – диаметром сфокусированного луча лазера. Излучение флуоресценции собирается объективом 4, в переднем фокусе которого расположен лазерноиндуцированный источник флуоресцентного излучения, занимающий первично возбужденный объем анализируемого вещества в кювете 3.

Первично возбужденный объем анализируемого вещества создается в зазоре между торцами металлических капилляров кюветы и определяет величину детектируемого объема, равную 0.25 мкл.

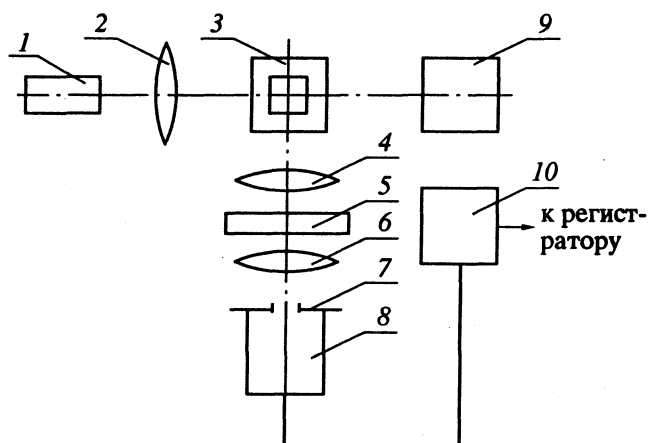


Рис. 1. Оптическая схема лазерного флуориметрического детектора жидкостного хроматографа "Цвет-3110".

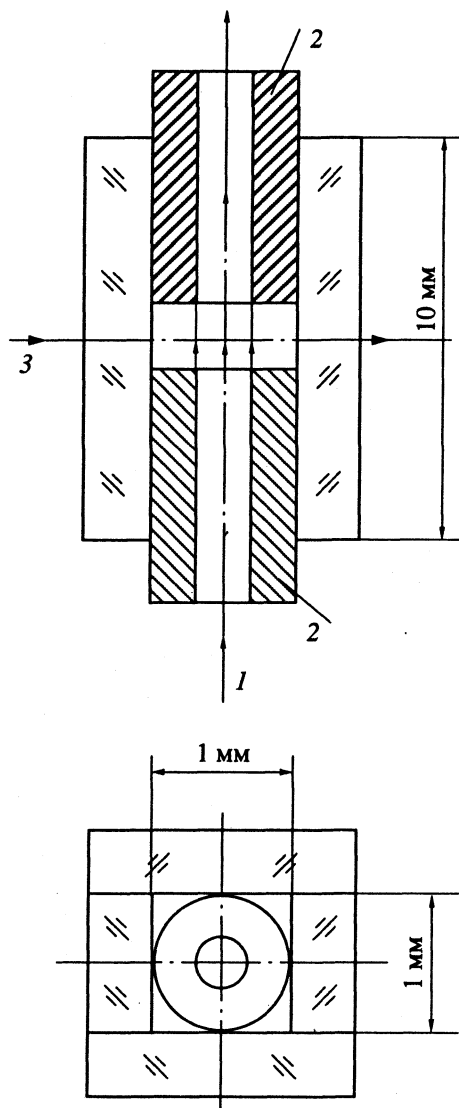


Рис. 2. Конструкция проточной оптической кюветы: 1 – элюент, 2 – капилляры из нержавеющей стали, 3 – излучение.

После объектива 4 параллельный пучок флуоресцентного излучения проходит через сменный интерференционный фильтр 5, предназначенный для выделения рабочей полосы флуоресцентного излучения бензопириенов на длине волны 403 нм. Далее излучение с помощью линзы 6 фокусируется на плоскость полевой диафрагмы 7 с прямоугольным световым окном. В плоскости полевой диафрагмы 7 создается действительно увеличенное изображение первично возбужденного объема и вторично возбужденных объемов. Полевая диафрагма 7 через свое прямоугольное окно пропускает изображение первично возбужденного объема на входное окно фотоприемника 8 и не пропускает изображение вторично возбужденных объемов. Сигналы канала регистрации флуоресцентного излучения и опорного канала 9 подаются в канал нормировки 10, на выходе которого получают отношение этих сигналов. При этом в канале нормировки обеспечивается нормировка сигнала флуоресценции на сигнал опорного канала. Нормировка обеспечивает компенсацию нестабильности мощности излучения лазера, которая может приводить к большим погрешностям, при измерениях сигнала флуоресценции. Канал регистрации флуоресценции детектора работает в режиме счета фотонов. В качестве фотоприемника используется квантокон ФЭУ-136.

Достоинством прамочной оптической кюветы детектора является повышенная разрешающая способность, которая обеспечивается герметичным расположением в канале кюветы

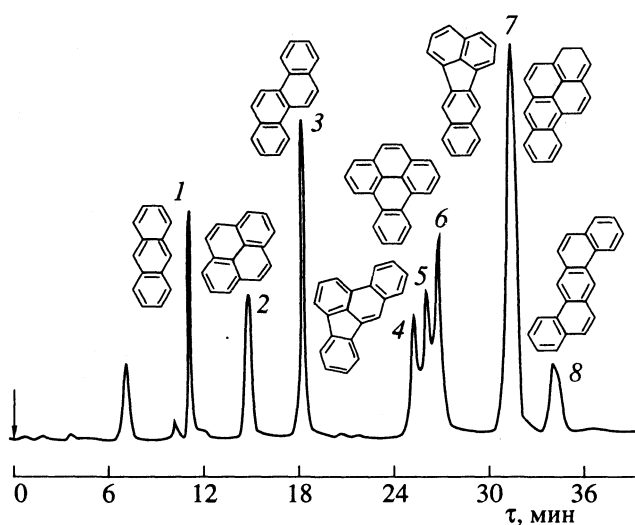
двух металлических капилляров с минимальным зазором между торцами капилляров. При этом конструкция кюветы позволяет использовать детектор максимально эффективно даже в режиме капиллярной жидкостной хроматографии при уменьшении объема детектирования до нескольких нанометров.

Достоинством оптической схемы детектора является наличие полевой диафрагмы с прямоугольным световым окном, расположенным непосредственно перед входным окном фотоприемника в плоскости изображения фокусирующей линзы канала регистрации флуоресцентного излучения и имеющей размеры прямоугольного светового окна, совпадающие с размерами изображения первично возбужденного объема. Постановка полевой диафрагмы устраняет нелинейность, наблюдаемую даже в пределах двух порядков линейно динамического диапазона детектирования, и значительно расширяет линейный динамический диапазон детектирования.

Дальнейшее уменьшение мощности лазерного излучения путем использования низкоинтенсивного гелий-кадмиевого лазера непрерывного действия с мощностью излучения 3 мВт на линии 325 нм оптимизирует оптическую схему детектора по уменьшению фона от рассеянного кюветой лазерного излучения и обеспечивает предел детектирования бенз(а)пирена на низком порядка  $70 \times 10^{-18}$  моля уровне. При этом снижение мощности лазерного излучения до 3 мВт позволило уменьшить длину излучателя гелий-кадмиевого лазера до 600 мм. Только после уменьшения длины излучателя лазера до 600 мм стало возможным использование его в качестве источника излучения в лазерном флуориметрическом детекторе серийного жидкостного хроматографа "Цвет-3110".

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Целью эксперимента было хроматографическое разделение и высокочувствительное определение полиароматических углеводородов с помощью жидкостного хроматографа "Цвет-3110" с лазерным флуориметрическим детектором. Все полиароматические углеводороды, использованные в эксперименте, приобретали в фирме "Элсико" (г. Москва) и применяли без дополнительной очистки. Исследовали следующие полиароматические углеводороды: антрацен, дибенз(а, h)антрацен, бенз(а)антрацен, бенз(е)пирен, бенз(а)пирен, пирен, бенз(в)флуорантен, бенз(к)флуорантен, хризен. Ацетонитрил приобретали у фирмы "Криохром" (второй сорт, г. Санкт-Петербург). В эксперименте использовали дистиллированную воду. Исходные растворы полиароматических углеводородов готовили в



**Рис. 3.** Хроматограмма ПАУ: 1 – антрацен, 2 – пирен, 3 – хризен, 4 – бенз(в)флуорантен, 5 – бенз(е)пирен, 6 – бенз(к)флуорантен, 7 – бенз(а)пирен, 8 – дибенз(а, h)антрацен. Условия разделения: колонка  $25 \times 0.4$  см, сорбент – силосорб  $C_{18}$ , элюент ацетонитрил–вода (84 : 16), расход элюента  $0.5 \text{ см}^3/\text{мин}$ , дозируемый объем  $100 \text{ мм}^3$ .



смеси ацетонитрил–вода (80 : 20) для совместимости с подвижной фазой.

Использовали колонку фирмы “Элсико” длиной 25 см и внутренним диаметром 0,4 см, заполненную сорбентом силасорб С<sub>18</sub>. Применяли гелий-кадмиевый лазер непрерывного действия ЛГН-409 Львовского ПО “Полярон” мощностью 3 мВт с линией 325 нм.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На рис. 3 представлена хроматограмма смеси стандартов полиароматических углеводородов (ПАУ), полученная при изократическом режиме элюирования, а на рис. 4 представлена хроматограмма ПАУ с известными концентрациями. При этом детектирующий объем кюветы составлял 0,25 мкл, дозируемый объем – 100 мкл и содержал указанные количества ПАУ.

По хроматограмме чистых компонентов были определены пределы детектирования *P* (в пикограммах (пг)) для нескольких ПАУ. Результаты приведены ниже, предел детектирования указан при отношении сигнал/шум, равном 2 (I – пирен; II – бенз(а)антрацен, III – бенз(в)флуорантен, IV – бенз(а)пирен, V – дибенз(а, h)антрацен):

Соединение	I	II	III	IV	V
<i>P</i> , пг	0.012	0.04	0.06	0.018	0.016

Из приведенных данных видно, что возможно высокочувствительное определение бензпиренов при дальнейшем уменьшении мощности УФ-излучения гелий-кадмиевого лазера до 3 мВт. При этом предел детектирования бенз(а)пирена получен нами на уровне 0,018 пг ( $70 \times 10^{-18}$  моля), что на порядок ниже, чем предел детектирования, полученный при использовании аргонового ионного лазера непрерывного действия повышенной мощности УФ-излучения (~17 Вт) [9]. Кроме того, следует обратить внимание, что в указанных на рис. 3 условиях происходит полное отделение бенз(а)пирена от бенз(е)пирена и других близких по структуре пятичленных ПАУ; это при низком пороге детектирования дает возможность контроля загрязнений окружающей среды ПАУ на уровне предельно допустимых концентраций (ПДК).

Пример хроматографического разделения экстракта сухого остатка коксовой батареи показан на рис. 5а, а на рис. 5б показано разделение того же экстракта, но с добавлением раствора стандарта бенз(а)пирена. Концентрация бенз(а)пирена в экстракте определялась на уровне ПДК.

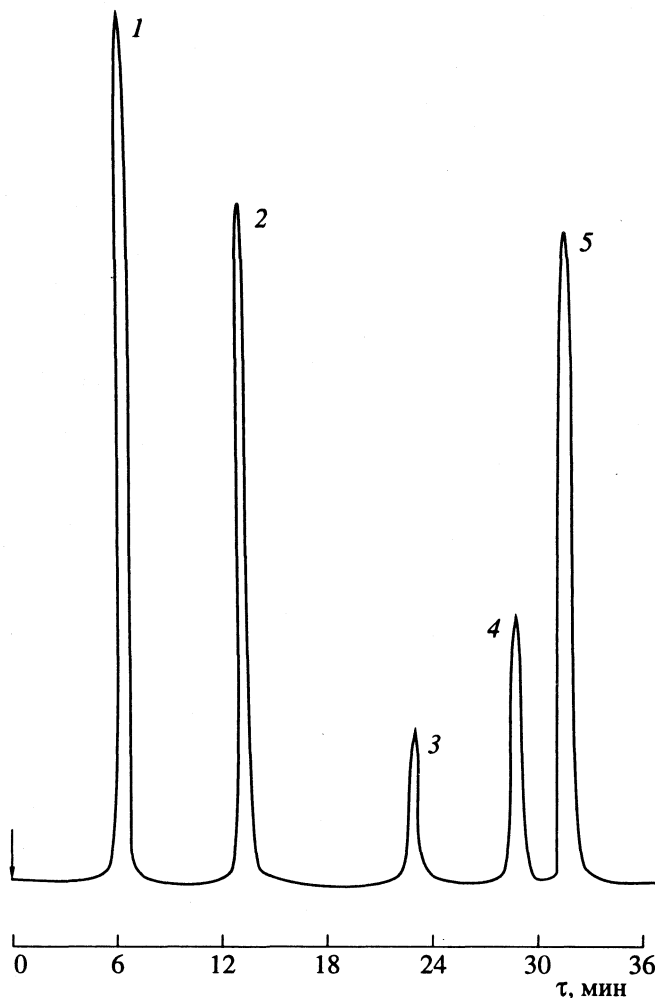


Рис. 4. Количественная хроматограмма ПАУ (в скобках указано содержание ПАУ в 100 мкл дозируемого объема): 1 – пирен (300 пг), 2 – бенз(а)антрацен (760 пг), 3 – бенз(в)флуорантен (560 пг), 4 – бенз(а)пирен (300 пг), 5 – дибенз(а, h)антрацен (760 пг). Условия разделения как на рис. 3.

В работе [11] при использовании лазерного флуориметрического детектора жидкостного хроматографа “Цвет-3110” показана возможность получения предела детектирования ократоксинов на уровне 0,1 фемтомоля ( $10^{-16}$  моля). Результаты работы [12] позволяют предположить, что с помощью лазерного флуориметрического детектора жидкостного хроматографа “Цвет-3110” также возможен высокочувствительный (на фемтомольном пределе обнаружения) анализ афлатоксинов.

Можно предположить, что для дальнейшего уменьшения габаритов блока флуориметра лазерного флуориметрического детектора перспективно использование низкоинтенсивного аргонового ионного лазера непрерывного действия без принудительного воздушного охлаждения, так как при мощности 3 мВт на линиях УФ-излучения такой лазер может иметь излучатель длиной менее

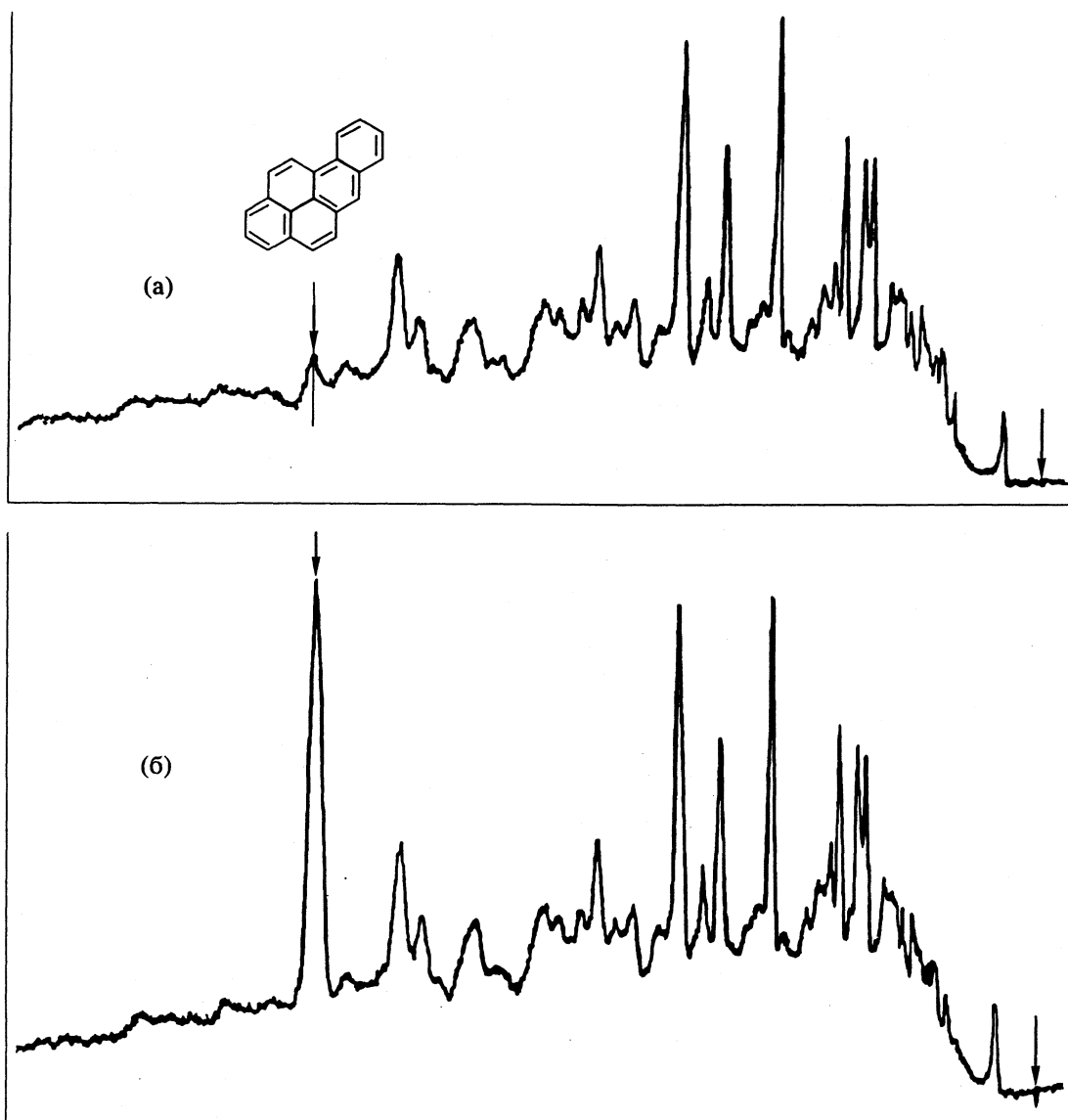


Рис. 5. Хроматограмма разделения экстракта сухого остатка коксовой батареи (а) и хроматограмма разделения той же пробы с добавлением стандарта бенз(а)пирена (б).

200 мм. Также перспективно использовать лазерный флуориметрический детектор, серийно выпускаемый отдельно от хроматографа "Цвет-3110".

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sepaniak M.J., Yeung E.S. // *Anal. Chem.* 1977. V. 49. P. 1554.
2. Hershberger L.W., Gallis J.B., Christian G.D. // *Ibid.* 1979. V. 51. P. 1444.
3. Todoriki H., Hirakawa A. // *Chem. Pharm. Bull.* 1980. V. 28. P. 1337.
4. Yeung E.S., Sepaniak M.J. // *Anal. Chem.* 1980. V. 52. P. 1465A.
5. Zare R.N. // *Science (Washington D.C.)*. 1984. V. 226. P. 298.
6. Sanda K., Imasaka T., Ishibashi N. // *Anal. Chem.* 1986. V. 58. P. 2649.
7. Lobazov A.Ph., Mostovnikov V.A., Nechaev S.V. et al. // *J. Chromatogr.* 1986. V. 365. P. 321.
8. Roach M.C., Harmony M.D. // *Anal. Chem.* 1987. V. 59. P. 411.
9. Roach M.C., Harmony M.D. // *J. Chromatogr.* 1988. V. 455. P. 332.
10. Лисковец М.А., Владыкин Г.Б., Радченко А.Ю. // Прямоточная оптическая кювета: А. с. № 1746262 СССР. J01N30/74.
11. Агеев А.Н., Владыкин Г.Б., Орлов В.И. и др. // Материалы VI симпозиума по молекулярной жидкостной хроматографии. Москва, октябрь 1993 г. М., 1993.
12. Эллер К.И., Рыбакова Н.В., Тутельян В.А. // *Журн. аналит. химии.* 1987. Т. 42. С. 322.

## МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544

### ПРОГРАММИРОВАНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ В ЖИДКОСТНОЙ АДСОРБЦИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 1994 г. А. Н. Агеев, В. И. Орлов, Я. И. Яшин

Акционерное общество "Цвет", Дзержинск Нижегородской области

Показана необходимость термостатирования колонок в жидкостной хроматографии, так как изменение температуры колонок на 1 К может приводить к изменению времени удерживания на 2 - 3% и к изменению высоты пиков на 1 - 2%. Выявлены преимущества метода программирования температуры в жидкостной хроматографии, связанные с увеличением степени разделения по сравнению с высокими температурами в изотермическом режиме, уменьшением времени разделения и увеличением высоты пика.

Программирование температуры в жидкостной хроматографии, в отличие от газовой, практически не используется. По-видимому, это связано с двумя обстоятельствами: во-первых, до сих пор еще существует представление, что температура слабо влияет на удерживания в жидкостной хроматографии; во-вторых, среди исследователей широко распространено мнение, что все проблемы анализа многокомпонентных смесей можно решить с использованием программирования элюирующей способности подвижной фазы, т.е. градиентного элюирования. Необходимо заметить, что при практическом использовании метода градиентного элюирования встречается ряд серьезных трудностей, ограничивающих применение этого метода [1]. Прежде всего, колонка после проведения разделения требует регенерации, процесс которой иногда значительно более длителен, чем процесс разделения, в силу чего общее время анализа сокращается незначительно. Получение точных количественных данных требует высокой точности воспроизведения градиентной кривой, что является сложной технической задачей. Достаточно сказать, что стоимость хроматографов, снабженных системами градиентной подачи растворителя, примерно в два раза превышает стоимость приборов без этой системы.

При использовании метода градиентного элюирования для получения "плавной" кривой изменения полярности растворителя необходимо смешение двух растворителей с не слишком сильно различающимися полярностями. Только в этом случае можно получить хорошее разделение сложной смеси. Но в этом случае общий диапазон изменения элюирующей силы растворителя не может быть очень большим, не более чем в 100 раз, что ограничивает разделение смесей, коэффициенты разделения компонентов которых отличаются более чем в 100 раз. Таким образом, на пути

практического использования метода градиентного элюирования встречается ряд трудностей.

Этих трудностей в значительной степени можно избежать при использовании программирования температуры. Как в газовой, так и в жидкостной хроматографии температура является одним из наиболее существенно влияющих на процесс разделения параметров. В работах [2 - 4] изучено влияние температуры на удерживание в жидкостной хроматографии, а в работе [3] впервые проведено программирование температуры в жидкостной хроматографии. Показано, что при программировании температуры от 24 до 70°C время удерживания сократилось в 3 раза при сохранении полноты разделения за счет увеличения эффективности колонки. С повышением температуры снижается вязкость растворителя, что приводит к ускорению массообмена и к снижению ВЭТТ. С ростом температуры уменьшается удерживаемый объем (при использовании однородного растворителя), пики сужаются, высота их

**Таблица 1.** Времена удерживания ( $T_R$ , мин) и удерживаемые объемы ( $V$ , мл) при различных температурах ( $t$ , °C) и скоростях программирования температуры ( $v_t$ , К/мин)

$t$	$T_R$	$V$	$T_R$	$V$	$v_t$	$T_R$	
	I		II			I	II
30	18.5	19.3	30.0	32	1	18.0	26.3
40	12.4	14.2	17.6	20.2	2	16.0	20.6
50	9.7	11.2	13.1	16.1	3	14.2	17.4
60	7.7	10.5	10.0	13.7	4	12.6	15.2
70	6.6	9.9	8.2	12.0			
80	5.7	9.25	7.0	11.3			

Примечание. Исследуемые соединения: I - нитробензол, II - дифениламин.

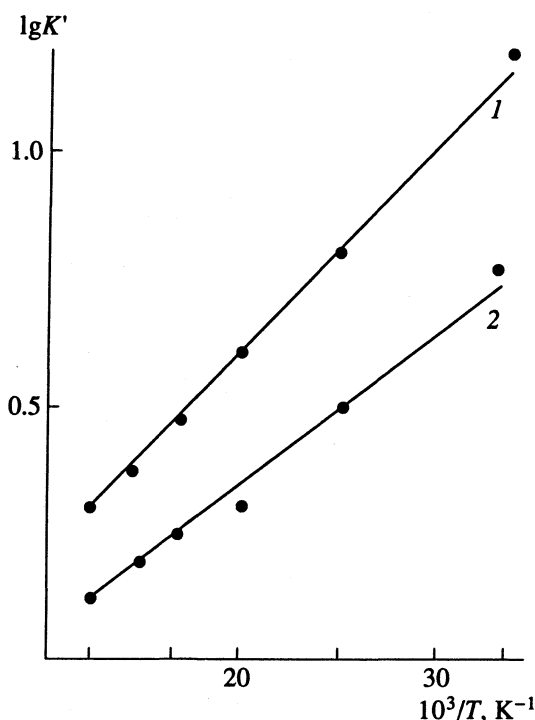


Рис. 1. Зависимости логарифма удерживаемого объема от обратной температуры для дифениламина (1) и нитробензола (2). Колонка  $10 \times 0.4$  см с силихромом С-80, элюент – гексан.

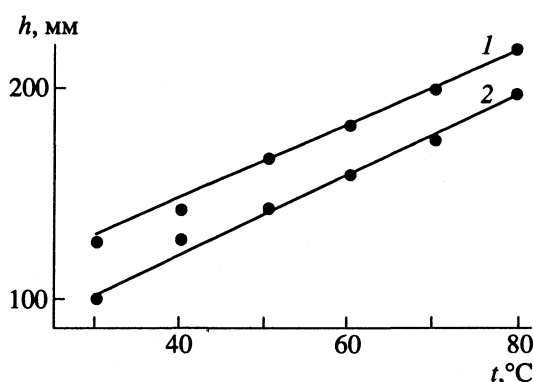


Рис. 2. Зависимости высоты пика ( $h$ ) от температуры ( $t$ ): 1 – дифениламин, 2 – нитробензол. Колонка  $10 \times 0.4$  см с силихромом С-80, элюент – гексан.

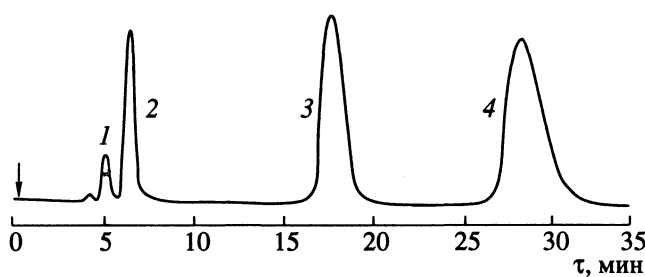


Рис. 3. Хроматограмма смеси бензола (1), фенантрена (2), нитробензола (3) и дифениламина (4). Колонка  $10 \times 0.4$  см с силихромом С-80, элюент – нонан, температура колонок  $30^\circ\text{C}$ .

увеличивается в связи с уменьшением коэффициента распределения [5, 6]. Однако простое увеличение температуры разделения в жидкостной хроматографии (изотермический режим) не всегда приводит к успеху, так как с ростом температуры снижается селективность разделения, что может привести к недостаточному разрешению.

Оптимизировать процесс разделения, сохранив достаточное разрешение и в то же время существенно сократив время разделения, возможно при использовании программирования температуры.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали жидкостный хроматограф "Цвет-304" с УФ-детектором. Прибор имеет воздушный термостат с рабочим диапазоном температур от  $30$  до  $150^\circ\text{C}$ . В верхней части термостата установлены змеевики для предварительного подогрева элюента, поступающего в дозаторы и колонки. В работе использовали колонки длиной от  $10$  до  $35$  см, диаметром  $4$  мм, заполненные силихромом С-80 или С-3.

Программирование температуры обеспечивается программатором ПТ-07, дающим возможность изменять температуру со скоростью от  $0.1$  до  $4$  К/мин в диапазоне от  $30$  до  $150^\circ\text{C}$ . В работе использовали модельную смесь: бензол, фенантрен, нитробензол, дифениламин в гексане. Концентрация компонентов смеси позволяла работать на шкале  $0.1$  единиц оптической плотности УФ-детектора.

В качестве элюентов использовали гексан и нонан. При использовании гексана программирование температуры проводили в диапазоне от  $30$  до  $60^\circ\text{C}$ , нонана – в диапазоне от  $30$  до  $80^\circ\text{C}$ .

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хроматограф "Цвет-304" имеет пневмонасос постоянного давления. При повышении температуры вязкость растворителя падает, сопротивление колонки уменьшается и скорость растворителя увеличивается. В среднем изменение скорости растворителя составляет  $\sim 1\%$  на  $1$  К. Увеличение скорости растворителя дополнительно сокращает время анализа.

В табл. 1 показано изменение времени удерживания и удерживаемого объема при изменении температуры разделения в изотермическом режиме и при программировании температуры (элюент – нонан). Как следует из таблицы, изменение скорости потока вносит весьма существенный вклад в уменьшение времени удерживания.

На рис. 1 приведен график зависимости логарифма удерживаемого объема от обратной температуры, представляющий отрезок прямой, что характерно для однородных элюентов. Необходи-

мость стабилизации температуры в жидкостной хроматографии очевидна с точки зрения воспроизводимости времени удерживания, т.е. идентификации. Изменение температуры на 1 К приводит к изменению времени удерживания на 2 - 3%.

На рис. 2 приведена зависимость высоты пиков от температуры разделения. Увеличение высоты пика примерно в 2 раза при изменении температуры в диапазоне 30 - 80°C, связанное с уменьшением коэффициента распределения и повышением концентрации анализируемого компонента в элюенте, позволяет соответственно увеличить чувствительность анализа. Из этих данных можно сделать вывод о необходимости стабилизации температуры в жидкостной хроматографии, так как ее изменение ведет к ошибкам в количественном анализе по высотам пиков (1 - 2% на 1 К).

В табл. 2 приведена зависимость степени разделения  $R$  от температуры разделения. Величина  $R$  существенно ухудшается при повышении температуры, поэтому разделение при повышенной температуре не всегда оправдано. Однако использование программирования температуры позволяет сохранить высокое значение  $R$  для веществ, выходящих первыми при низкой температуре, и сократить время выхода последних компонентов, сохранив приемлемое значение величины  $R$  для них за счет повышения эффективности колонок.

**Таблица 2.** Зависимость степени разделения  $R$  от температуры колонки ( $t$ , °C) в изотермическом режиме и от скорости программирования температуры ( $v_t$ , К/мин) в режиме программирования температуры колонки

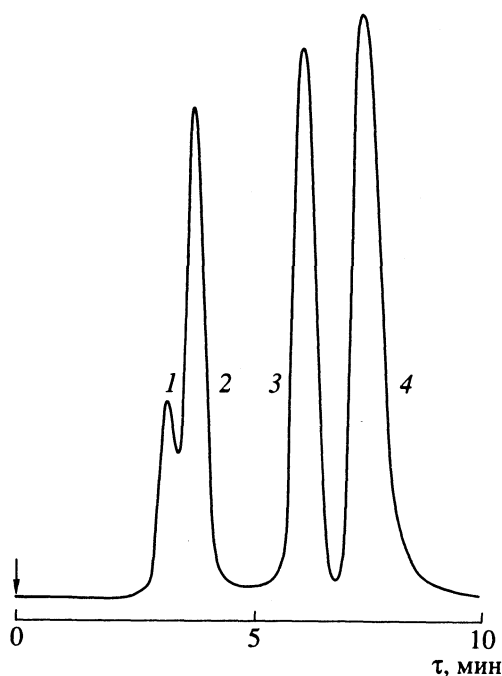
$t$	$R'$	$R''$	$v_t$	$R'$	$R''$
30	1.08	3.2	1	1.07	2.8
40	0.89	2.66	2	1.06	2.3
50	0.80	2.06	3	1.04	2.13
60	0.75	1.60	4	1.00	2.0
70	0.73	1.40			
80	0.72	1.34			

Примечание. Обозначения:  $R'$  - фенантрен/бензол,  $R''$  - дифениламин/нитробензол.

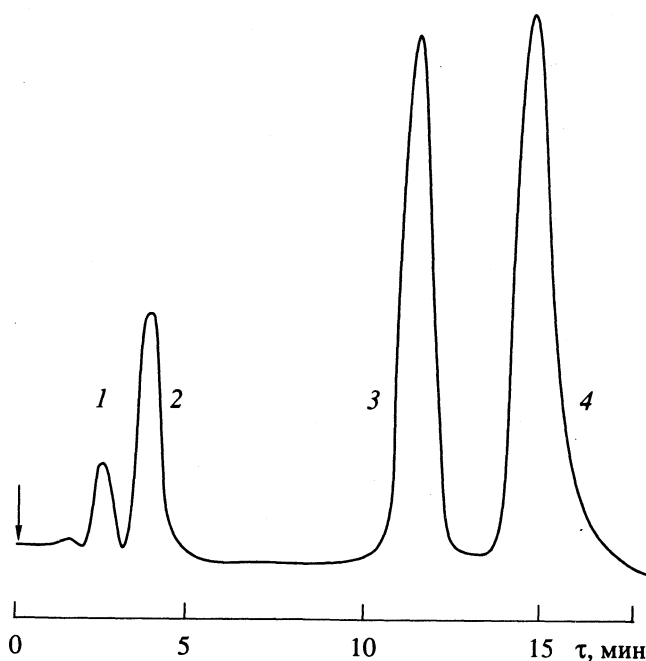
Общее время анализа (табл. 1) при программировании температуры уменьшается примерно в 2 раза при сохранении разрешения на приемлемом уровне.

Высота пика определяется в основном температурой выхода компонента, при изменении скорости программирования температуры выхода изменяются, в силу чего высота пика зависит от скорости программирования температуры, увеличиваясь с повышением скорости.

На рис. 3 - 5 приведены хроматограммы разделяемой смеси при температурах 30 и 80°C и при



**Рис. 4.** Хроматограмма смеси (рис. 3). Температура колонки - 80°C, остальные условия те же.



**Рис. 5.** Хроматограмма смеси (рис. 3). Программирование температуры от 30 до 80°C со скоростью 3 К/мин, остальные условия те же.

программировании температуры со скоростью 3 К/мин. Из сопоставления хроматограмм наглядно видно преимущества метода с использованием программирования температуры, а именно, увеличение разрешения по сравнению с высокими температурами, уменьшение времени выхода и увеличение высоты пика последних компонентов по сравнению с низкими температурами.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Engelhardt H. // *Z. Anal. Chem.* 1975. В. 277. S. 267.
2. Kiselev A.V., Lebedeva N.P., Frolov I.I., Yashin Ya.I. // *Chromatographia*. 1972. V. 5. № 2. P. 341.
3. Lebedeva N.P., Frolov I.I., Yashin Ya.I. // *J. Chromatogr.* 1971. V. 58. P. 11.
4. Aratskova A.A., Vetrova Z.P., Yashin Ya.I. // *Ibid.* 1986. V. 365. P. 27.
5. Хебзуд Г., Харрис В. Газовая хроматография с программированием температуры. М.: Мир, 1968.
6. Яшин Я.И. Физико-химические основы хроматографического разделения. М.: Химия, 1976.
7. Snyder L.R. // *Chrom. Sci.* 1970. V. 8. № 12. P. 692.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ ПРОИЗВОДНЫХ ФЕНОЛА  
С ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

© 1994 г. Т. Т. Белямова, Я. И. Коренман, В. Н. Фокин, Я. И. Яшин

Акционерное общество "Цвет", Дзержинск Нижегородской области

Установлены закономерности удерживания производных фенола в обращенно-фазовой хроматографии в зависимости от строения и природы заместителей. Получена корреляция параметров удерживания от молекулярных масс соединений. Определена относительная чувствительность электрохимического детектора к различным производным фенола.

Производные фенола – распространенные исходные продукты синтеза многих химических соединений. Многие из них являются весьма токсичными и канцерогенными соединениями, например, хлорфенолы, нафтолы и другие. В связи с этим контроль производных фенолов в объектах окружающей среды является актуальной задачей.

В последнее время для анализа фенолов, особенно в водах, чаще всего применяют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с электрохимическим детектированием [1, 2]. Однако нет систематических исследований как закономерностей удерживания разных производных фенола, так и относительной чувствительности электрохимического детектора к разным производным.

Цель настоящей работы – восполнить этот пробел.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Измерения проводили на жидкостном хроматографе ХПЖ-1 с электрохимическим детектором производства АО "Цвет" (Дзержинское ОКБА). Использовали аналитическую колонку размера 100 × 2 мм, заполненную силикагелем с привитыми алкильными группами C<sub>18</sub> зернением 5 мкм. В качестве подвижной фазы применяли смесь вода-ацетонитрил-уксусная кислота (70 : 30 : 0.1), расход подвижной фазы 0.05 мл/мин. Дозирование пробы осуществляли краном-дозатором, объем дозы 1 мкл.

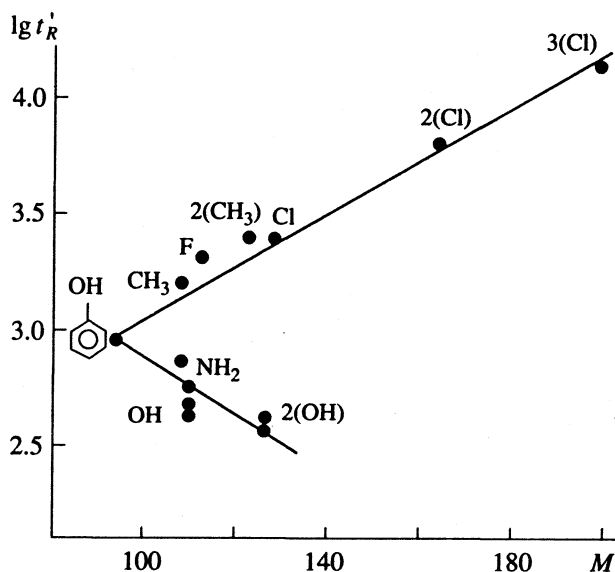
Детектирование производили по измерению тока окисления фенолов на рабочем электроде из стеклоуглерода при приложенном к нему потенциале +1.2 В. Вспомогательный электрод – сам корпус ячейки, ячейка стенкоструйного типа. Расчет параметров хроматографических пиков фенолов производили с помощью встроенной в прибор микро-ЭВМ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В табл. 1 приведены результаты измерений параметров удерживания производных фенола, полученные при указанных условиях.

Видно, что в гомологическом ряду фенолов с увеличением числа атомов углерода времена удерживания  $t_R$  закономерно возрастают. Например, в ряду фенол-крезолы-ксиленоны наблюдается последовательное увеличение  $t_R$ , этильная группа вносит меньший вклад в удерживание, чем две метильные группы.

Для фенолов-изомеров (табл. 2) наблюдаются две закономерности.



Зависимость логарифма исправленных времен удерживания от молекулярной массы производных фенола. Колонка 100 × 2 мм с силикагелем C<sub>18</sub>, размер зерен 5 мкм, 25°C; элюент: вода, ацетонитрил, уксусная кислота в соотношении 70 : 30 : 0.1, расход 0.05 см<sup>3</sup>/мин.

**Таблица 1.** Времена удерживания ( $t_R$ ) производных фенола на силикагеле с привитой группой  $C_{18}$  ( $t_{отн}$  – относительное время удерживания)

№	Соединение	$t_R, c$	$t_{отн}$
1	Флороглюцин	387	0.42
2	Пирогаллол	415	0.45
3	Гидрохинон	433	0.47
4	Резорцин	480	0.52
5	Пирокатехин	557	0.60
6	<i>n</i> -Аминофенол	598	0.64
7	<i>o</i> -Аминофенол	735	0.79
8	Монометилрезорцин	834	0.90
9	Гваякол	886	0.95
10	Фенол	930	1.00
11	<i>n</i> -Нитрофенол	1505	1.62
12	<i>n</i> -Крезол	1507	1.62
13	<i>o</i> -Крезол	1636	1.76
14	<i>o</i> -Хлорфенол	1949	2.10
15	<i>n</i> -Фторфенол	2081	2.24
16	<i>n</i> -Хлорфенол	2436	2.62
17	3,4-Ксиленол	2554	2.75
18	3,5-Ксиленол	2818	3.03
19	<i>n</i> -Бромфенол	2937	3.16
20	2-Нафтол	3935	4.23
21	<i>o</i> -Иодфенол	4419	4.75
22	1-Нафтол	4740	5.10
23	2,4-Дихлорфенол	6210	6.68
24	2,4-Дибромфенол	10197	10.96
25	2,4,6-Трихлорфенол	13780	14.82

**Таблица 2.** Коэффициент емкости ( $K'$ ) и изменение свободной энергии адсорбции ( $\Delta(\Delta G)$ ) изомеров производных фенола на функциональную группу (относительно фенола) на силикагеле с привитой группой  $C_{18}$

Соединение	$K'$			$\Delta(\Delta G), \text{кДж/моль}$		
	<i>орто</i> -	<i>мета</i> -	<i>пара</i> -	<i>орто</i> -	<i>мета</i> -	<i>пара</i> -
Гидроксифенол	2.09	1.67	1.41	1.71	2.27	2.69
Аминофенол	3.08	–	2.33	0.75	–	1.44
Метоксифенол	3.92	3.63	–	0.15	0.34	–
Нитрофенол	–	–	7.37	–	–	–1.41
Крезол	8.09	–	7.371	–1.64	–	–1.414
Фторфенол	–	–	10.56	–	–	–2.3
Хлорфенол	9.83	–	12.53	–2.13	–	–2.73
Бромфенол	–	–	15.31	–	–	–3.22
Иодфенол	23.55	–	–	–4.29	–	–
Нафтол	25.33	20.96	–	–4.47	–	–

1. Полярные заместители в *орто*-положении вступают в сильное внутримолекулярное взаимодействие с гидроксильной группой, уменьшая тем самым взаимодействие адсорбата с подвижной фазой. К таким заместителям относятся группы  $NH_2$ ,  $OSN_3$ ,  $OH$ ,  $NO_2$ . Порядок удерживания следующий: *орто*- > *мета*- > *пара*-.

2. Изомеры, *орто*-заместители которых не вступают во внутримолекулярное взаимодействие, характеризуются следующим порядком удерживания: *пара*- > *мета*- > *орто*-. Такая закономерность свойственна для галогензамещенных фенолов.

Удерживание фенолов, имеющих несколько одинаковых заместителей, зависит от числа и полярности заместителей. Для полярных заместителей с увеличением их числа наблюдается уменьшение времени удерживания фенола, например, удерживание уменьшается в ряду:

пирогаллол (дигидроксифенол) <  
< пирокатехин (моногидроксифенол) < фенол.

Для неполярных и слабополярных заместителей, наоборот, с увеличением их числа наблюдается возрастание времени удерживания, например, в ряду:

хлорфенол < дихлорфенол < трихлорфенол.

Для галогензамещенных фенолов возрастание времен удерживания наблюдается с уменьшением электроотрицательности галогена в ряду:  $F^- < Cl^- < Br^- < I^-$ .

На рисунке приведена зависимость логарифма исправленных времен удерживания от молекулярной массы исследуемых производных фенола. В обращенно-фазовой хроматографии используются неполярный адсорбент и полярная подвижная фаза, поэтому появление в молекулах производных фенола неполярных или слабополярных функциональных групп приводило к увеличению удерживания, а появление полярных функциональных групп – к уменьшению удерживания, так как усиливается взаимодействие адсорбат–элюент, приводящее к уменьшению общего удерживания. Это иллюстрируется на приведенном рисунке. Следует обратить внимание, что галогенные функциональные группы ведут себя как неполярные алкильные группы.

Экспериментальные данные, полученные при установлении чувствительности электрохимического детектора к производным фенола, показаны в табл. 3. При сравнении сигнала электрохимического детектора – площади хроматографического пика соединения, соответствующей 1 нг производных фенола, выявляются некоторые закономерности:

у фенолов-гомологов с увеличением числа атомов углерода электрохимический сигнал уменьшается;



**Таблица 3.** Чувствительность электрохимического детектора к производным фенола

Соединение	$s$	$s_{\text{отн}}$	Соединение	$s$	$s_{\text{отн}}$
1	174.5	0.18	14	799	0.85
2	538	0.57	15	430	0.46
3	406	0.43	16	820	0.87
4	665	0.71	17	598	0.64
5	849	0.90	18	177.8	0.19
6	612	0.65	19	1517	1.61
7	1082	1.15	20	731	0.78
8	369	0.39	21	1124	1.20
9	476	0.51	22	736	0.78
10	940	1.00	23	738	0.78
11	100	0.11	24	750	0.80
12	798	0.86	25	465	0.50
13	740	0.75			

Примечание. Номера соединений соответствуют приведенным в табл. 1,  $s$  – площадь пика, приходящаяся на 1 нг вещества, нА с/нг;  $s_{\text{отн}}$  – относительная площадь пика.

у фенолов-изомеров с полярным заместителем электрохимический сигнал уменьшается в ряду *орто-мета-пара*, а с неполярным заместителем увеличивается в том же ряду;

симметричное расположение заместителей понижает электрохимический сигнал;

с уменьшением электроотрицательности галогена сигнал увеличивается в ряду:  $F^- < Cl^- < Br^-$ ;

для разных нафтолов электрохимический сигнал практически не изменяется при изменении расположения ОН-группы;

введение некоторых полярных заместителей значительно увеличивает электрохимический сигнал.

Для исследованных производных фенола относительная чувствительность колебалась в пределах одного порядка (от 0.18 для флороглюцина до 1.6 для бромфенола). Эти данные следует учитывать при анализе микропримесей.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee H.K., Li S.F.Y., Tay Y.H. // J. Chromat. 1988. V. 438. P. 429.
2. Peltonen K., Pukkila J. // Ibid. 1988. V. 439. P. 375.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544.6

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРЕХОДНЫХ МЕТАЛЛОВ  
НА ДИНАМИЧЕСКИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ  
КАТИОНООБМЕННИКАХ

© 1994 г. О. Н. Обрезков, О. В. Крохин, А. В. Пирогов, С. Н. Семенова, О. А. Шпигун

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет*

Динамически модифицированный додецилбензолсульфоновой кислотой силикагель использован для ионохроматографического разделения переходных металлов. В качестве элюентов применены растворы солей стронция с комплексообразующими добавками лимонной, винной, щавелевой, пиррофосфорной и дипиколиновой кислот. Найден оптимальные условия для селективного определения катионов меди, никеля, свинца, кобальта, кадмия, железа(II) и марганца; продолжительность анализа 25 мин, пределы обнаружения переходных металлов с фотометрическим детектированием пиридилазорезорцинатных комплексов 0.1 - 1 мкг/мл. Показано, что применение фосфор- и азотсодержащих комплексообразующих лигандов позволяет изменить селективность динамически модифицированных катионообменников к переходным металлам.

Традиционным подходом при ионохроматографическом определении переходных металлов является использование комплексообразующих реагентов в подвижной фазе. Разделение обычно осуществляется на сульфокатионообменниках, которые характеризуются довольно сильным сродством к двухзарядным катионам переходных металлов. В качестве комплексообразующих добавок хорошо зарекомендовали себя винная, лимонная, щавелевая кислоты [1, 2]. Для детектирования ионов металлов применяют кондуктометрическое и спектрофотометрическое детектирование [3, 4]. Наибольшей популярностью пользуется вариант спектрофотометрического детектирования с послеклоночной реакцией. В результате такой реакции образуется окрашенный комплекс реагента с ионами металлов, поглощающий при другой длине волны, чем сам реагент. Это позволяет проводить чувствительное детектирование переходных металлов.

Сорбенты низкой емкости с химически привитыми функциональными группами в процессе работы, как правило, теряют свои хроматографические свойства. С этой точки зрения, динамически модифицированные ионообменники предпочтительнее, поскольку слой функциональных групп восстанавливается в процессе анализа, есть и иные преимущества. Цель данной работы – изучить поведение ионов переходных металлов на динамически модифицированных неподвижных фазах при использовании кислород-, азот- и фосфорсодержащих комплексообразующих реагентов в качестве компонентов подвижной фазы.

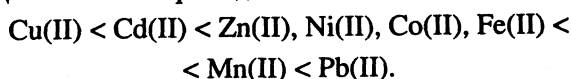
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали ионные хроматографы SIC-800 ("Биотроник", Германия), Цвет-3006 (Россия); колонки 3 × 50, 3 × 100, 4 × 150 мм, заполненные суспензионным способом. Сорбентом служил силикагель (размер зерна 5 мкм), модифицированный раствором додецилбензолсульфокислоты. Детектирование осуществляли при использовании проточного фотометрического детектора "Optidec-01" ( $\lambda = 520$  нм). В качестве послеклоночного реагента использовали раствор пиридилазорезорцина с концентрацией 1 ммоль/л (рН 11). Исходные растворы с концентрацией 10 ммоль/л готовили из ацетатов или нитратов переходных металлов. Рабочие растворы готовили из исходных непосредственно перед использованием. Для приготовления элюентов и проб применяли деионированную воду с сопротивлением 2 МОм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для элюирования сильно удерживаемых ионов переходных металлов необходимо наличие двухзарядного иона в подвижной фазе. Как правило, в качестве такого иона применяют ион этилендиамония [5]. Нами предложен элюент, содержащий ионы стронция. Данный элюент имеет априори некоторые преимущества: большую стабильность растворов при хранении, меньшую токсичность и себестоимость. Кроме того, в отличие от подвижной фазы с этилендиаминном, данный элюент может использоваться в более широком интервале рН.

Нами был получен следующий элюотропный ряд катионов переходных металлов:



При использовании колонки размером  $3 \times 100$  мм, концентрации стронция в элюенте 10 ммоль/л (в гидрофталатном буфере pH 3) и скорости потока подвижной фазы 1 мл/мин время удерживания свинца составляло ~12 мин. Таким образом, экспериментально установлено, что данный элюент имеет необходимую элюирующую способность для определения переходных металлов. Однако в отсутствие комплексообразования селективность определения ионов цинка, никеля, кобальта и железа недостаточна. Для повышения селективности в элюент добавляли винную, лимонную, щавелевую или пирофосфорную кислоты.

При использовании сорбентов на основе силикагеля существует ограничение на pH подвижной фазы (обычно  $2 < \text{pH} < 6$ ). При определении переходных металлов накладывается еще одно условие, связанное с распределением форм комплексов металла с комплексообразующим лигандом и гидроксил-ионов. Наличие нескольких комплексов при определенном значении pH подвижной фазы приводит к существенному уменьшению эффективности колонки. Так, например, при pH 3 эффективность колонки составляла 14000 ТТ/м для никеля, при повышении pH подвижной фазы до 4.2 эффективность снизилась до 4000 ТТ/м. С помощью компьютерного моделирования равновесий в системе Ni-лимонная кислота-гидроксил показано, что при pH 4.2 примерно половина ионов никеля находится в виде цитратного комплекса, а половина – в виде гидроксокомплекса. Таким образом, для разделения катионов переходных металлов необходимо выбирать кислоты, диссоциирующие в диапазоне pH от 2 до 4. Такому условию удовлетворяют названные выше кислоты.

Известно, что время удерживания определяемого иона уменьшается с увеличением концентрации комплексообразующего лиганда в элюенте и повышением устойчивости образуемого комплекса [6]:

$$t_R = K(Q(1 - E)V/c\Sigma\beta_i L^i F),$$

где  $K$  – константа ионного обмена,  $E$  и  $Q$  – пористость и удельная емкость сорбента соответственно,  $V$  – общий объем колонки,  $c$  – концентрация элюирующего иона,  $L$  – равновесная концентрация комплексообразующего агента,  $\beta_i$  – константа устойчивости комплекса.

На рис. 1 представлены зависимости удерживания переходных металлов от pH элюента. При увеличении pH растет степень диссоциации лимонной кислоты и времена удерживания, как правило, уменьшаются. Однако для ионов с малой константой устойчивости цитратных комплексов

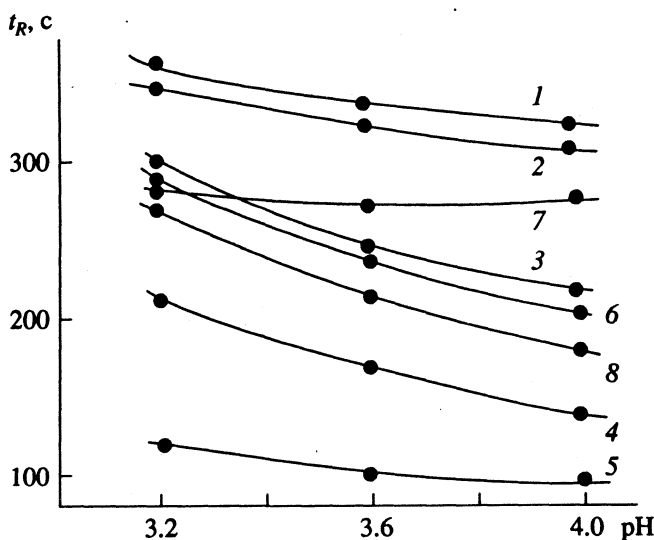


Рис. 1. Зависимости удерживания переходных металлов (1 – Mn, 2 – Fe(II), 3 – Co, 4 – Ni, 5 – Cu, 6 – Zn, 7 – Cd, 8 – Pb) от pH подвижной фазы. Колонка  $3 \times 100$  мм; элюент: 3 ммоль/л  $\text{SrCl}_2$ , 6 ммоль/л лимонная кислота в гидрофталатном буфере. Скорость подачи элюента 1 мл/мин.

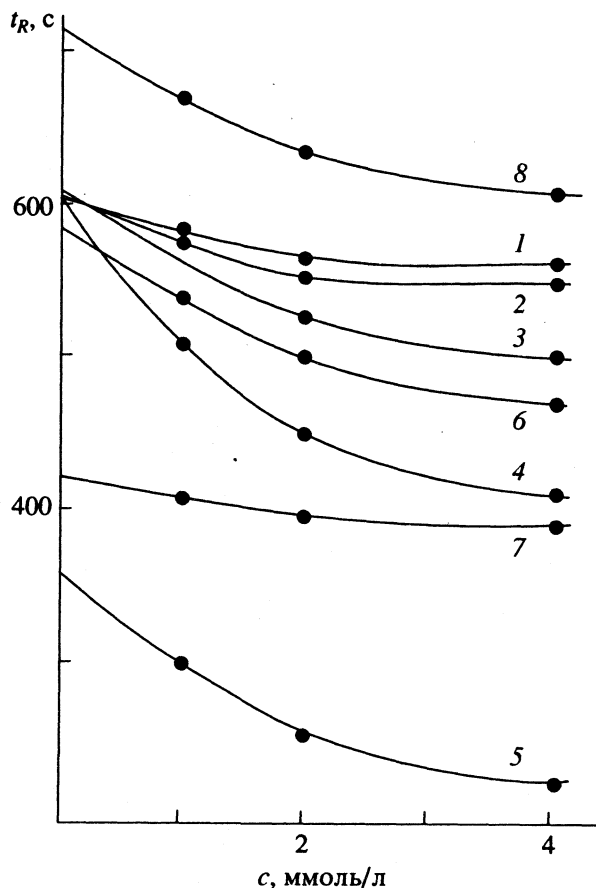


Рис. 2. Зависимости удерживания переходных металлов от концентрации лимонной кислоты в подвижной фазе. Колонка  $3 \times 100$  мм; элюент: 10 ммоль/л  $\text{SrCl}_2$ , pH 3.0 (гидрофталатный буфер). Скорость подачи элюента 1 мл/мин; 1 – 8 – см. рис. 1.

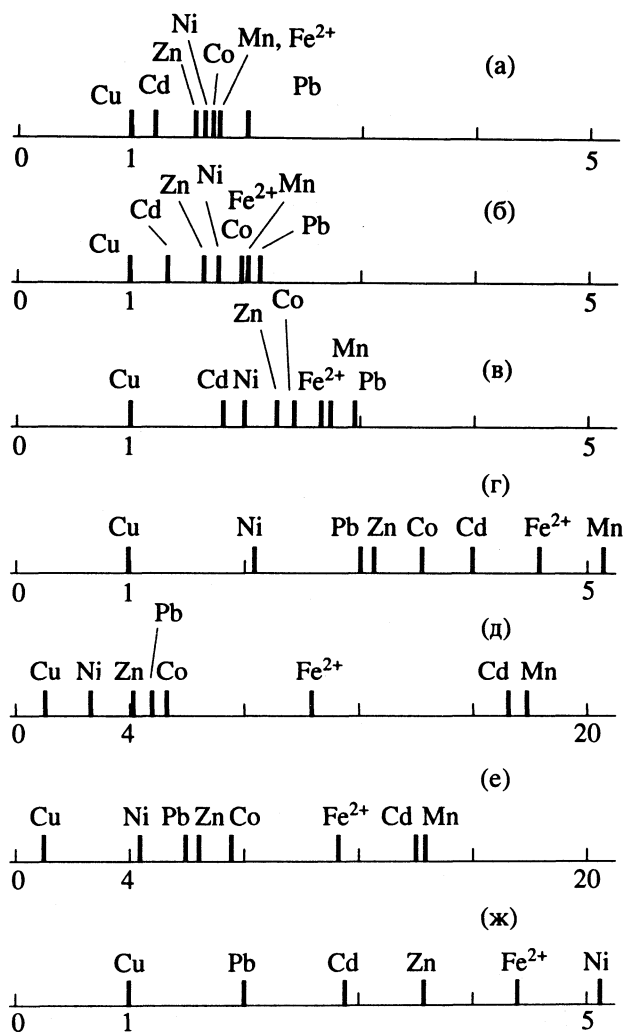


Рис. 3. Шкалы селективности ( $\alpha(i) = t_r(i)/t_r(\text{Cu})$ ). Колонка  $3 \times 100$  мм. Скорость подачи элюента 1 мл/мин. Элюент: а – 10 ммоль/л  $\text{SrCl}_2$ , pH 3.0; б – 10 ммоль/л  $\text{SrCl}_2$ , 4 ммоль/л винная кислота, pH 3.0; в – 10 ммоль/л  $\text{SrCl}_2$ , 4 ммоль/л лимонная кислота, pH 3.0; г – 3 ммоль/л  $\text{SrCl}_2$ , 6 ммоль/л лимонная кислота, pH 3.8; д – 2 ммоль/л лизин, 4 ммоль/л щавелевая кислота, pH 3.0; е – 2 ммоль/л лизин, 2 ммоль/л щавелевая кислота, pH 2.8; ж – 4 ммоль/л  $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , pH 2.5.

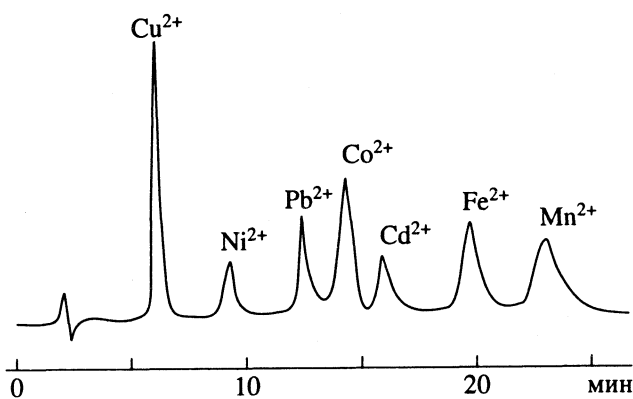
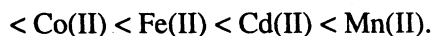
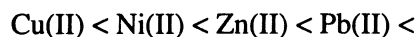


Рис. 4. Хроматограмма смеси переходных металлов. Колонка  $4 \times 150$  мм; элюент: 3 ммоль/л  $\text{SrCl}_2$ , 6 ммоль/л лимонная кислота, pH 3.8. Скорость потока элюента 1.5 мл/мин.

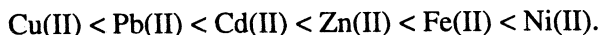
(например, кадмия) такое уменьшение практически незаметно. Рисунок 2 иллюстрирует зависимость удерживания от концентрации комплексообразующей кислоты в элюенте. Наименьшее изменение времени удерживания характерно для ионов кадмия, железа и марганца. Константы устойчивости комплексов этих металлов с лимонной кислотой ( $pK = 2.2, 2.12$  и  $2.08$  соответственно [7]) ниже, чем у других исследованных металлов. В соответствии с этим время удерживания свинца, никеля, цинка уменьшается значительно сильнее.

На рис. 3 представлены шкалы селективности динамически модифицированного катионообменника при использовании различных комплексообразующих добавок в подвижной фазе. При составлении шкал время удерживания меди принималось за единицу. Добавление в элюент винной кислоты при pH 3 практически не влияет на селективность разделения (рис. 3б). Сильнее влияют добавки лимонной и щавелевой кислот (рис. 3в, 3д), имеющие более высокие значения констант диссоциации. В случае щавелевой кислоты произошло значительное изменение селективности:



Увеличение pH подвижной фазы приводит к росту равновесной концентрации комплексообразующего лиганда и как следствие этого – улучшению селективности (рис. 3в, 3г, 3е, 3д). Так, снижение pH от 3.0 до 2.8 приводит к изменению порядка элюирования в триаде цинк–свинец–кобальт. Наибольшая селективность была достигнута при использовании лимонной кислоты при pH 3.8 (рис. 4). Изучение подобных зависимостей необходимо при выборе условий определения переходных металлов в реальных образцах природных и промышленных вод.

Представлялось интересным использование в качестве комплексообразующих добавок кислот, содержащих гетероатомы (азот, фосфор), способные к донорно-акцепторным взаимодействиям. Нами было исследовано поведение переходных металлов при добавлении в подвижную фазу пирофосфорной кислоты. Данная кислота диссоциирована при pH 3 и образует устойчивые комплексы с рядом переходных металлов. Был получен следующий ряд селективности:



Характерно, что по сравнению с лимонной или винной кислотами значительно изменилось время элюирования никеля. Это может быть объяснено влиянием гетероатома фосфора на комплексообразующие свойства кислоты. На рис. 5 представлена хроматограмма переходных металлов, полученная в присутствии пирофосфорной кислоты в подвижной фазе. Она характеризуется полным разрешением пиков свинца, цинка и

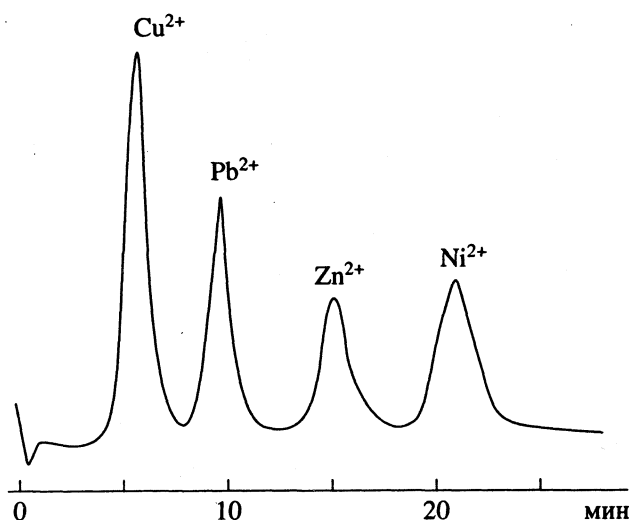


Рис. 5. Хроматограмма смеси переходных металлов. Колонка  $3 \times 100$  мм; элюент: 4 ммоль/л  $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , pH 2.5. Скорость потока элюента 1.0 мл/мин.

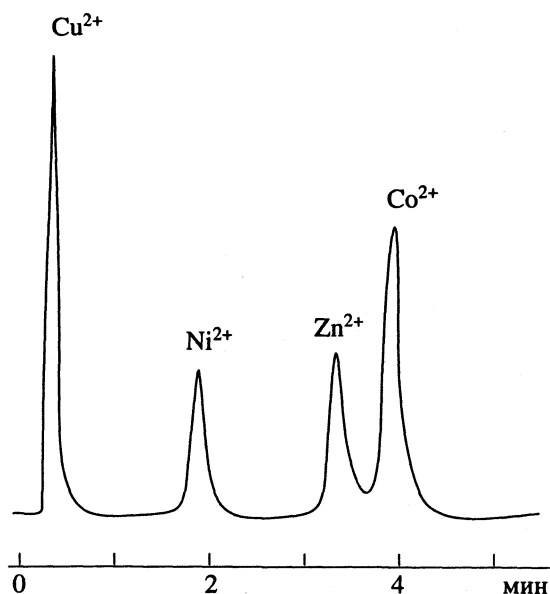


Рис. 6. Хроматограмма смеси переходных металлов. Колонка  $3 \times 100$  мм; элюент: 3 ммоль/л лизин, 2 ммоль/л щавелевая кислота, pH 3.2. Скорость потока элюента 0.6 мл/мин.

никеля, т.е. тех ионов, которые часто трудно разделить при элюировании растворами винной или лимонной кислот.

При использовании в качестве компонента подвижной фазы дипиколиновой кислоты наблюдали значительное отличие времени удерживания

кадмия, марганца и железа от времени удерживания остальных металлов. Так, например, при элюировании ионов меди, никеля, цинка, кобальта и свинца за 3 мин время удерживания кадмия  $>30$  мин. Возможно, данный эффект можно использовать при пробоподготовке, применении смешанных элюентов или селективном определении железа, кадмия, марганца в присутствии других переходных металлов.

Двухосновные аминокислоты в некоторых условиях можно использовать в качестве элюента при определении переходных металлов. Так, при элюировании водным раствором лизина ионы меди, никеля, цинка и кобальта удалось селективно определить в течение 5 мин (рис. 6). Следует отметить, однако, что аминокислотные элюенты менее устойчивы при хранении, чем подвижные фазы, содержащие стронций. Ресурс работы колонок также снижается. С другой стороны, при использовании лизина уменьшается предел обнаружения по сравнению с элюентом на основе солей стронция. В условиях рис. 6 предел обнаружения никеля составил 0.1 мкг/мл без предварительного концентрирования. Перспективными могут оказаться кислоты, способные к избирательному взаимодействию с каким-либо ионом, что даст выигрыш при использовании смешанных элюентов.

Таким образом, установлено, что селективность разделения переходных металлов на динамически модифицированном ионообменнике зависит от природы комплексообразующего агента, его концентрации в подвижной фазе и pH. Показана возможность применения двухзарядных катионов щелочно-земельных металлов или аминокислот для селективного и экспрессного определения переходных металлов на уровне 0.1 - 1 мкг/мл без предварительного концентрирования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yan D.R., Schwedt G. // *Anal. Chim. Acta.* 1985. V. 178. P. 347.
2. Yan D.R., Stumpp E., Schwedt G. // *Fresenius Z. Anal. Chem.* 1985. B. 322. S. 474.
3. Sevenich G.J., Fritz J.S. // *Anal. Chem.* 1983. V. 55. P. 12.
4. Van D.R., Schwedt G. // *Fresenius Z. Anal. Chem.* 1985. B. 320. S. 325.
5. Reiffenstuhl S., Bonn G. // *Ibid.* 1988. B. 332. S. 130.
6. Haddad P.R., Jackson P.E. // *J. Chromatogr. Library.* (Elsevier.) 1990. V. 46. P. 103.
7. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. 6-е изд., перераб. и доп. М.: Химия, 1989. С. 322.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.422

ИОНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХЛОРИД-ИОНА  
ПРИ ИЗБЫТКЕ БОРНОЙ КИСЛОТЫ

© 1994 г. А. Д. Карпюк, М. В. Вахрушева, Н. К. Сажина

Всероссийский научно-исследовательский институт неорганических материалов  
им. акад. А.А. Бочвара, Москва

Показана возможность использования двухколоночной анионо-обменной хроматографии для определения  $\text{Cl}^-$ -ионов на уровне  $\geq 10$  мкг/л в присутствии макрокonzентраций борной кислоты. Изучено влияние матричного эффекта  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Предложен элюент и разработана методика хроматографического определения хлорид-иона в теплоносителе первого контура АЭС методом двухколоночной ионной хроматографии.

Ускорение коррозии оборудования энергетических установок в присутствии примесей анионной природы [1] привлекает все большее внимание исследователей и практиков к обеспечению достоверного контроля содержания анионов в водных растворах [2 - 4]. Проблема определения  $\text{Cl}^-$  в теплоносителе первого контура, кроме того, актуальна с точки зрения обеспечения безаварийной работы АЭС и повышения их экологической безопасности. Наиболее распространенный на АЭС двухколоночный вариант ионной хроматографии (ИХ) обеспечивает определение анионов в теплоносителе второго контура на уровне  $\geq 1$  мкг/л [2, 3].

Анализ  $\text{Cl}^-$ -иона в водном теплоносителе первого контура осложняется необходимостью его определения в присутствии избытка борной кислоты (до 40 г/л). Действительно, при определении  $\text{Cl}^-$  методом двухколоночной ИХ (ДИХ) с использованием в качестве ионообменника смолы, приготовленной на стирол-дивинилбензольной матрице, наблюдается матричный эффект, т.е. значение аналитического сигнала и время удерживания  $\text{Cl}^-$ -иона меняется сложным образом в зависимости от концентрации  $\text{H}_3\text{BO}_3$  [5, 6]. Поскольку величина матричного эффекта может определяться природой используемого анионообменника, то нами было изучено влияние борной кислоты на определение  $\text{Cl}^-$ -ионов при использовании сорбента на основе смеси оксиметилметакрилата и этилендиметакрилата (ХИКС-1).

В настоящей работе изучена возможность определения  $\text{Cl}^-$  в присутствии избытка борной кислоты и предложена методика его определения методом ДИХ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

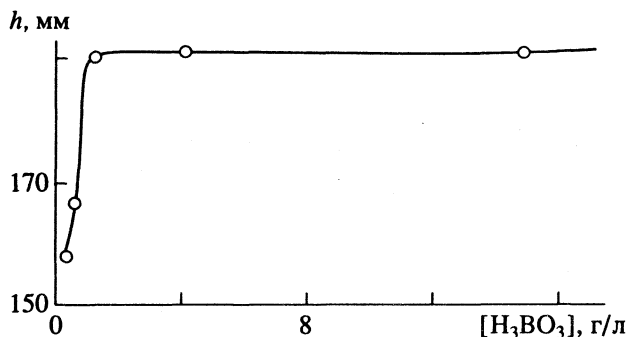
Работу выполняли на ионном хроматографе "Цвет-3006". Условия хроматографирования: разделительная колонка  $5 \times 100$  мм, заполненная

ХИКС-1 (25 - 40 мкм), подавительная колонка  $6 \times 200$  мм, заполненная КРС-8П-Т40; для концентрирования анализируемых растворов с содержанием  $\text{Cl}^-$ -ионов  $\geq 10$  мкг/л применяли концентрирующую колонку  $4 \times 15$  мм с сорбентом ХИКС-1. Элюенты: 1)  $2.4 \times 10^{-3}$  М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  -  $3 \times 10^{-3}$  М  $\text{NaHCO}_3$ ; 2) 0.32 М  $\text{H}_3\text{BO}_3$  -  $6 \times 10^{-3}$  М  $\text{NaOH}$ . Расход элюента 2 мл/мин. Объем петли дозатора 100 мкл. При концентрировании объем пробы 25 мл.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования по определению  $\text{Cl}^-$  в присутствии  $\text{H}_3\text{BO}_3$  показали, что ион  $\text{Cl}^-$  хорошо детектируется в присутствии макрокonzентраций борной кислоты и 15-кратный избыток  $\text{H}_3\text{BO}_3$  по отношению к  $\text{Cl}^-$  не мешает его определению (рисунок).

Обращает на себя внимание, что при  $[\text{H}_3\text{BO}_3] \geq 1$  г/л значение аналитического сигнала  $\text{Cl}^-$  практически не зависит от концентрации  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Наблюдаемая картина удовлетворительна для определения  $\text{Cl}^-$  при его содержании  $\geq 1$  мг/л, однако в водном теплоносителе содержание  $\text{Cl}^-$  необходимо контролировать на уровне  $\geq 10$  мкг/л,



Зависимость высоты пика  $\text{Cl}^-$ -иона от концентрации присутствующей в пробе борной кислоты;  $[\text{Cl}^-] = 10$  мкг/л.

т.е. требуется концентрирование пробы. При решении этой задачи в присутствии избытка борной кислоты (например, 2 г/л) при использовании карбонатного элюента отсутствует не только корреляция между значением аналитического сигнала  $h$  и содержанием  $\text{Cl}^-$ , но и времена удерживания  $\text{Cl}^-$ -иона резко увеличиваются при последовательном выполнении анализов. Все это свидетельствует о том, что использование карбонатного элюента при определении  $\text{Cl}^-$  на уровне  $\geq 10$  мкг/л в присутствии борной кислоты методом ДИХ не обеспечивает достоверного контроля.

Замена элюирующего  $\text{CO}_3^{2-}$ -иона на  $\text{V}_4\text{O}_7^{2-}$ , как было установлено нами, снимает указанные выше проблемы, однако время удерживания  $\text{Cl}^-$  велико (40 мин). Поэтому с целью уменьшения влияния борной кислоты на определение хлорид-иона и повышения экспрессности анализа нами было предложено "генерировать" элюирующий ион непосредственно в растворе борной кислоты, используемой в качестве элюента. Для этого в 1 л 2%-го раствора  $\text{H}_3\text{VO}_3$  вводили 6 мл 1 н. раствора  $\text{NaOH}$ . Необходимо отметить, что в данном случае однозначно определить элюирующий ион достаточно сложно, скорее всего, мы имеем дело с равновесием, в котором участвуют  $\text{OH}^-$ -ионы, анионы борной, три- и гексаборной кислот. Выяснение природы элюирующего иона будет результатом дальнейших исследований. Эффективность предложенного элюента была исследована при анализе образцов, содержащих 10, 20, 40, 80 мкг/л  $\text{Cl}^-$  в присутствии макроконцентраций  $\text{H}_3\text{VO}_3$  (таблица).

Из данных, представленных в таблице, видно, что во всем диапазоне определяемых содержаний  $\text{Cl}^-$  изменение концентрации борной кислоты практически не влияет на значения анали-

Зависимость высоты ( $h$ , мм) пика  $\text{Cl}^-$  от концентрации  $\text{H}_3\text{VO}_3$  (г/л)

$[\text{Cl}^-]$ , мкг/л	2	10	20	30	40
0	4	4	4	4	4
10	25	24	24	24	23
20	34	37	37	38	38
40	68	66	66	66	65
80	130	134	133	132	130

тического сигнала  $\text{Cl}^-$ . При этом достигается удовлетворительная линейность градуировочного графика, построенного при различных концентрациях  $\text{H}_3\text{VO}_3$ :  $\rho > 0.95$ . Значения относительного среднего квадратического отклонения во всем диапазоне определяемых содержаний составляют 0.05 - 0.04. Из представленных данных следует, что ДИХ в предложенном варианте генерирования элюирующего иона в растворе  $\text{H}_3\text{VO}_3$  позволяет успешно осуществлять определение  $\text{Cl}^-$  в присутствии макроконцентраций борной кислоты.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Эванс Ю.Р. Коррозия и окисление металлов. М.: Машиз., 1962. 855 с.
2. Полетаева И.Л., Вахрушева М.В., Карпюк А.Д. // Заводск. лаб. 1992. № 2. С. 8.
3. Карпюк А.Д., Полетаева И.Л. // Там же. 1993. № 5. С. 13.
4. Карпюк А.Д., Вахрушева М.В., Губачев А.Ю. // Там же. 1993. № 5. С. 11.
5. Strekert H.H., Epstein B.D. // Anal. Chem. 1984. V. 56. P. 21.
6. Lung Tan // J. Radional. and Nuclear Chem. Articles. 1988. V. 123. № 2. P. 421.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544

ПРИМЕНЕНИЕ ДВУХКОЛОНОЧНОЙ АНИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ  
С РАЗДЕЛИТЕЛЬНОЙ КОЛОНКОЙ ПЕРЕМЕННОЙ ДЛИНЫ  
ДЛЯ КОНТРОЛЯ СОДЕРЖАНИЯ АНИОНОВ  
В ВОДНОМ ТЕПЛОНОСИТЕЛЕ

© 1994 г. И. Л. Полетаева, З. Н. Игнатова, А. Д. Карпюк

Всероссийский научно-исследовательский институт неорганических материалов  
им. акад. А.А. Бочвара, Москва

Предложен метод, названный двухколоночной ионной хроматографией с изменяющейся длиной разделительной колонки, для одновременного определения слабо- и сильноудерживаемых анионов в теплоносителе АЭС и ТЭЦ при содержаниях определяемых анионов  $>1$  мкг/дм<sup>3</sup>. Исследована зависимость значений аналитических сигналов от концентрации определяемых ионов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работу выполняли на ионном хроматографе "Цвет-3006". Разделительная колонка размером  $6 \times 200$  мм и концентрирующая колонка размером  $4 \times 15$  мм были наполнены сорбентом Anieks N, 10 мкм. Подавительные колонки размером  $6 \times 50$  мм были наполнены катионитом КУ-2. Элюент –  $5 \times 10^{-3}$  М NaHCO<sub>3</sub>, объем пробы 25 см<sup>3</sup>.

Принципиальная схема хроматографа "Цвет-3006", работающего в режиме двухколоночной ионной хроматографии (ДИХ) с изменяющейся длиной разделительной колонки, представлена на рис. 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты исследований анионного состава теплоносителя второго контура АЭС, проведенных в России и за рубежом [1, 2], показали, что состояние водно-химического режима определяется не только присутствием в теплоносителе ионов неорганической природы, но и анионами органического происхождения. При этом доминирующее влияние на значение электропроводности и протекание процессов коррозии могут оказывать как муравьиная и уксусная кислоты, так и ионы SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> и Cl<sup>-</sup>. В этой связи очевидно, что для принятия научно и экономически обоснованных решений по оптимизации водно-химического режима необходимо знание содержания в теплоносителе всех анионных примесей, определяющих его состояние. В настоящее время наиболее общепринятым способом решения задачи контроля содержания анионов в теплоносителе является ионная хроматография. При этом для контроля содер-

жания неорганических анионов наибольшее распространение получила ДИХ [3], а для низших карбоновых кислот (НКК) – ионоэкслюзионная хроматография (ИЭХ) [3, 4]. Такой подход принят за рубежом, однако для России в настоящее время малопримем из-за отсутствия серийно выпускаемых сорбентов для ИЭХ.

Поэтому на основании результатов предыдущих исследований по определению неорганических анионов и НКК методом ДИХ [1, 5] мы изучили возможность одновременного определения указанных групп анионов методом ДИХ. Необходимо подчеркнуть, что в традиционном варианте ДИХ не позволяет решить поставленную задачу. Действительно, в условиях, в которых достигается хорошее разделение слабоудерживаемых ионов F<sup>-</sup>, НКК, времена удерживания Cl<sup>-</sup> и SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> чрезвычайно велики, или указанные анионы не

Содержание анионов в теплоносителе ТЭЦ Иркутского региона (мкг/дм<sup>3</sup>)

ТЭЦ	CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup>	HCOO <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	F <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Ново-Иркутская ТЭЦ	18	54	12	<1	5
Ново-Иркутская ТЭЦ	20	50	2	–	42
ТЭЦ-9	125	9	70	–	34
ТЭЦ-9	60	24	22	7	180
ТЭЦ-11	50	124	31	–	40
ТЭЦ-11	24	10	161	2	41



детектируются вследствие прочной сорбции на разделительной колонке. Напротив, в условиях определения ионов  $\text{Cl}^-$  и  $\text{SO}_4^{2-}$  невозможно добиться разделения пиков  $\text{F}^-$  и НКК.

Переход от изократного элюирования к градиентному [6, 7] и использование микромембранных подавителей [7], в принципе, позволяет решить проблему одновременного определения слабо- и сильноудерживаемых анионов. Однако реализация в отечественной практике такого подхода и необходимость определения анионов на уровне  $>5$  мкг/дм<sup>3</sup> наталкивается на трудности приборного и методического характера. Для решения задачи одновременного определения слабо- и сильноудерживаемых анионов и повышения гибкости ДИХ в настоящей работе предложен подход, который мы назвали ДИХ с изменяющейся длиной разделительной колонки. Принципиальная схема такого подхода представлена на рис. 1. Представленная схема включает в себя концентрирующую колонку 4, необходимую для контроля содержащий анионных примесей в водном теплоносителе на уровне  $>5$  мкг/дм<sup>3</sup>. При этом в предложенном варианте концентрирующая колонка выполняет две функции: 1) непосредственное концентрирование всех анионов анализируемой пробы, 2) разделение сильноудерживаемых анионов.

Согласно предложенной схеме, анионы после концентрирования элюируются на разделительную колонку 6 (рис. 1а). Отметим, что в зависимости от емкости и типа сорбента и состава элюента время элюирования анионов составляет 1 - 4 мин. В течение этого времени, как было установлено в ходе предварительных исследований, происходит полное элюирование слабоудерживаемых анионов ( $\text{F}^-$ , уксусной и муравьиной кислот), а ионы  $\text{SO}_4^{2-}$  и  $\text{Cl}^-$  удерживаются на концентрирующей колонке 4. Затем поток элюента вместе с ионами  $\text{F}^-$  и НКК, минуя концентрирующую колонку, направляется на разделительную колонку 6, где происходит разделение указанных анионов. Это фиксируется на хроматограмме. После выхода формиат-иона поток элюента направляется через концентрирующую колонку 4, минуя разделительную 6 (рис. 1б). За счет того, что концентрирующая колонка значительно короче разделительной, время удерживания сульфат- и хлорид-ионов невелико, и они детектируются сразу за формиат-ионом. Время анализа анионов составляет 20 - 25 мин (рис. 2). Видно, что в выбранных условиях достигается хорошее разделение всех рассматриваемых анионов.

Согласно [8], при использовании ДИХ зависимость высоты пика от концентрации определяемых анионов нелинейна, тем не менее полученные нами данные показали их линейность в широком диапазоне (1 - 1000 мкг/дм<sup>3</sup>) для всех

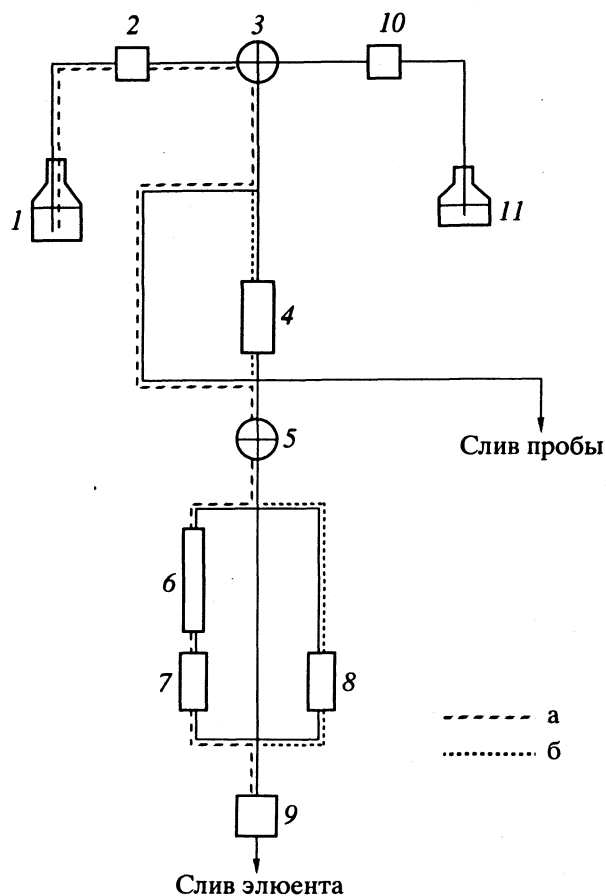


Рис. 1. Принципиальная схема ионного хроматографа с изменяющейся длиной разделительной колонки: 1 - элюент, 2 - элюентный насос, 3 - кран-дозатор, 4 - концентрирующая колонка, 5 - кран, переключающий подавительные колонки, 6 - разделительная колонка, 7 и 8 - подавительные колонки, 9 - детектор, 10 - концентрирующий насос, 11 - емкость с пробой; а - определение  $\text{F}^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{HCOO}^-$ , б -  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ .

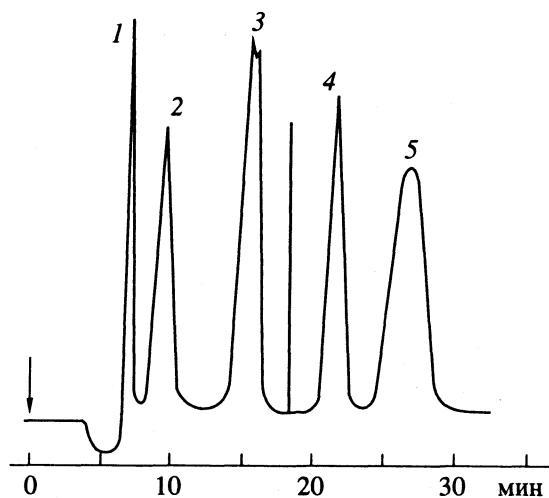


Рис. 2. Хроматограмма стандартного раствора ионов  $\text{F}^-$  (1),  $\text{CH}_3\text{COO}^-$  (2),  $\text{HCOO}^-$  (3),  $\text{Cl}^-$  (4) и  $\text{SO}_4^{2-}$  (5) в условиях ДИХ с изменяющейся длиной разделительной колонки.

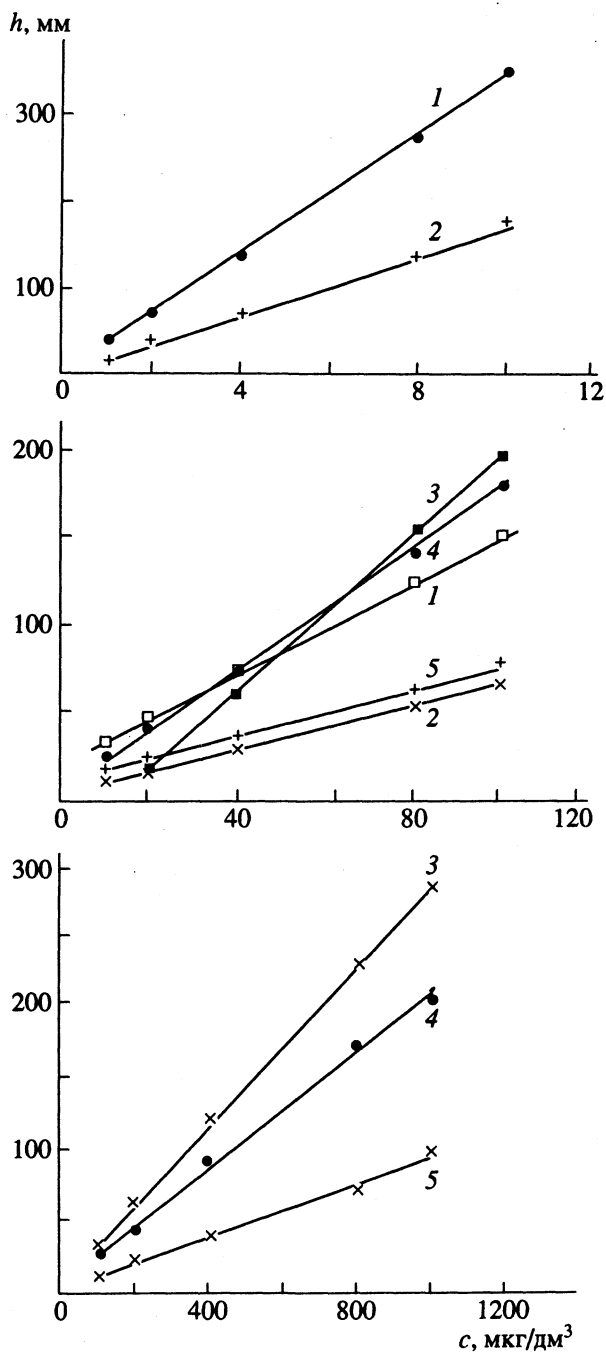


Рис. 3. Линейные зависимости высот пиков  $h$  от концентраций анионов  $c$ : 1 –  $F^-$ , 2 –  $Cl^-$ , 3 –  $HCOO^-$ , 4 –  $CH_3COO^-$ , 5 –  $SO_4^{2-}$ ;  $\rho > 0.99$ .

определяемых анионов (рис. 3). Это согласуется с результатами работы [9] и показывает, что при использовании обычного подавления с помощью колонки, заполненной КУ-2, а не мембранного подавления, калибровочные графики линейны.

Таким образом, данный метод можно использовать, в частности, для анализа теплоносителя энергопроизводящих установок. Он был внедрен в лаборатории химслужбы АО "Иркутскэнерго". В таблице представлены результаты анализа теплоносителя некоторых ТЭЦ Иркутского региона. Видно, что в ряде случаев концентрации муравьиной и уксусной кислот, как правило, сопоставимы с концентрациями неорганических анионов. Это подтверждает необходимость регулярного контроля водных теплоносителей энергопроизводящих установок на содержание анионов органической и неорганической природы.

Представленный материал убедительно свидетельствует, что изменение длин разделительных колонок в ходе одного анализа для групп слабо- и сильноудерживаемых анионов существенно увеличивает гибкость и возможности ДИХ при работе в изократическом режиме. Наличие линейной зависимости высот определяемых ионов от их концентраций позволяет осуществлять определение анионов в широком диапазоне концентраций от 1 до 1000 мкг/дм<sup>3</sup>.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карпюк А.Д., Андропова Г.А., Вахрушева М.В. и др. // Теплоэнергетика. 1991. Т. 7. С. 9.
2. Byers W.A. // Abst. Pap. Pittsburgh Conf. and Expo. Anal. Chem. and Appl. Spectrosc. Atlantic City. N.Y. March 10 - 14, 1986. S. 1. s. a. 768.
3. Фритц Дж., Гьерде Д., Поланд К. Ионная хроматография. М.: Мир, 1984. С. 273.
4. Smith R.E. Ion Chromatography Application. CRC Press. Inc. Boca Raton. Florida, 1988. P. 177.
5. Карпюк А.Д., Полетаева И.Л. // Завод. лаб. 1993. № 5. С. 13.
6. Locridge Y.F., Forteir N.F., Schmuckler C., Fritz Y.S. // Anal. Chim. Acta. 1987. В. 192. S. 41.
7. Campbell D.L. // Abst. Pap. Pittsburgh Conf. and Expo. Anal. Chem. and Appl. Spectrosc. New Orleans. Febr. 22 - 26, 1988. P. 10 - 17.
8. Doury-Berthod M., Giompaoli P., Pitsh H., Sella G. // Anal. Chem. 1985. V. 57. P. 2257.
9. Polit L.N., McNair H.H., Roclin R.D. // J. Liq. Chromatography. 1987. V. 10(5). P. 829.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544

ВЛИЯНИЕ ЗАМЕЩЕННЫХ ФЕНОЛОВ НА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ  
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИЛЬНО- И СЛАБОУДЕРЖИВАЕМЫХ АНИОНОВ  
МЕТОДОМ ДВУХКОЛОНОЧНОЙ ИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 1994 г. А. Д. Карпюк, З. Н. Игнатова, И. Л. Полетаева

Всероссийский научно-исследовательский институт неорганических материалов  
им. акад. А.А. Бочвара, Москва

Изучено влияние добавок в подвижную фазу замещенных фенолов на ионохроматографическое определение анионов. Найдено, что введение в элюент добавок пентафторфенола и *n*-нитрофенола существенно сокращает времена удерживания анионов и повышает чувствительность их определения. Установлен различный характер влияния добавок на времена удерживания слабо- и сильно-удерживаемых анионов. Показан оптимальный диапазон концентраций модифицирующих элюент добавок ( $9 \times 10^{-4}$  -  $18 \times 10^{-4}$  М), позволяющий осуществлять одновременное определение в изократическом режиме сильно- и слабоудерживаемых анионов. Установлено влияние природы модифицирующей добавки на времена удерживания анионов.

Использование ионохроматографических (ИХ) методов в анализе анионов получило в последнее время широкое распространение. Наиболее традиционным методом анализа смесей анионов является двухколоночная ионная хроматография (ДИХ) [1, 2]. Вместе с тем, несмотря на обилие практического материала, способы совершенствования и оптимизация ионохроматографического определения анионов привлекают пристальное внимание исследователей [3]. Одним из способов оптимизации разделения анионов может служить введение в подвижную фазу органических модификаторов [3]. Так, в работе [2] представлены сведения о сокращении времени удерживания органических анионов при введении в подвижную фазу кетонов, эфиров. Вопрос же поиска новых модификаторов, повышающих эффективность разделения неорганических анионов, сокращающих время их определения и одно-

временно расширяющих возможности традиционно используемых в отечественной практике сорбентов, изучен недостаточно.

Цель работы – изучение влияния природы и концентрации добавок замещенных фенолов в подвижную фазу, используемую в ДИХ, на хроматографическое определение слабо- и сильно-удерживаемых анионов и оценка возможности одновременного определения анионов методом ДИХ в изократическом режиме.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследования проводили на ионном хроматографе "Цвет-3006". Разделительную колонку  $4 \times 200$  мм заполняли анионообменником ХИКС-1. В качестве подвижной фазы использовали растворы  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaOH}$  либо их смесей.

Таблица 1. Влияние органических добавок (*c* – их концентрация) на времена удерживания анионов (мин) в стандартном элюенте ( $3 \times 10^{-3}$  М  $\text{NaHCO}_3$  -  $2.4 \times 10^{-3}$  М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) при различных значениях pH

<i>c</i> × 10 <sup>4</sup> , М	pH	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	CrO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	MoO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	SCN <sup>-</sup>	I <sup>-</sup>
–	10.25	2.30	3.90	9.10	9.10	17.8	–	63.6	–	–	–
C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> OH											
9	10.25	2.22	2.87	4.65	5.50	8.60	36.6	24.5	15.75	22.1	12.7
18	9.90	2.27	2.87	4.24	4.70	7.10	26.4	18.0	13.2	15.2	9.80
36	9.45	2.12	2.57	3.93	4.40	5.75	17.7	11.8	9.40	10.3	7.10
<i>n</i> -NO <sub>2</sub> -фенол											
9	9.88	2.30	3.90	4.25	5.60	8.50	28.2	20.6	15.2	17.0	–
18	9.35	2.30	3.00	3.60	5.20	7.10	20.3	15.45	11.8	11.8	8.20
36	7.60	1.70	2.70	2.90	3.80	5.60	15.2	10.45	8.20	9.10	6.40

**Таблица 2.** Уменьшение времени удерживания анионов при введении в стандартный элюент добавок замещенных фенолов ( $3.6 \times 10^{-3}$  М) по сравнению со стандартным элюентом (%)

Добавка	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	CrO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
C <sub>6</sub> F <sub>5</sub> OH	8	34	57	67	81
<i>n</i> -NO <sub>2</sub> -Ph-OH	21	31	68	69	83

В качестве модификаторов подвижной фазы в настоящей работе применяли растворы пентафторфенола (ПФФ), *n*-нитрофенола (ПНФ) и фенола.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты исследований по использованию фенолов в качестве модифицирующих элюент добавок представлены в табл. 1 - 3. Видно, что в отсутствие модифицирующих добавок времена удерживания сильноудерживаемых анионов CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, SCN<sup>-</sup> составляют >1 ч; хроматографические пики сильно размыты, это делает невозможным не только их идентификацию при совместном присутствии, но и достоверное установление времени удерживания анионов. При введении в элюент замещенных фенолов достигается значительное сокращение времен удерживания всех анионов, причем наиболее интересным свойством вводимых добавок является разная степень их влияния на времена удерживания слабо- и сильноудерживаемых анионов.

Данные табл. 2 показывают, на сколько уменьшается время удерживания анионов при введении органических модификаторов (концентрация добавки  $36 \times 10^{-4}$  М) по сравнению с временами удерживания при использовании стандартного элюента. Из данных табл. 1, 2 следует, что при введении органических модификаторов время удерживания слабоудерживаемых анионов, например F<sup>-</sup>, меняется незначительно (8 - 21%); напротив, для сильноудерживаемых SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> и особенно CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup> оно уменьшается на 67 - 69 и 81 - 83% соответственно.

Еще в большей мере влияние добавок ПФФ и ПНФ фенола проявляется на примере ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> и других сильноудерживаемых анионов. Действительно, только введение в стандартный элюент добавок модификатора обеспечивает определение сильноудерживаемых анионов. Так, анионы SCN<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup> не детектируются при использовании стандартного элюента и в то же время при наличии ПФФ и ПНФ в элюенте время удерживания указанных анионов составляет 9 - 15 мин. Наблюдаемое различие во влиянии добавок ПФФ и ПНФ на времена удерживания слабо- и сильноудерживаемых анионов, а именно, с одной стороны, небольшое уменьшение времени удерживания для Cl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, а с другой - значительно его сокращение для сильноудерживаемых анионов, позволяет существенно расширить возможности ИХ за счет увеличения числа одновременно анализируемых ионов (рисунки).

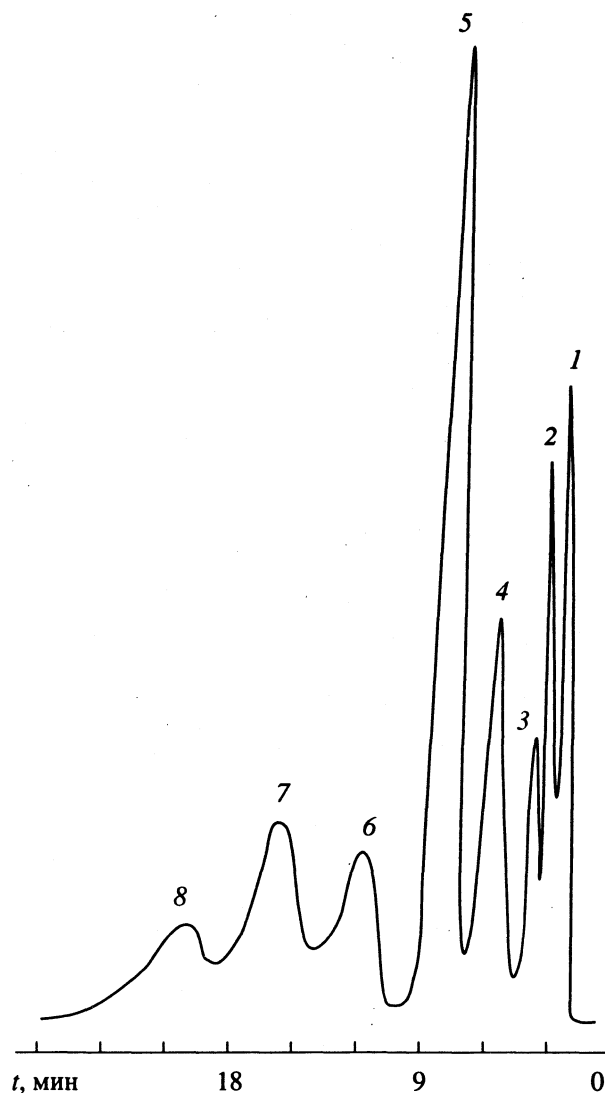
**Таблица 3.** Влияние добавок фенола (опыты 2, 5, 8 и 9) и пентафторфенола (опыты 3, 6, 10 и 11) на времена удерживания анионов (мин) при использовании различных элюентов

Опыт	$c \times 10^4$ , М	F <sup>-</sup>	HCOO <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
$2.4 \times 10^{-3}$ М Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>								
1	-	2.625	3.725	4.875	5.875	10.375	18.375	23.75
2	5.6	2.90	-	4.50	-	8.80	13.60	28.80
3	5.6	2.50	-	3.80	-	5.80	9.10	15.20
$1.0 \times 10^{-3}$ М NaOH								
4	-	6.25	8.00	16.00	32.50	-	-	-
5	10.0	6.80	8.20	16.20	33.10	-	-	-
6	9.0	3.375	3.375	5.00	8.50	-	-	-
$2.4 \times 10^{-3}$ М Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + $3.0 \times 10^{-3}$ М NaHCO <sub>3</sub>								
7	-	2.3	-	3.9	-	9.1	9.1	17.8
8	9.0	2.575	-	4.09	-	8.90	-	24.20
9	36.0	2.575	-	4.54	-	8.90	-	24.2
10	9.0	2.12	-	2.87	-	4.65	5.0	8.63
11	36.0	2.12	-	2.57	-	3.93	4.4	5.75

Из данных табл. 1 следует, что с увеличением концентрации замещенных фенолов время удерживания всех исследуемых анионов уменьшается, причем оптимальным диапазоном концентраций вводимых добавок является  $(9 - 18) \times 10^{-4}$  М. Действительно, в этом случае достигается удовлетворительное разделение указанных анионов. Дальнейшее увеличение концентрации замещенных фенолов несущественно влияет на времена удерживания слабоудерживаемых анионов, а разделение сильноудерживаемых анионов при их совместном присутствии затруднено. Следует отметить, что в отличие от добавок в подвижную фазу эфиров, кетонов, содержание которых в элюенте может достигать 10 об. %, концентрации добавок сопоставимы с концентрациями элюирующего иона ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) и определяемых ионов.

Таким образом, действие вводимых модифицирующих добавок определяется, скорее всего, не изменением физических свойств элюента, например, диэлектрической проницаемости [2], а может быть объяснено следующими причинами. Во-первых, замещенные фенолы являются сильными кислотами и могут служить источниками элюирующего иона. Это может служить, в частности, объяснением сокращения времен удерживания анионов при введении модифицирующих добавок к карбонатному элюенту (табл. 1 - 3). Вместе с тем, при введении ПФФ в  $1 \times 10^{-3}$  М NaOH сильноудерживаемые анионы не детектируются, а для слабоудерживаемых – наблюдается некоторое сокращение времен удерживания (табл. 3, опыты 2 и 3, 4). Наблюдаемые эффекты могут свидетельствовать о том, что ионы  $\text{C}_6\text{F}_5\text{O}^-$  и *n*- $\text{NO}_2\text{-Ph-O}^-$  могут выступать в роли элюирующих, однако их элюирующая способность недостаточна для элюирования сильноудерживаемых ионов, т.е. помимо аддитивности элюирующих свойств вводимых добавок и элюента на сокращение времени удерживания влияют другие факторы. Одним из них могла быть сольватация анализируемых анионов [2 - 4], способная привести к росту стабилизации анионов с увеличением их размера. Однако низкие добавки модификаторов и тот факт, что замещенные фенолы при введении в элюент находятся в ионной форме, указывает на малую роль сольватации определяемых анионов. Подтверждением этому может служить эффективность добавки динитрофенола ( $pK = 4$ ) при его введении в стандартный элюент.

Отметим, что концентрация вводимых добавок динитрофенола составляет  $1 \times 10^{-5}$  М. Поэтому мы полагаем, что наблюдаемые эффекты могут быть объяснены сольватацией катионных центров ионообменной смолы. Рост сольватной оболочки будет приводить к ослаблению взаимодействий определяемых анионов и ионообменной смолы. В случае малых анионов, сольватированных молекулами воды и находящихся преимущественно



Хроматограмма стандартного раствора анионов. Условия хроматографирования: разделительная колонка ХИКС-1 ( $4 \times 200$  мм), подавительная колонка КРС-4П ( $6 \times 200$  мм), элюент  $3 \times 10^{-3}$  М  $\text{NaHCO}_3$  +  $2.4 \times 10^{-3}$  М  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  +  $1.8 \times 10^{-3}$  М  $\text{C}_6\text{F}_5\text{OH}$ . Расход элюента 2 мл/мин; 1 -  $\text{F}^-$ , 2 -  $\text{Cl}^-$ , 3 -  $\text{NO}_3^-$ , 4 -  $\text{HPO}_4^{2-}$ , 5 -  $\text{SO}_4^{2-}$ , 6 -  $\text{MoO}_4^-$ , 7 -  $\text{CrO}_4^{2-}$ , 8 -  $\text{ClO}_4^-$ .

венно в подвижной фазе, ослабление взаимодействия незначительно повлияет на времена удерживания слабоудерживаемых ионов. Напротив, для сильноудерживаемых, особенно многоатомных менее сольватированных анионов, движущей силой, определяющей время удерживания, является взаимодействие ионита с анионами. Естественно, сольватация ионита модификаторами будет приводить к сокращению времени удерживания объемных анионов. Некоторым подтверждением этому также может служить тот факт, что при введении в стандартный элюент слабой кислоты – фенола – времена удерживания анионов практически не изменяются по сравнению с

полученными для элюента без добавок (табл. 3). Следует отметить, что фенол не образует фенолятов в карбонатной среде, т.е. сольватация ионообменной смолы в этом случае незначительна.

Отметим также, что предлагаемые модифицирующие добавки, помимо значительного сокращения времени удерживания анионов, улучшают форму пиков за счет уменьшения размывания краев. Вследствие этого растет эффективность колонки, улучшается воспроизводимость результатов анализа, понижаются пределы обнаружения определяемых ионов.

Таким образом, использование замещенных фенолов в качестве органической добавки при определении анионов методом ДИХ существенно

расширяет его возможности, значительно упрощает и удешевляет анализ смеси слабо- и сильно-удерживаемых анионов, повышает его точность и экспрессность.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Фритц Дж., Гьерде Д., Поланд К. Ионная хроматография. М.: Мир, 1984.
2. Пургин С.В., Шпигун О.А., Криволапов С.В. // Журн. аналит. химии. 1988. Т. 43. № 4. С. 717.
3. Схунмакерс П. Оптимизация селективности в хроматографии. М.: Мир, 1983.
4. Гордон Дж. Органическая химия растворов электролитов. М.: Мир, 1979.

МАТЕРИАЛЫ VI ВСЕРОССИЙСКОГО СИМПОЗИУМА  
ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.544:612.017

ОЧИСТКА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ  
С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ  
ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 1994 г. А. В. Стоянов

*Научно-производственный центр медицинской биотехнологии, Москва*

Описан процесс оптимизации условий ионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии моноклональных антител, специфичных к простагландинам семейства E. Для выбора условий фракционирования использованы теоретически рассчитанные зависимости заряда молекул иммуноглобулинов и основных примесных белков от pH среды. Методом хроматофокусирования произведено разделение отдельных компонентов спектра изоэлектрического фокусирования антител и их Fab-фрагментов. Для Fab-фрагментов получены также изоэлектрически гомогенные фракции с помощью только ионообменной хроматографии в градиенте концентрации соли.

С появлением гибридной технологии [1] стало возможным получение в больших количествах специфически взаимодействующих с любым, предварительно заданным антигеном, иммуноглобулинов (так называемых моноклональных антител). Моноклональные антитела (МАТ) наиболее широко используются для определения количественного содержания или простого детектирования веществ самой различной природы, присутствующих в очень малых концентрациях, а также являются удобной моделью для изучения взаимодействия белков с белками и низкомолекулярными веществами. В связи с этим в настоящее время во многих лабораториях проводятся работы по определению строения антигенсвязывающих центров различных МАТ при помощи рентгеноструктурного анализа.

Различного рода научные или прикладные задачи, так или иначе связанные с получением МАТ, предъявляют соответственно различные требования к их чистоте. Для диагностических целей очистка МАТ, как правило, заключается в простом освобождении от различных примесных белков, в то время как для кристаллизации, стандартизации препаратов и при решении некоторых других проблем требуется получение изоэлектрически гомогенных МАТ или их Fab-фрагментов, что сопряжено с некоторыми трудностями, поскольку различие в их изоэлектрических точках ( $pI$ ) является достаточно малым.

Высокоэффективная жидкостная ионообменная хроматография позволяет не только легко отделять искомый продукт от примесных белков, но и разделять изоформы белков, очень незначительно различающиеся по величинам  $pI$  (отмеченное выше в наибольшей мере относится к хроматофокусированию), при этом вследствие крайне малого относительного различия молекулярных

масс невозможно применение таких методов, как гель-фильтрация и ультрацентрифугирование. Кроме того, для сравнительно небольших полипептидов единичные модификации аминокислот, которые могут быть причиной микрогетерогенности [2], весьма слабо отражаются на гидрофобных свойствах молекул, что делает невозможным использование гидрофобной хроматографии.

В данной работе приводится способ оптимизации очистки МАТ от примесных белков асцитной жидкости с помощью ионообменной хроматографии на основе анализа теоретически полученных зависимостей заряда молекул иммуноглобулинов и примесных белков от pH, что позволяет избежать кропотливого экспериментального подбора условий разделения, а также описывается получение  $pI$ -гомогенных МАТ и их антигенсвязывающих (Fab) фрагментов, специфичных к простагландинам серии E.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Моноклональные антитела к простагландинам E (получение и характеристики описаны в работе [3]) представляли собой набор, включающий иммуноглобулины, обозначаемые 2F7, 2G5, 2H2 и 1H1 и принадлежащие к классу IgG. Их спектр изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) состоял из двух - трех основных компонентов с изоэлектрическими точками в области, близкой к нейтральной ( $pI = 7$ ), и нескольких минорных компонентов.

Имуноглобулины подвергались осаждению из асцитической жидкости при помощи 33 - 40% (от насыщения) сульфата аммония, после чего диализовались в течение 10 - 12 ч при 4°C против стартового буфера. Перед нанесением на колонку образцы центрифугировались в течение 10 мин при 10000g.

В работе использовались ионообменники фирмы "Pharmacia": Моно-Q (сильный катионообменник), Моно-S (сильный анионообменник) и Моно-P (анионообменник, специально предназначенный для хроматофокусирования). Профиль рН-градиента (в случае хроматофокусирования) контролировался при помощи проточного рН-метра. Эксперименты проводились на хроматографической системе FPLC.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Для выбора условий очистки МАТ с помощью ионообменной хроматографии был применен метод теоретического моделирования зависимостей

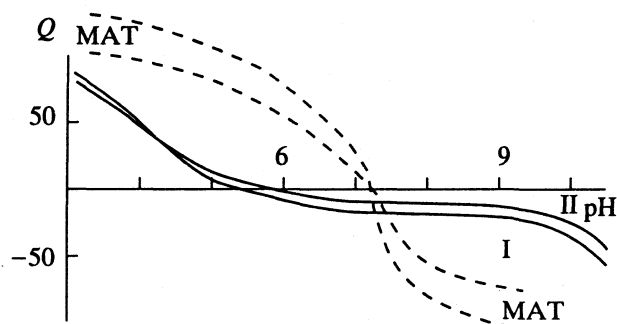


Рис. 1. Теоретически рассчитанные зависимости заряда молекул от рН среды (кривые титрования) для основных примесных компонентов (I – альбумин, II – трансферрин) и примерное расположение кривой титрования моноклональных анти-РGE-антител (область, ограниченная пунктирными линиями).

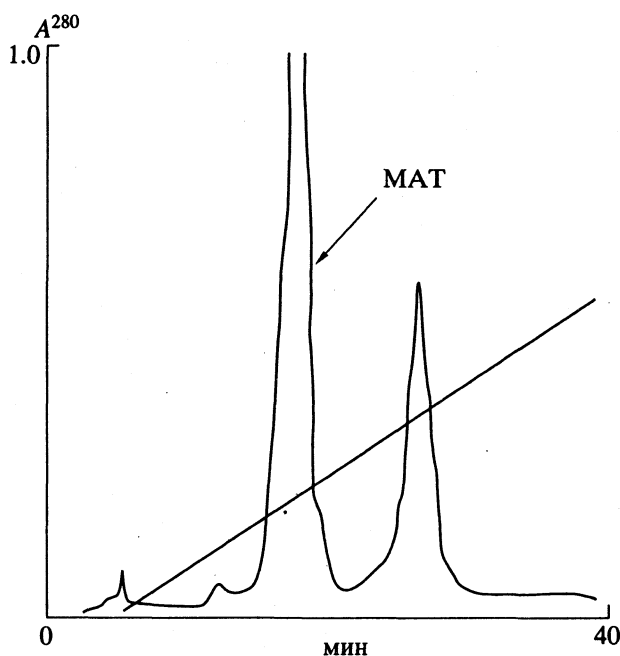


Рис. 2. Ионообменная хроматография МАТ на анионообменнике Моно-Q, 20мМ трис-НСI-буфер (рН 8.05), элюция – 0 - 400 мМ LiCl, скорость 1 мл/мин.

заряда белковых молекул от рН среды [4] для компонентов, входящих в состав исходной смеси. В данном методе предполагается, что ионизация всех ионогенных групп, имеющих в белковой молекуле, происходит независимо друг от друга (т.е. степень диссоциации произвольной ионогенной группы определяется только константой диссоциации данной ионогенной группы и не зависит от степеней диссоциации всех остальных групп). Для молекулы белка, имеющей  $N + M$  групп, образующих положительный и отрицательный заряд соответственно, общий заряд молекулы рассчитывается по формуле:

$$Q = \sum_{n=1}^N \frac{[H^+]}{K_n^+ + [H^+]} - \sum_{m=1}^M \frac{K_m^-}{K_m^- + [H^+]},$$

где  $K_n^+$  и  $K_m^-$  – константы диссоциации ионогенных групп,  $[H^+]$  – концентрация ионов водорода в растворе.

Метод экспериментального определения данных зависимостей, носящих название "кривых титрования", и их использование для выбора условий фракционирования белков были предложены Розентгреном [5]. Теоретический расчет кривых титрования позволяет не только обойтись без экспериментальной процедуры их получения, но и избежать артефактов, связанных с наличием молекулярно-ситового эффекта при движении белков в полиакриламидном геле, влияние которого зависит от размеров (и конформации) белковых молекул.

Исходный продукт в качестве балластного белка содержал достаточно большое количество альбумина и трансферрина, что подтверждалось как картиной электрофореза с додецилсульфатом натрия (ДСН), так и результатами аналитического изоэлектрофокусирования. Для приближенного расчета кривых титрования этих примесных белков были использованы данные по первичной структуре [6 - 8]. В случае МАТ моделирование кривой было более грубым: указывалась полоса, в которой должна была находиться кривая титрования (было использовано экспериментально определенное значение изоэлектрической точки и данные о содержании ионогенных аминокислот в иммуноглобулинах мыши [9]).

Результаты моделирования приведены на рис. 1. Видно, что можно выбрать следующие возможные способы разделения: при использовании сильного анионообменника можно попытаться поочередно элюировать с колонки в градиенте концентрации соли последовательно антитела и примесные белки в диапазоне рН ~ 7.5 - 8, либо собрать антитела в проскоке при рН стартового буфера < 7, но  $\geq 6$ . Второй способ лучше не использовать при одноступенчатой очистке, так как при



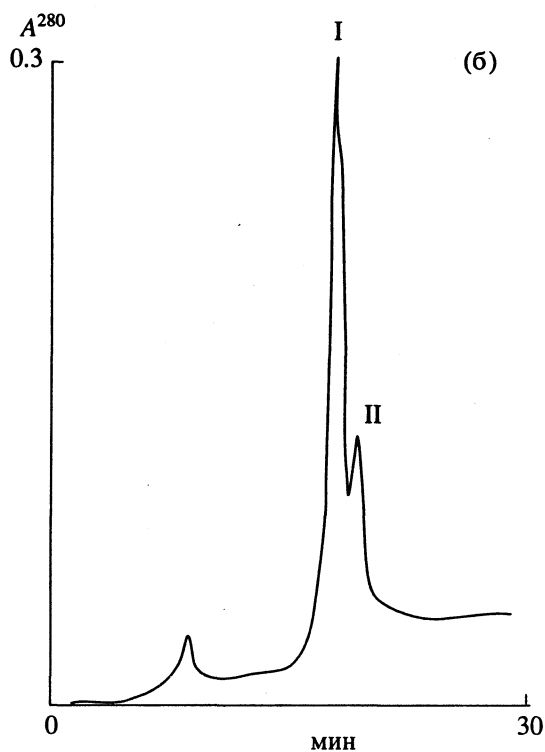
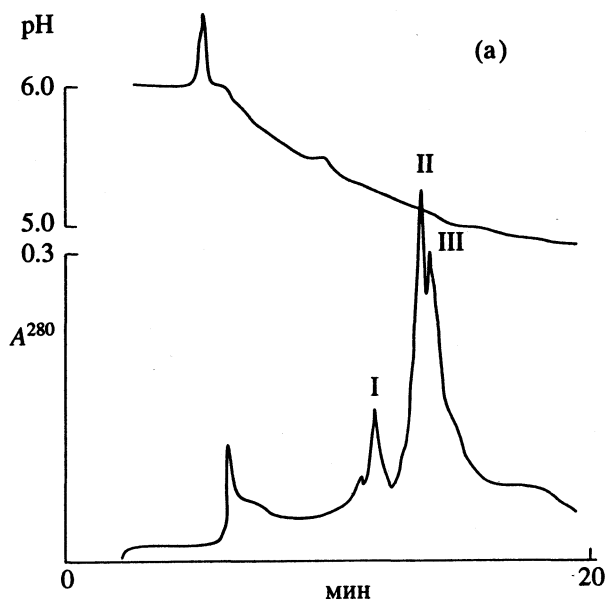


Рис. 3. Хроматофокусирование МАТ на анионообменнике Моно-Р; а – МАТ 2F7: стартовый буфер – триэтанолламин 25мМ (рН 6.0), элюция – РВ 74 (степень разведения 1/13) рН 5.0, скорость 0.5 мл/мин; б – МАТ 1N7: стартовый буфер – метилимидазол 25 мМ (рН 5.8), элюция – РВ 74 (степень разведения 1/15) рН 5.10, скорость 0.35 мл/мин. Пики I, II, III соответствуют отдельным компонентам ИЭФ-спектра МАТ.

сборе нужного белка в проскоке можно также собрать некоторое количество примесных белков (каждый из которых может быть в очень небольшой концентрации), имеющих изоэлектрические точки в широком диапазоне рН. При работе с силь-

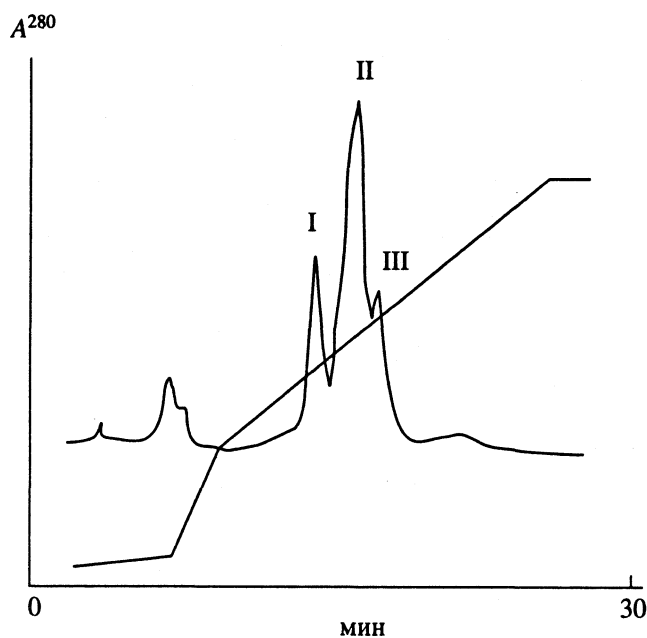


Рис. 5. Ионообменная хроматография Fab-фрагментов МАТ 2F7 на катионообменнике Моно-S 5 × 5, буфер – Na-ацетат 20мМ (рН 6.18), элюция – 0 - 150 мМ NaCl, скорость – 1 мл/мин; пики I, II, III соответствуют отдельным компонентам спектра Fab-фрагментов.

ным катионообменником в данной ситуации представляется наиболее целесообразным выбрать значение рН стартового буфера так, чтобы основной компонент примеси оказался в проскоке, и затем элюировать антитела в плавном градиенте соли.

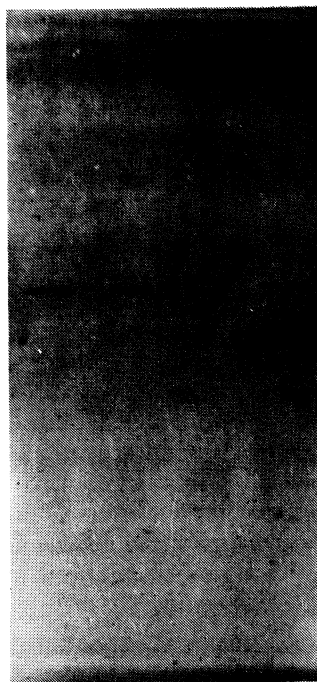


Рис. 4. Основные компоненты ИЭФ-спектра МАТ 2F7 в р/г-гомогенном состоянии. Верх соответствует значению рН 10, низ – рН 5.

В результате экспериментов, проведенных в соответствии с теоретическим анализом на ионообменниках Моно-Q  $5 \times 20$  (рН 7.6 - 8.2) и Моно-S  $5 \times 20$  (рН 5.0 - 6.0), были получены свободные от примесей препараты антител 2F7 и 2H2 по данным электрофореза с ДСН (типичная хроматограмма для анионообменника Моно-Q приведена на рис. 2), которые были использованы в дальнейшем для получения *rI*-гомогенных фракций антител.

Антитела каждого вида были подвергнуты фракционированию методом хроматофокусирования на анионообменнике Моно-P в очень узких рН-градиентах (0.7 - 0.5 ед. рН). Профиль элюции для МАТ 2F7 и 1H7 приведен на рис. 3. В результате экспериментов удалось получить основные компоненты ИЭФ-спектра в чистом виде (рис. 4), а также фракции, содержащие каждый из минорных компонентов в преобладающем количестве для МАТ 2F7, 2H2, 2G5 и 1H7.

В процессе хроматофокусирования МАТ наблюдалось аномально низкое значение рН, при котором происходило их элюирование с колонки, что, возможно, объясняется эффектом Доннана.

*rI*-Гомогенные Fab-фрагменты (процедура получения описана в [3]) благодаря существенно большим различиям в *rI* соседних компонентов ИЭФ-спектра (-0.3 ед. рН) легко разделялись при помощи хроматофокусирования в стандартных рН-градиентах [10]. При помощи только ионообменной хроматографии на анионообменнике Моно-S в плавном градиенте соли удалось получить фракции, содержащие каждый из компонентов ИЭФ-спектра в преобладающем количестве (хроматограмма приведена на рис. 5). Посредством рехроматографирования степень чистоты удавалось увеличить до состояния практически полной *rI*-гомогенности. Выбор буфера, имеющего значение рН, более близкое к изоэлектрическим точкам Fab-фрагментов, способствовал значительному улучшению разделения.

Таким образом, использование теоретических зависимостей заряда от рН для компонентов смеси белков позволяет эффективно осуществлять выбор условий очистки с помощью ионообменной хроматографии для исследуемых анти-РGE-антител, данная схема легко может быть применена для выделения из асцитической жидкости произвольных антител, при этом необходимо знать лишь примерное значение их изоэлектрических точек. Получение отдельных компонентов ИЭФ-спектра для Fab-фрагментов ( $\Delta rI \approx 0.3$ ) оказалось возможным при работе с буферами, имеющими достаточно близкое к *rI* значение рН. Использование специфического варианта ионообменной хроматографии – хроматофокусирования – позволило выделить *rI*-гомогенные моноклональные антитела ( $\Delta rI \approx 0.1$ ), для чего потребовалось создать очень узкие рН-градиенты.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kohler G., Milstein C. // Nature 1975. V. 256. P. 495.
2. Williamson A., Salaman M.R., Kreth H.W. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1973. V. 209. P. 210.
3. Kurochkin S., Perfilyeva E., Selezneva L.A. et al. // ICSU short reports. 1990. V. 10. P. 254.
4. Стоянов А.В. Теоретические аспекты микрогетерогенности белков. М., 1993. 19 с. – Деп. в ВИНИТИ 07.07.93, № 1872-B93.
5. Rosentgren A. // Electrophoresis and Electrofocusing / Ed. by B. Radola. B.: De Gluter, 1977. P. 165.
6. Brown J. // Proc. FEBS Mett. Colloq. 1978. V. 9. P. 1.
7. Banfield D., Chow B., Funk W. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V. 1089. P. 262.
8. Strickland P. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 12. P. 2549.
9. Sequences of proteins of immunological interest. Ed. by E. Kabat et al. 4th ed. U.S. Dep. of Health, 1987. P. 716.
10. Chromatofocusing with Polybuffer and PBE. Pharmacia Laboratory Separation Division. Uppsala: Rams & Lund, 1984. P. 17.

УДК 536.7+541.11

РАСЧЕТ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ  
ЧЕТВЕРНЫХ МЕТАЛЛИЧЕСКИХ СИСТЕМ  
НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ О ГРАНИЧНЫХ  
ТРОЙНЫХ СИСТЕМАХ

© 1994 г. А. Н. Мамедов, И. Г. Мехдиев

Академия наук Азербайджанской республики, Институт неорганической и физической химии, Баку

Поступила в редакцию 07.06.93 г.

Предложены уравнения расчета термодинамических свойств четырехкомпонентных металлических систем на основании данных о граничных тройных системах. Эти уравнения успешно апробированы на системе Cd-Sn-Pb-Bi.

Экспериментальное исследование термодинамических свойств жидких многокомпонентных систем очень трудоемко. Кроме того, для многокомпонентных систем не всегда удается подобрать достаточно надежный метод исследования. Некоторые многокомпонентные системы вследствие близости значений электродных потенциалов компонентов не пригодны для исследования термодинамических свойств с применением метода ЭДС [1]. Применение метода измерения давления насыщенного пара осложняется сопоставимыми величинами давления паров компонентов, т.е. наличием в системе двух относительно летучих компонентов и неидеальностью паровой фазы.

Большой практический интерес представляет возможность оценки термодинамических характеристик многокомпонентных систем по данным граничных систем. Такие расчетные методы широко апробированы только на тройных системах [1, 2]. В настоящей работе в результате развития аддитивных расчетных методов Колера и Бонье [2] получены уравнения для расчета термодинамических функций растворов четырехкомпонентной системы на основании данных о граничных тройных системах.

Применим идею Колера [2] об аддитивном сложении термодинамических функций систем 1-2, 1-3 и 2-3 по сечениям  $x_1/x_2$ ,  $x_1/x_3$  и  $x_2/x_3$  при расчете термодинамических функций системы 1-2-3 к системе 1-2-3-4. В случае четырехкомпонентной системы (рисунок) аддитивное сложение термодинамических функций тройных систем логично провести по разрезам  $a_1$ ,  $b_1$  (для системы 1-2-3),

$a_2$ ,  $b_2$  (система 1-2-4),  $a_3$ ,  $b_3$  (система 1-3-4),  $a_4$ ,  $b_4$  (система 2-3-4), где

$$\begin{aligned} a_1 &= (x_1 + x_2) / (x_1 + x_2 + x_3), & b_1 &= x_1 / (x_1 + x_2); \\ a_2 &= (x_1 + x_2) / (x_1 + x_2 + x_4), & b_2 &= x_1 / (x_1 + x_2); \\ a_3 &= (x_1 + x_3) / (x_1 + x_3 + x_4), & b_3 &= x_1 / (x_1 + x_3); \\ a_4 &= (x_2 + x_3) / (x_2 + x_3 + x_4), & b_4 &= x_2 / (x_2 + x_3). \end{aligned} \quad (1)$$

Тогда уравнение для расчета избыточной свободной энергии смешения растворов системы 1-2-3-4 можем написать в общем виде

$$\begin{aligned} \Delta G_{1234}^{\text{изб}} &= [\Psi_{123}]_{a_1, b_1} x_1 x_2 x_3 + [\Psi_{124}]_{a_2, b_2} x_1 x_2 x_4 + \\ &+ [\Psi_{134}]_{a_3, b_3} x_1 x_3 x_4 + [\Psi_{234}]_{a_4, b_4} x_2 x_3 x_4. \end{aligned} \quad (2)$$

Здесь  $\Psi_{ijk}$  – функция, связанная с интегральной избыточной свободной энергией смешения тройной системы  $i-j-k$ . Например, для системы 1-2-3 имеем

$$\Delta G_{123}^{\text{изб}} = \Psi_{123} x_1^1 x_2^1 x_3^1, \quad (3)$$

Расчитанные по уравнениям (4) - (8) и экспериментальные значения  $\Delta G_{1234}^{\text{изб}}$ , Дж/моль, системы Cd-Sn-Pb-Bi при 760 К

$x_{\text{Cd}}$	$x_{\text{Sn}}$	$x_{\text{Pb}}$	(4)	(5)	(7)	(8)	Опыт [3]
0.20	0.16	0.48	1344	936	1032	1012	914
0.30	0.14	0.42	1760	1228	1312	1288	1200
0.50	0.20	0.20	2200	1348	1632	1488	1360
0.70	0.12	0.12	1676	1120	1328	1212	1090
0.80	0.08	0.08	1460	880	992	904	846

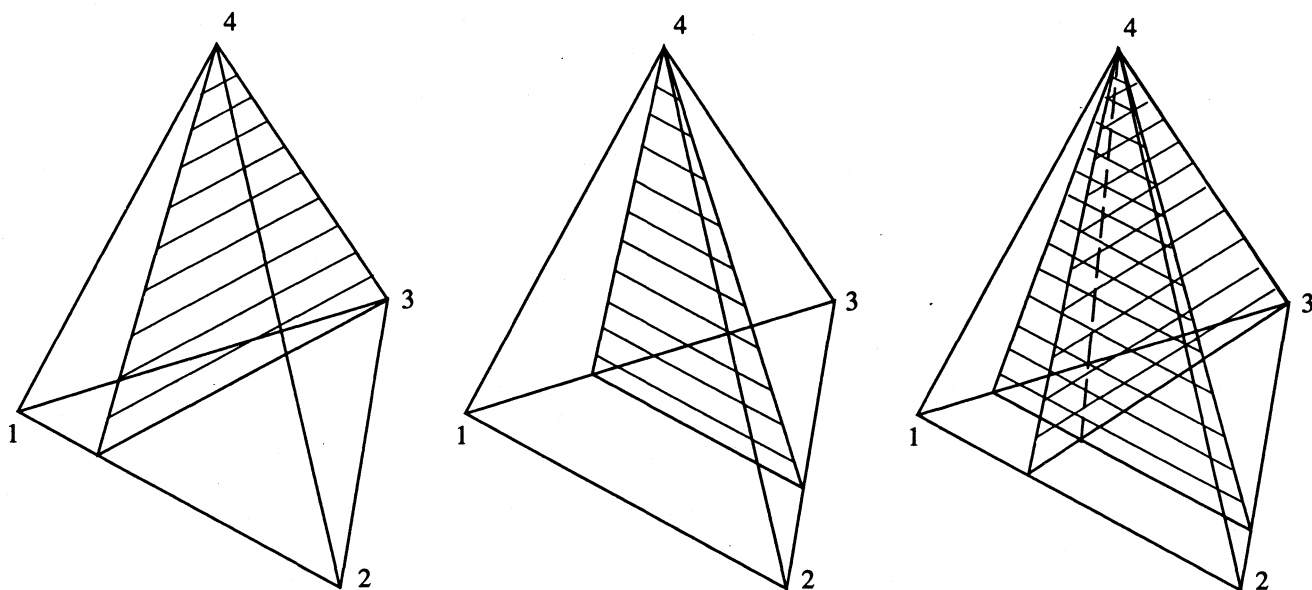


Схема концентрационных сечений четырехкомпонентной системы 1-2-3-4;  $a_1, b_1 = \text{const}$ .

где  $x'_1, x'_2, x'_3$  – мольные доли компонентов в тройной системе 1-2-3

$$x'_1 = x_1 / (x_1 + x_2 + x_3),$$

$$x'_2 = x_2 / (x_1 + x_2 + x_3),$$

$$x'_3 = x_3 / (x_1 + x_2 + x_3).$$

Подставляя эти выражения в уравнение (3), с учетом  $x_1 + x_2 + x_3 = 1 - x_4$  получаем

$$\Psi_{123} = \Delta G_{123}^{\text{изб}} \frac{(1 - x_4)^3}{x_1 x_2 x_3}.$$

Аналогичного вида соотношения получаются и для функций  $\Psi_{124}, \Psi_{134}$  и  $\Psi_{234}$ . С учетом этого уравнение (2) принимает вид

$$\begin{aligned} \Delta G_{1234}^{\text{изб}} = & [\Delta G_{123}^{\text{изб}}]_{a_1, b_1} (1 - x_4)^3 + \\ & + [\Delta G_{124}^{\text{изб}}]_{a_2, b_2} (1 - x_3)^3 + \\ & + [\Delta G_{134}^{\text{изб}}]_{a_3, b_3} (1 - x_2)^3 + \\ & + [\Delta G_{234}^{\text{изб}}]_{a_4, b_4} (1 - x_1)^3. \end{aligned} \quad (4)$$

Развивая идею Бонье [2] об аддитивном сложении избыточных термодинамических функций систем 1-2 и 1-3 по изоконцентрате системы 1-2-3 применительно к четверной системе, можем написать

$$\begin{aligned} (\Delta G_{1234}^{\text{изб}})_{a_4, b_4} = & \frac{1}{2} \left[ \frac{x_2 + x_3}{1 - x_1} (\Delta G_{123}^{\text{изб}})_{x_1, x_2/x_3} + \right. \\ & \left. + \frac{x_2 + x_4}{1 - x_1} (\Delta G_{124}^{\text{изб}})_{x_1, x_2/x_4} + \frac{x_3 + x_4}{1 - x_1} (\Delta G_{134}^{\text{изб}})_{x_2, x_3/x_4} \right]. \end{aligned} \quad (5)$$

При выводе уравнения (5) процесс образования четырехкомпонентного расплава разбили на следующие стадии. Вначале образуются тройные расплавы 1-2-3, 1-2-4 и 1-3-4. Далее смешением их по разрезам  $x_1 = \text{const}$  и  $x_i/x_j = \text{const}$  получается четырехкомпонентный раствор. Комбинируя эти процессы, получаем соотношение для расчета  $\Delta G_{1234}^{\text{изб}}$ :

$$\begin{aligned} 2\Delta G_{1234}^{\text{изб}} = & \frac{x_2 + x_3}{1 - x_1} \Delta G_{123}^{\text{изб}} + \\ & + \frac{x_2 + x_4}{1 - x_1} \Delta G_{124}^{\text{изб}} + \frac{x_3 + x_4}{1 - x_1} \Delta G_{134}^{\text{изб}}. \end{aligned} \quad (6)$$

Из соотношения (6) вытекает уравнение (5). Однако при таком аддитивном сложении не учитывается вклад тройной системы 2-3-4. Если это сделать в линейном и квадратичном приближениях (такие приближения оправдались применительно к тройным системам), то можем написать следующие соотношения:

$$\begin{aligned} (\Delta G_{1234}^{\text{изб}})_{a_4, b_4} = & (\Delta G_{1234}^{\text{изб}})'_{a_4, b_4} + \\ & + (1 - x_1) (\Delta G_{234}^{\text{изб}})_{a_4, b_4}, \end{aligned} \quad (7)$$

$$\begin{aligned} (\Delta G_{1234}^{\text{изб}})_{a_4, b_4} = & (\Delta G_{1234}^{\text{изб}})'_{a_4, b_4} + \\ & + (1 - x_1)^2 (\Delta G_{234}^{\text{изб}})_{a_4, b_4}, \end{aligned} \quad (8)$$

где величина  $(\Delta G_{1234}^{\text{изб}})'_{a_4, b_4}$  получена по уравнению (5).

Изложенный метод справедлив и для расчета энтальпии смешения четверной системы. Вычисленные значения интегральной избыточной свободной энергии смешения четверной системы Cd(1)–Sn(2)–Pb(3)–Bi(4) по уравнениям (4) - (8) сопоставлены с экспериментальными данными в таблице.

Из таблицы видно, что лучшее согласие расчетных данных с экспериментальными имеется в случае применения наиболее простого уравнения (5). Это связано с тем, что характер взаимодействия компонентов в системе Cd–Sn–Pb–Bi и граничных тройных системах одинаков.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Морачевский А.Г.* Термодинамика расплавленных металлических и солевых систем. М.: Metallургия, 1987. 240 с.
2. *Морачевский А.Г.* // Термодинамические свойства металлических сплавов и современные методы их исследования. Киев: Наукова думка, 1976. С. 71.
3. *Moser Z., Zabdyr L.* // Arch. Hutn. 1977. V. 22. № 4. P. 509.

УДК 536:546.65\*131

## ЗАКОНОМЕРНОСТИ В ИЗМЕНЕНИИ ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДИХЛОРИДОВ ЛАНТАНИДОВ

© 1994 г. В. Ф. Горюшкин

Сибирский металлургический институт им. С. Орджоникидзе, Новокузнецк

Поступила в редакцию 22.06.93 г.

Изучены закономерности в изменении термодинамических свойств дихлоридов в зависимости от порядкового номера лантанида. Проведено сравнение с соответствующими изменениями свойств для трихлоридов и металлов.

Периодичность в изменении свойств соединений лантанидов и ее теоретическое обоснование рассматривались, в основном, на свойствах соединений со степенью окисления +3 [1 - 3]. В работе [4] нами выявлены закономерности в изменении кристаллографических и структурных свойств дихлоридов лантанидов. На этой базе можно продолжить изучение закономерностей в изменении и других свойств дихлоридов, в частности, термодинамических.

Термодинамические свойства  $\text{LnCl}_2$  за последнее время исследованы достаточно полно. Потенциалы электродов  $\text{Ln}|\text{LnCl}_2$  и стандартные энтальпии образования дихлоридов лантанидов определены нами в работах [5 - 11]. Имеются данные [12 - 17] по стандартным теплотам и энтропиям дихлоридов. Чтобы получить более полную картину при изучении закономерностей, необходимо сравнить свойства дихлоридов лантанидов со свойствами соответствующих трихлоридов и металлов. Для этой цели мы использовали данные из справочников и работ [18 - 23].

### СТАНДАРТНЫЕ ОТНОСИТЕЛЬНЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ ЭЛЕКТРОДОВ $\text{Ln}|\text{LnCl}_2$

В [5 - 11] измерены ЭДС семи гальванических элементов



где  $\text{Ln} = \text{Nd}, \text{Sm}, \text{Eu}, \text{Dy}, \text{Ho}, \text{Tm}, \text{Yb}$ . Это позволяет проследить за закономерностями в изменении стандартных потенциалов электродов  $\text{Ln}|\text{LnCl}_2$ , поскольку ЭДС элемента (1) равна

$$E^\circ = \varphi_{\text{Ln}^{2+}/\text{Ln}}^\circ - \varphi_{\text{Sr}^{2+}/\text{Sr}}^\circ, \quad (2)$$

и, если условно принять электродный потенциал стронциевого электрода равным нулю, то

$$E^\circ = E_{\text{Ln}^{2+}/\text{Ln}}^\circ, \quad (3)$$

где  $E_{\text{Ln}^{2+}/\text{Ln}}^\circ$  – стандартный потенциал лантанидного электрода относительно стронциевого.

Графически зависимость стандартных относительных потенциалов электродов  $\text{Ln}|\text{LnCl}_2$  (таблица) от порядкового номера лантанида приведена

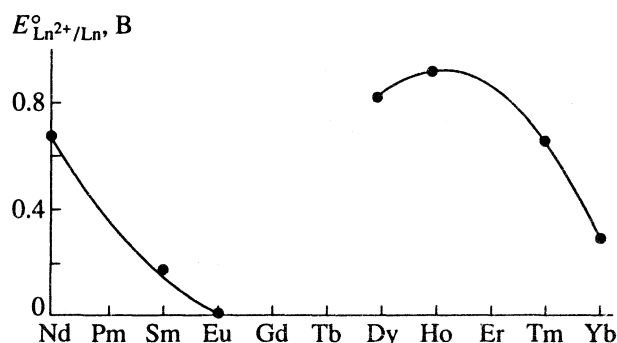


Рис. 1. Зависимость стандартных относительных потенциалов электродов  $\text{Ln}|\text{LnCl}_2$  при 298.15 К от порядкового номера лантанида.

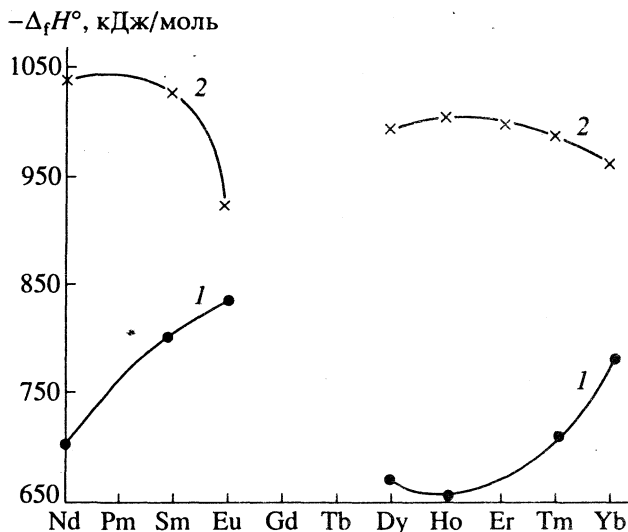


Рис. 2. Зависимости стандартных энтальпий образования  $\text{LnCl}_2$  (1) и  $\text{LnCl}_3$  (2) при 298.15 К от порядкового номера лантанида.

на рис. 1. Анализ величин электродных потенциалов показывает, что наиболее активным восстановителем, по силе практически равным стронцию, является металлический европий. Восстановительная способность лантанидов изменяется периодически: в ряду легких лантанидов увеличивается от неодима к европию, а в ряду тяжелых — от диспрозия-гольмия к иттербию. В ряду тяжелых лантанидов нет монотонного изменения стандартных относительных потенциалов электродов  $\text{Ln}|\text{LnCl}_2$ : от Dy к Ho потенциал увеличивается, а затем только уменьшается к Yb.

### СТАНДАРТНЫЕ ЭНТАЛЬПИИ ОБРАЗОВАНИЯ ДИХЛОРИДОВ ЛАНТАНИДОВ

Стандартные энтальпии образования дихлоридов лантанидов, вычисленные из данных по ЭДС гальванических элементов (1) по методу III закона термодинамики, приведены в таблице и на рис. 2. На рис. 2 приведены также стандартные энтальпии образования трихлоридов по данным [18, 20 - 23]. Как для ди-, так и для трихлоридов наблюдается периодическая зависимость энтальпии образования от порядкового номера лантанида с разделением на подгруппы хлоридов легких и тяжелых лантанидов. В группе тяжелых заметно особое положение хлоридов гольмия, наблюдается противоположный характер изменения рассматриваемой функции для ди- и трихлоридов.

### СТАНДАРТНЫЕ ЭНТРОПИИ ДИХЛОРИДОВ ЛАНТАНИДОВ

На рис. 3 стандартные энтропии дихлоридов лантанидов [12 - 17] в зависимости от порядкового номера лантанида сравниваются с изменениями энтропий трихлоридов и металлов [18 - 23]. Зависимости энтропий дихлоридов и металлов практически повторяют друг друга, а зависимость энтропий трихлоридов (за исключением участка  $\text{NdCl}_3\text{--SmCl}_3$ ) имеет противоположный характер. При этом отмечается интересное явление — энтропии ди- и трихлорида гольмия совпадают друг с другом, что находится в противоречии с известным правилом Латимера. Для европия и тулия энтропии соответствующих ди- и трихлоридов также оказываются близки.

### СТАНДАРТНЫЕ ТЕПЛОЕМКОСТИ ДИХЛОРИДОВ ЛАНТАНИДОВ

Стандартные теплоемкости ди-, трихлоридов и металлов лантанидов [12 - 23] в зависимости от порядкового номера приведены на рис. 4. Сравнение рис. 4 с предыдущими показывает, что, хотя изменение теплоемкостей не повторяет в точ-

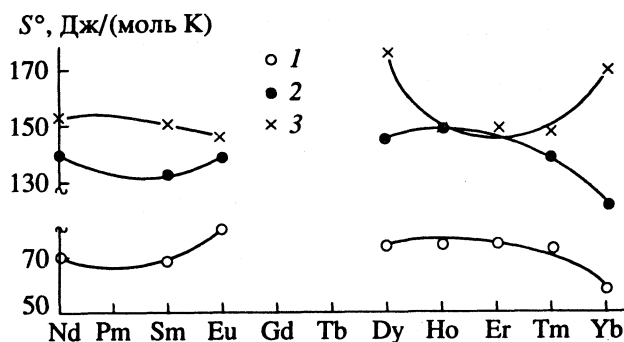


Рис. 3. Зависимости стандартных энтропий Ln (1),  $\text{LnCl}_2$  (2) и  $\text{LnCl}_3$  (3) при 298.15 К от порядкового номера лантанида.

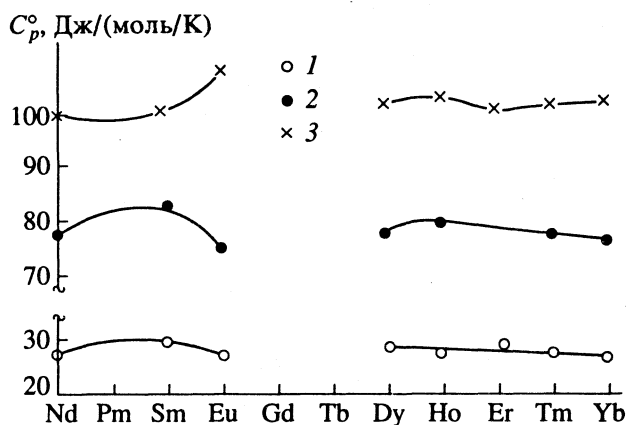


Рис. 4. Зависимости стандартных теплоемкостей лантанидов и их хлоридов при 298.15 К от порядкового номера лантанида; 1 - 3 — см. рис. 3.

ности изменения рассмотренных выше функций, отмеченные ранее закономерности остаются прежними.

Таким образом, изменение термодинамических свойств дихлоридов в зависимости от порядкового номера лантанида имеет периодический характер с разделением на подгруппы хлоридов легких и тяжелых лантанидов. Однако в каждой подгруппе нет монотонного изменения термодинамических свойств. В подгруппе дихлоридов тяжелых лантанидов отмечается особое положение свойств дихлорида гольмия. Соответствующие

Значения ЭДС гальванических элементов (1) при 298.15 К и стандартные энтальпии образования  $\text{LnCl}_2(\kappa)$ , кДж/моль

Ln	$E^\circ, \text{В}$	$-\Delta_f H^\circ$	Ln	$E^\circ, \text{В}$	$-\Delta_f H^\circ$
Nd [5]	0.6841	$699.8 \pm 1.2$	Ho [9]	0.8999	$660.0 \pm 6.9$
Sm [6]	0.1840	$798.4 \pm 2.8$	Tm [10]	0.6333	$712.9 \pm 2.9$
Eu [7]	0.0025	$833.2 \pm 1.2$	Yb [11]	0.2694	$780.8 \pm 1.5$
Dy [8]	0.8006	$676.4 \pm 2.5$			

термодинамические свойства дихлоридов и металлов изменяются симбатно, а ди- и трихлоридов – антибатно.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Jorgensen C.K.* // *K. Inorg. nucl. Chem.* 1970. V. 32. P. 3127.
2. *Джуринский Б.Ф.* // *Журн. неорган. химии.* 1980. Т. 25. № 1. С. 79.
3. *Вохмин В.Г., Ионова Г.В.* // *Журн. физ. химии.* 1990. Т. 64. № 2. С. 449.
4. *Астахова И.С., Горюшкин В.Ф.* // *Журн. неорган. химии.* 1992. Т. 37. № 4. С. 707.
5. *Горюшкин В.Ф., Подсевалов В.П., Пошевнева А.И., Зальмова С.А.* // *Журн. физ. химии.* 1990. Т. 64. № 2. С. 515.
6. *Горюшкин В.Ф., Пошевнева А.И., Подсевалов В.П.* // Там же. 1992. Т. 66. № 12. С. 3391.
7. *Горюшкин В.Ф., Пошевнева А.И., Васильев В.В., Подсевалов В.А.* // Там же. В печати.
8. *Горюшкин В.Ф., Подсевалов В.П., Зальмова С.А., Пошевнева А.И.* // Там же. 1989. Т. 63. № 1. С. 241.
9. *Горюшкин В.Ф., Пошевнева А.И.* // Там же. 1994. Т. 68. № 1. С. 172.
10. *Горюшкин В.Ф., Подсевалов В.П., Зальмова С.А., Пошевнева А.И.* // Там же. 1989. Т. 63. № 7. С. 1913.
11. *Горюшкин В.Ф., Пошевнева А.И., Васильев В.В., Подсевалов В.П.* // Там же. 1994. Т. 68. № 1. С. 174.
12. *Толмач П.И.* Теплоемкость и термодинамические функции ряда ди- и трихлоридов лантаноидов в интервале температур 10 - 320 К: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. М.: МГУ, 1988.
13. *Гавричев К.С., Толмач П.И., Горбунов В.Е., Горюшкин В.Ф.* // *Журн. физ. химии.* 1987. Т. 61. № 4. С. 1132.
14. *Гавричев К.С., Толмач П.И., Горбунов В.Е., Горюшкин В.Ф.* // Там же. 1987. Т. 61. № 4. С. 1129.
15. *Толмач П.И., Горбунов В.Е., Гавричев К.С., Горюшкин В.Ф.* // Там же. 1986. Т. 60. № 6. С. 1556.
16. *Толмач П.И., Горбунов В.Е., Гавричев К.С. и др.* // Там же. 1987. Т. 61. № 11. С. 2898.
17. *Толмач П.И., Гавричев К.С., Горбунов В.Е., Горюшкин В.Ф.* // Там же. 1987. Т. 61. № 3. С. 826.
18. *Barin I., Knacke O., Kubashevski O.* Thermochemical properties of inorganic substances. Supplement. Berlin; Heidelberg; N.Y.: Springer-Verlag, 1977. 861 p.
19. *Hultgren R., Desai R.D., Gleiser M. et al.* Selected Values of the Thermodynamic Properties of the Elements. Ohio: ASM, 1973.
20. *Sommers J.A., Westrum E.F.* // *J. Chem. Thermodynamics.* 1976. V. 8. P. 1115.
21. *Sommers J.A., Westrum E.F.* // *Ibid.* 1977. V. 9. P. 1.
22. *Толмач П.И., Горбунов В.Е., Гавричев К.С. и др.* // *Журн. физ. химии.* 1990. Т. 64. № 4. С. 1096.
23. *Толмач П.И., Горбунов В.Е., Гавричев К.С., Горюшкин В.Ф.* // Там же. 1990. Т. 64. № 4. С. 1093.



УДК 542.61

## СВЯЗЬ КОЭФФИЦИЕНТОВ АКТИВНОСТИ ВЕЩЕСТВ С АКТИВНОСТЬЮ РАСТВОРИТЕЛЯ В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ НЕВОДНЫХ РАСТВОРАХ

© 1994 г. А. В. Очкин

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

Поступила в редакцию 24.09.93 г.

На основе перекрестного соотношения выведено уравнение для расчета изменения коэффициента активности растворенного вещества при введении в раствор другого вещества по активностям растворителя. Уравнение использовано для вывода зависимости, показывающей изменение коэффициентов активности растворенного вещества (алкиламмониевой соли) при гидратации.

Для расчета равновесия в экстракционных системах необходимо знать коэффициенты активности в органической фазе, которая является многокомпонентным неводным раствором. Прямое определение коэффициентов активности компонентов в таких растворах невозможно, единственный путь – их расчет по активностям растворителя. Для такого расчета можно использовать соотношение вида [1]:

$$\left(\frac{\partial \ln f_2}{\partial r_{13}}\right)_{r_{23}} = \left(\frac{\partial \ln f_1}{\partial r_{23}}\right)_{r_{13}}, \quad (1)$$

где  $f_i$  – мольный коэффициент активности компонента  $i$  в растворе;  $r_{ij} = x_i/x_j$  – отношение мольных долей компонентов  $i$  и  $j$ . Индекс 1 относится к растворителю.

После интегрирования (1) вдоль линии  $r_{23} = \text{const}$  получим

$$\ln(f_2/f_2^*) = \int_{r_{13}}^{r_{13}'} \left(\frac{\partial \ln f_1}{\partial r_{23}}\right)_{r_{13}} dr_{13}, \quad (2)$$

Расчет по уравнению (2) осложнен, когда за исходное состояние принят бесконечно разбавленный раствор ( $f_2^* = 1$ ), так как в этом случае  $r_{13} \rightarrow \infty$ , а остальные величины  $r_{i3}$  становятся неопределенными. Чтобы избежать этого затруднения, необходимо провести замену переменных  $r_{13}$  и  $r_{23}$  на молярности  $m_2$  и  $m_3$ , тогда уравнение (2) можно преобразовать к виду:

$$\ln f_2 = -\frac{10^3}{M_1} \int_0^{m_3} \left(\frac{\partial \ln f_1}{\partial m_2}\right)_{m_3} \frac{dm_3}{m_3}, \quad (3)$$

где  $M_1$  – молекулярная масса растворителя.

Когда отклонения от идеальности велики, зависимость  $\ln f_1$  от  $m_2$  нелинейна, и интегрирование по уравнению (3) затруднено [2]. Тогда расчет  $\ln f_2$

следует проводить относительно коэффициента активности  $f_2^*$  в бинарном растворе при  $m_3 = 0$  (здесь и далее надстрочечный индекс “\*” будет обозначать термодинамическую функцию бинарного раствора с  $m_3 = 0$ , а термодинамические функции другого бинарного раствора с  $m_2 = 0$  будут обозначаться надстрочечным индексом “0”). Тогда вместо (3) можно получить

$$\ln f_2 = -\frac{10^3}{M_1} \int_0^{m_3} \left(\frac{\partial \ln(f_1/f_1^0 f_1^*)}{\partial m_2}\right)_{m_3} \frac{dm_3}{m_3} - \frac{10^3}{M_1} \int_0^{m_3} \left(\frac{\partial \ln f_1^*}{\partial m_2}\right)_{m_3} \frac{dm_3}{m_3}. \quad (4)$$

Для удобства дальнейших преобразований в уравнении (4) введен коэффициент  $f_1^0$ , поскольку  $(\partial \ln f_1^0 / \partial m_2)_{m_3} = 0$ . Так как интегрирование ведется вдоль линии с постоянным соотношением  $m_2/m_3$ , то второй член в правой части уравнения (4) равен  $f_2^*$  (коэффициент активности второго компонента в его бинарном растворе). Тогда уравнение (4) принимает вид

$$\ln(f_2/f_2^*) = -\frac{10^3}{M_1} \int_0^{m_3} \left(\frac{\partial \ln(f_1/f_1^0 f_1^*)}{\partial m_2}\right)_{m_3} \frac{dm_3}{m_3}. \quad (5)$$

Уравнение (5) позволяет определить коэффициенты активности в сложных многокомпонентных растворах по коэффициентам активности в более простых растворах. Процедуру применения (5) можно продемонстрировать на примере описания влияния гидратации на коэффициенты активности алкиламмониевых солей в неполярных растворителях. Как известно [1], в таких растворах концентрация воды  $m_w$  линейно зависит от концентрации соли  $m_2$ , а уменьшение активности

растворителя при введении воды такое же, как при введении воды в чистый растворитель:

$$m_b = m_b^0(1 + k_h m_2), \quad (6)$$

$$\ln a_1 = \ln a_1^* - \frac{M_1}{10^3} m_b^0, \quad (7)$$

где  $m_b^0$  – растворимость воды в чистом растворителе,  $a_1$  – активность растворителя,  $k_h$  – параметр гидратации, связанный с гидратным числом  $h$  уравнением

$$k_h = h/m_b^0. \quad (8)$$

Тогда из (6) и (7) получим

$$\begin{aligned} \ln f_1 = \ln f_1^* - \ln \left( 1 + \frac{M_1}{10^3} m_2 \right) - \frac{M_1}{10^3} m_b^0 + \\ + \ln \left[ 1 + \frac{M_1}{10^3} (m_2 + m_b) \right]. \end{aligned} \quad (9)$$

После разложения логарифмов в правой части в ряд Тейлора и пренебрежения всеми членами, кроме первого, получим

$$\ln(f_1/f_1^*) = 0.001 M_1 (m_b - m_b^0). \quad (10)$$

Обычно  $f_1^0 = 1$ , тогда после подстановки (10) в (5) и интегрирования получим

$$\ln(f_2/f_2^*) = -k_h m_b / (1 + k_h m_2) = -h. \quad (11)$$

Выражение (11) применимо для разбавленных растворов и было получено ранее [1] другим способом.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ягодин Г.А., Коган С.З., Тарасов В.В. и др. Основы жидкостной экстракции / Под ред. Г.А. Ягодина. М.: Химия, 1981.
2. Очкин А.В., Лазаревич В.Е., Дмитриев А.Ю., Загорец П.А. // Радиохимия. 1978. Т. 20. С. 53.

УДК 547.712.735.759:541.11

## ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТЬ N-ЗАМЕЩЕННЫХ ФЕНОТИАЗИНОВ И ИХ КАТИОН-РАДИКАЛОВ

© 1994 г. О. Б. Томилин, А. В. Явкина, Е. П. Коновалова, Э. П. Санаева

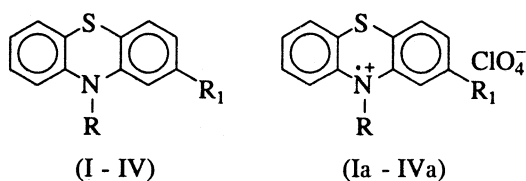
Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск

Поступила в редакцию 30.09.93 г.

Методами термохимии исследована термостабильность ряда N-замещенных производных фено-тиазина и их катион-радикалов. Установлено отсутствие полимеризационных процессов в исследуемом интервале температур.

Гипотеза о возможности получения магнитных материалов (органических ферромагнетиков) на основе органических полисопряженных высокоспиновых молекул [1 - 3] вызвала значительный интерес к поиску и изучению перспективных в этом отношении соединений, в том числе к моно- и диацетиленам, содержащим стабильные нитроксильные радикалы в боковой цепи [4]. Нами предприняты синтез и изучение свойств некоторых моно- и диацетиленовых мономеров, включающих свободнорадикальный фрагмент с более высокой степенью делокализации неспаренного электрона по сравнению с нитроксильным радикалом [5].

В настоящей работе изучена термостабильность N-пропаргилфенотиазинов (I, II) и их катион-радикалов (Ia, IIa) по сравнению с устойчивостью N-метилпроизводных (III, IV, IIIa, IVa):



Соединение	I, Ia	II, IIa	III, IIIa	IV, IVa
R	CH <sub>2</sub> -C≡CH	CH <sub>2</sub> -C≡CH	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
R <sub>1</sub>	H	Cl	H	Cl

Приведенные соединения можно рассматривать как модели для изучения возможности использования ион-радикальных солей в твердофазной полимеризации, инициируемой термически [2]. Данные по систематическому термохимическому исследованию соединений фено-тиазинового ряда в литературе отсутствуют.

Соединения I, II, Ia - IVa синтезированы и идентифицированы нами ранее [5]. В таблице приведены некоторые характеристики полученных фено-тиазинов и их катион-радикальных солей.

Данные элементного анализа соединений I, II, Ia - IVa на C, H, N соответствуют вычисленным.

Соединения III и IV получены по описанным методикам [6].

Термостабильность соединений I - IV и Ia - IVa изучена методом термогравиметрического анализа (ТГА) в интервале 25 - 250°C на установке фирмы "PERKIN-ELMER" (скорость нагрева 15 К/мин, навеска вещества ~1 мг, ошибка измерений 1%). Для соединений I - IV установлена существенная потеря массы при температуре выше 150°C (рис. 1); соответствующие им катион-радикалы Ia - IVa обладают меньшей термической устойчивостью, что выражается в потере массы уже при незначительных температурах (рис. 2). Так, для Ia потеря массы при 93°C составила 4.7 мас. %, при 148°C - 8.9 мас. % (рис. 2, кривая 2). На термограмме соединения I (рис. 1, кривая 2) зафиксирован небольшой эндоэффект при 94°C, обусловленный, возможно, деструкцией пропаргильного фрагмента. Характер термограмм соединений II

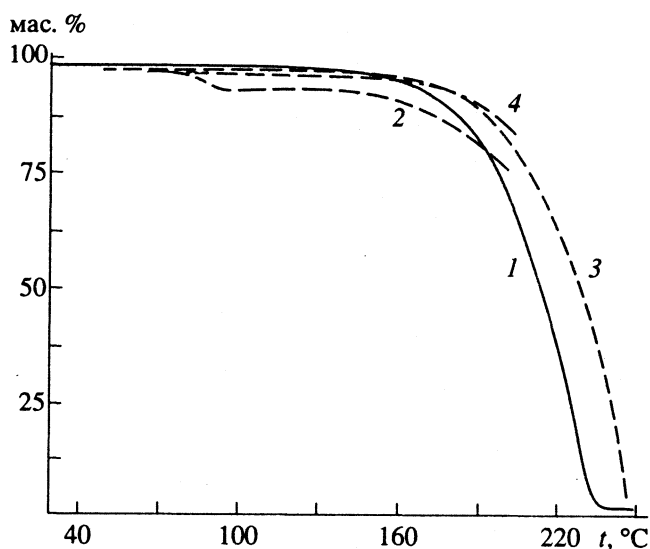


Рис. 1. Кривые ТГА для N-метил- (1), N-пропаргил- (2), N-метил-2-хлор- (3) и N-пропаргил-2-хлорфенотиазина (4).

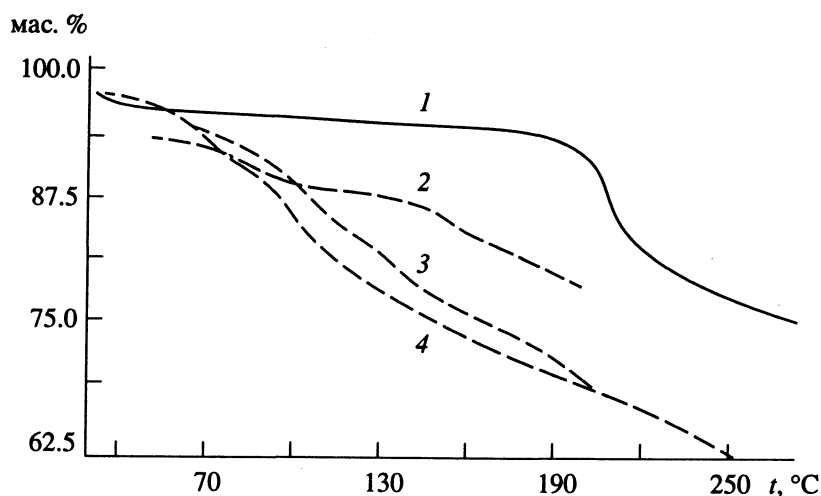


Рис. 2. Кривые ТГА для катион-радикалов N-замещенных фенотиазинов; 1 - 4 - см. рис. 1.

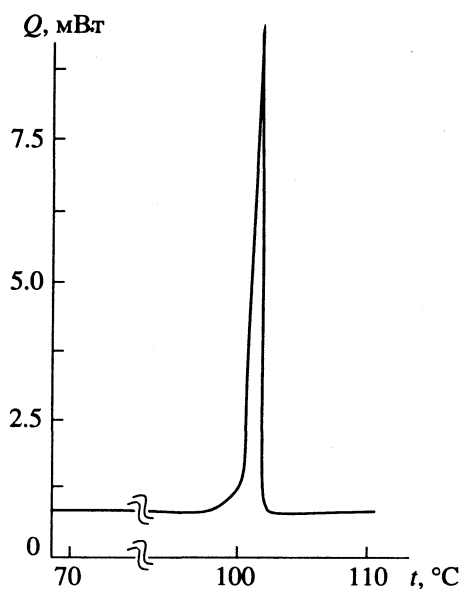


Рис. 3. Кривая ДСК для N-метилфенотиазина ( $Q$  - тепловой поток).

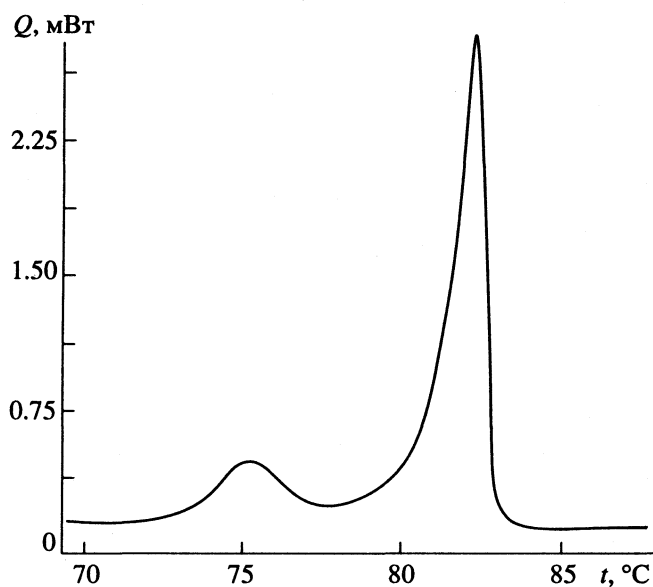


Рис. 4. Кривая ДСК для N-метил-2-хлорфенотиазина.

и IV (рис. 1, кривые 4 и 3) указывает на некоторое стабилизирующее влияние атома хлора в положении 2 фенотиазинового кольца.

Калориметрическим методом с использованием дифференциального сканирующего калориметра фирмы "PERKIN-ELMER" получены дифференциальные кривые (кривые ДСК) для соеди-

нений II, III, IV (рис. 3 - 5). Навески веществ во всех случаях составляли 1 мг, ошибка измерений 1%. Во всех случаях зафиксированы эндотермические эффекты; температуры максимумов пиков 101.22, 82.08, 109.62°C и теплоты процессов 85.14, 71.79, 60.66 Дж/г соответственно. Существование только эндотермических эффектов в

#### Характеристики синтезированных производных фенотиазина

Соединение	$t_{пл}, °C$	$\nu, см^{-1}$	$\lambda_{max}, нм$	Соединение	$t_{пл}, °C$	$\nu, см^{-1}$	$\lambda_{max}, нм$
I	85 - 86	3270 ( $\equiv C-H$ )	-	IIa	109 - 110	-	490, 505
II	110 - 111	3271 ( $\equiv C-H$ )	-	IIIa	230 (разл.)	-	475, 510
Ia	80 - 81	-	475, 510	IVa	91 - 92 (разл.)	-	480, 525

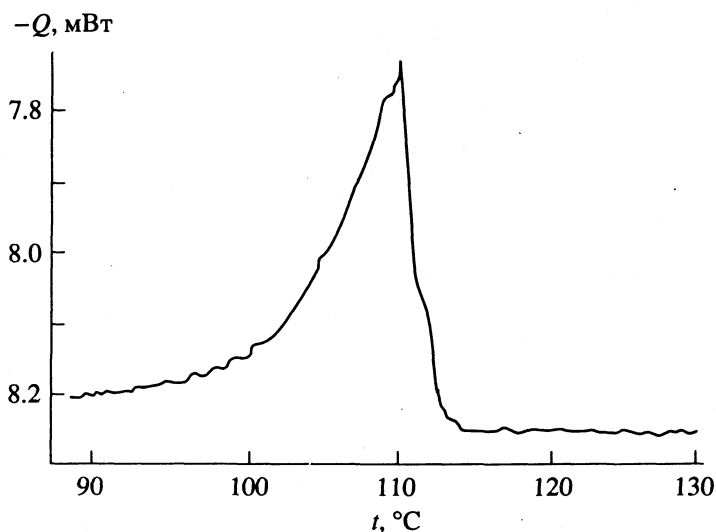


Рис. 5. Кривая ДСК для N-пропаргил-2-хлорфенотиазина.

изученных образцах свидетельствует об отсутствии полимеризационных процессов в исследуемом интервале температур [7].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Овчинников А.А. // Докл. АН СССР. 1977. Т. 236. № 4. С. 9281.
2. Виноградов Г.А. // Успехи химии. 1984. Т. 53. № 1. С. 135.
3. Бучаченко А.Л. // Там же. 1990. Т. 59. № 4. С. 529.
4. Лазарева О.Л., Сускина В.И., Шапиро А.Б., Шеголихин А.Н. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1991. № 1. С. 226.
5. Томилин О.Б., Явкина А.В., Коновалова Е.П., Санаева Э.П. // Тез. докл. Всесоюз. конф. "Электроника органических материалов". Домбай, 1990. С. 67.
6. Vlassa M., Senan M. // Rev. roum. chim. 1988. V. 33. № 2. P. 195.
7. Кальве Э., Прат А. Микрокалориметрия. М.: Изд-во иностр. лит., 1963. С. 139 - 295.

КРАТКИЕ  
СООБЩЕНИЯ

УДК 541.8

СТАНДАРТНЫЕ ХИМИЧЕСКИЕ ПОТЕНЦИАЛЫ  
ГАЛОГЕН-АНИОНОВ В НЕВОДНЫХ РАСТВОРАХ

© 1994 г. А. И. Мишустин

Московская государственная академия химического машиностроения

Поступила в редакцию 26.10.93 г.

На основе потенциометрических данных по стандартным энергиям Гиббса переноса галогенидов лития между растворителями и полученных методом спин-решеточной релаксации ядер  $^7\text{Li}$  стандартных энергий Гиббса переноса катионов лития между растворителями определены стандартные энергии Гиббса переноса галоген-анионов ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ) между растворителями.

Одна из важнейших проблем термодинамики растворов электролитов – разделение термодинамических функций сольватации или переноса электролита между растворителями на ионные составляющие. Для разделения используются те или иные нетермодинамические допущения; в последние годы часто применяется допущение равенства термодинамических функций сольватации больших ионов, таких как тетрафениларсоний и тетрафенилборат [1, 2]. Однако данные различных авторов зачастую заметно расходятся.

Для определения стандартных энергий Гиббса переноса между растворителями  $\Delta G_{\text{пер}}^\circ$  индивидуальных ионов может быть использован альтернативный метод, который основан на определении каким-либо спектроскопическим методом константы равновесия “пересольватации” определенного иона в бинарном растворителе, позволяющей рассчитать стандартную энергию Гиббса переноса этого иона между компонентами бинарного растворителя. Ранее автором были определены значения  $\Delta G_{\text{пер}}^\circ$  катионов лития между растворителями с помощью измерений времен спин-решеточной релаксации ядер лития-7 в разбавленных растворах солей лития в различных бинарных растворителях [3, 4]. В результате математической обработки этих величин получен самосогласованный набор стандартных химических потенциалов катионов лития в 40 растворителях относительно водных растворов. Эти значения позволяют предсказывать величины энергии Гиббса переноса ионов лития ( $\Delta G_{\text{пер}}^\circ(\text{Li}^+)$ ) между различными растворителями в хорошем согласии с данными прямого эксперимента [5].

В работе [6] указанный набор стандартных химических потенциалов катионов лития был применен для разделения на ионные вклады стандартных энергий Гиббса переноса фторида лития между растворителями, рассчитанных из экспериментальных данных по растворимости. Цель

настоящей работы – разделение на ионные вклады имеющиеся в литературе экспериментальные величины стандартных энергий Гиббса переноса других галогенидов лития ( $\text{LiX}$ ), полученные потенциометрическим методом.

Литературные данные по  $\Delta G_{\text{пер}}^\circ(\text{LiX})$  вместе с указанными величинами  $\Delta G_{\text{пер}}^\circ(\text{Li}^+)$  и рассчитанные значения  $\Delta G_{\text{пер}}^\circ(\text{X}^-)$  приведены в табл. 1. Все величины даны в молярной концентрационной шкале в кДж/моль. Поскольку приводимые ранее значения  $\Delta G_{\text{пер}}^\circ(\text{Li}^+)$  [3 - 5] были даны в шкале мольных долей, они пересчитывались в молярную шкалу по уравнению:

$$\Delta G_{\text{пер}}^\circ(\text{Li}^+) = \Delta G_{\text{пер}}^\circ(\text{Li}^+)_{\text{мол. доли}} + RT \ln \frac{M_s \rho_{\text{H}_2\text{O}}}{M_{\text{H}_2\text{O}} \rho_s} \quad (1)$$

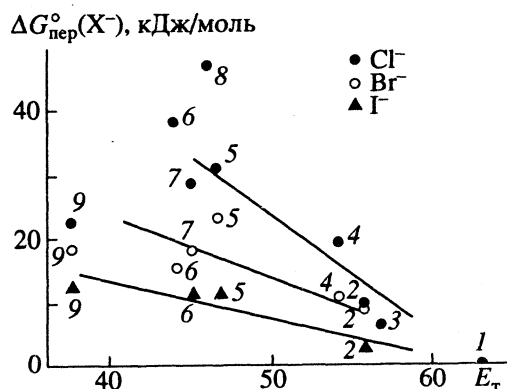


Рис. 1. Корреляция между значениями  $\Delta G_{\text{пер}}^\circ(\text{X}^-)$  и  $E_T$ ; растворители: 1 – вода, 2 – метанол, 3 – формамид, 4 – метилформамид, 5 – пропиленкарбонат, 6 – диметилформамид, 7 – диметилсульфоксид, 8 – ацетонитрил, 9 – тетрагидрофуран.

Таблица 1. Стандартные энергии Гиббса переноса галогенидов лития и ионов Li<sup>+</sup> и X<sup>-</sup> из воды в растворитель, кДж/моль

Растворитель	$\Delta G_{\text{пер}}^{\circ}(\text{LiX})$	$\Delta G_{\text{пер}}^{\circ}(\text{Li}^+)$	$\Delta G_{\text{пер}}^{\circ}(\text{X}^-)$	Ссылка
X = Cl				
Метанол	16.7	7.4	9.3	[7]
Формаид	4.2	-1.7	5.9	[7]
Диметилформаид	31.0	-7.3	38.3	[7]
Диметилсульфоксид	20.1	-7.9	28.0	[7]
Пропиленкарбонат	61.9	31.6	30.3	[7]
Ацетонитрил	66.1	19.0	47.1	[7]
Метилформаид	13.8	-5.4	19.2	[8]
Тетрагидрофуран	34.8	13.8	21.0	[9]
X = Br				
Метанол	15.9	7.4	8.5	[8]
Метилформаид	8.4	-1.7	10.1	[8]
Диметилсульфоксид	10.0	-7.9	17.9	[8]
Диметилформаид	7.5	-7.3	14.8	[8]
Пропиленкарбонат	54.4	31.6	22.8	[8]
Тетрагидрофуран	31.3	13.7	17.6	[9]
X = I				
Метанол	11.3	7.4	3.9	[7]
Диметилсульфоксид	3.3	-7.9	11.2	[7]
Пропиленкарбонат	41.8	31.6	10.2	[7]
Тетрагидрофуран	26.0	13.7	12.5	[9]

Таблица 2. Сравнение полученных в данной работе (\*) и литературных значений  $\Delta G_{\text{пер}}^{\circ}(\text{X}^-)$  (кДж/моль)

Растворитель	*	[2]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]
X = Cl							
Метанол	9.3	13.2	14	12.6	12.5	11.3	32.5
Формаид	5.9	13.7	13	13.8			18.2
Метилформаид	19.2		21	20.5			
Диметилформаид	38.3	48.3	46	46.0	44.0	41.8	57.1
Диметилсульфоксид	28.0	40.3	40	38.5	39.5	36.4	49.0
Пропиленкарбонат	30.3	39.8	42	42.3	36.0	36.0	49.6
Ацетонитрил	47.1	42.1	42	42.3	37.7	36.4	54.1
Тетрагидрофуран	21.0	45.5 [9]					68.3
X = Br							
Метанол	8.5	11.1	11	11.3	10.2	9.2	
Метилформаид	10.1		15	15.1			
Диметилформаид	14.8	36.2	34	30.1	32.6	30.1	
Диметилсульфоксид	17.9	27.4	27	25.5	26.3	23.4	
Пропиленкарбонат	22.8	30.0		32.6	21.9	25.1	
Тетрагидрофуран	17.6	46.3 [9]					
X = I							
Метанол	3.9	7.3	8	6.7	6.8	5.9	26.8
Диметилсульфоксид	11.2	10.4	9	13.4	9.8	6.7	19.4
Пропиленкарбонат	10.2	13.7	12	19.2	5.0	11.3	19.4
Тетрагидрофуран	12.5	54.4 [9]					39.9

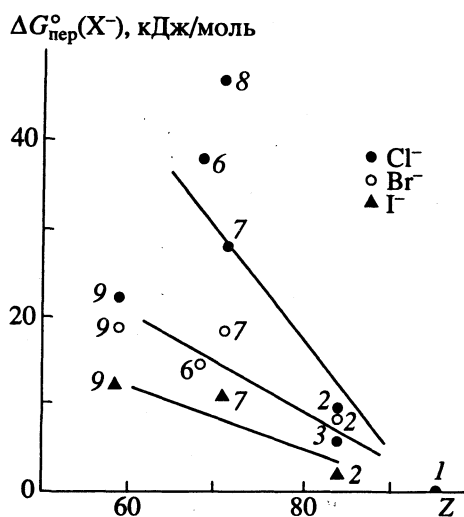


Рис. 2. Корреляция между  $\Delta G_{\text{пер}}^{\circ}(X^{-})$  и Z-фактором. Обозначения те же, что и на рис. 1.

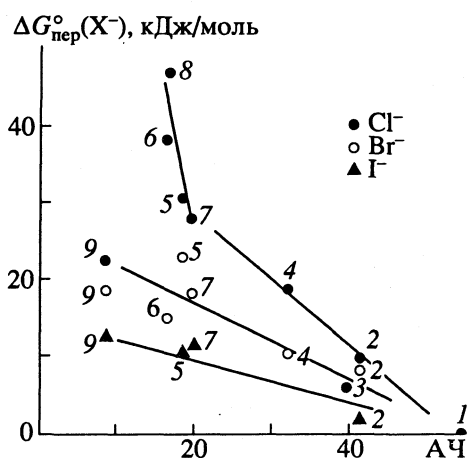


Рис. 3. Корреляция между  $\Delta G_{\text{пер}}^{\circ}(X^{-})$  и акцепторным числом. Обозначения те же, что и на рис. 1.

где  $M_S$  и  $M_{H_2O}$  – молекулярные массы растворителя и воды,  $\rho_S$  и  $\rho_{H_2O}$  – плотности растворителя и воды соответственно.

В табл. 2 определенные нами значения стандартных энергий Гиббса переноса анионов  $X^{-}$  между растворителями (точнее, из воды в растворитель) сравнены с литературными данными различных авторов, использовавших то или иное нетермодинамическое допущение. Как видно из табл. 2, для большинства растворителей значения  $\Delta G_{\text{пер}}^{\circ}$  удовлетворительно согласуются, но для ряда растворителей расходятся, особенно резко в случае тетрагидрофурана.

Рассмотрим полученные стандартные химические потенциалы хлорид-, бромид- и иодид-анионов в неводных растворах относительно водных, с точки зрения их зависимости от свойств раство-

рителей. Все значения  $\Delta G_{\text{пер}}^{\circ}(X^{-})$  положительны, т.е. галоген-анионы предпочтительно сольватированы водой. Не обнаруживается какой-либо зависимости от электрического дипольного момента молекул растворителей и их диэлектрической проницаемости. Это свидетельствует о том, что энергия сольватации галоген-анионов не описывается в рамках простейших электростатических теорий. В то же время найдены корреляции с эмпирическими мерами электроноакцепторной способности растворителей, такими как  $E_T$ -фактор Димрота–Райхардта [15], Z-фактор Косовера [16] и акцепторное число (АЧ) [17]. Первые две характеристики определены по сдвигам в УФ-спектрах эталонных соединений, а последняя – по величине химического сдвига в спектре ЯМР ядер  $^{31}\text{P}$  триэтилфосфиноксида (который предполагается линейно зависящим от энергии взаимодействия этой молекулы с молекулами растворителя).

Корреляция величин  $\Delta G_{\text{пер}}^{\circ}(X^{-})$  с  $E_T$  представлена на рис. 1, а корреляция с Z-фактором – на рис. 2. Как видно из рисунков, точки ложатся на прямые, наклон которых наибольший для хлорид-анионов и наименьший – для иодид-анионов. Аналогичные корреляции для фторид-анионов характеризуются еще большим наклоном, как следует из рисунков, приведенных в работе [6]. Это различие наклонов отражает различие энергий взаимодействия анион–растворитель, наибольших в случае фторид-анионов и наименьших – в случае иодид-анионов. Существование корреляции между величинами  $\Delta G_{\text{пер}}^{\circ}(\text{Cl}^{-})$  и  $E_T$  было отмечено ранее [18]. Необходимо отметить, что в случае  $\Delta G_{\text{пер}}^{\circ}(\text{Cl}^{-})$  точки для ацетонитрила и особенно для тетрагидрофурана существенно отклоняются от корреляционной прямой (рис. 1).

Более сложный характер имеет корреляция между  $\Delta G_{\text{пер}}^{\circ}(\text{Cl}^{-})$  и акцепторным числом (АЧ).

Точки для  $\Delta G_{\text{пер}}^{\circ}(\text{Cl}^{-})$  ложатся на две прямые различного наклона – отдельно для диполярных апротонных и для протонных растворителей (рис. 3). Точка для тетрагидрофурана также выпадает из корреляции. Подобное поведение наблюдалось ранее [19]. Для других галоген-анионов различие между апротонными и протонными растворителями не проявляется, возможно, вследствие недостаточного количества экспериментальных точек. Найденное различие наклонов в случае  $\Delta G_{\text{пер}}^{\circ}(\text{Cl}^{-})$  можно объяснить тем, что, по-видимому, АЧ не может служить универсальной характеристикой электроноакцепторной способности растворителей.

Существование корреляций  $\Delta G_{\text{пер}}^{\circ}(X^{-})$  с эмпирическими характеристиками электроноакцепторной способности растворителей свидетельствует о важной роли донорно-акцепторного взаи-



модействия анион-молекула растворителя в механизме сольватации всех галоген-анионов [6]. Для всех галоген-анионов энергия сольватации выше в случае протонных растворителей, чем диполярных апротонных; возможно, отчасти это можно объяснить способностью протонных растворителей образовывать водородную связь с галоген-анионами.

Тот факт, что точки для тетрагидрофурана существенно отклоняются от корреляционных прямых, может быть объяснен очень сильной ионной ассоциацией галогенидов лития в тетрагидрофуране, который обладает наименьшей диэлектрической проницаемостью из всех рассмотренных растворителей. По данным [20], в растворах хлорида лития в тетрагидрофуране преобладают димеры; другие галогениды лития также сильно агрегированы. Существование таких агрегатов сильно затрудняет количественную обработку экспериментальных данных, так как требует учета всех существующих в растворах типов ионных ассоциатов и агрегатов; возможно, именно указанное обстоятельство приводит к ошибкам в определении стандартных энергий Гиббса сольватации солей в тетрагидрофуране, преодоление которых требует дополнительных исследований.

Таким образом, в рамках единого подхода получены наборы стандартных химических потенциалов галоген-анионов в ряде неводных растворителей.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Popovich O.* Treatise on Analytical Chemistry. N.Y.: Acad. Press, 1978. V. 1. Ch. 12. P. 711.
2. *Marcus Y.* Ion Solvation. N.Y.: Wiley, 1985. P. 307.
3. *Мишустин А.И.* Современные проблемы термодинамики растворов. М.: Наука, 1986. С. 191.
4. *Мишустин А.И.* // Журн. физ. химии. 1993. Т. 67. № 8. С. 1708.
5. *Мишустин А.И.* // Там же. 1981. Т. 55. № 1. С. 61.
6. *Мишустин А.И.* // Там же. 1993. Т. 67. № 8. С. 1734.
7. *Cox B.G., Waghorne W.E.* // Chem. Soc. Rev. 1980. V. 9. № 3. P. 381.
8. *Cox B.G., Hedwig C.R., Parker A.J., Watts D.W.* // Australian J. Chem. 1974. V. 27. № 3. P. 477.
9. *Elsemongy M.M., Abdel-Khalek A.A.* // Thermochemica Acta. 1991. V. 181. P. 79.
10. *Parker A.J., Mayer U., Schmid R., Gutmann V.* // J. Org. Chem. 1978. V. 43. № 10. P. 1843.
11. *Cox B.G.* // Ann. Reports Chem. Soc. 1973. V. 70. P. 249.
12. *Sakamoto I., Okazaki S., Sogabe K. et al.* // J. Electroanal. Chem. 1990. V. 286. P. 181.
13. *Salomon M., Stewenson B.K.* // J. Phys. Chem. 1973. V. 77. № 25. P. 3002.
14. *Badoz-Lambling J., Bardin J.C.* // Electrochimica Acta. 1974. V. 19. P. 725.
15. *Райхардт Х.* Растворители в органической химии. Л.: Химия, 1973. 150 с.
16. *Kosower E.M.* // J. Amer. Chem. Soc. 1958. V. 80. P. 3253.
17. *Mayer U., Gerger W., Gutmann V.* // Monatsh. Chemie. 1977. B. 108. S. 489.
18. *Wrona P.K.* // J. Electroanal. Chem. 1980. V. 108. P. 153.
19. *Mayer U.* // Pure Appl. Chem. 1979. V. 51. P. 1697.
20. *Reich H.J., Borst J.P., Dykstra R.R., Green D.P.* // J. Amer. Chem. Soc. 1993. V. 115. № 19. P. 8728.

УДК 541.183

АДСОРБЦИЯ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ БИНАРНЫХ РАСТВОРОВ  
В *n*-ДЕКАНЕ НА СИЛИКАГЕЛЕ КСК-2

© 1994 г. Н. А. Окишева, М. Н. Рахлевская, И. С. Родзивилова

Саратовский государственный технический университет

Поступила в редакцию 29.10.93 г.

Исследована адсорбция карбоновых кислот (уксусной, пропионовой, масляной) из бинарных растворов в *n*-декане на силикагеле КСК-2. Рассчитаны термодинамические функции компонентов объемных и адсорбционных растворов, отмечены закономерности их изменения. Приведено обоснование выбора емкости монослоя и числа слоев адсорбционного раствора в соответствии с условием "модели жесткого раствора".

При изучении адсорбции растворов наиболее сложной задачей является правильное определение величин предельной адсорбции ( $m_i$ ) компонентов раствора. В литературе приводятся различные подходы к определению  $m_i$ , но в основном они связаны с адсорбцией на микропористых сорбентах [1]. При адсорбции растворов, когда одновременно сорбируются все компоненты смеси, нахождение  $m_i$  вызывает определенные трудности.

Данная работа продолжает исследование равновесных характеристик адсорбционных растворов [2 - 4] и посвящена определению емкости адсорбционной фазы при совместной адсорбции карбоновых кислот (уксусной, пропионовой, масляной) и *n*-декана из их бинарных растворов на силикагеле.

На рис. 1 представлена экспериментально полученная изотерма избыточной адсорбции уксусной кислоты из раствора *n*-декана. Изотерма адсорбции имеет S-образную форму, характерную для адсорбции объемно-расслаивающихся систем [5]. Емкость монослоя, определенная по точке В, составила 2.45 ммоль/г. Величина удельной поверхности, рассчитанная по этой точке, составила 326 м<sup>2</sup>/г, что согласуется с паспортными данными данного силикагеля (325 м<sup>2</sup>/г). Это позволяет предположить, что полученное нами значение емкости монослоя уксусной кислоты из растворов в декане близко к истинной величине.

Для других карбоновых кислот, изученных нами, емкости монослоя были определены из известного соотношения Траубе [6] для гомологического ряда кислот

$$v_i a_{mi} = \text{const},$$

где  $a_{mi}$  – величина емкости монослоя, а  $v_i$  – мольный объем (в см<sup>3</sup>)  $i$ -го компонента раствора. Для пропионовой кислоты величина емкости монослоя ( $a_m$ ) составила 1.878 ммоль/г, а для масляной –  $a_m = 1.521$  ммоль/г.

В предположении о несжимаемости раствора и плотной упаковке молекул компонентов в поверхностном слое нами рассчитана величина емкости монослоя для *n*-декана  $a_m$  из условия:

$$s_{уд} = N_A \omega_0 a_m, \quad (1)$$

где  $N_A$  – число Авогадро,  $\omega_0$  – посадочная площадь молекулы адсорбата, см<sup>2</sup>. Удельная поверхность используемого силикагеля  $s_{уд} = 325$  м<sup>2</sup>/г. Рассчитанная таким образом емкость монослоя *n*-декана  $a_m = 0.94$  ммоль/г.

Для проверки достоверности выбранных нами параметров модели адсорбционного раствора (величин предельной адсорбции) оценивались изменения свободной энергии Гиббса, рассчитанные по методу избыточных величин  $\Delta G$  и методу полного содержания  $\Delta G_{\text{мод}}$  [7]. Предварительно было выбрано число слоев  $n$ , для которых выполняется термодинамический критерий Русанова [8]:

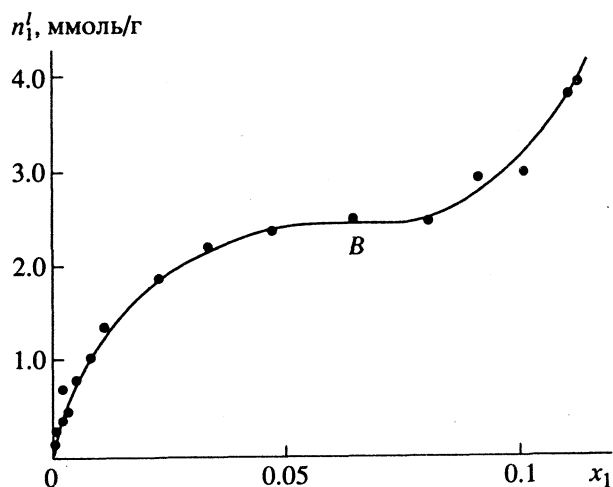


Рис. 1. Начальный участок изотермы избыточной адсорбции уксусной кислоты из раствора в декане на силикагеле КСК-2.

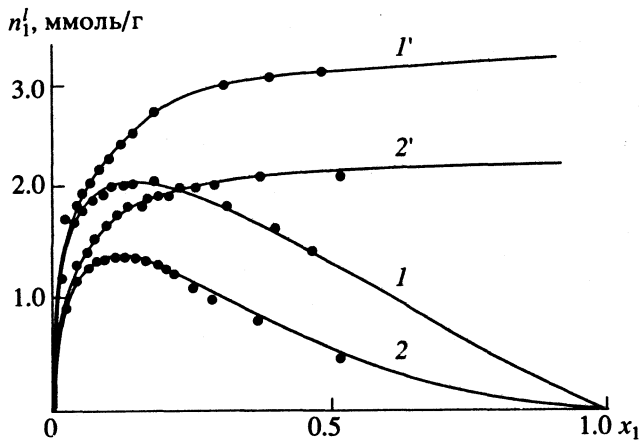


Рис. 2. Изотермы избыточной адсорбции и полного содержания пропионовой (1, 1') и масляной кислоты (2, 2') из раствора в декане на силикагеле КСК-2.

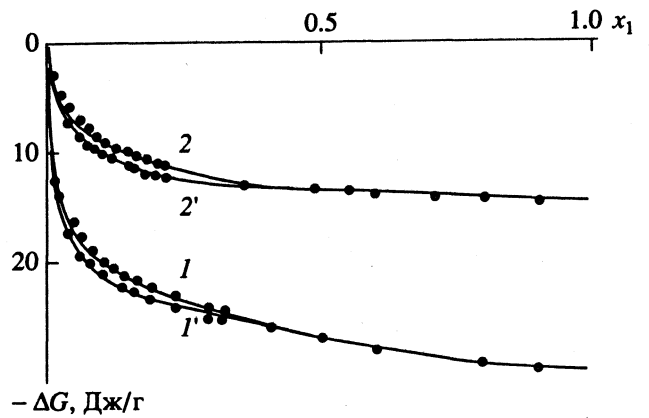


Рис. 3. Изменение свободной энергии смачивания  $\Delta G$ , рассчитанной по методу Гиббса (1, 2) и по методу полного содержания  $\Delta G_{\text{мод}}$  (1', 2') для систем пропионовая кислота-декан (1, 1') и масляная кислота-декан (2, 2').

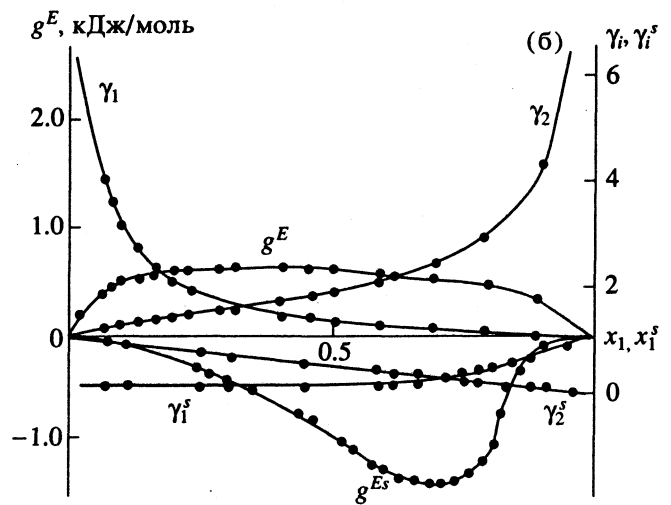
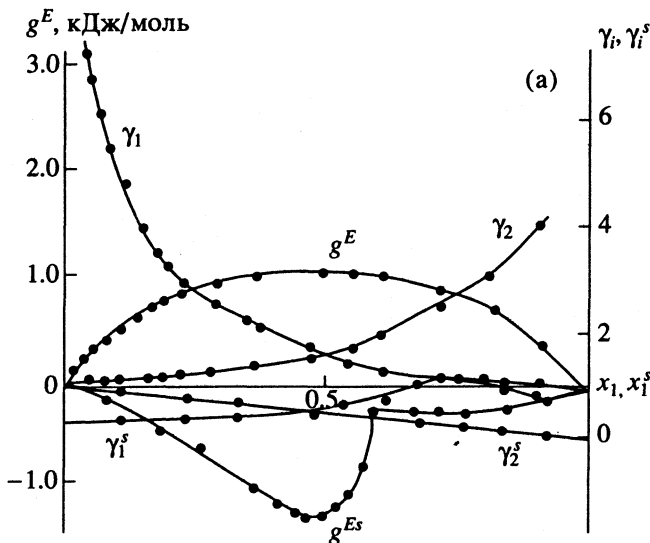


Рис. 4. Коэффициенты активности и избыточные свободные энергии смешения компонентов объемных ( $g^E$ ,  $\gamma_i$ ) и адсорбционных ( $g^{Es}$ ,  $\gamma_i^s$ ) растворов систем масляная кислота-*n*-декан (а) и пропионовая кислота-*n*-декан (б).

$\delta x_i^s / \delta x_i > 0$ , где  $x_i$  – состав объемного раствора, а  $x_i^s$  – состав адсорбционного раствора  $i$ -го компонента.

Известно [7], что для вычисления  $x_i^s$  необходима информация о параметрах модели (емкости монослоя, числе слоев, предельной величине адсорбции). При правильном выборе параметров модели по критерию Русанова наблюдается монотонное возрастание содержания компонента в адсорбционном растворе  $x_i^s$  с ростом концентрации компонента в объемном растворе  $x_i$ .

В случае адсорбции пропионовой кислоты из бинарного раствора в *n*-декане, согласно критерию Русанова, число адсорбционных слоев оказа-

лось равным 2, масляной кислоты из раствора в декане – 3.

Таким образом, для адсорбционного раствора пропионовая кислота (1)–*n*-декан (2) была выбрана модель двух слоев с величинами емкости монослоев, найденными по правилу Траубе для пропионовой кислоты  $a_{m1} = 1.878$  и из условия (1) для *n*-декана  $a_{m2} = 0.94$  ммоль/г. Предельные величины адсорбции компонентов 1 и 2 раствора пропионовая кислота (1)–*n*-декан (2) оказались соответственно равными  $m_1 = 2a_{m1} = 3.756$  и  $m_2 = 2a_{m2} = 1.88$  ммоль/г. Для адсорбционного раствора масляная кислота (1)–декан (2) выбрана модель трех слоев. В этом случае предельные величины адсорбции компонентов раствора соответственно равны  $m_1 = 3a_{m1} = 4.563$  и  $m_2 = 3a_{m2} = 2.82$  ммоль/г.

На рис. 2 приведены экспериментально полученные изотермы избыточной адсорбции компонентов раствора и рассчитанные на их основе изотермы полного содержания, которые использовались в дальнейшем для вычисления величин  $\Delta G$  по методу Гиббса и  $\Delta G_{\text{мод}}$  по методу полного содержания [2]. Величины полного содержания вычислялись на основе модели, которая рассматривает процесс адсорбции, как процесс взаимного вытеснения компонентов в адсорбционном слое при выполнении условия аддитивности молекулярных площадок.

На рис. 3 показаны изменения свободной энергии Гиббса изученных систем  $\Delta G$  и  $\Delta G_{\text{мод}}$ . Приведенные данные свидетельствуют о расхождении  $\Delta G$  и  $\Delta G_{\text{мод}}$  в пределах ошибок вычислений и подтверждают правильность выбранной модели [7].

Для указанных моделей были вычислены избыточные термодинамические функции смешения адсорбционных и объемных растворов. Методика их расчета приведена в работе [2]. На рис. 4 приведены изменения термодинамических функций изученных систем: избыточные свободные энергии смешения  $g^E$ ,  $g^{Es}$  и коэффициенты активности  $\gamma_i$ ,  $\gamma_i^f$  компонентов объемного и адсорбционного растворов соответственно. Из рис. 4 следует, что объемные растворы проявляют положительные отклонения от идеальности, а адсорбционные растворы – отрицательные. Подобный характер зависимости свободной энергии смешения и коэффициентов активности адсорбционных растворов ранее наблюдался при

адсорбции этилацетата из различных углеводов [2].

Таким образом, обоснован выбор модели адсорбционного раствора, учитывающей адсорбцию обоих компонентов раствора и число адсорбированных слоев. Рассчитаны термодинамические функции компонентов объемных и адсорбционных растворов, отмечены закономерности их изменения. Выполнение критерия А.И. Русанова [8] и О.Г. Ларионова [7] свидетельствует о том, что выбранные емкости адсорбционных слоев не противоречат физической картине адсорбции.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ларионов О.Г., Курбанбеков Э. // Физическая адсорбция из многокомпонентных фаз. М.: Наука, 1972. С. 85.
2. Родзивилова И.С., Рахлевская М.Н., Окишева Н.А., Соннова Е.А. // Журн. физ. химии. 1992. Т. 66. № 4. С. 1114.
3. Рахлевская М.Н., Родзивилова И.С., Рябухова Т.О. // Там же. 1987. Т. 61. № 4. С. 1080.
4. Рахлевская М.Н., Родзивилова И.С., Рябухова Т.О. // Там же. 1988. Т. 61. № 7. С. 1917.
5. Румянцева Г.А. Дис. ... канд. хим. наук. Саратов: СПИ, 1975.
6. Bartell F.E., Scheffler J.H. // J. Amer. Chem. Soc. 1931. V. 33. P. 250.
7. Ларионов О.Г. // Тр. V Всесоюз. конф. по теоретическим вопросам адсорбции. М.: Наука, 1983. С. 70 - 74.
8. Русанов А.И. // Физическая адсорбция из многокомпонентных фаз. М.: Наука, 1972. С. 79.

УДК 532.12

ПЬЕЗОМЕТРИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 1,2-АМИНОПРОПАНОЛА  
В ШИРОКОМ ИНТЕРВАЛЕ ТЕМПЕРАТУР

© 1994 г. В. Н. Карцев, М. Н. Родникова, В. В. Цепулин, А. Б. Разумова

Российская академия наук, Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова, Москва

Поступила в редакцию 12.11.93 г.

Измерены изотермическая сжимаемость и термический коэффициент объемного расширения 1,2-аминопропанола в интервале 283 - 333 К и рассчитано его внутреннее давление. Полученные результаты сравнены с аналогичными данными для моноэтаноламина и диолов и сделан вывод об устойчивости сетки Н-связей для этих соединений.

Одна из особенностей растворителей с пространственной сеткой водородных связей – сравнительно малая изотермическая сжимаемость и небольшой температурный коэффициент объемного расширения. В настоящей работе мы приводим экспериментальные данные по пьезометрическому исследованию одного из алифатических аминоспиртов – 1,2-аминопропанола (1,2-АП) – в интервале 283 - 333 К, сравниваем полученные результаты с аналогичными данными по моноэтаноламину (МЭА) и диолам [1] и делаем вывод об устойчивости сетки Н-связей у различных представителей указанных рядов бифуркатных соединений. Кроме того, из полученных экспериментальных данных мы рассчитываем внутреннее давление и обсуждаем вопрос о возможности выбора данной величины для характеристики устойчивости пространственной сетки Н-связей.

Молекулы аминоспиртов и диолов отвечают требованиям, необходимым для образования пространственной сетки Н-связей: они содержат не менее двух доноров и двух акцепторов протонов, поэтому мы вправе ожидать в данных соединениях пространственную сетку Н-связей [2]. Этому требованию отвечает и молекула 1,2-АП, но в отличие от МЭА, где реакционные группы расположены по концам углеводородного мостика и не испытывают стерических препятствий, вращение гидроксильной группы в 1,2-АП заторможено, что не может не повлиять на совершенство сетки Н-связей, а следовательно, и на ее устойчивость.

Измерение изотермической сжимаемости и температурного коэффициента объемного расширения было проведено на уникальной пикнометрической установке, описанной в [3]. Ошибка в определении изотермической сжимаемости составляла 1% при  $\Delta p = 4 \times 10^5$  Па, а термического коэффициента объемного расширения 2% при  $\Delta T = 0.3 - 1$  К. 1,2-АП фирмы "Мегск" перегонялся под вакуумом. Коэффициент преломления исследуемого образца составлял 1.44815 (20°C), а плотность – 0.95609 г/см<sup>3</sup> (25°C). Количество

воды определялось методом Фишера и не превышало 0.1%.

Были измерены изотермическая сжимаемость

$$\beta_T = -\frac{1}{V} \left( \frac{\partial V}{\partial p} \right)_T$$

$$\text{и термический коэффициент объемного расширения } \kappa = \frac{1}{V} \left( \frac{\partial V}{\partial T} \right)_p$$

1,2-АП в интервале 283 - 333 К. Полученные результаты представлены в табл. 1. Ранее [1] нами были определены изотермические сжимаемости и термические коэффициенты объемного расширения МЭА, этиленгликоля (Э) и 1,2-пропандиола (1,2-ПД).

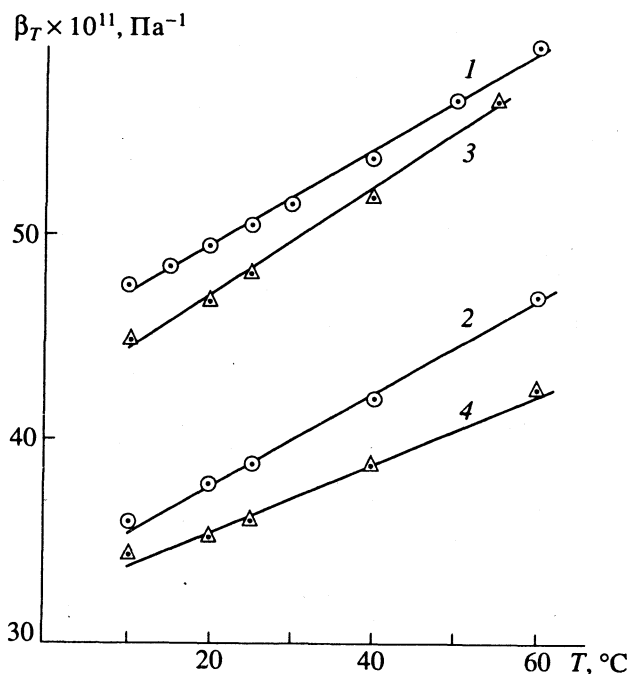


Рис. 1. Изотермическая сжимаемость  $\beta_T$  аминоспиртов (1 – 1,2-аминопропанол, 2 – моноэтаноламин) и диолов (3 – 1,2-пропандиол, 4 – этиленгликоль) в интервале 10 - 60°C.

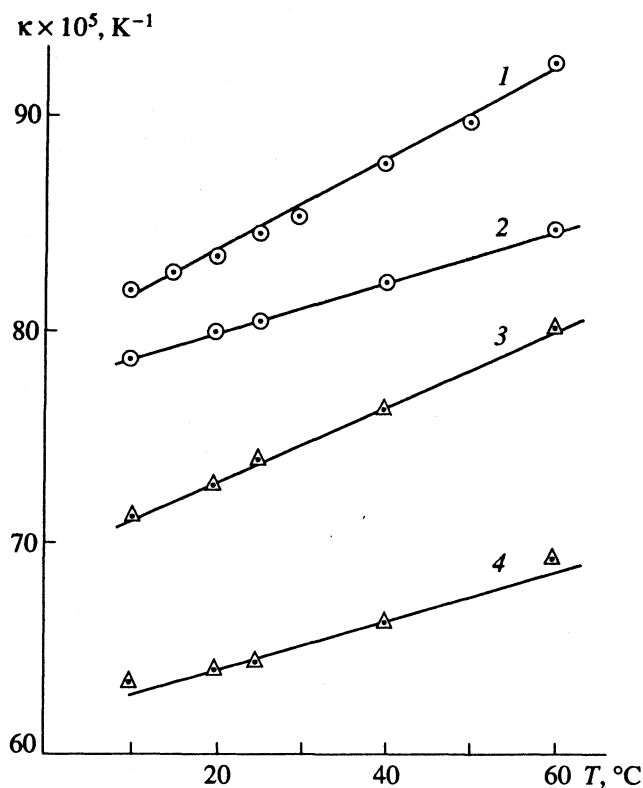


Рис. 2. Температурные зависимости термического коэффициента объемного расширения  $\kappa$  к аминокспиртов и диолов; 1 - 4 - см. рис. 1.

Сравнение этих данных с результатами настоящей работы проведено на рис. 1 и 2.

Из приведенных рисунков видно, что МЭА и Э обладают меньшими сжимаемостями и температурными коэффициентами объемного расширения.

Таблица 1. Изотермическая сжимаемость  $\beta_T$  и температурный коэффициент объемного расширения  $\kappa$  1,2-аминопропанола

$T, K$	$\beta_T \times 10^{11}, Pa^{-1}$	$\kappa \times 10^5, K^{-1}$	$T, K$	$\beta_T \times 10^{11}, Pa^{-1}$	$\kappa \times 10^5, K^{-1}$
283	47.7	82.1	303	51.6	85.5
288	48.6	82.9	313	53.9	88.1
293	49.6	83.8	323	56.6	90.2
298	50.6	84.7	333	59.2	93.0

Таблица 2. Внутреннее давление в аминокспиртах и диолах ( $p_i \times 10^6, Pa; \pm 3\%$ )

Вещество	283 К	293 К	298 К	313 К	333 К
МЭА	620	621	621	615	603
1,2-АП	487	495	498	502	512
Э	524	533	537	537	546
1,2-ПД	448	454	457	462	472

ния, чем их 1,2-пропанпроизводные. Мы связываем это с наличием более совершенной сетки Н-связей в МЭА и Э, молекулы которых обладают концевыми реакционными группами, не испытывающими стерических препятствий при образовании сетки Н-связей.

Охарактеризуем пространственную сетку Н-связей такой величиной, как внутреннее давление  $p_i = \kappa T / \beta_T$ . В табл. 2 мы приводим его значения при нескольких температурах. Видно, что наибольшим внутренним давлением обладают МЭА и Э, причем в изученном температурном интервале для аминокспиртов и диолов внутреннее давление с возрастанием температуры уменьшается. Исключение составляет МЭА, внутреннее давление которого проходит через максимум при 298 К. Внутреннее давление – термодинамическая величина, характеризующая изменение внутренней энергии системы в процессе небольшого изотермического расширения [4]. В работе [5] сопоставлены величины  $p_i$  для разных жидкостей и предположено, что оно отражает, в основном, универсальные взаимодействия. Этот подход нам кажется весьма условным. Для жидкостей очень важны температурные коэффициенты ряда свойств. Положительный температурный коэффициент внутреннего давления воды В.П. Белоусов [4] связывает с положительной величиной производной  $(\partial C_V / \partial V)_T$ . По правилу вычисления смешанных производных,

$$\frac{\partial}{\partial T} \left[ \left( \frac{\partial U}{\partial V} \right)_T \right]_V = \frac{\partial}{\partial V} \left[ \left( \frac{\partial U}{\partial T} \right)_V \right]_T = \left( \frac{\partial C_V}{\partial V} \right)_T$$

Для большинства жидкостей производная  $(\partial C_V / \partial V)_T < 0$ . Она положительна для воды, что в работе [4] объясняется наличием трехмерной сетки Н-связей.

В исследованных нами аминокспиртах и диолах, так же как и в воде,  $(\partial p_i / \partial T)_V > 0$ , а следовательно и  $(\partial C_V / \partial V)_T > 0$ , что, согласно [4], указывает на наличие пространственной сетки Н-связей в исследованных жидкостях.

Настоящая работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 93-03-5206).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Карцев В.Н., Родникова М.Н., Цепулин В.В., Маркова В.Г. // Журн. физ. химии. 1986. Т. 62. С. 2236.
- Родникова М.Н. // Там же. 1993. Т. 67. № 2. С. 275.
- Карцев В.Н., Иванов П.К., Теплов В.Г. // Там же. 1975. Т. 49. № 10. С. 2708.
- Белоусов В.П., Панов М.Ю. Термодинамика водных растворов неэлектролитов. Л.: Химия, 1983. 265 с.
- Dack M.R. // J. Austr. J. Chem. 1975. V. 28. № 8. P. 1643.

МЕТОДЫ И ТЕХНИКА  
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 541.11

УСОВЕРШЕНСТВОВАННЫЙ ФОТОГАЛЬВАНОМЕТРИЧЕСКИЙ  
УСИЛИТЕЛЬ И СТАБИЛИЗАТОР ТОКА  
ДЛЯ МОСТОВЫХ ИЗМЕРЕНИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ  
В КАЛОРИМЕТРИИ

© 1994 г. Э. Г. Лавут, Н. В. Человская

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет

Поступила в редакцию 29.12.93 г.

Описаны фотогальванометрический микровольтметр с логарифмической шкалой и улучшенной стабильностью нуля и стабилизатор тока для питания термометрического моста.

При проведении калориметрических измерений температуру чаще всего измеряют с помощью термометра сопротивления, включенного в мостовую схему. В данном случае с разных точек зрения выгоднее проводить измерения в режиме уравновешенного моста, т.е. фиксировать момент его равновесия. Во-первых, при этом существенно снижаются требования к стабильности источника питания термометрического моста и, кроме того, появляется возможность, сделав шкалу нуль-индикатора нелинейной (приблизительно логарифмической), избежать необходимости загробления прибора во время измерений и тем самым устранить погрешность, связанную с паразитной термо-ЭДС, возникающей при переключениях пределов шкалы.

В нашей работе был использован в качестве нуль-инструмента микровольтнаноамперметр Р325, состоящий из блока управления Р325/У и фотогальванометрического усилителя Ф305.2. Этот прибор был подвергнут значительной переделке с целью изменения характера шкалы и существенного уменьшения дрейфа нуля, который у штатного прибора слишком велик вследствие большого тепловыделения в обоих блоках усилителя Ф305.2. Поскольку особенно сильно изменения температуры влияют на гальванометр и фотосопротивление, последнее было заменено двумя встречно-параллельно включенными кремниевыми фотодиодами оптрона АОД-111А, а напряжение накала осветительной лампы снижено с 6 до 3 В. Трехщелевая маска в конденсоре была заменена однощелевой с шириной щели 3 мм, кроме того, упорный бортик с корпуса конденсора был убран, что позволило регулировать ширину изображения щели в несколько больших пределах. Для более полного использования падающего на оптрон светового потока последний был сжат в несколько раз в вертикальной плоскости с по-

мощью цилиндрической линзы, помещенной в выходном окне гальванометра.

Электрическая схема подверглась полной переделке; она была размещена на плате такой же конфигурации, которую имела штатная. Силовой трансформатор был переделан – вторичные обмотки заменены: обмотка II для питания операционного усилителя содержит 500 витков провода ПЭВ-2 диаметром 0.15 мм с отводом от середины (20 + 20 В), а обмотка III (накальная) – 60 витков провода ПЭВ-2 диаметром 0.53 мм (~5 В). На рис. 1 показаны принципиальная схема измененного блока Ф305.2 и та часть блока Р325/У, которой коснулась переделка (в этом блоке исключены также конденсатор С1 и выход на “внешний прибор”, клеммы которого использованы для вывода сигнала на детектор нуля).

Налаживание прибора сводится к фокусировке изображения щели на оптроне так, чтобы каждый фотодиод был освещен примерно наполовину, и к подбору полярности включения фотодиодов (чтобы не перегружать гальванометр в случае неправильного включения, в разрыв провода, идущего к контакту Р1, следует временно включить резистор сопротивлением в несколько десятков килоом). С помощью потенциометра R4 устанавливается максимальное значение петлевого усиления, при котором сохраняется стабильность системы при минимальной ее инерционности.

Благодаря шунтированию показывающего микроамперметра двумя встречно-параллельно включенными германиевыми триодами VT3, VT4 в диодном включении шкала прибора стала приблизительно логарифмической. Чувствительность в центре шкалы на самом чувствительном пределе в положении U осталась практически неизменной (20 нВ/дел), тогда как для отклонения стрелки на всю шкалу требовался сигнал ~15 мкВ, в то же время максимально возможная перегрузка показывающего микроамперметра при любом сигнале не превышала его номинальный ток

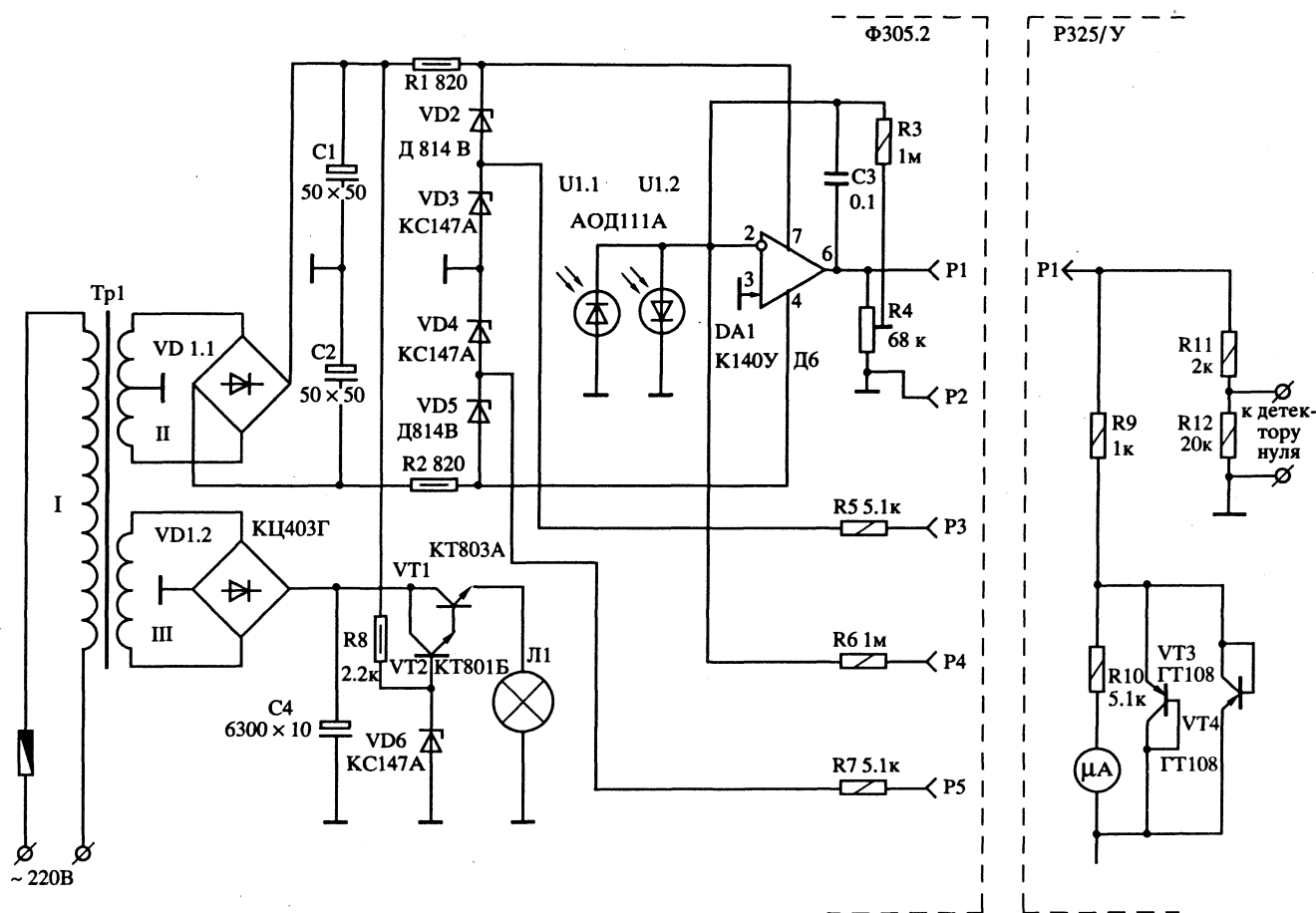


Рис. 1. Принципиальная схема усовершенствованного микровольтампера P325.

более чем вдвое. Что касается гальванометра, то при входных сигналах, меньших чем 300 мкВ, он работает в режиме компенсации. При использовании 25-омного равноплечного моста, питающегося током 20 мА, максимальная величина разбаланса, соответствующая подъему температуры на 3 К, составляет ~1.5 мВ. При сопротивлении рамки гальванометра 60 Ом это соответствует току 25 мкА. Такая перегрузка вполне безвредна, так как поворот рамки в обе стороны ограничен механическими упорами. Практически же во время измерений любое переключение измерительного плеча моста приводит к существенно меньшему разбалансу. Стабильность прибора такова, что за несколько часов непрерывной работы дрейф нуля не превышает одного деления шкалы (как правило, он вообще отсутствует).

Момент баланса термометрического моста фиксировался с помощью детектора нуля, принципиальная схема которого представлена в нижней части рис. 2. В верхней части того же рисунка дана схема стабилизатора тока для питания термометрического моста. На транзисторах VT1 - VT2 собран стабилизатор напряжения (~30 В), а на транзисторе VT3 и микросхеме DA1 - стабилизатор

тока для питания термометрического моста (ТМ); номинальная величина тока (20 мА) устанавливается резистором R9. Переключатель S1 служит для отключения питания моста при установке нуля прибора, а реле K1 и K2 предотвращают ложное срабатывание печатающего хронографа типа 21-372П при переключениях тумблера S1. Используются поляризованные реле типа РП-5 (паспорт РС4.522.003), отрегулированные на одно стабильное состояние с нормально замкнутыми контактами. Падение напряжения на 25-омном мосте составляет 0.5 В, что вполне достаточно для срабатывания реле K1 и K2 (~0.3 В).

В детекторе нуля использована микросхема DA2 в режиме триггера Шмитта, который при прохождении сигнала на выходе P325 через нуль выдает кратковременный отрицательный импульс на транзистор VT5 с включенным в его коллектор реле K3 (РЭС9 паспорт РС4.529.029-01), которое своими контактами замыкает вход печатающего хронографа, вызывая отпечаток времени, соответствующий моменту баланса моста.

Резистор R8 намотан из манганина, R9 - многооборотный проволочный потенциометр. Трансформатор использован от блока Φ305.2, у кото-



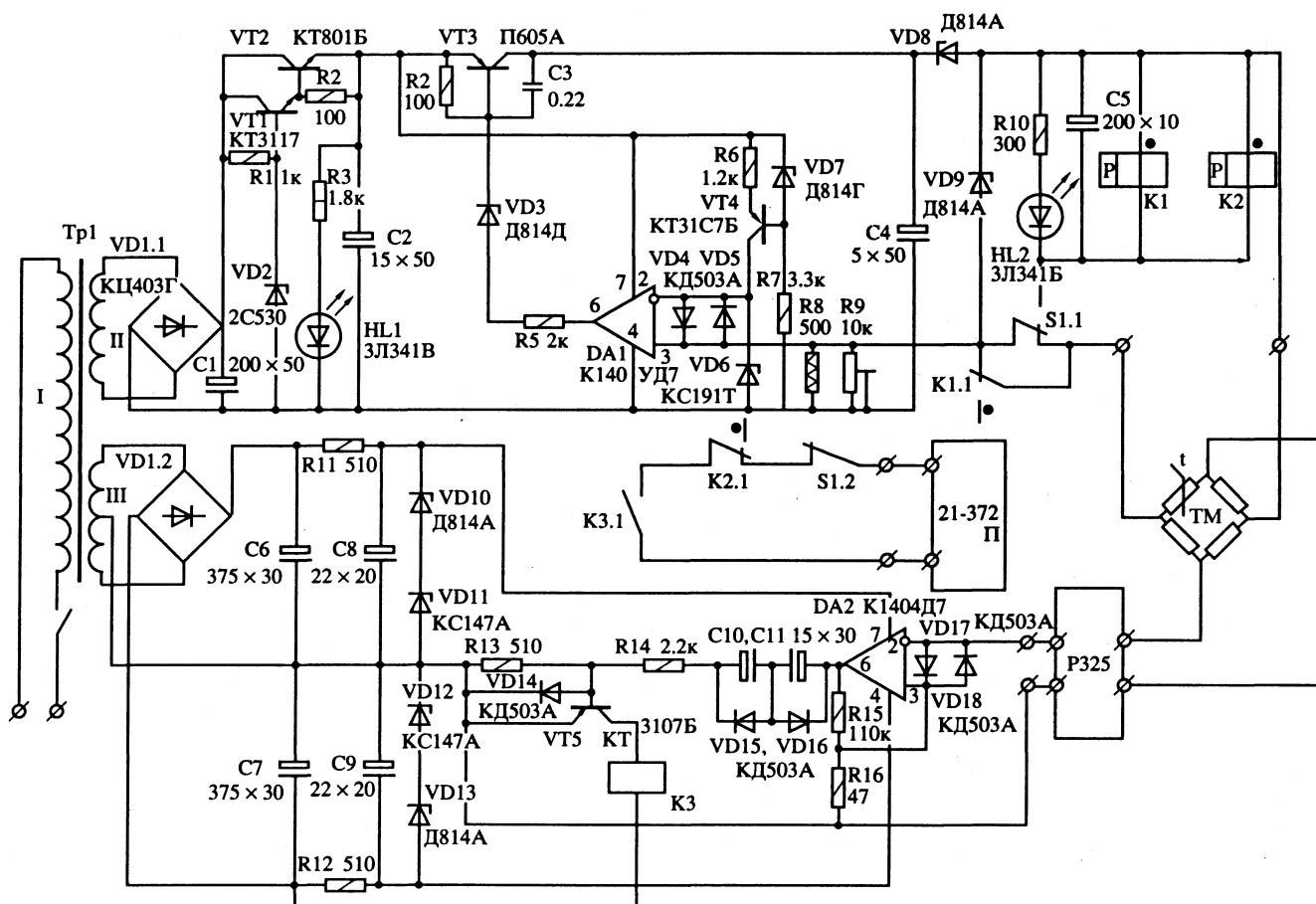


Рис. 2. Принципиальная схема стабилизатора тока и нуль-детектора.

рого вторичные обмотки заменены. Обмотка II содержит 380 витков провода ПЭВ-2 диаметром 0.2 мм, обмотка III состоит из 450 витков провода ПЭВ-2 диаметром 0.2 мм с отводом от середины.

Описанная система в течение длительного времени использовалась в прецизионных calorиметрических измерениях и показала высокие стабильность и надежность.

## МАРК СОЛОМОНОВИЧ ВИГДЕРГАУЗ

(1934 - 1994)

20 февраля 1994 г. на 60 году жизни скоропостижно скончался Марк Соломонович Вигдергауз, профессор, доктор химических наук, заслуженный деятель науки России, действительный член Российской академии естественных наук.

М.С. Вигдергауз широко известен в России и за рубежом своими фундаментальными и прикладными работами в области хроматографии. За 35 лет творческой деятельности им опубликовано 700 научных работ, шесть учебников и учебных пособий, семь монографий, получено 52 авторских свидетельства. Колоссальная работоспособность, эрудиция, широта интересов позволили М.С. Вигдергаузу организовать и возглавить на химическом факультете Самарского университета кафедру хроматографии. В 1988 г. им был создан первый в стране Институт хроматографии Российской академии естественных наук.

Профессор М.С. Вигдергауз щедро делился своими знаниями, идеями, опытом, под его руководством было защищено более 30 кандидатских диссертаций. Его работы отличались новизной и актуальностью, их результаты успешно использовались в нефтеперерабатывающей и химической промышленности.

М.С. Вигдергауз был блестящим организатором, в 1976 г. им было создано Поволжское отде-

ление Научного Совета РАН по хроматографии. Деятельность совета обеспечила широкое распространение и внедрение хроматографических методов в практику научно-исследовательских институтов и заводов этого региона.

М.С. Вигдергауз активно работал в Научном Совете по хроматографии РАН, был организатором ряда Всесоюзных конференций, ответственным редактором серии трудов по хроматографии и членом редколлегий "Журнала аналитической химии" и журнала "Chromatographia". Он постоянно принимал активное участие в Международных симпозиумах и конференциях, выступал с пленарными докладами на IV, V, VI Дунайских симпозиумах по хроматографии, а также на конференциях в Варшаве, Братиславе, Вильнюсе, Тарту и других.

М.С. Вигдергауз был самоотверженным, увлеченным тружеником, верным другом, добрым человеком.

Светлый образ Марка Соломоновича навсегда останется в памяти его многочисленных учеников, друзей и коллег.

*Научный Совет по хроматографии РАН*