ISSN 0044-4537

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

ТОМ
65
ВЫПУСК
10

«НАУКА»
1991

АКАДЕМИЯ НАУК СССР

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Основан в январе 1930 года

Выходит 12 раз в год

Том 65 Октябрь 1991 Вып. 10

Москва «Наука»

МАТЕРИАЛЫ V ВСЕСОЮЗНОГО СИМПОЗИУМА ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ*

ОБЩИЕ ВОПРОСЫ И ТЕОРИЯ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 543.54

© 1991 г.

Яшин Я. И.

НОВЕЙШИЕ ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Анализ библиографических указателей статей [1], материалов симпозиумов по хроматографии, состоявшихся в г. Стокгольме в 1989 г. и г. Амстердаме в 1990 г. [2, 3], а также материалов Питтсбурских конференций 1988–1990 г. [4] и личный опыт автора позволил сделать ряд заключений о достижениях и направлениях развития методов жидкостной хроматографии.

* г. Рига, ноябрь, 1990 г.

© Отделение общей и технической химии АН СССР, Институт физической химии АН СССР, 1991 г.

Хроматографические методы в целом занимают лидирующее положение в аналитической химии: по применению в аналитическом контроле хроматографические методы опережают даже все спектральные и спектроскопические методы [5]. В аналитической практике наибольшее применение находят следующие методы хроматографии: высокоэффективная жидкостная, газовая, ионная. В настоящее время интенсивно развивается сверхкритическая (флюидная) хроматография.

Как методы исследования и анализа развиваются все методы жидкостной хроматографии. Наряду с высокоэффективной колоночной хроматографией, это методы хроматографии на плоскости, особенно тонкослойная хроматография, методы капиллярного электрофореза. Наблюдается процесс взаимного влияния и обогащения достижениями разных методов. В начале семидесятых годов высокоэффективная жидкостная хроматография начала интенсивно развиваться благодаря успехам в теории и практике газовой хроматографии, которая к этому времени имела уже значительные достижения. В настоящее время быстрые темпы развития сверхкритической хроматографии связаны с достижениями как газовой, так и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Современные методы тонкослойной хроматографии, особенно в приборном плане в варианте «сэндвичевых» систем много позаимствовали от методов высокоэффективной колоночной хроматографии. Методы капиллярного электрофореза использовали опыт и технику капиллярной газовой и жидкостной хроматографии.

Постоянное совершенствование хроматографических методов стимулируется все возрастающими требованиями к анализам загрязнения окружающей среды, в медицине, биологии, в пищевой и фармацевтической промышленности. С другой стороны, хроматографические методы стимулируют развитие этих жизненноважных отраслей науки и промышленности. Хроматографические методы используются при исследованиях и анализах, связанных с самим человеком, его окружением, с тем, что он употребляет. В биологии и биотехнологии огромную роль играют методы разделения, в первую очередь хроматографические методы [6].

Следует отметить появившуюся новую тенденцию — для решения сложных проблем применяется комплекс хроматографических методов, например в экологии используют одновременно методы газовой, жидкостной и ионной хроматографии для анализа летучих и нелетучих молекулярных загрязнителей и вредных ионов.

Основные направления развития методов жидкостной хроматографии

1. Компьютеризация и автоматизация хроматографической аппаратуры.
2. Создание банков (библиотек) параметров удерживания и на их основе проведение идентификации пиков на хроматограммах и оптимизации степени разделения.
3. Создание экспертных систем.
4. Создание стабильных и воспроизводимых сорбентов и колонок.
5. Развитие и совершенствование капиллярных колонок в жидкостной, сверхкритической хроматографии и в электрофорезе.
6. Сочетание методов жидкостной и газовой хроматографии, газовой и сверхкритической хроматографии, жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза.
7. Сочетание жидкостной хроматографии с другими физико-химическими методами (масс-спектрометрия, инфракрасная спектрометрия с фурье-преобразованием, ядерного магнитного резонанса, инжекционно-проточный).

8. Развитие методов концентрирования.
9. Развитие препаративной жидкостной хроматографии.

Микропроцессорная техника применяется как для управления режимов в приборах, так и для обработки выходной хроматографической информации. Введение компьютерной техники в управление режимами позволило поднять точность поддержания параметров режима и улучшить сходимость последовательных изменений. Использование микроЭВМ при обработке результатов позволило автоматизировать процесс и исключить рутинную работу, кроме того были расширены возможности обработки по разным программам, в том числе и для случая неразделенных пиков. МикроЭВМ, работающие в составе хроматографов, могут хранить большой массив информации, в частности параметры удерживания. Поэтому создаются банки (библиотеки) параметров удерживания широкого круга веществ на разных колонках и эти данные используются для идентификации неизвестных компонентов, когда общий круг подозреваемых соединений известен и параметры удерживания их имеются в памяти микроЭВМ. Однако такой банк параметров удерживания целесообразно создавать только на стабильных, воспроизводимых колонках.

Во всех методах хроматографии широкий интерес проявляется к капиллярным колонкам. В газовой хроматографии за рубежом более 60—70% всех анализов выполняются на капиллярных колонках [7]. Сверхкритическая хроматография чаще всего реализуется в капиллярном варианте (кварцевые капиллярные колонки с привитыми фазами с CO_2 в качестве сверхкритической фазы и ионизационно-пламенным детектором [8]). В жидкостной хроматографии показаны большие возможности капиллярных колонок [7], получены колонки с рекордной эффективностью (3—5 миллионов теоретических тарелок). Однако следует отметить, что в жидкостной хроматографии имеются большие приборные трудности в реализации капиллярного режима, сдерживающие широкое применение капиллярных колонок. Большие успехи достигнуты в капиллярном электрофорезе, разработаны основы теории, конкретные методики; одиннадцать фирм выпускают приборы капиллярного электрофореза. Отработаны, по крайней мере, четыре метода капиллярного электрофореза (зонного, гелевого, мицеллярного, с сорбционным слоем на стенках). На капиллярах длиной 1—1,5 м достигнута эффективность около миллиона теоретических тарелок.

Одним из направлений является сочетание методов хроматографии. В работах [2, 9] обращается внимание на еще нераскрытые возможности сочетания жидкостной и газовой хроматографии. Этим методом можно разделять сложные смеси как высоко-, так и низкомолекулярных соединений, проводить групповое и покомпонентное разделение. Жидкостная колонка перед газовой колонкой может служить своеобразной системой пробоподготовки. Фирма «Карло Эрба» уже серийно выпускает подобный хроматограф, в котором соединены «on-line» жидкостный и газовый хроматографы. Исключительно перспективно сочетание жидкостной хроматографии и капиллярного электрофореза, разделение в этих методах основано на различных физических принципах, поэтому их сочетание дает качественно новые результаты, по-настоящему двухмерное разделение.

Жидкостная хроматография успешно объединяется и с другими физико-химическими методами. В последние годы достигнуты успехи в соединении жидкостных хроматографов с масс-спектрометром с использованием процессов термо- и электрораспыления как систем передачи проб от жидкостного хроматографа в ионную ловушку масс-спектрометра.

Жидкостная хроматография успешно применяется для анализа загрязнений окружающий среды. Однако во многих случаях необходимо предварительное концентрирование. Для жидкостных хроматографов в настоящее время проводятся работы по созданию устройств для ручного и автоматического концентрирования проб из разных сред.

Исключительный интерес вызывает препаративная жидкостная хроматография с ее уникальной возможностью выделять биологически активные вещества в чистом виде. Доля хроматографической аппаратуры составляет более половины среди всех других приборов. Интересные данные получены при опросе участников Питтсбургской конференции [10] по использованию ими аналитических приборов. Участники больше всего используют хроматографическую аппаратуру.

Большие успехи достигнуты в ионной хроматографии. Основные неорганические анионы (F^-, Cl^-, NO_2^-, NO_3^-, PO_4^{3-}, SO_4^{2-}) на современных ионообменниках разделяются всего за 2 мин, основные компоненты кислотных дождей (Cl^-, NO_3^-, SO_4^{2-}) — за 20—30 с, пределы детектирования на уровне ppb ($1-10^{-7}$%). В настоящее время намечается тенденция соединения возможностей высокоэффективной жидкостной хроматографии (в варианте ион-парном) с ионной хроматографией в одном приборе. В современных ионных хроматографах введены системы градиентного элюирования и системы одновременного определения катионов и анионов.

Достижения в теории высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В последние годы достигнуты успехи в создании теории нелинейной хроматографии (работы Ж. Гиошона с сотр. [11] и коллектива сотрудников Института физической химии АН СССР под руководством О. Г. Ларионова [12]). Некоторые выводы этой теории важны для препаративной жидкостной хроматографии.

Проводятся исследования по созданию единой теории удерживания в газоадсорбционной, сверхкритической адсорбционной и жидкостноадсорбционной хроматографии на основе статистической термодинамики [13].

Одним из наиболее важных достижений является оптимизация степени разделения с помощью экспертных систем. Наибольшие успехи достигнуты коллективами, созданными фирмой «Филлипс» [14].

В теории разделения оптических изомеров В. А. Даванковым с сотр. получены новые результаты [15, 16], показывающие возможность разделения оптических изомеров при двухточечных контактах (третьей точкой контакта может служить поверхность адсорбента).

Новые результаты получены и в теории оптимизации градиентного элюирования [17], ион-парной хроматографии [18], теории электрофоретических разделений [19].

В гель-фильтрационной хроматографии у нас в стране создана теория критической хроматографии [20]. Продолжаются работы по установлению связи параметров в ВЭЖХ с геометрической структурой молекул, а также с их химической и биологической активностью [21]. В ВЭЖХ широко используется геометрический фактор в разделении — применение циклодекстринов [22], краун-эфиров [23] и жидких кристаллов [24] для селективного разделения. Теории динамического модифицирования адсорбентов посвящена работа [25].

Один из новых методов — мембранная хроматография (разработка Т. И. Тенниковой, Б. Г. Белевского, Ф. Швеца), у которой имеются неплохие перспективы в препаративной жидкостной хроматографии.

Новые адсорбенты. Разработка новых адсорбентов для ВЭЖХ – одна из активных областей исследования [26]. Можно выделить следующие новые направления:

– разработка стабильных воспроизводимых адсорбентов;

– переход к широкопористым адсорбентам, на которых внутренний массообмен происходит быстрее;

– создание адсорбентов с привитыми группами, устойчивых во всем диапазоне pH среды;

– разработка для обращенно-фазовой хроматографии углеродных адсорбентов;

– разработка как для обращенно-, так и для нормально-фазовой хроматографии полимерных адсорбентов;

– создание адсорбентов для специальных применений, в частности для разделения органических оснований, сахаров, катехоламинов, гербицидов, триглицеридов, полиядерных ароматических соединений и в общем для контроля загрязнений окружающей среды;

– применение в качестве адсорбентов непористых частиц [27];

– широкое применение циклодекстринов для разделения, в том числе и привитых перметилированных (показано, что они могут быть универсальными адсорбентами для разделения соединений разных классов, стереоизомеров и оптических изомеров; циклодекстрины используют не только в ВЭЖХ, но и в сверхкритической и тонкослойной хроматографии);

– применение дифильных адсорбентов для биологических смесей, которые имеют гидрофобную поверхность в порах и гидрофильную – на внешней поверхности (поэтому высокомолекулярные соединения, в частности белки, не удерживаются и не выводят колонку из строя [28]).

В таблице приведены новые адсорбенты, которые появились в последние два года, подтверждающие справедливость отмеченных тенденций развития технологии получения адсорбентов.

Аппаратура для ВЭЖХ. Как указывалось выше, жидкостных хроматографов для ВЭЖХ выпускают больше, чем любых других аналитических приборов. В настоящее время можно выделить следующие самые общие тенденции развития хроматографической аппаратуры для ВЭЖХ:

– автоматизация хроматографов вплоть до создания систем для оптимизации разделения и экспертных систем на базе хроматографической аппаратуры;

– создание хроматографических станций, объединяющих хроматографы для ВЭЖХ, сверхкритической, ионной и газовой хроматографии;

– миниатюризация хроматографов;

– создание унифицированных, блочно-модульных систем;

– биосовместимость жидкостных трактов в хроматографах.

Большие достижения получены в разработке препаративных жидкостных хроматографов разной производительности для выделения биологически активных соединений. В некоторых препаративных системах используются колонки с эффективностью до 100 000 теоретических тарелок [29].

Из отечественных разработок следует выделить жидкостные хроматографы ДОКБА: микропроцессорный жидкостный хроматограф с лазерным флуориметрическим детектором «Цвет-3110», портативный жидкостный хроматограф ХПЖ-1 с электрохимическим детектором, портативный ионный хроматограф ХПИ-1. В НПО «Научприбор» разработан универсальный жидкостный хроматограф «Миллихром-5» с набором детектирующих систем.

Новые адсорбенты для ВЭЖХ

Название	Адсорбент		Размер частиц, мкм	Размер пор, Å	Фирма	Примечание
	основа	функциональная группа				
Capcell Pak	силикагель	C_{18}	3,5	120, 300	Shiseido	устойчив в пределах pH 2–10
Chromega-bond AS	силикагель	адамантан	5±1	60, 100, 120, 300	ES Industries	образец с 60 Å задерживает полимерные соединения
Hema-RPC$_{18}$	полимер	C_{18}	10; 60	100, 300	Alltech Associates	сополимер гидроксиметакрилата стабилен при pH 2–12 до 300 атм и до 180° C
Hypercarb PGC	углерод	графит. кольца	7±1,4	250	Keystone Scientific	с $s_{уд}$=150 м^2/г стабилен при pH 0–14, универсален
Jordi RPC	полимер	ДВБ	5	300, 500	Jordi Scientific	высокосшитый полимер; до pH 14 механически устойчив до 150° C
MRPH-Gel RP	полимер	ДВБ	5	300, 500	Nest Group	стабилен до pH 1–12; может работать с любым растворителем
Pye	силикагель	пирен	5	110	Nacalai Tesque	для диоксинов, ПАУ, витаминов, для хлорсодержащих соединений
Unisphere pBO	Al_2O_3	полибутадиен	8±1	250	Biotage	

Есть крупные достижения в разработке приборов для тонкослойной хроматографии [30]. Например, Р. Кайзером создана установка, позволяющая за 2 мин получать 36 хроматограмм, она работает под давлением, приближаясь по технике к хроматографам для ВЭЖХ. Наиболее важным узлом жидкостного хроматографа является детектор. Ниже приведен перечень детектирующих систем, в развитии которых достигнуты успехи: 1) спектрофотометрический детектор на диодной линейке повышенной чувствительности, 2) пульсационные электрохимические, 3) лазерный флуориметрический, 4) масс-спектрометрический, 5) лазерный термолинзовый, 6) многофункциональный, 7) лазерный интерференционно-поляризационный рефрактометр, 8) лазерный измеритель молекулярной массы (нефелометр + рефрактометр), 9) поляриметры, 10) непрямые (косвенные) методы детектирования, 11) методы детектирования в колонке, 12) электронозахватный, термоионный, пламенно-ионизационный и пламенно-фотометрический.

Спектрофотометрический детектор на диодной линейке широко применяется для детектирования сложных смесей. На них примерно на поря-

док снижен предел детектирования, в настоящее время уровень шума на таких детекторах до $(1 \div 2) \cdot 10^{-5}$ единиц оптической плотности (еоп), в частности на детекторах фирмы «Биосистемс». Показано, что рекордная чувствительность может быть достигнута на лазерном термолинзовом детекторе до $1 \cdot 10^{-6}$ еоп [31]. Высокая чувствительность достигается на лазерных флуориметрических детекторах (до $10^{-16} - 10^{-17}$ моля). В Дзержинском ОКБА, как уже отмечалось, разработан микропроцессорный жидкостный хроматограф «Цвет-3110» с таким детектором.

Разработаны импульсные электрохимические детекторы, позволяющие анализировать более широкий круг ионов и веществ. Используя сменные электроны из стеклоуглерода, золота, платины, серебра, можно определять такие трудные для детектирования ионы как CN^-, HS^-, Br^-, I^-, $S_2O_3^{2-}$, SCN^- и аминокислоты, фенолы, сахара, гидразин, спирты [32]. Стабильность таких детекторов выше и на них можно реализовать различные варианты детектирования. Новые возможности открываются при использовании непрямых косвенных методов детектирования [33] и непосредственного детектирования в колонке, в частности в микронабивных [34, 35]. Вновь появился интерес к применению специфических детекторов для газовой хроматографии (электронозахватного, термоионного, пламенно-фотометрического) в жидкостных хроматографах, а также универсального для органических соединений пламенно-ионизационного детектора [36]. Следует отметить также применение индуктивносвязанной плазмы в качестве детектирующей системы в жидкостной хроматографии [37] для определения микропримесей тяжелых металлов.

Насосы. Созданы универсальные насосы со сменными головками для аналитических и препаративных работ, совершенствуются системы градиентного элюирования с микропроцессорным управлением. Разработаны микронасосы с расходами 1—10 мкл/мин для капиллярной и микронасадочной жидкостной хроматографии.

Системы пробоотбора и концентрирования. Развитие вариантов микрохроматографии тормозится отсутствием хороших дозирующих систем [38]. Это наиболее слабо отработанный узел капиллярной жидкостной хроматографии, капиллярного электрофореза. Для анализа сложных смесей важна предварительная стадия пробоподготовки особенно в анализе биологических проб и проб окружающей среды, обычно это трудоемкие и длительные операции, часто наибольшая погрешность измерения допускается на данной стадии. Поэтому не случайно на разработку системы пробоподготовки в последнее время было направлено много усилий. На Международном симпозиуме по хроматографии было много сообщений, посвященных указанному вопросу [38]. В основном в разработках проводится прежде всего автоматизация процесса выделения, затем применение различных методов для селективного выделения анализируемых компонентов. Для этих целей привлекается прежде всего твердофазная экстракция, жидкостная экстракция, фильтрация, диализ, применение мембран [39].

Следует отметить метод сверхкритической экстракции, который стал широко использоваться в контроле загрязнений окружающей среды. Основные преимущества его: высокая скорость экстракции проб из сложной матрицы (проникающая способность сверхкритической жидкости-флюида на уровне газа, а растворяющая способность — на уровне жидкости), удаление основного вещества-растворителя (чаще всего CO_2) при низких температурах (что не приводит к разрушению и потерям анализируемых компонентов). Кроме того, CO_2 не вводит дополнительных загрязнений в пробу в отличие от жидких экстрагентов.

Из разработанных приборных систем следует выделить автоматические системы подготовки пробы фирмы «Жильсон» для сложных биологических систем, в частности есть системы для выделения катехоламинов из мочи, циклоспорина А из сыворотки, кокаина из мочи [39].

Благодаря достижениям в теории, технике и приборостроении методы ВЭЖХ широко используются в важнейших государственных и международных программах, прежде всего по контролю загрязнений окружающей среды (контроль диоксинов, афлатоксинов, полиядерных ароматических соединений, хлорированных дифенилов, нитрозоаминов, нитратов, ионов тяжелых металлов, кислых газов).

Хроматографические методы используются в программе «Геном человека» как в США, так и у нас в стране. Во многих медицинских, биологических, фармакологических областях хроматографические методы решают важные вопросы как в анализах, так и в выделении чистых веществ.

Дальнейшие перспективы ВЭЖХ будут связаны с совершенствованием теории, созданием экспертных систем для оценки межмолекулярных взаимодействий с использованием квантово-механических расчетов; несомненно, будут созданы приборы для капиллярной жидкостной хроматографии, будут развиваться многомерные варианты, комбинированные методы, будут разрабатываться стабильные адсорбенты для универсального рутинного анализа и сверхселективные — для разделения специальных смесей, а также системы быстрой диагностики на основе профильных (обзорных) хроматограмм биологических жидкостей на основе комплекса методов газовой, жидкостной и ионной хроматографии. По всем прогнозам в обозримом будущем высокие темпы развития методов ВЭЖХ будут сохранены.

Список литературы

1. Bibliography Section. J. Chromatogr. 1987. V. 412. № 1–6; 1988. V. 460, № 1–6; 1989. V. 486. № 1–6; 1990. V. 324. № 1–6.
2. 13th Intern. Symp. on Column Liquid Chromatography Stockholm June 25–30. 1989. J. Chromatogr. 1990. V. 507.
3. Abstract Book. 18th Intern. Symp. on Chromatography. 23–28. September 1990. RaI Congress Centre Amsterdam.
4. Abstr. Pap. Pittsburg Conf and Expo Anal. Chem. and Appl. Spectrosc. N. Y., 1990.
5. *Shimburg G.* Trends in Chromatographic Labor – Praxis. 1989. V. 13. P. 6.
6. *Nobotny M. V.* // Chimia. 1990. V. 44. P. 98.
7. *Berezkin V. G.* // Chem. Rev. 1989. V. 89. P. 287.
8. Supercritical fluid Chromatography / Ed. by R. M. Smith L.: Roy Soc. Chem. 1988. 238 p.
9. *Majors R. E.* // LC–GC. 1990. № 3. P. 198.
10. *Howard B.* // American Laboratory. January. 1989. P. 108.
11. *Guiochon G. et al.* Abstr. Book. 18th Intern. Symp. on Chromatography. 23–28 September 1990. Amsterdam, 1990.
12. *Калиничев А. И.* // Журн. физ. химии. 1989. Т. 64. № 11. С. 2984.
13. *Martire D. E.* // J. Liq. Chromatogr. 1988. V. 11. № 9. P. 1779.
14. *Buydens L.* Abstr. Book 18th Intern. Symp. on Chromatography 23–28 September 1990. Amsterdam, 1990.
15. *Даванков В. А., Навратил Дж., Уолтон Х.* Лигандообменная хроматография / Пер. с англ. М.: Мир, 1989. С. 294.
16. *Даванков В. А., Рогожин В., Курганов А. А.* Диплом № 372–1. Бюл. изобрет. 1990. № 17.
17. *Martin M.* // J. Liq. Chromatogr. 1988. V. 11. № 9. P. 1809.
18. *Bartha A., Vigh V.* // J. Chromatogr. 1990. V. 506. P. 85.
19. Advances in electrophoresis. V. I. / Ed. by A. Chramback et al. V. C. H. Weinheim, 1989. 44 p.
20. *Гурьянова В. В. и др.* // Тез. докл. V Всесоюз. симп. по молекулярной жидкостной хроматографии (Юрмала, 20–22 ноября 1990 г.). Рига, 1990. С. 102.
21. *Kaliszan R.* // J. Chromatogr. 1990. V. 506. P. 3.

22. *Hattori K. et al.* // J. Inclusion Phenom, 1987. V. 5. P. 73.
23. *Kaufmann A.* // Chromatographia. 1990. V. 29. № 1–2. P. 76.
24. *Aratskova A. A., Vetrova Z. P., Yashin Ya. I.* // J. Chromatogr. 1986. V. 365. P. 27.
25. *Шатц В. Д.* // Тез. докл. V Всесоюз. симп. по молекулярной жидкостной хроматографии (Юрмала, 20–22 ноября 1990 г.) Рига, 1990. С. 52.
26. *Яшин Я. И.* // Журн. аналит. химии. 1989. Т. 44. № 11. С. 1941.
27. *Unger K. K.* // TrAc. 1987. V. 6. P. 121.
28. *Сердан А. А. и др.* // Тез. докл. V Всесоюз. симп. по молекулярной жидкостной хроматографии. Юрмала, 20–22 ноября 1990. С. 140.
29. *Majors R. E.* // LC–GC. 1990. V. 8. № 4. P. 276.
30. *Jaenchen D. E., Issag H. J.* // J. Liq. Chromatogr. 1988. V. 11. № 9. P. 1941.
31. *Kettler C. N., Sepniok M. J.* // Anal. chem. 1987. V. 59. P. 1733.
32. Pulsed Amperometric Detector (PAD–II) Dionex 1990.
33. *Ishii D., Takeuchi T.* // J. Liq. Chromatogr. 1988. V. 11. № 9. P. 1865.
34. *Rowlen K. L. et al.* // Anal. Chem. 1989. V. 61. № 23. P. 2634.
35. *Verzele M. et al.* // J. Chromatogr. 1987. V. 325. P. 85.
36. *Malcolme-Lawes D. J. et al.* // Ibid. 1989. V. 482. P. 53.
37. *Boggs W. R., Fetser J.* // Anal. Chem. 1989. V. 61. № 3. P. 236.
38. *Sandra P.* // Abstr. Book 18th Intern. Symp. on Chromatography. 23–28. September 1990. RAI Congress. Centre Amsterdam P. MO–L–01.
39. The ASTED System Gilson. Clean-up and trace enrichment for HRLC. France. Gilson, 1990.

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 541.183

© 1991 г.

Калиничев А. И.

ДИНАМИКА РАЗМЫВАНИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПИКА В СЛУЧАЕ ПРОИЗВОЛЬНЫХ НЕЛИНЕЙНЫХ ИЗОТЕРМ СОРБЦИИ

Получено приближенное решение нелинейной задачи элютивной динамики сорбции одного вещества в случае внутридиффузионной кинетики в отсутствие продольной дисперсии в хроматографической колонке. Для решения соответствующих феноменологических уравнений задачи применена предложенная модификация метода интегральных соотношений с использованием одной подвижной границы для нулевой концентрации в выходном хроматографическом пике.

В данной работе рассматривается задача элютивной нелинейной динамики сорбции, которая описывается системой дифференциальных уравнений, включающей уравнение материального баланса и уравнение внутридиффузионной кинетики сорбции

$$\varkappa\frac{\partial a}{\partial T}+\frac{\partial c}{\partial T}+\frac{\partial c}{\partial X}=0, \quad X=x/u, \quad \varkappa=(1-\varepsilon)/\varepsilon, \tag{1}$$

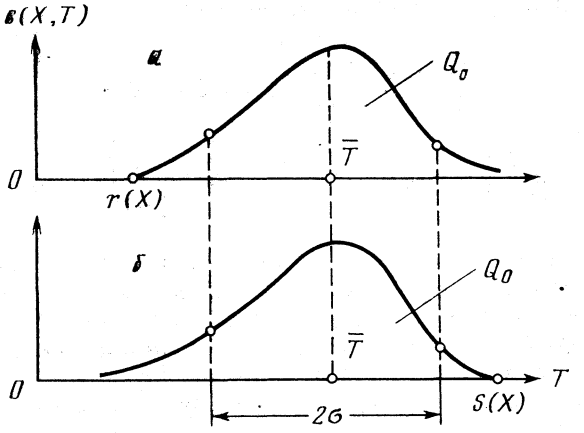
$$\frac{\partial a}{\partial T}=\beta(f(c)-a), \tag{2}$$

где c, a — концентрация сорбируемого вещества в подвижной и неподвижной фазах соответственно; u — линейная скорость потока подвижной фазы; ε — порозность сорбента в колонке; $f(c)$ — нелинейное уравнение изотермы сорбции; β — кинетический коэффициент, характеризующий скорость установления сорбционного равновесия в зерне.

Уравнение (2) представляет собой широко используемое феноменологическое уравнение внутридиффузионной кинетики, основанное на концепции линейных движущих сил, где кинетическая скорость пропорциональна степени отклонения концентрации в зерне от равновесного значения.

Получен ряд аналитических решений нелинейной задачи о размывании хроматографического пика в случае слабонелинейных полиномиальных изотерм [1, 2] и изотерм Ленгмюра [3, 4]. Известны варианты численных решений этой задачи [5, 6]. Ранее на основе модифицированного метода интегральных соотношений получено приближенное аналитическое решение, описывающее хроматографический пик в задаче нелинейной элютивной динамики сорбции при наличии размывающих эффектов: продольной дисперсии в колонке или внешнедиффузионной кинетики сорбции [7].

Искомые соотношения находятся интегрированием исходных уравнений и затем на основе предложенных концентрационных распределений путем решения полученных из интегральных соотношений уравнений



определяются параметры этих распределений. С использованием аналогичного подхода в данной работе получено приближенное решение системы (1), (2) для произвольных нелинейных (выпуклых, вогнутых, S- и σ-образных) изотерм.

Возможность успешного решения дифференциальных уравнений, выведенных из интегральных соотношений, главным образом определяется подходящим выбором концентрационного распределения для хроматографического пика. Предлагается аппроксимация выходного профиля с одной подвижной (зависящей от длины колонки) границей для нулевой концентрации (рисунок). В этом случае возможны два варианта: с границей слева (рисунок, *а*) или справа от пика вещества (рисунок, *б*). Рассмотрим вариант с границей r слева (r, рисунок, *а*), поскольку в обоих вариантах получаемые уравнения одинаковы, лишь (как будет показано) меняются пределы интегрирования для числовых констант, определяющих решения.

Аппроксимация концентрационного распределения в хроматографическом пике предлагается в виде

$$c(X,\ T)=Q_0(T-r)^n/[A(\sigma/E)^{n+1}]\exp\{-[(T-r)^2/(\sigma/E)^2]\}, \qquad (3)$$

$$\bar{T}=\int_r^\infty Tc(X,T)dT=r+\sigma B/(EA), \qquad (4)$$

$$Q_0=\int_r^\infty c(X,T)dT,$$

где Q_0 — общее количество хроматографируемого вещества; $\bar{T}$ — центр тяжести пика (рисунок); n — выбираемый произвольно постоянный коэффициент; A, B, E — числовые постоянные (величина которых зависит от n);

$$B=\int_0^\infty y^{n+1}\exp(-y^2)dy; \quad A=\int_0^\infty y^n\exp(-y^2)dy; \qquad (5)$$

$$E=[(n+1)/2-(B/A)^2]^{1/2}.$$

Вид концентрационного распределения (3) характеризуется двумя параметрами: $r(X)$ и $\sigma(X)$, функциональная зависимость которых от рас-

стояния X определяется решением уравнений

$$\frac{d(\bar{T})}{dX} = 1 + \frac{\varkappa}{Q_0}\int_r^\infty f(c)dT, \quad k=1, \tag{6}$$

$$\frac{d(\sigma^2)}{dX} = \frac{2\varkappa}{Q_0}\left[\int_r^\infty Tf(c)dT - \bar{T}\int_r^\infty f(c)dT\right] + \frac{2\varkappa}{\beta Q_0}\int_r^\infty f(c)dT, \quad k=2. \tag{7}$$

Интегральные соотношения k-го порядка выводятся умножением обеих сторон уравнений (1), (2) на T^k с последующим интегрированием по T от r до ∞. Уравнение (6) представляет собой интегральное соотношение первого порядка, а уравнение (7) есть комбинация уравнения (6) и интегрального соотношения второго порядка. Уравнения (6), (7) определяют основные параметры хроматографического пика — центр тяжести ($\bar{T}$) и дисперсию (σ) (рисунок). Положение пика (центр тяжести $\bar{T}$) по соотношению (6) определяется статическим параметром — видом изотермы $f(c)$, а его размывание (дисперсия, σ) определяется совместным аддитивным действием двух факторов: нелинейностью изотермы и неравновесностью процесса.

Первое слагаемое в (7) равно нулю для линейной изотермы ($f(c) = \Gamma c$) и описывает размывание хроматографического пика (σ), обусловленное лишь статическим фактором — нелинейностью изотермы, а второе слагаемое (с коэффициентом $1/\beta$) описывает размывание, обусловленное неравновесностью процесса с учетом нелинейности изотермы $f(c)$, которая представляется здесь в виде полинома

$$f(c) = \sum_{i=1} \Gamma_i c^{m_i}, \tag{8}$$

где m_i — произвольные (не обязательно целочисленные) показатели степени; Γ_i — постоянные коэффициенты. Полиномом вида (8) может быть аппроксимирована любая нелинейная произвольная изотерма.

Подставляя (8) в (6) и (7) и используя при интегрировании этих уравнений распределение (3), получим обыкновенные дифференциальные уравнения для определения зависимостей $\sigma(X)$, $r(X)$

$$\frac{d\sigma}{dX} = \sum_{i=1} (L_i/\sigma^{m_i-1} + R_i/\sigma^{m_i}), \tag{9}$$

$$\frac{dr}{dX} = 1 + \sum_{i=1} \{[\beta R_i - BL_i/(AE)]/\sigma^{m_i-1} - BR_i/AE\sigma^{m_i}\}, \tag{10}$$

$$L_i = \frac{\varkappa}{Q_0}\Gamma_i (Q_0/A)^{m_i} E^{m_i-2}(B_i - BA_i/A);$$

$$A_i = \int_0^\infty y^{nm_i}\exp(-m_i y^2)dy;$$

$$R_i = \frac{\varkappa}{Q_0}\Gamma_i (Q_0/A)^{m_i}\frac{1}{\beta}E^{m_i-1}A_i;$$

$$B_i = \int_0^\infty y^{nm_i+1} \exp(-m_i y^2) dy. \qquad (11)$$

При переходе от варианта распределения рисунка *а* к варианту рисунка *б* центр тяжести выражается в виде $\overline{T}=s-\sigma B/(EA)$, а пределы интегрирования $(0, \infty)$ в интегралах (5), (11) следует заменить на $(-\infty, 0)$, а в уравнениях (6), (7) с (r, ∞) на $(-\infty, s)$.

Решение уравнения (9) дает зависимость $\sigma(X)$, а после подстановки в (10) и интегрирования получим зависимость для подвижной границы.

Продемонстрируем решения, полученные для ряда примеров изотерм $f(c)$.

1. Линейная изотерма $f(c)=\Gamma c$

$$\sigma^2=HX(1+\varkappa\Gamma)^2, \quad \overline{T}=(1+\varkappa\Gamma)X, \qquad (12)$$

$$r=(1+\varkappa\Gamma)(X-(B/(AE))(HX)^{1/2}), \qquad (13)$$

где $H=2\varkappa\Gamma u/[(1+\varkappa\Gamma)^2]$ – известный в хроматографии параметр: ВЭТТ (высота эквивалентной теоретической тарелки), а коэффициенты B, A равны, например, для $n=2$

$$B=1/2, \quad A=(\pi)^{1/2}/4, \quad E=(^3/_2-4/\pi)^{1/2}.$$

Соотношения (12), (13) для центра тяжести $(\overline{T})$ и дисперсии (σ) пика совпадают с хорошо известными в теории линейной хроматографии. Соотношение (13) (если вместо границы r использовать границу s) показывает зависимость от длины колонки X времени выхода пика хроматографируемого вещества (для варианта с подвижной границей s, рисунок, *б*).

2. Полиномиальная кубическая изотерма $f(c)=\Gamma_1 c+\Gamma_2 c^2+\Gamma_3 c^3$

$$\int \sigma^3 d\sigma/[(L_2+R_1)\sigma^2+(L_3+R_2)\sigma+R_3]=X, \qquad (14)$$

при больших расстояниях X $(X\gg(L_3+R_2)^2/2(L_2+R_1)^3)$

$$\sigma^2/2=(L_2+R_1)X;$$

$$r=(1+R_1\beta)X+2(X)^{1/2}(R_2-BL_2/(AE)-BR_1/(AE))/(2(R_1+L_2))^{1/2}.$$

3. Полиномиальная квадратичная изотерма $f(c)=\Gamma_1 c+\Gamma_2 c^2$

$$\sigma^2/2-R_2\sigma/(L_2+R_1)+[R_2/(L_2+R_1)]^2\ln[1+(L_2+R_1)\sigma/R_2]=(L_2+R_1)X,$$
$$dr/dX=1+\beta R_1+(\beta R_2-B(L_2+R_1)/(AE))/\sigma-BR_2/(AE\sigma^2). \qquad (15)$$

4. Изотерма Фрейндлиха $f(c)=\Gamma_m c^m$ $(m>1$ или $m<1)$

$$\int \sigma^m d\sigma/(L_m\sigma+R_m)=X,$$
$$dr/dX=1+(\beta R_m-BL_m/(AE))/\sigma^{m-1}-(BR_m/(AE))/\sigma^m, \qquad (16)$$

где $L_m=(\varkappa/Q_0)\Gamma_m(Q_0/A)^m E^{m-2}(B_m-BA_m/A)$, $R_m=(\varkappa/Q_0)\Gamma_m(Q_0/A)^m E^{m-1}A_m$. При больших расстояниях X $(X\gg(R_m/L_m)^m/mL_m)$

$$\sigma=(mL_mX)^{1/m};$$

$$r=X-BR_m\ln X/(AEmL_m)+m^{1/m}((R_m\beta-BL_m)/(AE))X^{1/m}/(L_m)^{1-1/m} \qquad (17)$$

Список литературы

1. *Houghton G.* // J. Phys. Chem. 1963. V. 67. № 1. P. 84.
2. *Золотарев П. П., Калиничев А. И.* // Докл. АН СССР. 1972. Т. 204. С. 630.
3. *Аринштейн А. Э.* // Журн. физ. химии. 1983. Т. 58. № 7. С. 1773.
4. *Wade J. L., Bergold A. F., Carr P. W.* // Anal. Chem. 1987. V. 59. № 9. P. 1286.
5. *Golshan-Shirazi S., Guiochon G.* // J. Phys. Chem. 1990. V. 94. P. 495.
6. *Lin B., Ma Z., Golshan-Shirazi S., Guiochon G.* // J. Chromatogr. 1990. V. 500. P. 185.
7. *Калиничев А. И.* // Журн. физ. химии. 1989. Т. 64. № 11. С. 2984.

Академия наук СССР
Институт физической химии
Москва

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

Лебедев Ю. Я.

ЭКСТРЕМАЛЬНЫЕ ЗАВИСИМОСТИ ХАРАКТЕРИСТИК ЗОНЫ ВЕЩЕСТВА ОТ ПАРАМЕТРОВ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Проанализированы универсальные зависимости конкретных относительных характеристик зоны от обобщенной координаты, включающей основные параметры хроматографической системы. Рассчитаны и проанализированы «частные» кривые, т. е. зависимости высоты, ширины и объема задержки зоны от скорости элюции и размеров зерен пористого материала в колонке. Установлены простые соотношения для расчета экстремальных параметров системы и характеристик зон. По уравнениям теории неравновесной хроматографии построена хроматограмма с экстремальными и обычными характеристиками зоны. Приведено экспериментальное доказательство существования универсальных кривых экстремального типа для хроматографических систем с участием биологически активных веществ (окситетрациклина, тетрациклина, сывороточного альбумина, витамина B_{12}).

Уже для простейшей хроматографической системы, характеризующейся независимыми параметрами

$$h,\ s,\ R,\ \alpha,\ u,\ \Gamma_i,\ D_{a,i} \text{ или } V_{cb},\ V_{st},\ R,\ v,\ \Gamma_i,\ D_{a,i} \qquad (1)$$

(h и s — высота и площадь поперечного сечения рабочей части колонки; V_{cb} и V_{st} — объемы подвижной и неподвижной частей; R — средний радиус сферических зерен, α — порозность, $u(v)$ — линейная (объемная) скорость движения подвижной фазы в колонке (скорость элюции); Γ_i — коэффициент равновесного распределения i-го компонента между фазами; $D_{a,i}$ — эффективный коэффициент диффузии i-го компонента в порах зерна) и обобщенной координатой длины [1—3]

$$\lambda_i \equiv 3(1-\alpha)\Gamma_i D_{a,i} h/\alpha u R^2 \equiv 3\Gamma_i D_{a,i} V_{st}/vR^2 \qquad (2)$$

(в случае симметричных зон ($\lambda \geqslant 30$) координата λ с точностью до множителя 2,5 имеет смысл числа эффективных теоретических тарелок $N_{эф}$, т. е. $\lambda = 2{,}5N_{эф}$, ($Bi = \infty$) [4]), обнаружено множество экспериментальных закономерностей, не объяснимых с позиций классической теории хроматографии. Прежде всего, наблюдаются значительное смещение удерживаемого объема V_c^*, возрастание высоты $c_{макс}$ и уменьшение ширины ΔV зоны с увеличением скорости элюции или размеров зерен [2]; резкое нарушение симметричности зон при варьировании параметров u, R, h [2]; возможность разделения веществ с близкими коэффициентами распределения [5, 6] и, наконец, экстремальные зависимости для характеристик зоны [7].

В работах [2—9] перечисленные закономерности объяснены с позиций теории неравновесной хроматографии, один из основных выводов кото-

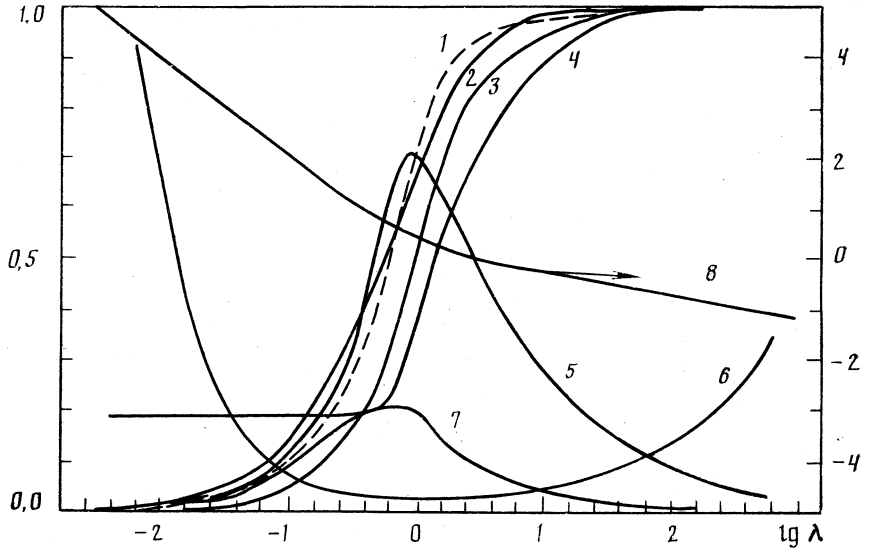


Рис. 1. Универсальные кривые для характеристик движения зоны: $1 - K^{*}_{a,c}$, $2 - \theta^{d}_{t,V}$, $3 - \theta^{c}_{t,V}$, $4 - \xi$, $5 - 0{,}5\ \Delta V/\Gamma V_{st}$, $6 - c_{макс}/(50Q\Gamma^{-1}V_{st}^{-1})$, $7 - \Delta\theta_{t,V}$, $8 - \lg(c_{макс}/QD_a v^{-1}R^{-2})$

рой — возможность реализации в хроматографии различных режимов движения зон: не только квазиравновесного (КВ), но также неравновесного (НР) и переходного (ПР) [2, 3, 9]. Гамма новых закономерностей обнаруживается именно тогда, когда компоненты движутся в колонке в условиях НР- или ПР-режимов. Из теории также следует, что кинетико-динамические закономерности зон в конкретном режиме, и экстремальные особенности зон отражены в наиболее общем виде на универсальных кривых в координатах $X - \lg\lambda$, где X — конкретная безразмерная характеристика движения зоны [8].

Цель работы — анализ экстремальных особенностей универсальных и «частных» кривых, экспериментальное доказательство существования универсальных кривых и проверка адекватности теории и эксперимента на основе данных по ситовой и ионообменной хроматографии с участием биологически активных веществ.

Примеры универсальных кривых приведены на рис. 1 [8]. На нем относительные характеристики движения зоны имеют следующий смысл:

$$\theta_{t,V} \equiv (t_c^{*} - hu^{-1})/(1-\alpha)\Gamma h\alpha^{-1}u^{-1} = (V_c^{*} - V_{cb})/\Gamma V_{st},$$

$$\theta^{a}_{t,V} \equiv (t_a^{*} - hu^{-1})/(1-\alpha)\Gamma h\alpha^{-1}u^{-1} = (V_a^{*} - V_{cb})/\Gamma V_{st},$$

$$\Delta\theta_{t,V} \equiv \theta^{a}_{t,V} - \theta^{c}_{t,V} = (V_a^{*} - V_c^{*})/\Gamma V_{st},$$

$$K^{*}_{a,c} \equiv a_R(t_c^{*})/\Gamma c_{макс}, \qquad \xi \equiv \Delta V^{-}/\Delta V^{+}$$

— соответственно относительное время (объем) задержки компонента, относительное время (объем) задержки компонента при наблюдении за формированием зоны в неподвижной фазе, относительное смещение (по оси

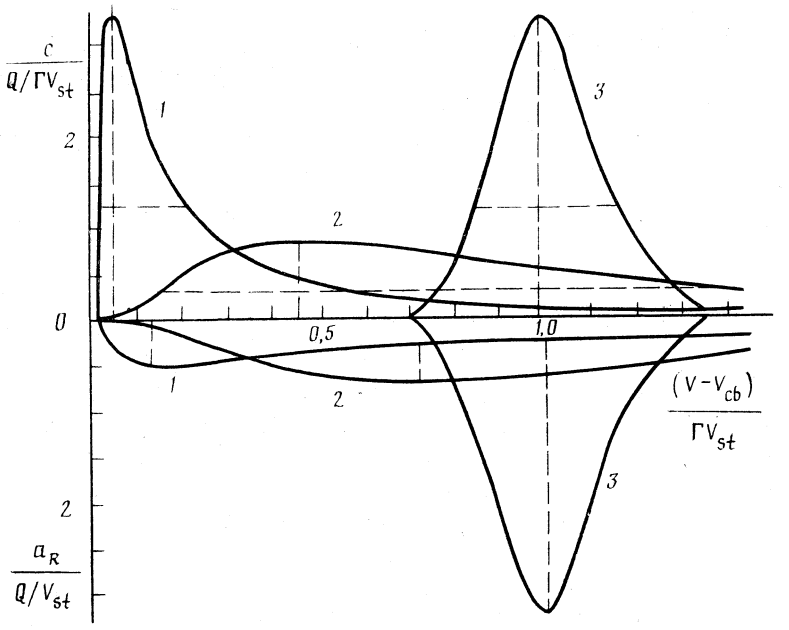


Рис. 2. Элюционные кривые (в относительных координатах) для подвижной (c) и неподвижной (a_R) фаз, соответствующие условиям: Γ, D_a, V_{cb}, V_{st}=const; $v_3 : v_2 : v_1 = 1 : 27{,}7 : 250$ (R=const) или $R_3 : R_2 : R_1 = 1 : 5{,}26 : 15{,}8$ (v=const); λ_3=25 (квазиравновесный режим), λ_2=0,9 (переходный режим), λ_1=0,1 (неравновесный режим)

времени или объема) концентрационных максимумов зон в каждой из фаз для одного компонента, относительный коэффициент межфазного распределения компонента в момент времени t_c^*, коэффициент симметрии зоны; $(\Delta V/\Gamma V_{st})$ — относительная ширина выходной зоны; $c_{макс}/Q(\Gamma V_{st})^{-1}$ и $c_{макс}/QD_a v^{-1}R^{-2}$ — относительные высоты зоны. Смысл же абсолютных характеристик зоны таков: $t_c^*(V_c^*)$ — удерживаемое время (объем), соответствующее на хроматограмме положению максимальной концентрации $c_{макс}$ компонента; t_a^* и V_a^* — время и объем пропущенного через колонку раствора, необходимые для формирования (в неподвижной фазе) зоны с максимальной концентрацией $a_R^{макс}$ компонента; a_R — средняя по зерну концентрация компонента в неподвижной фазе; ΔV^- и ΔV^+ — ширины выходной зоны на высоте $c_{макс}/e$ справа и слева от точки V_c^*; Q — общее количество компонента, введенного в колонку.

Универсальные кривые (рис. 1) характеризуются наличием экстремума (максимума, минимума или точки перегиба), который соответствует системам с координатой $\lambda_э$=0,95 ед. В системах с экстремальной координатой зоны движутся в условиях ПР-режима. Закономерности же движения зон в КВ- и НР-режимах наиболее полно реализуются в системах с координатами $\lambda \gg \lambda_э$ и $\lambda \ll \lambda_э$ соответственно. Так, закономерности классической хроматографии наблюдаются практически в системах с $\lambda \geqslant 30$. Типичную картину того, как меняются на хроматограмме характеристики зоны при переводе ее движения из КВ- в ПР- и далее в НР-режим, можно видеть из рис. 2 (расчет выполнен по уравнениям неравновесной хроматографии). Прослеживаются основные особенности: неравновесное распределение компонента между фазами, смещение максимумов зоны в каждой

из фаз относительно равновесного положения $V^*_{\text{равн}}((V^*_{\text{равн}}-V_{\text{св}})/\Gamma V_{st}=1)$, изменение симметрии зоны в каждой из фаз, прохождение высоты $c_{\text{макс}}$ зоны через минимум, а ширины зоны через максимум, запаздывание в формировании концентрации $a_R^{\text{макс}}$ по сравнению с формированием концентрации $c_{\text{макс}}$, прохождение характеристики $\Delta\theta_{t,v}$ через максимум.

Считая неравновесность межфазного массообмена главной причиной экстремального поведения характеристик зоны при варьировании параметров (1), можно заключить: в системах с $\lambda<0{,}95$ вследствие существенной неравновесности ($K^*_{a,c}<70\%$) имеется быстрый «проскок» части вещества зоны из колонки с образованием резкого переднего фронта, при этом основная масса вещества сосредоточивается в периферийных слоях зерен по всей длине колонки, затем медленно уходит из них с образованием в выходной зоне длинного заднего фронта; в системах с $\lambda>0{,}95$ неравновесность ($K^*_{a,c}>70\%$) все меньше влияет на формирование массы вещества в каждой из фаз около одного центра тяжести, при этом вещество в неподвижной фазе успевает сосредоточиться по всей глубине зерна. Экстремальные же характеристики зоны обнаруживаются в системах со степенью неравновесности $K^*_{a,c}=70\%$, когда достигается наибольшее временное расхождение в моментах формирования концентраций $c_{\text{макс}}$ и $a_R^{\text{макс}}$.

Численное значение любого из экстремальных параметров (при фиксированных остальных) можно рассчитать по соотношению

$$\Gamma D_a V_{st}/vR^2=0{,}317 \tag{3}$$

Например, $v_э=3{,}15\Gamma D_a R^{-2}V_{st}$, $R_э=0{,}56(\Gamma D_a v^{-1}V_{st})^{1/2}$, $V_{st}{}^э=0{,}317vR^2/\Gamma D_a$, $(\Gamma D_a)_э=0{,}317vR^2/V_{st}$. Величины же экстремальных характеристик можно оценить по следующим соотношениям:

$$c^э_{\text{макс}}/Q=0{,}84/\Gamma V_{st}=2{,}6D_a/vR^2, \tag{4}$$

$$\Delta V_э=1{,}4\Gamma V_{st}=0{,}44vR^2/D_a, \tag{5}$$

$$(V_c^*-V_{cb})_э=0{,}47\Gamma V_{st}=0{,}15vR^2/D_a, \tag{6}$$

$$(V_a^*-V_{cb})_э=0{,}65\Gamma V_{st}=0{,}21vR^2/D_a, \tag{7}$$

$$(V_a^*-V_c^*)_э=0{,}2\Gamma V_{st}=0{,}06vR^2/D_a. \tag{8}$$

(В (4)–(8) параметры ΓV_{st} связаны с параметрами D_a/vR^2 соотношением (3), поэтому при произвольных Γ и V_{st} параметры D_a, v, R – непроизвольны и наоборот.) Наконец, имеются экстремальные характеристики с фиксированными значениями:

$$(K^*_{a,c})_э\approx 0{,}7, \qquad \xi_э\approx 0{,}3. \tag{9}$$

Так, для системы с заданными параметрами $\Gamma=3$, $D_a=10^{-8}$ см^2/с, $R=100$ мкм, $V_{st}=50$ см^3 экстремальные характеристики будут наблюдаться при $v_э=2{,}8$ мл/мин, при этом $c^э_{\text{макс}}/Q=5{,}6\cdot 10^{-3}$ мл$^{-1}$, $\Delta V_э=205$ мл, $(V_c^*-V_{cb})_э=70{,}0$ мл, $(V_a^*-V_{cb})_э=98{,}0$ мл, $(V_a^*-V_c^*)_э=28$ мл. Для сравнения – движение того же вещества в условиях предельно квазиравновесного режима ($\lambda\geqslant 30$) в системе с теми же заданными параметрами будет осуществляться при $v<0{,}1$ мл/мин; при этом характеристики зоны будут: $c_{\text{макс}}/Q>0{,}02$ мл$^{-1}$, $\Delta V<50$ мл, $V_c^*-V_{cb}\approx V_a^*-V_{cb}\approx 150$ мл, $V_a^*-V_c^*\approx 0$, $K^*_{a,c}\approx 1$, $0{,}95\leqslant\xi\leqslant 1$.

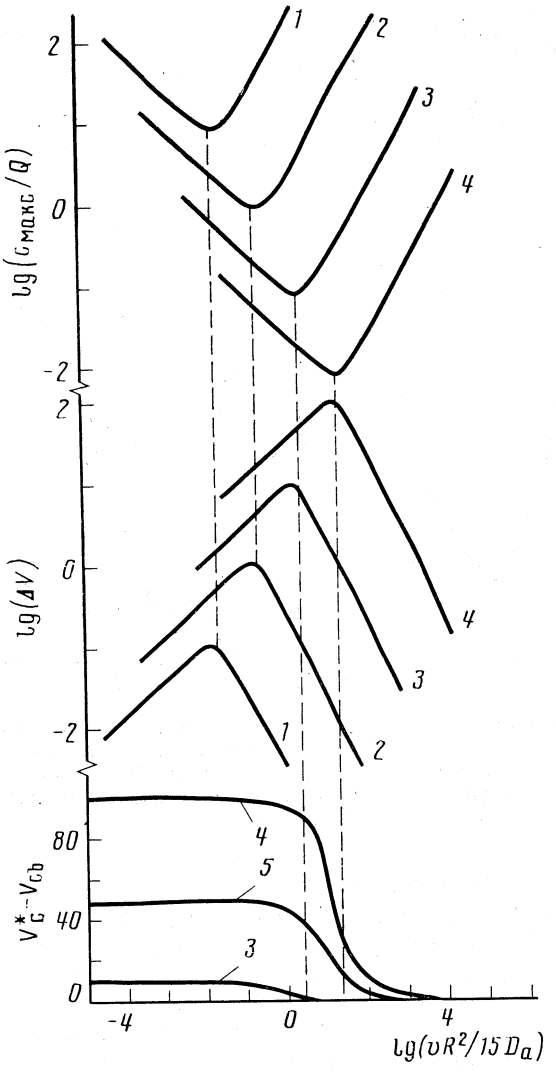


Рис. 3. Влияние параметров v (при R=const) или R^2 (при v=const) или vR^2 на высоту, ширину и объем задержки зоны; Г, D_a=const; ГV_{st}: *1* – 0,1; *2* – 1; *3* – 10; *4* – 100; *5* – 50 мл; размерность характеристик: $c_{макс}/Q$ – мл$^{-1}$, ΔV – мл; ($V_c^* - V_{cb}$) – мл

Каждая из универсальных кривых может быть преобразована во множество «частных» кривых экстремального вида в координатах $X - \lg \Pi$, где П — «индивидуальный» или «комплексный» параметр. Примеры «комплексных» параметров — ГD_a, vR^2, $V_{st}v^{-1}$, D_aR^{-2} и др.; они представляют собой произведения из индивидуальных параметров, входящие в выражение (2) для λ. Пример частных экстремальных кривых приведен на рис. 3. В отличие от универсальных кривых *3*, *5*, *6* на рис. 1 «частные» кривые для высоты, ширины и объема задержки зоны (на рис. 3) — более информативны с точки зрения влияния «комплексных» параметров $vR^2/15D_a$ и ГV_{st}. Отчетливо видно, что при малых скоростях элюции (или мелких зернах) экстремум любой характеристики наблюдается на коротких колонках, а при больших u (или крупных зернах) — на более длинных колон-

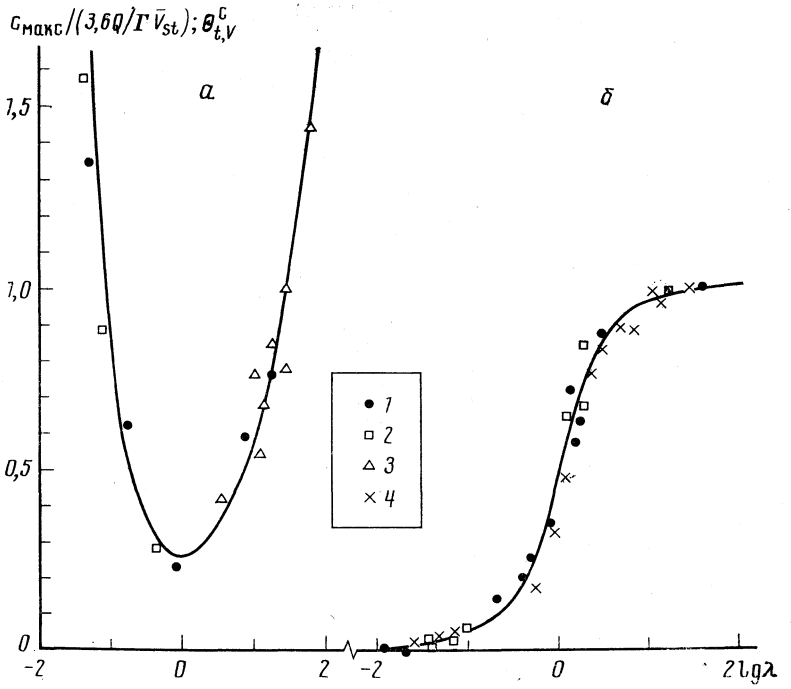


Рис. 4. Универсальные кривые для высоты (*а*) и объема задержки (*б*) выходной зоны. Сплошные кривые – теория. Точки – эксперимент для окситетрациклина (*1*), тетрациклина (*2*) в колонке с катионитом Дауэкс 50×4; для витамина B_{12} (*3*) в колонке с биогелем Р-100; для альбумина (*4*) в колонке с пористым стеклом СМП-1М-1000

ках. Эта особенность однозначно следует из (3) при Г, D_a=const. Другие особенности (рис. 3): падение $c^{э}_{макс}$, рост $\Delta V_э$ и $(V_c^* - V_{cb})_э$ с увеличением параметров $(vR^2/15D_a)_э$ и $(\Gamma V_{st})_э$ – следствие общих формул (4)–(6).

Эксперимент подтверждает существование «частных» экстремальных зависимостей: для движения зоны белка через колонку с пористым стеклом (случай ситовой хроматографии) при варьировании u [7]: для движения органического иона окситетрациклина через колонку с катионитом (случай ионообменной хроматографии) путем варьирования u или R [7]. На рис. 4 предпринята попытка путем варьирования параметров u, R, Г, D_a, h экспериментально доказать существование универсальных зависимостей экстремального типа. Для этого использовали экспериментальные данные по элюции двух близких антибиотиков (окситетрациклина (ОТЦ) и тетрациклина (ТЦ)) через колонку с ионитом, а также данные по элюции витамина B_{12} через биогель и сывороточного альбумина через пористое стекло. Опыты проводили по общепринятым методикам. Порцию вещества вводили в колонку методом «поршня», после чего колонку промывали соответствующим раствором постоянного состава. По существу в опытах варьировали не только перечисленные параметры, но и типы компонентов, пористых материалов, элюентов (таблица). Несмотря на многообразие варьируемых условий опытов, экспериментальные точки удовлетворительно располагаются около теоретических кривых. Тем самым существование универсальных кривых с экстремальными свойствами доказано как теоретически, так и экспериментально.

Вещество	Г	$D_a \cdot 10^{10}$, см²/с	R, мкм	u, см/мин	V_{st}, см³	s, см²
ОТЦ	111	16	49	0,8–21	1,53	0,35
ТЦ	210	4,5	455	0,8–21	1,53	0,35
B_{12}	0,85	2700	105	0,5–3	10–40	0,965
Альбумин	0,42	430	50	0,15–9	15	0,95

Примечание. Для ОТЦ и ТЦ элюент — 1 н. раствор NaCl, pH 1,6; для витамина B_{12} и сывороточного альбумина — физиологический раствор 0,15 н. NaCl, pH 7,4.

По результатам работы можно сделать следующие практические рекомендации: при фракционировании веществ желательно избегать условий эксперимента, обеспечивающих реализацию экстремальных характеристик для любого компонента; необходимо обеспечить достаточно высокую точность анализа выходных кривых для компонентов, которые движутся в условиях, близких к экстремальным ($0{,}5<\lambda<1{,}5$) — в противном случае можно придти к непредсказуемой картине в поведении их характеристик движения.

Список литературы

1. *Мясников И. А., Гольберт К. А.* // Журн. физ. химии. 1953. Т. 27. С. 1311.
2. *Лебедев Ю. Я., Самсонов Г. В.* // Коллоид. журн. 1975. Т. 37. № 6. С. 1109.
3. *Елькин Г. Э., Лебедев Ю. Я., Самсонов Г. В.* // Высокомолекуляр. соединения. А. 1975. Т. 17. № 8. С. 1870.
4. *Лебедев Ю. Я.* // Журн. физ. химии. 1980. Т. 54. № 7. С. 1822.
5. *Коликов В. М., Мчедлишвили Б. В., Лебедев Ю. Я., Красильников И. В.* // Коллоид. журн. 1977. Т. 39. № 3. С. 562.
6. *Лебедев Ю. Я.* // Журн. физ. химии. 1988. Т. 62. № 9. С. 2387.
7. *Лебедев Ю. Я.* // Там же. 1989. Т. 63. № 4. С. 1128.
8. *Лебедев Ю. Я.* // Там же. 1989. Т. 63. № 11. С. 2991.
9. *Лебедев Ю. Я.* // Там же. 1990. Т. 64. № 3. С. 755, 761.

Ленинградский государственный
технический университет

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

Андреев В. П., Хидекель М. И.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ КАПИЛЛЯРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА ОТКРЫТЫХ КОЛОНКАХ

Изложена математическая модель хроматографического процесса в открытой капиллярной колонке с учетом анизотропной диффузии в слое сорбента конечной толщины. Получены аналитические выражения для координаты максимума пробы, дисперсии и ВЭТТ. Сопоставлены результаты и обсужден вопрос применимости настоящей модели и известной теории Голея при увеличении фактора емкости колонки.

В связи с развитием и все большей миниатюризацией жидкостной хроматографии на открытых капиллярных колонках (ОКК) [1, 2] большое значение приобретает построение адекватной математической модели и оптимизация на ее основе колонок и режимов разделения. В настоящее время наиболее широко используется модель Голея [3], разработанная первоначально для газовой хроматографии. При этом как в работе [3], так и в более поздних работах [4, 5] отношение толщины слоя неподвижной фазы к радиусу колонки принималось величиной много меньшей единицы, что позволяло считать задачу массопереноса в неподвижной фазе одномерной.

В последнее время стали применяться открытые колонки диаметром до 5 мкм и можно ожидать дальнейшего уменьшения диаметра колонки. При этом толщина слоя неподвижной фазы и радиус колонки становятся соизмеримыми и одномерное приближение вряд ли допустимо. Цель данной работы состояла в том, чтобы исключить указанное предположение и построить модель, пригодную для произвольных ОКК.

Рассмотрим капилляр, на стенки которого нанесен слой сорбента (неподвижная фаза). В свободной, т. е. не занятой сорбентом, области капилляра, имеется установившийся ламинарный поток вязкой несжимаемой жидкости (профиль скорости потока — пуазейлевский). Радиус свободной зоны капилляра — a, толщина нанесенного на стенки неподвижного слоя — δ. В момент времени $t=0$ в свободную область капилляра вбрасывается проба, концентрацию которой будем считать малой. Проба движется вместе с потоком жидкости, одновременно с этим происходит перераспределение вещества между подвижной и неподвижной фазами, что сказывается на скорости перемещения и на размывании пробы. Считая задачу симметричной относительно поворота вокруг оси x ($\partial/\partial\varphi\equiv 0$), запишем уравнения, описывающие движение пробы в областях $0\leqslant r<a$ и $a<r<a+\delta$. При этом функции и параметры, относящиеся к первой области, будем обозначать индексом «1», относящиеся ко второй области — индексом «2» (систе-

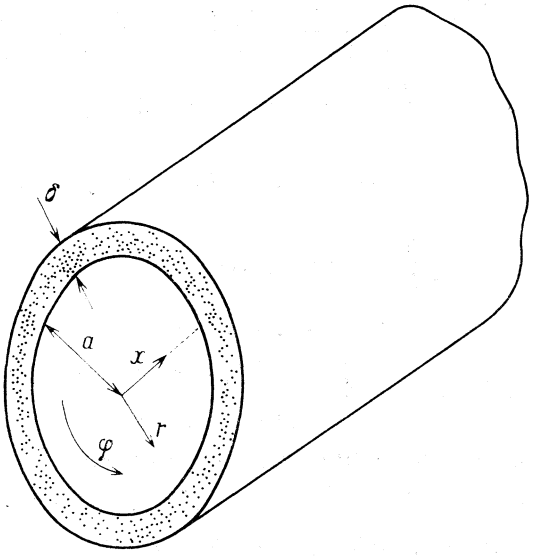


Рис. 1. Схематическое изображение ОКК и система координат

ма координат показана на рис. 1)

$$\frac{\partial c_1}{\partial t} + u_{\text{макс}}\left[1 - \frac{r^2}{a^2}\right]\frac{\partial c_1}{\partial x} = D_1\left[\frac{1}{r}\frac{\partial}{\partial r}\left[r\frac{\partial c_1}{\partial r}\right] + \frac{\partial^2 c_1}{\partial x^2}\right], \tag{1}$$

$$\frac{\partial c_2}{\partial t} = D_2{}^r\frac{1}{r}\frac{\partial}{\partial r}\left[r\frac{\partial c_2}{\partial r}\right] + D_2{}^x\frac{\partial^2 c_2}{\partial x^2}. \tag{2}$$

При записи уравнения (2) мы считали, что неподвижная фаза может обладать анизотропными свойствами. Запишем граничные условия для поставленной задачи

$$\frac{\partial c_1}{\partial r} = 0 \quad \text{при} \quad r=0, \tag{3}$$

$$\frac{\partial c_2}{\partial r} = 0 \quad \text{при} \quad r=a+\delta, \tag{4}$$

$$D_1\frac{\partial c_1}{\partial r} = D_2{}^r\frac{\partial c_2}{\partial r} \quad \text{при} \quad r=a, \tag{5}$$

$$c_1 = kc_2 \text{ при } r=a. \tag{6}$$

Относительно начального условия будем считать:

$$c_i(0,x,r) = \begin{cases} c_0 f(x,r), & \text{если} \quad i=1 \\ 0, & \text{если} \quad i=2. \end{cases} \tag{7}$$

Запишем задачу (1)—(7) в безразмерном виде

$$\frac{\partial \vartheta_1}{\partial \tau} + [1-R^2]\frac{\partial \vartheta_1}{\partial X} = \frac{1}{R}\frac{\partial}{\partial R}\left[R\frac{\partial \vartheta_1}{\partial R}\right] + \frac{1}{\text{Pe}^2}\frac{\partial^2 \vartheta_1}{\partial X^2}, \tag{8}$$

$$\frac{\partial \vartheta_2}{\tau} = \frac{\beta}{R}\frac{\partial}{\partial R}\left[R\frac{\partial \vartheta_2}{\partial R}\right] + \frac{a}{\mathrm{Pe}^2}\frac{\partial^2 \vartheta_2}{\partial X^2}, \tag{9}$$

$$\frac{\partial \vartheta_1}{\partial R} = 0 \quad \text{при} \quad R=0, \tag{10}$$

$$\frac{\partial \vartheta_2}{\partial R} = 0 \quad \text{при} \quad R=1+d, \tag{11}$$

$$\frac{\partial \vartheta_1}{\partial R} = \beta\frac{\partial \vartheta_2}{\partial R} \quad \text{при} \quad R=1, \tag{12}$$

$$\vartheta_1 = k\vartheta_2 \text{ при } R=1, \tag{13}$$

$$\vartheta_i(0, X, R) = \begin{cases} F(X,R), & \text{если} \quad i=1 \\ 0, & \text{если} \quad i=2. \end{cases} \tag{14}$$

При этом были введены следующие безразмерные переменные и комплексы:

$$\vartheta_i = c_i/c_0,\ R = r/a,\ X = D_1 x/u_{\text{макс}}a^2,\ \tau = D_1 t/a^2,$$

$$\mathrm{Pe} = u_{\text{макс}}a/D_1,\ \alpha = D_2^x/D_1,\ \beta = D_2^r/D_1.$$

Мы будем искать не само распределение $\vartheta_i(\tau, X, R)$, а моменты этого распределения. Введем определение момента порядка «n»

$$\mu_{n,i}(\tau, R) = \int_{-\infty}^{\infty} X^n \vartheta_i(\tau, X, R)\, dX, \quad n=0, 1, 2, \ldots, \quad i=1, 2. \tag{15}$$

Уравнения для определения моментов $\mu_{n,i}$ получаются из (8) и (9) после интегрирования по оси X с соответствующим весом X^n

$$\frac{\partial \mu_{n,1}}{\partial \tau} - \frac{1}{R}\frac{\partial}{\partial R}\left[R\frac{\partial \mu_{n,1}}{\partial R}\right] = n[1-R^2]\,\mu_{n-1,1} + n(n-1)\,\mu_{n-2,1}/\mathrm{Pe}^2, \tag{16}$$

$$\frac{\partial \mu_{n,2}}{\partial \tau} - \frac{\beta}{R}\frac{\partial}{\partial R}\left[R\frac{\partial \mu_{n,2}}{\partial R}\right] = \frac{a}{\mathrm{Pe}^2}\,n(n-1)\,\mu_{n-2,2}. \tag{17}$$

Граничные и начальные условия для $\mu_{n,i}$ получаются аналогично

$$\frac{\partial \mu_{n,1}}{\partial R} = 0 \quad \text{при} \quad R=0, \tag{18}$$

$$\frac{\partial \mu_{n,2}}{\partial R} = 0 \quad \text{при} \quad R=1+d, \tag{19}$$

$$\frac{\partial \mu_{n,1}}{\partial R} = \beta\frac{\partial \mu_{n,2}}{\partial R} \quad \text{при} \quad R=1, \tag{20}$$

$$\mu_{n,1} = k\mu_{n,2} \text{ при } R=1, \tag{21}$$

$$\mu_{n,i}(0, R) = \begin{cases} P_n(R) = \int_{-\infty}^{+\infty} X^n F(X,R)\, dR, & \text{если} \quad i=1. \\ 0, & \text{если} \quad i=2. \end{cases} \tag{22}$$

Известно, что решение задач типа (16)–(22) содержит члены трех типов: а) независящие от времени, б) пропорциональные τ^n и в) экспоненциально убывающие во времени. Ясно, что для достаточно больших времен, а именно для времен много больших, чем характерное «диффузионное» время $\tau_{\text{диф}} = \max_i (a^2/D_i)$, в решении можно пренебречь слагаемыми третьего типа.

В связи с тем, что в хроматографических установках детектирование, как правило, производится интегрально по сечению канала, занятому подвижной фазой, практическое значение будут иметь осредненные по сечению моменты

$$\bar{\mu}_{n,i}(\tau) = 2\int_0^1 \mu_{n,i}(\tau, R) R\, dR.$$

Время хроматографического эксперимента, как правило, много больше $\tau_{\text{диф}}$. Для достаточно больших времен можно считать, что распределение ϑ_i является нормальным, и, следовательно, для его описания достаточно найти три характеристики:

1) площадь пика – $\bar{\mu}_{0,i}(\tau)$;
2) координату максимума пика – $\eta_i(\tau) = \bar{\mu}_{1,i}/\mu_{0,i}$;
3) дисперсию пика – $\sigma_i^2(\tau) = \bar{\mu}_{2,i}/\bar{\mu}_{0,i} - \eta_i^2$.

Зная перечисленные характеристики, мы можем записать

$$\vartheta_i(\tau, X) = \bar{\mu}_{0,i}(\tau) \exp[-\{X-\eta_i(\tau)\}^2/2\sigma_i^2(\tau)]/[2\pi\sigma_i^2(\tau)]^{1/2}.$$

Для больших времен $\tau \gg \tau_{\text{диф}}$ решение задачи (17)–(22) для первых трех моментов ($n=1, 2, 3$) будем искать в виде

$$\mu_{n,i}(\tau, R) = \varkappa_{n,i}\tau^2 + \omega_{n,i}(R)\tau + \nu_{n,i}(R), \quad i=1, 2. \tag{23}$$

Опуская математические подробности приведем здесь выражения, полученные для $\bar{\mu}_{0,i}$, $\eta_i(\tau)$ и $\sigma_i^2(\tau)$

$$\bar{\mu}_{0,i} = \gamma k G_0, \tag{24}$$

$$\eta_i(\tau) = k\gamma\tau/4 + G_1/G_0 + {}^1/_{12} + k\gamma(6-7\beta)/96\beta - k^2\gamma^2((2-\beta)/64\beta - k\gamma^2 d(d+2)[1+ \\ +3(1+d)^2]/64\beta + k\gamma^2(1+d)^4\ln(1+d)/16\beta, \tag{25}$$

$$\sigma_i^2(\tau) = k\gamma\tau\{G_1/G_0 + [1+\alpha d(d+2)/k]/\mathrm{Pe}^2 + 11/192 + k\gamma(3-4\beta)/96\beta + \\ + k^2\gamma^2(\beta-2)/128\beta - k\gamma^2 d(d+2)[1+3(1+d)^2]/128\beta + \\ + k\gamma^2(1+d)^4\ln(1+d)/32\beta\} + F(k, d, \beta, \alpha), \tag{26}$$

где

$$G_k = \int_0^1 P_k(R) R\, dR = \text{const}, \qquad k=1, 2;$$

$$\gamma = 2/(k+d(2+d)).$$

Функция $F(k, d, \beta, \alpha)$, входящая в (26), не приводится здесь в явном виде из-за своей громоздкости. Кроме того очевидно, что вклад этой функции в дисперсию $\sigma_i^2(\tau)$ будет уменьшаться с ростом времени.

Зная координату центра максимума $\eta_i(\tau)$ и дисперсию $\sigma_i^2(\tau)$ пика, мы можем определить высоту эффективной теоретической тарелки (ВЭТТ)

$$H = \sigma_i^2(\tau)/\eta_i(\tau)$$

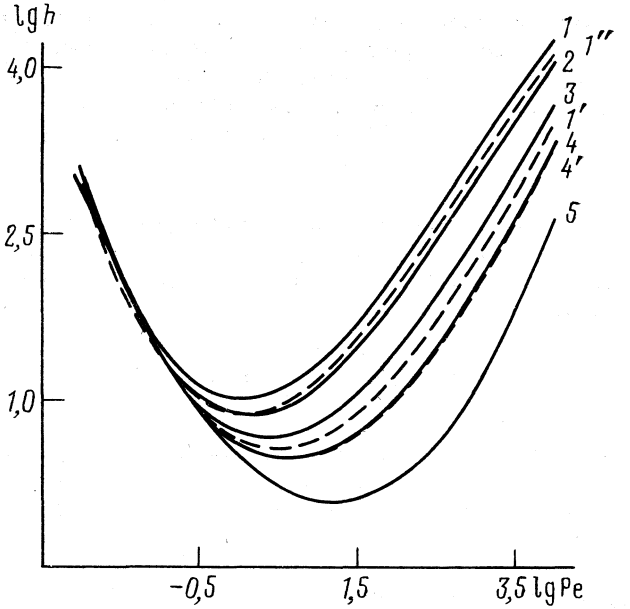


Рис. 2. Зависимости приведенной ВЭТТ от числа Пекле для различных факторов емкости: K=300 (*1*, *1'*, *1''*), 125 (*2*), 21 (*3*), 2,01 (*4*, *4'*), 0,0 (*5*) (длина ОКК равна 100 см, $\alpha=\beta=10^{-3}$). Кривые *1*, *2*, *3* и *4* построены по нашей теории ($k=10^{-2}$, d=1,0; 0,5; 0,1; 0,01); *1'* и *4'* – по формуле (29), *1''* – по формуле (28); *5* – по формуле (27)

или приведенную ВЭТТ

$$h=\mathrm{Pe}\,H(\tau).$$

Если параметры d, α, β стремятся к нулю, то наше решение вырождается в известную формулу Тейлора [6], описывающую размывание вещества, движущегося в канале с несорбирующими стенками и которая в принятой здесь системе обезразмеривания имеет следующий вид:

$$h=4/\mathrm{Pe}+\mathrm{Pe}/48. \qquad (27)$$

Уравнение Голея [3] для приведенной ВЭТТ в наших обозначениях может быть записано следующим образом:

$$h=4/\mathrm{Pe}+\mathrm{Pe}\,(1+6K+11K^2)/48\,(1+K)^2+4\mathrm{Pe}\,Kd^2/3\beta\,(1+K)^2. \qquad (28)$$

Фактор емкости K, входящий в уравнение Голея, связан с использовавшимся нами коэффициентом распределения между подвижной и неподвижной фазами k простым соотношением

$$K=d(d+2)/k.$$

Когда d мало, последним слагаемым в выражении (28) можно пренебречь и, следовательно, будем иметь

$$h=4/\mathrm{Pe}+\mathrm{Pe}\,(1+6K+11K^2)/48\,(1+K)^2. \qquad (29)$$

Редуцированная формула Голея (29) получается из нашего решения, если d и α стремятся к нулю, а β=1. Формула Голея (28), учитывающая диффузию вещества в неподвижной фазе, также может быть выделена из

нашего решения, которое, однако, помимо членов, входящих в (28), содержит и другие слагаемые, описывающие массоперенос в неподвижном слое.

На рис. 2 показаны зависимости приведенной ВЭТТ от числа Пекле для различных факторов емкости K, полученные из расчетов, выполненных как по изложенной здесь теории, так и по формулам Голея (28) и (29). Из рисунка следует, что для малых K результаты нашей теории и теории Голея практически совпадают. Для больших K видно, что уравнение (29) дает заниженные по сравнению с нашими данными значения ВЭТТ. В работе [7] было проведено сравнение экспериментальных значений h для тонких ОКК с полученными по (29), показавшее, что экспериментальные ВЭТТ существенно превосходят теоретические. Это различие объяснялось [2] значительным экстраколоночным размыванием вещества. Теперь же очевидно, что помимо экстраколоночного размывания несовпадение экспериментальных и теоретических данных было обусловлено отсутствием (29) члена, описывающего массоперенос в неподвижной фазе.

Расчет по формуле (28) дает значения h, превышающие результаты, полученные по (29), но меньшие, чем получаются по нашей теории (на 24,5% в области минимума h). Тот факт, что наша модель строилась на основании более адекватно отражающей действительность постановки задачи и то, что (28) входит в наше решение как составная часть, позволяет надеяться, что изложенная выше теория более точна. Окончательно этот вопрос может быть разрешен в ходе специальной серии экспериментов. Отметим, что оптимальные значения Pe, т. е. скорости прокачки растворителя, соответствующие минимумам кривых *1*, *1′* и *1″*, отличаются друг от друга примерно в 1,5 раза, что делает вопрос об определении адекватной модели достаточно актуальным.

Список литературы

1. *Беленький Б. Г., Ганкина Э. С., Мальцев В. Г.* Капиллярная жидкостная хроматография. Л.: Наука, 1987.
2. *Kennedy R. T., Oates M. D., Cooper B. R. et al.* // Science. 1989. V. 246. P. 57.
3. *Goley M. J. E.* // Gas Chromatography 1958. L.: Butterworths, 1959. P. 36.
4. *Золотарев П. П., Максимычева М. А., Угрозов В. В.* // Журн. физ. химии. 1985. Т. 59. № 11. С. 2769.
5. *Максимычева М. А., Угрозов В. В., Золотарев П. П.* // Там же. 1986. Т. 60. № 7. С. 1697.
6. *Taylor G.* // Proc. Royal Soc. (London). 1953. V. 219A. № 1136. P. 186.
7. *Tsuda T., Nakagawa G.* // J. Chromatogr. 1983. V. 268. № 3. P. 369.

Академия наук СССР
Институт аналитического приборостроения
Ленинград

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

Андреев В. П., Хидекель М. И.

О ВЛИЯНИИ СТЕНОК КАНАЛА ПРИ ПРОТОЧНОМ ФРАКЦИОНИРОВАНИИ МАКРОМОЛЕКУЛ НА ВРЕМЯ РАЗДЕЛЕНИЯ

Рассмотрена трехмерная модель проточного фракционирования в канале прямоугольного сечения. Показано, что влияние боковых стенок канала приводит к изменению характеристик разделения макромолекул. На основе построенной трехмерной модели проанализированы различные способы ввода пробы в канал проточного фракционирования.

Метод проточного фракционирования (ПФ) веществ в полях различной физической природы имеет уже более чем двадцатилетнюю историю [1]. Основная идея метода и его возможности подробно рассмотрены в ряде обзоров [2—6]. Область применения ПФ весьма широка, метод с успехом применялся для разделения частиц вещества, масса которых лежала в диапазоне от 10^3 до 10^{16} а. е. м. [7]. К настоящему времени предложено значительное число вариантов методик ПФ, отличающихся как по виду поперечного поля, обеспечивающего миграцию частиц к стенкам канала, так и по геометрии канала. Однако на сегодняшний день наиболее часто для ПФ используются каналы с прямоугольным сечением.

В большинстве работ, посвященных моделированию процессов ПФ, решалась двумерная задача [8—11], что обосновывалось малостью отношения глубины b к ширине канала w (обычно отношение $a=w/b$ имеет порядок 10—100). Однако разсогласование между данными экспериментов и результатами двумерного анализа оказалось значительным. В работе [12], в которой исследовалось влияние боковых стенок канала, было показано, что даже для $a=100$ нельзя пренебрегать эффектами, обусловленными трехмерностью канала.

С другой стороны очевидно, что форма начального распределения вводимой в канал пробы может существенно влиять на характеристики разделения. Двумерная же теория принципиально не позволяет рассмотреть этот вопрос в полном объеме. В связи с вышесказанным становится ясно, что построение трехмерной модели ПФ и анализ на ее основе различных способов ввода пробы является актуальной задачей, которой и посвящена настоящая работа.

Задача состоит в определении концентрации пробы, которая переносится по каналу прямоугольного сечения установившимся ламинарным потоком растворителя и взаимодействует с внешним полем, приложенным перпендикулярно потоку. Концентрацию пробы будем считать малой.

Скорость пробы будет складываться из двух составляющих (рис. 1): вдоль оси канала вместе с потоком растворителя — u и под действием внешней силы перпендикулярно оси канала — v. Скорость поперечного смеще-

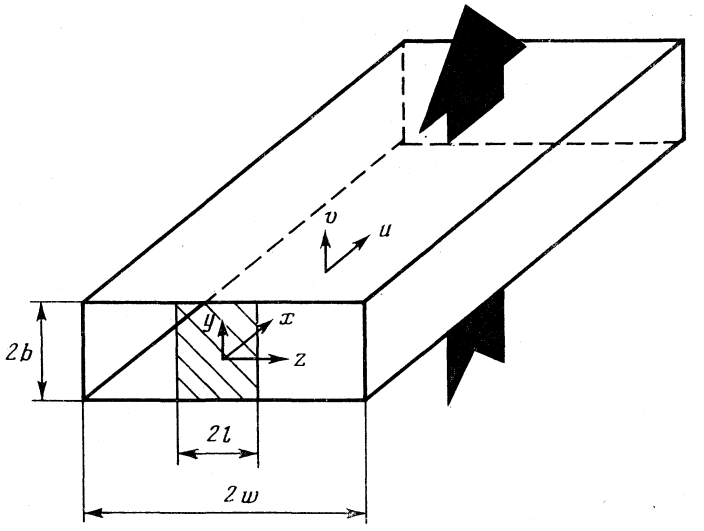


Рис. 1. Схематическое изображение канала для проточного фракционирования и система координат; u – скорость продольного потока; v – скорость поперечного смещения частиц пробы под действием внешнего поля, которое обозначено темной стрелкой; $2l$ – ширина «столбика» начального распределения пробы при шприцевом вводе

ния компонент пробы v будем считать постоянной

$$v=\text{const}. \tag{1}$$

В различных вариантах ПФ добиваются выполнения условия (1) разными способами [2]. При названных условиях концентрация пробы в безразмерном виде описывается следующим образом:

$$\frac{\partial\theta}{\partial\tau}+\bar{u}(Y,Z)\frac{\partial\theta}{\partial X}+\mathrm{Pe}\frac{\partial\theta}{\partial Y}=\frac{1}{\mathrm{Pe}_*^2}\frac{\partial^2\theta}{\partial X^2}+\frac{\partial^2\theta}{\partial Y^2}+\frac{1}{a^2}\frac{\partial^2\theta}{\partial Z^2}, \tag{2}$$

$$\frac{\partial\theta}{\partial Y}-\mathrm{Pe}\,\theta=0 \quad \text{при} \quad Y=\pm1, \tag{3}$$

$$\frac{\partial\theta}{\partial Z}=0 \quad \text{при} \quad Z=\pm1, \tag{4}$$

$$\theta(0,\ X,\ Y,\ Z)=H_1(X)H_2(Y)H_3(Z). \tag{5}$$

Выше были введены следующие обозначения:

$$\theta=c/c_0,\ X=xD/b^2u_{\text{макс}},\ Y=y/b,\ Z=z/w,\ \tau=tD/b^2,$$

$$a=w/b,\ \mathrm{Pe}=vb/D,\ \mathrm{Pe}_*=u_{\text{макс}}b/D;$$

$$\bar{u}(Y,Z)=u/u_{\text{макс}}=4\sum_{r=0}^{\infty}(-1)^r[1-\mathrm{ch}(\varphi_r aZ)/\mathrm{ch}(\varphi_r a)]\cos(\varphi_r Y)/\varphi_r^3. \tag{6}$$

Заметим, что в связи с тем, что детектирование производится интегрально по сечению канала, нас, вообще говоря, интересует усредненная по сечению

концентрация пробы

$$\bar{\theta}(\tau, X)=\int_{-1}^{1}\int_{-1}^{1}\theta(\tau, X, Y, Z)\,dY\,dZ/4.$$

Согласно обобщенной дисперсионной теории [10, 12], средняя по сечению концентрация описывается следующим уравнением:

$$\frac{\partial\bar{\theta}}{\partial\tau}=\sum_{k=1}^{\infty}K_k(\tau)\frac{\partial^k\bar{\theta}}{\partial X^k}, \tag{7}$$

где

$$K_k(\tau)-\delta_{k2}/\mathrm{Pe}_*^2=-\int_{-1}^{1}\int_{-1}^{1}\bar{u}(Y, Z)f_{k-1}(\tau, Y, Z)\,dY\,dZ/4. \tag{8}$$

Здесь и далее δ_{ij} – символ Кронекера.

Уравнения, граничные и начальное условия для функций $f_k(\tau)$, входящих в (8), можно легко получить из исходной задачи (2)–(5)

$$\frac{\partial f_k}{\partial\tau}+\mathrm{Pe}\frac{\partial f_k}{\partial Y}-\frac{\partial^2 f_k}{\partial Y^2}-\frac{1}{a^2}\frac{\partial^2 f_k}{\partial Z^2}=f_{k-2}/\mathrm{Pe}_*^2-\bar{u}f_{k-1}-\sum_{i=1}^{\infty}f_{k-i}K_i, \tag{9}$$

$$\frac{\partial f_k}{\partial Y}-\mathrm{Pe}\,f_k=0 \quad \text{при} \quad Y=\pm1, \quad k=0, 1, 2, \ldots, \tag{10}$$

$$\frac{\partial f_k}{\partial Z}=0 \quad \text{при} \quad Z=\pm1, \quad k=0, 1, 2, \ldots, \tag{11}$$

$$f_k(0, Y, Z)=\delta_{k0}4H_2(Y)H_3(Z)\Big/\int_{-1}^{1}\int_{-1}^{1}H_2(Y)H_3(Z)\,dY\,dZ, \tag{12}$$

где $f_k=0$, если $k<0$.

Для достаточно больших времен, т. е. для времен, сравнимых с характерным диффузионным временем, распределение средней по сечению канала концентрации $\bar{\theta}$ можно считать гауссовским и тогда для описания $\bar{\theta}$ достаточно сохранить в (7) два первых члена

$$\frac{\partial\bar{\theta}}{\partial\tau}=K_1\frac{\partial\bar{\theta}}{\partial X}+K_2\frac{\partial^2\bar{\theta}}{\partial X^2}.$$

В этом случае координата максимума и дисперсия пика пробы будут

$$X_{\text{макс}}=-\int_0^{\tau}K_1(\tau')\,d\tau',$$

$$\sigma^2(\tau)=\int_{-\infty}^{\infty}X_1^2\bar{\theta}\,dX_1\Big/\int_{-\infty}^{\infty}\bar{\theta}\,dX_1=2\xi+\int_{-\infty}^{\infty}X^2H_1(X)\,dX\Big/\int_{\infty}^{\infty}H_1(X)\,dX.$$

Решая последовательно задачу (9)–(12) для $k=0$ и $k=1$ и подставляя результат в (8), получим

$$K_1(\tau)=-\Big[A_0F+\sum_{i=1}^{\infty}A_iR_i\exp(-\gamma_i{}^2\tau)+\sum_{j=1}^{\infty}A_jQ_j\exp(-\mu_j{}^2\tau)+$$

$$+\sum_{i=1}^{\infty}\sum_{j=1}^{\infty}A_{ij}L_{ij}\exp(-\lambda_{ij}{}^2\tau)\Big]\Big/4, \qquad (13)$$

$$K_2(\tau)-1/\mathrm{Pe}_*{}^2=X_{\text{макс}}(\tau)\,[K_1(\tau)-K_1(\infty)]-\Big[\sum_{m=1}^{\infty}M_{m0}(\tau)R_m+$$

$$+\sum_{n=1}^{\infty}M_{0n}(\tau)Q_n+\sum_{m=1}^{\infty}\sum_{n=1}^{\infty}M_{mn}(\tau)L_{mn}\Big]\Big/4, \qquad (14)$$

где

$$A_0=4/\|\chi_0\|^2\|\psi_0\|^2=\mathrm{Pe}/\mathrm{sh}(\mathrm{Pe}),$$

$$A_i=4\int_{-1}^{1}H_2(Y)\exp(-\mathrm{Pe}\,Y)\chi_i(Y)\,dY\Big/\Big[\|\chi_i\|^2\|\psi_0\|^2\int_{-1}^{1}H_2(Y)\,dY\Big],$$

$$A_j=4\int_{-1}^{1}H_3(Z)\psi_j(Z)\,dZ\Big/\Big[\|\chi_0\|^2\|\psi_j\|^2\int_{-1}^{1}H_3(Z)\,dZ\Big],$$

$$A_{ij}=A_iA_j/A_0,$$

$$\|\chi_i\|^2=\delta_{0i}2\,\mathrm{sh}(\mathrm{Pe})/\mathrm{Pe}+(1-\delta_{0i})\,(1+G_i{}^2),$$

$$\|\psi_j\|^2=2\delta_{0j}+(1-\delta_{0j}),$$

$$F=\int_{-1}^{1}\int_{-1}^{1}\bar{u}(Y,Z)\chi_0(Y)\psi_0(Z)\,dY\,dZ,$$

$$R_i=\int_{-1}^{1}\int_{-1}^{1}\bar{u}(Y,Z)\chi_i(Y)\psi_0(Z)\,dY\,dZ,$$

$$Q_j=\int_{-1}^{1}\int_{-1}^{1}\bar{u}(Y,Z)\chi_0(Y)\psi_j(Z)\,dY\,dZ,$$

$$L_{ij}=\int_{-1}^{1}\int_{-1}^{1}\bar{u}(Y,Z)\chi_i(Y)\psi_j(Z)\,dY\,dZ,$$

$$\psi_j(Z)=\delta_{0j}+(1-\delta_{0j})\,[\delta_{2k,\,j}\cos(\omega_jZ)+\delta_{2k-1,\,j}\sin(\omega_jZ)\,],$$

$$\chi_i(Y)=\delta_{0i}\exp(\mathrm{Pe}\,Y)+(1-\delta_{0i})\exp(\mathrm{Pe}\,Y/2)\,[\cos(\omega_iY)+G_i\sin(\omega_iY)\,],$$

$$G_i=\delta_{2k,\,i}\mathrm{Pe}/2\omega_i-\delta_{2k-1,\,i}2\omega_i/\mathrm{Pe},\quad i=0,\,1,\,2,\ldots,$$

$$M_{mn}(\tau)=-\exp(-\lambda_{mn}{}^2\tau)\int_{0}^{\tau}\exp(\lambda_{mn}{}^2\tau')\rho_{mn}(\tau')\,d\tau'/(\|\chi_m\|^2\|\psi_n\|^2),$$

$$\rho_{mn}(\tau')=\int_{-1}^{1}\int_{-1}^{1}\bar{u}(Y,Z)f_0(\tau',Y,Z)\exp(-\mathrm{Pe}\,Y)\chi_m(Y)\psi_n(Z)\,dY\,dZ,$$

$$\mu_j^2=\delta_{0j}+(1-\delta_{0j})\,\omega_j^2/a^2,$$

$$\omega_j=\pi j/2,$$

$$\gamma_i^2=\delta_{0i}+(1-\delta_{0i})\,(\omega_i^2+\mathrm{Pe}^2/4),$$

$$\lambda_{ij}^2=\gamma_i^2+\mu_j^2.$$

Коэффициенты A_i, A_j и A_{ij} определяются, как видно из формул, видом начального распределения пробы. Так, для равномерного по сечению распределения пробы, что соответствует вводу пробы в канал вместе с продольным потоком, будет [13]

$$A_i=2\,\mathrm{Pe}\,\omega_i\,\mathrm{ch}\,(\mathrm{Pe}/2)\,[\omega_i\,\mathrm{th}\,(\mathrm{Pe}/2)\cos(\omega_i)+\mathrm{Pe}\sin(\omega_i)/2]\,\gamma_i^{-4},$$

$$A_j=0.$$

При шприцевом вводе пробы (диаметр иглы шприца l) коэффициент A_i остается тем же, а коэффициент A_j будет

$$A_j=2\,\mathrm{Pe}\,\delta_{2k,\,j}\sin(\omega_j l)/[\mathrm{sh}\,(\mathrm{Pe})\,\omega_j l].$$

Если при вводе пробы была проведена экспозиция за время $\tau_э$, то коэффициент A_i будет иметь вид

$$A_i=2\,\mathrm{Pe}\,\omega_i\,\mathrm{ch}\,(\mathrm{Pe}/2)\exp(-\gamma_i^2\tau_э)\,[\omega_i\,\mathrm{th}\,(\mathrm{Pe}/2)\cos(\omega_i)+\mathrm{Pe}\sin(\omega_i)/2]/\gamma_i^4,$$

а коэффициент A_j для равномерного по сечению и шприцевого распределений будет соответственно

$$A_j=0,$$

$$A_j=2\,\mathrm{Pe}\exp(-\mu_j^2\tau_э)\,\delta_{2k,\,j}\sin(\omega_j l)/[\mathrm{sh}\,(\mathrm{Pe})\,\omega_j l].$$

Что касается начального распределения пробы вдоль оси X, то для простоты положим, что в отсутствие экспозиции

$$H_1(X)=\delta(X).$$

Соответственно, после экспозиции будет

$$H_1^э(X)=\mathrm{Pe}_*\exp(-\mathrm{Pe}_*^2\,X^2/4\tau_э)/2(\pi\tau_э)^{1/2}.$$

Заметим, что приведенные выше случаи начального распределения не исчерпывают возможностей представляемой теории, которая позволяет рассматривать практически любой вид начального распределения.

На рис. 2, *а* и 2, *б* показаны соответственно зависимости $K_1(\tau)$ и $K_2(\tau)$, полученные по изложенной трехмерной и двумерной [10] теориям. Видно, что если для коэффициента конвекции K_1 имеются лишь сравнительно небольшие количественные расхождения, то для коэффициентов дисперсии K_2 наблюдается и качественное различие. В двумерном варианте $K_2(\tau)$ довольно быстро выходит на стационарное значение $K_2(\infty)$. В трехмерном же канале $K_2(\tau)$ приходит к стационарному значению за время, существенно превышающее времена, характерные для реальных экспериментов. Как количественные, так и качественные отличия трехмерной теории от двумерной отчетливо видны на рис. 3, где изображены зависимости высоты теоретической тарелки $h=\sigma^2(\tau)/X_{\text{макс}}(\tau)$ от времени.

Коэффициент конвекции $K_1(\tau)$ в трехмерном канале уменьшается до асимптотического значения за время $\tau_*\approx 3/\mathrm{Pe}$ (при наличии экспозиции $\tau_*=3/\mathrm{Pe}-\tau_э$). С другой стороны, коэффициент $K_2(\tau)$ растет во всем инте-

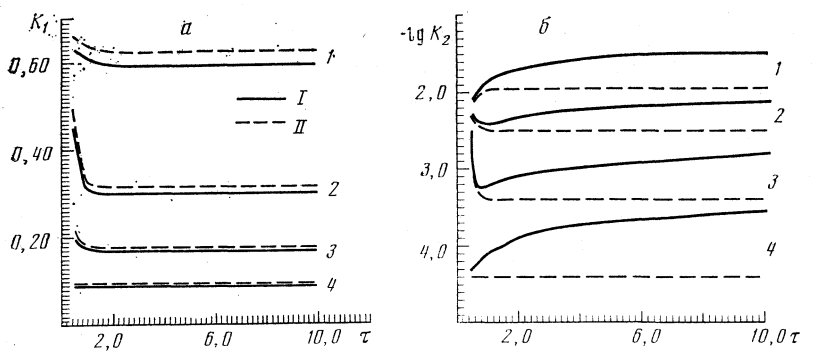


Рис. 2. Рассчитанные по трехмерной (I) и двумерной (II) теориям зависимости коэффициентов конвекции (*а*) и дисперсии (*б*) от времени, при значениях числа Пекле поперечного потока, равных 1 (*1*), 5 (*2*), 10 (*3*), 20 (*4*)

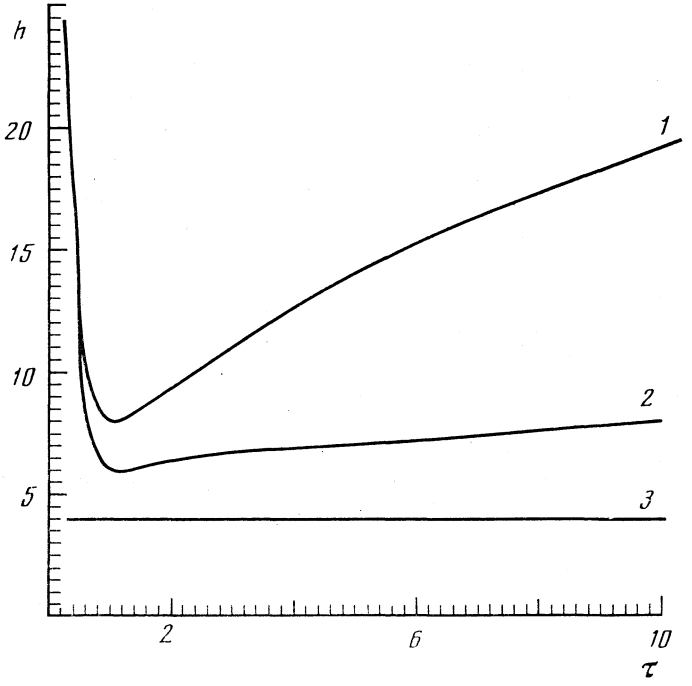


Рис. 3. Зависимости нормированной высоты теоретической тарелки от безразмерного времени для числа Pe=10: *1* – равномерное начальное распределение; *2* – распределение типа «столбик» (l=0,1); *3* – расчет по двумерной теории (экспозиция всюду отсутствует)

ресном с практической точки зрения интервале времен. Следовательно, должно существовать такое $\tau_{опт}$, при котором высота теоретической тарелки $h(\tau)$ минимальна (рис. 3). Найдено, что в зависимости от вида начального распределения $\tau_{опт} \sim 1 \div 2$. Однако для достижения достаточного разрешения обычно требуется существенно большее время эксперимента. Коэффициент разрешения K_R определяется следующим образом:

$$K_R(\tau) = |X_{макс}(tD_1/b^2, \mathrm{Pe}_1)/D_1 - X_{макс}(tD_2/b^2, \mathrm{Pe}_2)/D_2| / 2[\sigma(tD_1/b^2, \mathrm{Pe}_1)/D_1 + \sigma(tD_2/b^2, \mathrm{Pe}_2)/D_2].$$

Значения $\tau^* = l^* D_1/b^2$, при которых $K_R = 1$

Pe_1	Pe_2	I	II	III	IV	V
34	40	5,7	5,6	5,1	4,85	5,3
17	20	12,6	12,5	11,3	10,9	11,0
8	10	14,4	14,1	13,8	13,4	13,7
4	5	19,7	19,3	18,5	18,4	18,6

В таблице приведены времена $\tau^* = t^* D_1/b^2$, при которых $K_R = 1$. В тех случаях, где имеет место экспозиция, время экспозиции ($\tau_э = 1/Pe_1$) входит в величину τ^*. В таблице I и II трехмерная теория, равномерное начальное распределение без экспозиции и с экспозицией; III и IV — трехмерная теория, распределение типа «столбик» ($l = 0{,}1$) без экспозиции и с экспозицией; V — двумерная теория, экспозиция отсутствует. Из таблицы следует, что в случае шприцевого ввода пробы времена τ^* меньше, чем в случае равномерного начального распределения при тех же значениях ΔPe. Двумерная теория дает результаты, заниженные по сравнению с данными трехмерной теории и практически совпадающие со случаем шприцевого ввода пробы. Вид начального распределения, как и экспозиция, слабо влияет на коэффициент конвекции $K_1(\tau)$ и сильно на коэффициент дисперсии $K_2(\tau)$.

Поведение коэффициентов конвекции и дисперсии указывает на наличие некоторых оптимальных значений параметров разделяющей системы. Следовательно, на основании трехмерной теории можно ставить задачу об оптимизации процесса ПФ.

Список литературы

1. *Giddings J. C.* // Sep. Sci. 1966. V. 1. № 1. P. 123.
2. *Андреев В. П., Рейфман Л. С.* // Nauch. apparat. 1986. V. 1. № 3. P. 3.
3. *Андреев В. П., Семенов С. Н., Кузнецов А. А., Рейфман Л. С.* // Журн. физ. химии. 1986. Т. 60. № 12. С. 2913.
4. *Андреев В. П., Семенов С. Н., Кузнецов А. А., Рейфман Л. С.* // Там же. 1987. Т. 61. № 1. С. 1.
5. *Janča J.* // Separation Methods / Ed. by Z. Deyl. N. Y.: Marcel Dekker, 1984. P. 497.
6. *Janča J., Kleparnik K., Janova V., Chmelik L.* // J. Liq. Chromatography. 1984. V. 7. Suppl. 1. P. 1.
7. *Giddings J. C.* // J. Chromatogr. 1976. V. 25. P. 3.
8. *Giddings J. C.* // J. Chem. Phys. 1968. V. 49. № 1. P. 81.
9. *Lee H. L., Lightfoot E. N.* // Sep. Sci. and Tech. 1976. V. 11. P. 417.
10. *Krishnamurthy S., Subramanian R. S.* // Ibid. 1977. V. 12. № 4. P. 347.
11. *Jayaraj K., Subramanian R. S.* // Ibid. 1978. V. 13. № 9. P. 791.
12. *Takahashi T., Gill W. N.* // Chem. Eng. Commun. 1980. V. 5. P. 367.
13. *Андреев В. П., Хидекель М. И.* // Nauch. apparat. 1989. V. 4. № 4. P. 123.

Академия наук СССР
Институт аналитического приборостроения
Ленинград

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

Андреев В. П., Казакова Л. Б.

СТУПЕНЧАТОЕ ПРОГРАММИРОВАНИЕ ПОПЕРЕЧНОЙ СКОРОСТИ ПРИ ГИДРОДИНАМИЧЕСКОМ ПРОТОЧНОМ ФРАКЦИОНИРОВАНИИ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

С помощью обобщенной дисперсионной теории получены аналитические выражения, описывающие концентрацию пробы в канале проточного фракционирования при ступенчатом изменении во времени скорости поперечного потока. Приведены результаты расчетов по полученным формулам.

Создатель метода проточного фракционирования Дж. К. Гиддингс в первой же статье, посвященной этому методу [1], указывал, что одним из преимуществ проточного фракционирования является возможность программирования, т. е. изменение во времени степени прижатия компонентов пробы к стенке канала. В случае гидродинамического проточного фракционирования (ГПФ) это означает возможность изменения во времени скорости поперечного потока. Ситуация, иллюстрирующая возможную выгоду от программирования, выглядит следующим образом. Пусть есть смесь, состоящая из трех компонентов, причем первый и второй разделить сложнее, чем второй и третий, например, их коэффициенты диффузии (в случае ГПФ это единственный параметр, по которому идет разделение) относятся как $D_1 : D_2 : D_3 = 1/10 : 1/11 : 1/15$, тогда после выхода из канала разделенных первых двух компонентов целесообразно изменить скорость поперечного потока с тем, чтобы ускорить выход третьего компонента. Наряду со ступенчатым изменением во времени степени прижатия в [1] указывалось на возможность и непрерывного ее изменения. Результаты экспериментальной реализации ГПФ при непрерывно уменьшающейся во времени скорости поперечного потока описаны в [2]. Седиментационное проточное фракционирование при экспоненциальном убывании во времени скорости вращения центрифуги реализовано в работах [3, 4].

Теоретической моделью, доказавшей свою эффективность для анализа проточного фракционирования, является обобщенная дисперсионная теория. В частности, в [5] была показана целесообразность использования обобщенной дисперсионной теории (ОДТ) для анализа ПФ при отсутствии экспозиции, нами та же модель использовалась для оценки влияния времени экспозиции на характеристики ГПФ [6]. Преимущества ОДТ перед более простыми моделями проявляются именно там, где необходимо исследовать переходные процессы, связанные с изменением распределения концентрации пробы по поперечному сечению канала. Очевидно, что такой переходный процесс будет всегда иметь место при изменении во времени поперечного поля или потока. В то же время если о применении ОДТ к анализу экспоненциально программируемого ПФ сообщалось [7], то моделирование ступенчатого ПФ не проводилось. Настоящая работа и посвящена этому анализу.

Как известно [5], процесс ПФ описывается уравнением конвективной диффузии и условиями, имеющими в безразмерной форме следующий вид:

$$\frac{\partial\theta}{\partial\tau}+(1-Y^2)\frac{\partial\theta}{\partial X}+\mathrm{Pe}\frac{\partial\theta}{\partial Y}=\left(\frac{1}{\mathrm{Pe}_{\|}}\frac{\partial^2\theta}{\partial X^2}+\frac{\partial^2\theta}{\partial Y^2}\right), \quad (1)$$

$$\frac{\partial\theta}{\partial Y}(\tau, X, \pm 1)=\mathrm{Pe}\,\theta(\tau, X, \pm 1), \quad (2)$$

$$\theta(0, X, Y)=H_1(X)H_2(Y), \quad (3)$$

$$\theta(\tau, X, Y)\to 0, \quad X\to\infty, \quad (4)$$

где $\theta=c/c_0$, $U(Y)=u(y)/u_0=1-Y^2$, $Y=y/b$, $X=vx/b^2u_0$, $\tau=Dt/b^2$, $\mathrm{Pe}=bv/D$, $\mathrm{Pe}_\parallel=bu_0/D$, $H_1(X)=h_1(x)$, $H_2(X)=h_2(Y)$, $u_0={}^3/_2\langle u\rangle$, c, u, v, t, x, y – размерные концентрация, скорость продольного и поперечного потоков, время, продольная и поперечная координаты, b – половина глубины канала, а $c_0h_1(x)h_2(y)$ – начальное распределение концентрации пробы. Решение, в соответствии с ОДТ, ищется в виде

$$\theta(\tau, X, Y)=\sum_{k=0}^{\infty} f_k(\tau, Y)\frac{\partial^k\theta_m}{\partial X^k}, \tag{5}$$

где

$$\theta_m(\tau, X)={}^1/_2\int_{-1}^{1}\theta(\tau, X, Y)\,dY. \tag{6}$$

Тогда уравнение (1) сводится к виду

$$\frac{\partial\theta_m}{\partial\tau}=\sum_{i=1}^{\infty}K_i(\tau)\frac{\partial^i\theta_m}{\partial X^i}, \tag{7}$$

где

$$K_i(\tau)=\frac{\delta_{i2}}{\mathrm{Pe}_\parallel}-\frac{1}{2}\int_{-1}^{1}f_{i-1}(\tau, Y)\,(1-Y^2)\,dY. \tag{8}$$

А функции f_k должны удовлетворять уравнению

$$\frac{\partial f_k}{\partial\tau}+\sum_{i=1}^{k}f_{k-i}K_i(\tau)+\mathrm{Pe}\frac{\partial f_k}{\partial Y}-\mathrm{Pe}_\parallel{}^{-2}f_{k-2}+(1-Y^2)f_{k-1}=0 \tag{9}$$

с условиями

$$\frac{\partial f_k(\tau, \pm1)}{\partial Y}=\mathrm{Pe}\,f_k(\tau, \pm1), \tag{10}$$

$$f_0(0, Y)=2H_2(Y)\Big/\int_{-1}^{1}H_2(Y), \tag{11}$$

$$f_k(0, Y)=0, \quad k=1, 2, 3\ldots. \tag{12}$$

Функции f_k при этом автоматически удовлетворяют условиям

$$\int_{-1}^{1}f_k(\tau, Y)\,dY=2\delta_{0k}. \tag{13}$$

При этом, если нас интересует область $\tau\geqslant2/\mathrm{Pe}$, то ряд в уравнении (7) можно обрывать на втором члене. Решение (7) имеет вид

$$\theta_m(\tau, X)=\frac{1}{4(\pi\xi)^{1/2}}\left[\int_{-1}^{1}H_2(Y)\,dY\right]\int_{-\infty}^{\infty}H_1(X')\exp\left[-\frac{(X'-X)^2}{4\xi}\right]dX', \tag{14}$$

где

$$X_1=X+\eta(\tau), \quad \eta(\tau)=\int_0^{\tau}K_1(\gamma)\,d\gamma, \quad \xi(\tau)=\int_0^{\tau}K_2(\gamma)\,d\gamma. \tag{15}$$

Дисперсионные коэффициенты K_1, K_2 имеют смысл безразмерных скорости движения пика пробы по каналу и скорости роста дисперсии пика. При этом локальная концентрация будет довольно точно описываться первыми двумя членами ряда (5).

Если теперь применить указанный анализ ОДТ к каждой из областей ступенчатой функции, изображенной на рис. 1, то локальная концентрация к моменту τ_n будет иметь вид

$$\theta_{\text{нач}}^{n+1} = \theta_{\text{кон}}^{n} = f_0(\tau_n, Y)\,\theta_m^n(\tau, X) + f_1(\tau_n, Y)\frac{\partial_m \theta_m^n(\tau_n, X)}{\partial X}. \qquad (16)$$

Поскольку при применении ОДТ необходимо, чтобы начальное условие имело вид произведения двух функций только от X и только от Y (3), то, воспользовавшись линейностью задачи (1)–(4), решение, получающееся при начальном распределении (16), будем искать в виде суммы решений двух задач. Для этого необходимо тождественно преобразовать (16) к следующему виду:

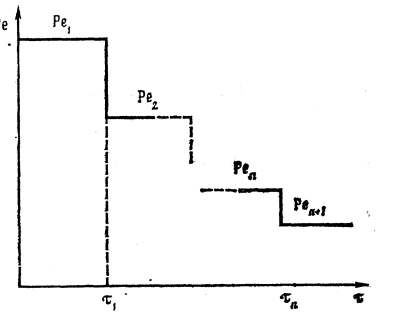


Рис. 1. Ступенчатая функция программирования поперечного прижатия

$$\theta_{\text{нач}}^{n+1} = H_1^{(1)}(X) H_2^{(1)}(Y) + H_1^{(2)}(X) H_2^{(2)}(Y), \quad (17)$$

где

$$H_1^{(1)}(X) = \theta_m^n(\tau_n, X) - \frac{\partial \theta_m^n(\tau_n, X)}{\partial X}, \quad (18)$$

$$H_2^{(1)}(Y) = f_0(\tau_n, Y), \quad (19)$$

$$H_1^{(2)}(X) = \frac{\partial \theta_m^n(\tau_n, X)}{\partial X}, \quad (20)$$

$$H_2^{(1)}(Y) = f_0(\tau_n, Y) + f_1(\tau_n, Y). \quad (21)$$

Это преобразование понадобилось, так как, согласно (11), в начальное условие для функции $f_0^{n+1}(\tau, Y)$ входит член $\left[\int_{-1}^{1} H_2^{(2)}(Y)\,dY\right]^{-1}$, а согласно (13), $\int_{-1}^{1} f_1(\tau, Y)\,dY = 0$. Теперь, воспользовавшись (14), получаем выражения для средней концентрации в области $\tau_n < \tau < \tau_{n+1}$

$$\theta_m^{n+1}(\tau, X) = \frac{1}{2(\pi\xi_1)^{1/2}} \int_{-\infty}^{\infty} \theta_m^n(\tau, X') \left[1 - \frac{X' - X_1^{(1)}}{2\xi_1}\right] \cdot$$

$$\cdot \exp\left[-\frac{(X' - X_1^{(1)})^2}{4\xi_1}\right] dX' + \frac{1}{4\xi_2(\pi\xi_2)^{1/2}} \int_{-\infty}^{\infty} \theta_m^n(\tau_n, X') \cdot$$

$$\cdot [X' - X_1^{(2)}] \exp\left[-\frac{(X' - X_1^{(2)})^2}{4\xi_2}\right] dX', \qquad (22)$$

где $X_1^{(1)}$ и ξ_1 получены согласно (15) при подстановке в (3) величин $H_1^{(1)}$ и $H_2^{(1)}$ из (18), (19), а $X_1^{(2)}$ и ξ_2 при подстановке в (3) величин $H_1^{(2)}$ и $H_2^{(2)}$ из (20), (21).

Полученное выражение (22) позволяет определить среднюю по поперечному сечению канала концентрацию пробы в любой момент времени при произвольном числе и величине ступеней ступенчатой функции (рис. 1).

На рис. 2–5 изображены рассчитанные в соответствии с (22) зависимости от времени координаты максимума пика пробы, его дисперсия, а также производных от этих величин по времени, т. е. результирующих значений $K_1(\tau)$ и $K_2(\tau)$ при наличии экспозиции и в ее отсутствие. Изображен случай ступенчатого изменения поперечного потока во времени, все три ступени имеют одинаковую длительность $\tau = 1$, Pe принимает последовательно значения Pe = 15, 10, 5. Очевидно, что имеют место как стационарные области $K_1 = \text{const}$, $K_2 = \text{const}$, соответствующие установив-

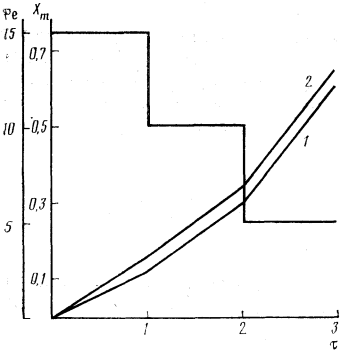


Рис. 2

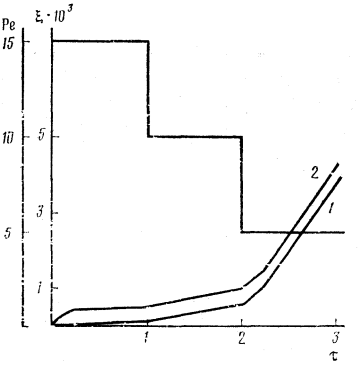


Рис. 3

Рис. 2. Зависимости безразмерной координаты максимума пика от безразмерного времени: *1* – с экспозицией, *2* – без экспозиции

Рис. 3. Зависимости безразмерной дисперсии пика от безразмерного времени: *1* – с экспозицией, *2* – без экспозиции

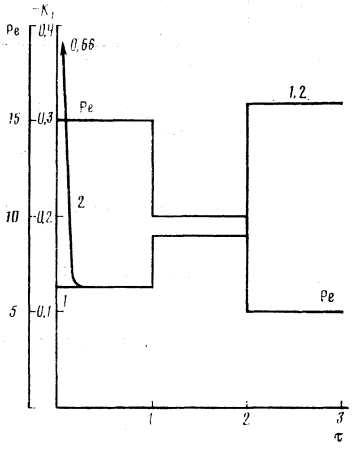


Рис. 4

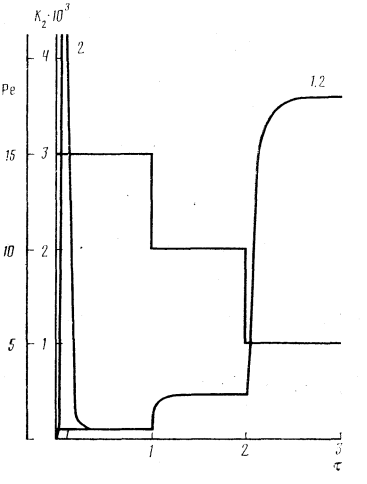


Рис. 5

Рис. 4. Зависимости безразмерной скорости движения пика по каналу от безразмерного времени: *1* – с экспозицией, *2* – без экспозиции

Рис. 5. Зависимости безразмерной скорости роста дисперсии пика от безразмерного времени: *1* – с экспозицией, *2* – без экспозиции

шейся зависимости концентрации от поперечной координаты, так и области переходных процессов.

Полученные аналитические выражения (17)–(22), а также реализованная на их основе программа позволяют подбирать оптимальную ступенчатую функцию, уменьшающую время анализа при заданном предположительном составе пробы.

Список литературы

1. *Giddings J. C.* // Sep. Sci. 1966. V. 1. № 1. P. 123.
2. *Wahlund K. et al.* // Anal. Chem. 1986. V. 58. P. 573.
3. *Kirkland J. J. et al.* // Anal. Chem. 1980. V. 52. P. 1944.
4. *Yau W. W., Kirkland J. J.* // Sep. Sci. Technol. 1981. V. 16. P. 577.
5. *Krishnamurthy S., Subramanian R. S.* // Sep. Sci. 1977. V. 12. P. 347.
6. *Андреев В. П. и др.* // Журн. физ. химии. 1989. Т. 63. № 4. С. 998.
7. *Yau W. W., Kirkland J. J.* // Anal. Chem. 1984. V. 56. P. 1461.

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

Агеев А. Н., Яшин Я. И.

ЗАКОНОМЕРНОСТИ УДЕРЖИВАНИЯ ЭФИРОВ о-ФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ В ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Изучены закономерности удерживания эфиров *о*-фталевой кислоты в нормально-фазовой хроматографии (НФХ) на силикагеле, обработанном гексаметилдисилоксаном и обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ) при различном содержании изопропанола в гексане (НФХ) и воде (ОФХ). Измерены параметры удерживания фталатов в обоих вариантах жидкостной хроматографии. Установлена связь селективности разделения и параметров удерживания в зависимости от содержания изопропанола в элюентах.

Ранее авторами [1, 2] были исследованы закономерности удерживания эфиров *о*-фталевой кислоты, имеющих важнейшее значение в различных отраслях народного хозяйства, как в прямом варианте жидкостной хроматографии на гидроксилированном силикагеле КСС-4 с элюентом гексан, так и в обращенно-фазовой хроматографии на силикагеле КСК-2 с привитой фазой С16 и элюенте изопропанол – вода (60 : 40). Было обнаружено, что в нормально-фазовом варианте удерживание фталатов увеличивается в порядке уменьшения числа атомов углерода в молекуле. Это может быть связано с двумя причинами: во-первых, более длинные алкильные цепи мешают ориентации молекул фталатов при специфическом ориентационном взаимодействии с полярной поверхностью гидроксилированного силикагеля; во-вторых, рост длины алкиль-

Таблица 1

Изменения свободной энергии $\Delta\Delta G$ и коэффициент емкости K_e фталатов на колонке 10×0,6 см с адсорбентом Silasorb C18, размер частиц 7–10 мкм при разном содержании изопропанола в воде (скорость элюента 1,5 см³/мин, ~22° С)

№№ п.п.	Вещество	K_e			$-\Delta\Delta G$, кДж/моль		
		40%	60%	70%	40%	60%	70%
1	*о*-диметилфталат	1,63	0,90	0,43	4043	2316	2925
2	*м*-диметилфталат	2,84	1,14	0,57	5396	2904	3592
3	*п*-диметилфталат	3,88	1,45	0,68	6156	3482	4054
4	*о*-диэтилфталат	3,08	1,12	0,53	5593	2859	3439
5	*о*-дипропилфталат	7,37	1,69	0,77	7719	3862	4341
6	*о*-дибутилфталат	18,53	2,71	1,07	9965	5011	5159
7	*о*-диизобутилфталат	16,65	2,61	1,02	9704	4917	5039
8	*о*-диамилфталат	44,92	4,39	1,57	12122	6181	6111
9	*о*-диизоамилфталат	37,78	4,14	1,45	11700	6041	5919
10	*о*-дигексилфталат		7,06	2,28		7340	7044
11	*о*-диоктилфталат		14,00	3,98		9007	8422
12	*о*-динонилфталат		29,92	6,12		10857	9485
13	*о*-дидецилфталат		47,37	10,70		11976	10871
14	*о*-дидодецилфталат			23,8			12852

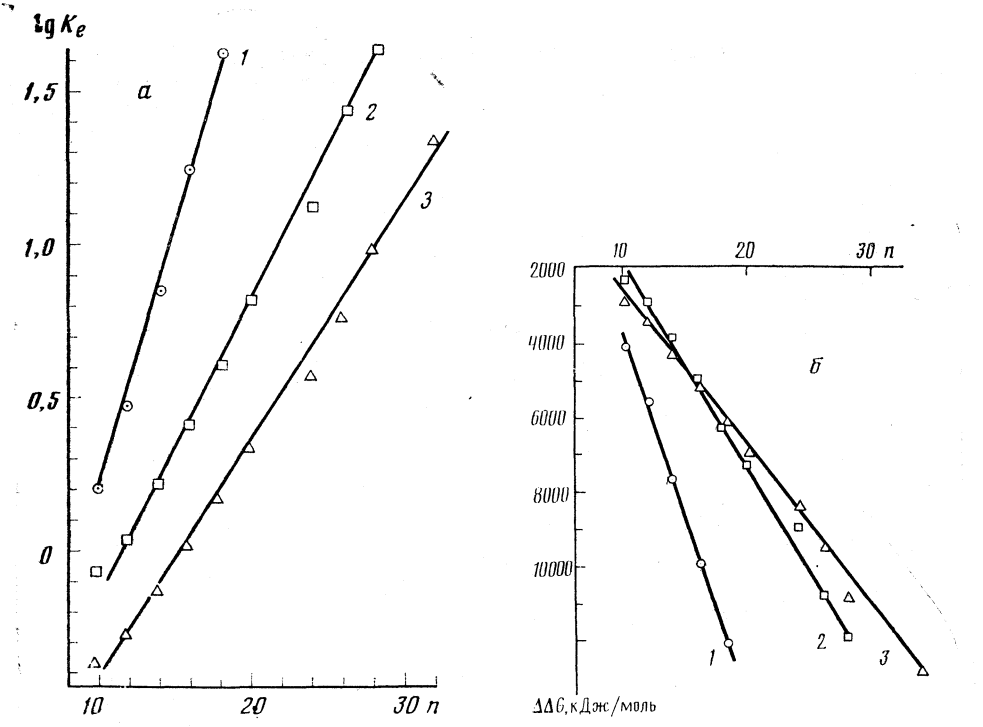


Рис. 1. Зависимости логарифма коэффициента емкости (*а*) и изменения свободной энергии $\Delta\Delta G$ (*2*) от общего количества атомов углерода (n) при различном содержании изопропанола в воде: *1* – 40, *2* – 60, *3* – 70%. Колонка 10×0,6 см заполнена Silasorb С18, размер частиц 7–10 мкм, элюент: изопропанол – вода, расход 1,5 см³/мин, ~22° С

ной цепи увеличивает вклад взаимодействия адсорбат – элюент, которое также приводит к уменьшению удерживания.

В настоящей работе продолжены исследования закономерностей удерживания фталатов в нормально-фазовом варианте на силикагеле КСС-4, обработанном гексаметилдисилазоном (ГМДС) с элюентом гексан – изопропанол при различном содержании изопропанола и в обращенно-фазовой хроматографии на колонке с силосорбом С18 при различном соотношении изопропанола и воды.

Экспериментальная часть. Измерения проводили на жидкостном хроматографе «Цвет-306» со спектрофотометрическим детектором. Время выхода t_0 несорбируемого компонента определяли расчетным путем. Исследуемые вещества – метчики и растворители – имели квалификацию «х. ч.» и «ч. д. а». Объем пробы при дозировании исключал перегрузку колонки и выход из линейного диапазона.

Обсуждение результатов. Обращенно-фазовая хроматография. В табл. 1 приведены коэффициенты емкости и изменения свободной энергии адсорбции фталатов на колонке Silasorb С18 при различном соотношении спирта и воды, а на рис. 1 представлены зависимости $\lg K_e$ и изменений свободной энергии адсорбции $\Delta\Delta G$ от числа атомов углерода (n) в молекуле. Зависимости эти линейны и удерживание возрастает с увеличением длины алкильной цепи заместителей, причем, чем меньше спирта в смеси, тем сильнее удерживание. Обращенно-фазовая хроматография показывает хорошие результаты при разделении производных *о*-фталевой кислоты, а также изомерных производных фталатов.

Нормально-фазовая хроматография. В табл. 2 приведены коэффициенты емкости K_e и изменения свободной энергии адсорбции $\Delta\Delta G$ различных фталатов на колонке с силикагелем КСС-4, обработанным гексаметилдисилазаном (ГМДС) при различном содержании изопропанола в гексане. На рис. 2 приведены зависимости $\lg K_e$ и $1/K_e$ от числа атомов углерода в молекуле фталатов. Видно, что порядок удерживания аналогичен порядку удерживания на гидроксилированном силикагеле. Зависимость же $\Delta\Delta G$ от числа атомов углерода в молекуле (n) имеет также нелинейный характер.

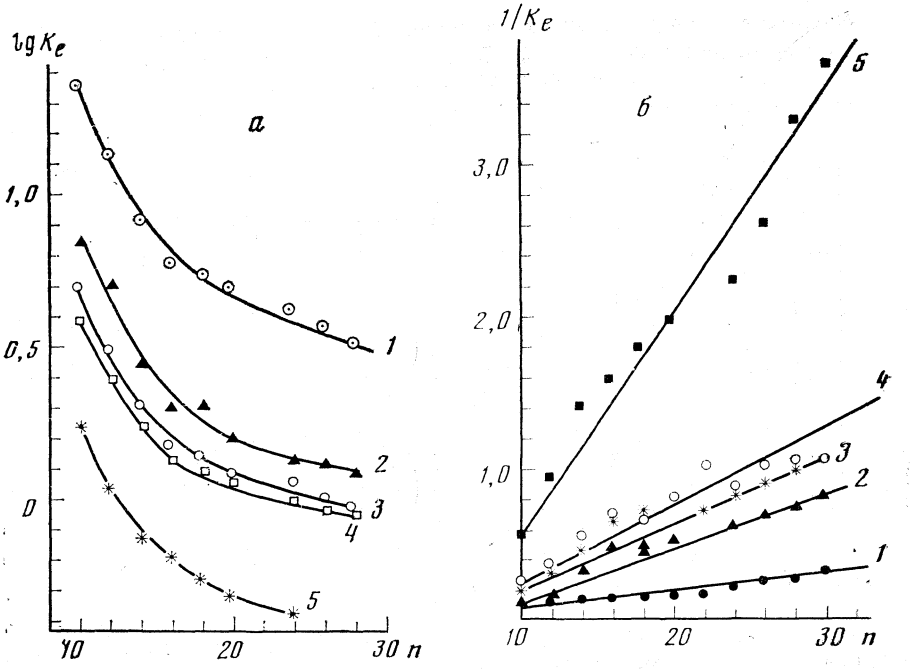


Рис. 2

Рис. 2. Зависимости логарифма коэффициента емкости K_e (*а*) и величины $1/K_e$ (*б*) от общего количества атомов углерода в молекуле (n) на силикагеле КСС-4, обработанном ГМДС, при различном содержании изопропанола в гексане: *1* – 0,1; *2* – 0,25; *3* – 0,5; *4* – 1,0; *5* – 5,0%. Колонка 30×0,6 см, размер частиц 7–10 мкм, элюент: гексан – изопропанол, расход 3 см³/мин, ~22° С

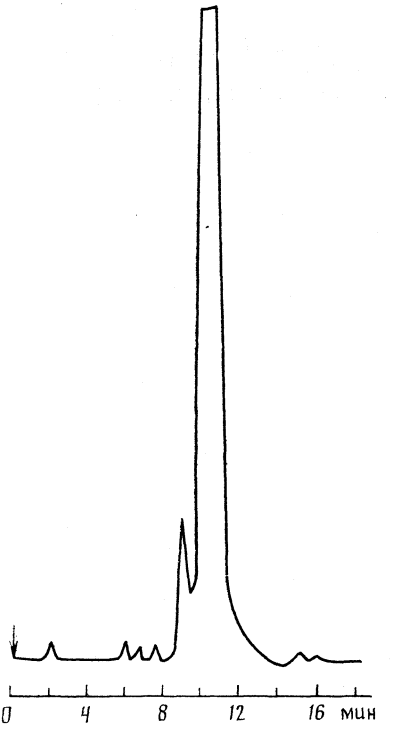


Рис. 3

Рис. 3. Хроматограмма примесей в диокталфталате (жидкая фаза), условия см. рис. 1

Таблица 2

Изменения свободной энергии адсорбции ΔΔG и коэффициенты емкости K_e фталатов на колонке 30×0,6 с КСС-4, обработанным ГМДС при разном содержании изопропанола в гексане

Вещество	K_e					ΔΔG, кДж/моль				
	0,1%	0,25%	0,5%	1%	5%	0,1%	0,25%	0,5%	1%	5%
1	21,08	7,30	6,20	3,81	1,75					
2	8,20	3,40	2,20	0,78	0,40					
3	7,40	2,89	2,30	2,10	1,00					
4	14,10	5,10	3,10	2,54	1,05	0,43	0,36	0,42	0,44	0,55
5	8,48	2,81	2,08	1,75	0,70	0,98	0,99	0,92	0,84	0,99
6	6,10	2,03	1,53	1,39	0,63	1,13	1,31	1,25	1,08	1,11
7	5,94	2,02		1,51	0,55	1,36	1,35		1,00	1,25
8	5,44	2,05	1,37	1,23	0,50	1,46	1,34	1,37	1,22	1,35
9	5,38	1,80	1,40	0,91		1,47	1,48	1,34	1,54	
10	5,00	1,58	1,20	1,13	0,45	1,55	1,60	1,51	1,31	1,46
11	4,32	1,34	1,10	0,96	0,38	1,71	1,80	1,60	1,48	1,66
12	3,80	1,29	1,00	0,91	0,30	1,84	1,84	1,71	1,59	
13	3,28	1,20	0,95	0,93	0,27	2,00	1,91	1,76	1,52	

Примечание. Номера веществ см. в табл. 1.

На рис. 3 представлена хроматограмма разделения жидкой фазы диоктилфталата, применяемой в газовой хроматографии.

Список литературы

1. *Агеев А. Н., Яшин Я. И.* // Журн. аналит. химии. 1989. Т. 44. № 9. С. 1632.
2. *Агеев А. Н., Яшин Я. И.* // Тез. докл. V Всесоюз. симп. по молекулярной жидкостной хроматографии. Рига, 1990. С. 3.

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

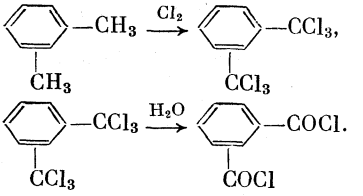
© 1991 г.

Муляшов С. А., Сировский Ф. С., Гречишкина О. С.

СВЯЗЬ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК АРОМАТИЧЕСКИХ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ И НЕКОТОРЫХ ИХ ПРОИЗВОДНЫХ СО СТРОЕНИЕМ МОЛЕКУЛ

Изучены хроматографические свойства ряда ароматических карбоновых кислот и их эфиров. Найдено, что удерживание этих соединений в обращенно-фазовой хроматографии наилучшим образом описывается уравнением, линейно связывающим коэффициент емкости с суммой группового инкремента удерживания и коэффициентом распределения в системе октанол – вода. Показано, что данное уравнение может быть использовано для идентификации примесей, образующихся в процессах получения мономеров.

Производные терефталевой кислоты находят широкое применение в качестве мономеров для получения термостойких полимеров. Как известно, эти соединения получают в результате следующих реакций [1]:



При этом на первой стадии образуется ряд побочных продуктов, трудно поддающихся выделению из целевых веществ и ухудшающих качество полимеров.

Аналитический контроль этого процесса может быть осуществлен методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в системе обращенных фаз с переводом анализируемых хлорангидридов в метиловые эфиры.

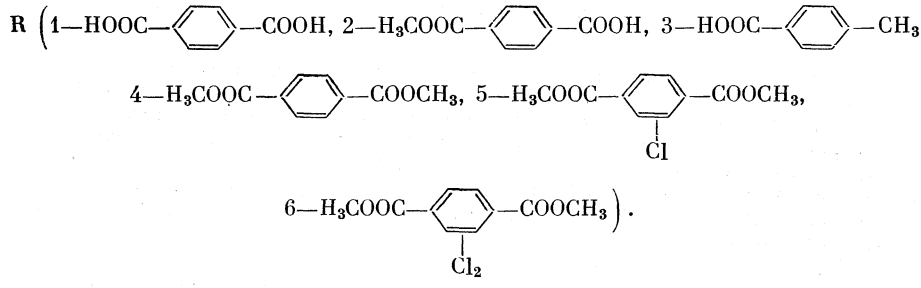
Данный метод может быть использован не только для количественного определения целевого продукта в виде диметилтерефталата, но и для быстрой идентификации образующихся примесей, что важно с точки зрения своевременной корректировки технологического режима. Для этих целей могут быть использованы известные из литературы корреляционные зависимости типа удерживание – строение, в основе которых лежат представления об аддитивном характере логарифма коэффициента емкости.

Экспериментальная часть. Определение коэффициентов емкости терефталевой кислоты и ее производных проводили на хроматографе «Милихром», колонка КАХ-2 (Силасорб С18). Элюент – ацетонитрил : вода : фосфорная кислота (85%-ная) в объемных соотношениях 50 : 50 : 0,2. Аналитическая длина волны – 240 нм, скорость подачи элюента – 100 мкл/мин. Анализируемые соединения выделяли из технических продуктов и очищали методом препаративной ВЭЖХ на силанизированном диметилдихлорсиланом силикагеле *L* (фракция 40–60 мкм). Идентификацию полученных соединений проводили методами ИК- и ПМР-спектрометрии. Коэффициенты емкости карбоновых кислот – продуктов окисления дурола определяли на хроматографе «Цвет-304», колонка Силасорб С2, (10×0,6 см), элюент – вода : уксусная кислота в соотношении 98 : 2, аналитическая длина волны 254 нм.

Обсуждение результатов. Для проверки возможности использования имеющихся в литературе данных по групповым инкрементам удерживания производных бензо-

R	lg k'	Σs_i [2]	lg P[3]	R	lg k'	Σs_i [2]	lg P[3]
1	−0,477	−2,38	1,40	7	1,23	−0,12	3,08
2	−0,071	−1,27	1,86	8	0,19	−1,84	0,99
3	0,082	−0,92	2,27	9	0,51	−1,84	2,75
4	0,485	−0,16	2,11	10	0,76	−1,84	2,75
5	0,641	0,05	2,82	11	−0,097	−2,52	0,64
6	0,900	0,26	3,53	12	−0,22	−3,72	0,18

ла [2], нами были измерены (таблица) коэффициенты емкости ряда производных терефталевой кислоты



Обработка полученных результатов в координатах lg k'–Σs_i дает прямую с коэффициентом корреляции 0,983. Из рисунка следует, что полученная зависимость может быть разбита на два отрезка, соответствующих веществам, содержащим карбоксильную группу и не содержащим таковой. Соответствующие коэффициенты корреляции равны 0,999 и 0,990. Данный результат согласуется с имеющимися представлениями, что простые однопараметровые линейные соотношения, описывающие связь структура – свойство, выполняются только для достаточно узких рядов соединений с заместителями близкой природы [4]. Известно также, что удерживание в обращенно-фазовых системах можно описать уравнениями, связывающими коэффициент емкости с коэффициентом распределения данного соединения в системе октанол – вода [2].

Для изучавшихся соединений коэффициенты распределения (lg P) были определены нами расчетным путем по методу Лео – Ганча [3]. Однако эта модель является весьма приближенной, так как поведение веществ в хроматографической системе существенно отличается от распределения в системе жидкость – жидкость, поскольку селективность хроматографических систем в данной схеме не учитывается [2, с. 73]. Для наших данных коэффициент корреляции уравнения

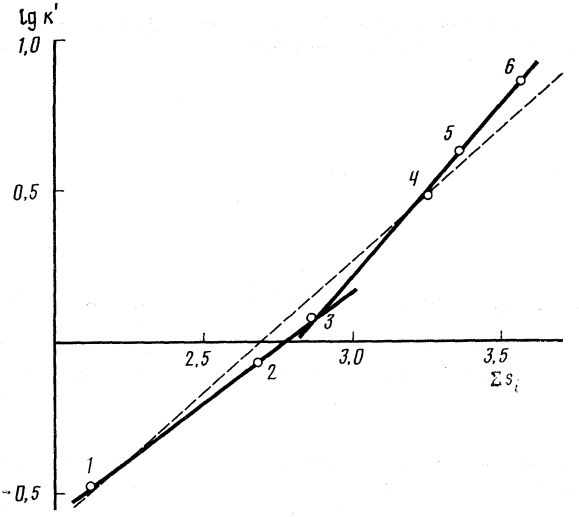
$$\lg k' = A + B \lg P \qquad (1)$$

составил 0,880. Тем не менее, величины lg P табулированы для очень большого числа соединений и методика их расчета довольно проста [3]. В нашем случае оказалось, что учет селективности хроматографической системы можно провести, дополнив модель с параметрами Лео – Ганча инкрементами удерживания. Тогда полученные экспериментальные данные хорошо линеаризуются в координатах уравнения

$$\lg k' = -(0{,}244 \pm 0{,}048) + (0{,}0309 \pm 0{,}022)\ (\lg P + \Sigma s_i),$$

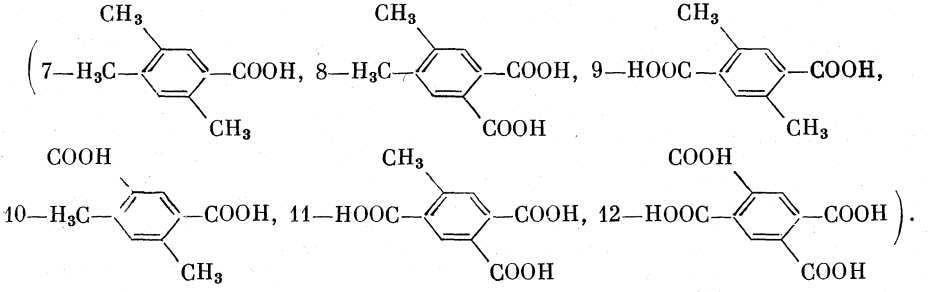
коэффициент корреляции – 0,990.

Таким образом, в обращенно-фазовой системе на удерживание ароматических карбоновых кислот и их эфиров влияют два основных фактора – взаимодействие сорбата со «щеткой» алкильных радикалов сорбента и с поверхностно-сольватированным сорбентом. Первый из этих факторов описывается коэффициентом распределения – lg P, второй – инкрементом удерживания. Причем вклады этих факторов однородны, на что указывает вид полученного корреляционного уравнения. Для подтверждения данного предположения нами были определены коэффициенты удерживания ряда



Зависимость коэффициента емкости терефталевой кислоты и ряда ее производных от суммы инкрементов удерживания: *1* – терефталевая кислота, *2* – монометиловый эфир терефталевой кислоты, *3* – *пара*-толуиловая кислота, *4* – диметилтерефталат, *5* – хлордиметилтерефталат, *6* – дихлордиметилтерефталат

ароматических карбоновых кислот R (таблица), образующихся при окислении дурола



Для данных кислот коэффициент корреляции уравнения (1) равен 0,936. В то же время коэффициент корреляции уравнения

$$\lg k' = (0{,}393 \pm 0{,}073) + (0{,}218 \pm 0{,}033)\ (\lg P + \Sigma s_i)$$

равен 0,960. Несколько худшая корреляция, чем в первом случае объясняется тем, что для диметилтерефталевой и диметилизофталевой кислот равны как инкременты для расчета $\lg P$, так и инкременты удерживания s_i. Тем не менее, близкие коэффициенты при сомножителе $\lg P + \Sigma s_i$ указывают, по нашему мнению, на достоверность предложенной схемы.

Список литературы

1. *Моцарев Г. В., Успенская И. Н.* Хлорпроизводные алкилароматических углеводородов. Получение и переработка. М.: Химия, 1983.
2. *Шатц В. Д., Сахартова О. В.* Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига: Зинатне, 1988. С. 390.
3. *Leo A., Hansch C., Elkins D.* // Chem. Rev. 1971. V. 71. P. 525.
4. *Пальм В. А.* Основы количественной теории органических реакций. 2-е изд. Л.: Химия, 1977. С. 360.

Московский химико-технологический институт
им. Д. И. Менделеева

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

Сердан А. А., Богословский С. Ю., Нестеренко П. Н.

ЗАВИСИМОСТЬ УДЕРЖИВАНИЯ НЕКОТОРЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ДИФИЛЬНОМ СОРБЕНТЕ ОТ pH И ИОННОЙ СИЛЫ ЭЛЮЕНТА

На основе сорбента силасорб С-18 путем адсорбции и последующей сшивки глутаровым альдегидом молекул человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) получен дифильный сорбент ОФ-ЧСА. Изучены хроматографические свойства сорбента и показана его применимость для определения лекарственных препаратов в биологических жидкостях с прямым вводом пробы в разделяющую колонку.

Анализы лекарственных препаратов и их метаболитов в биологических жидкостях могут быть выполнены методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с водным элюентом на хроматографических колонках, заполненных гидрофобным сорбентом (RP, С-18 и др.).

Возникающие при этом трудности связаны с наличием в пробе белковых молекул, которые адсорбируются на доступной им поверхности сорбента и быстро выводят колонку из строя. Чтобы защитить колонку, исследователь вынужден удалять белковые молекулы из пробы, используя специальные методики пробоподготовки, или непосредственно в хроматографической системе, например, с помощью предколонки. Можно предотвратить адсорбцию белков, солюбилизировав их ион-парными реагентами или поверхностно-активными веществами. Перечисленные методы трудоемки и зачастую приводят к снижению эффективности хроматографического разделения, а многостадийная пробоподготовка нежелательна еще и из-за опасности внесения загрязнений в пробу и потери анализируемых компонентов пробы, что приводит к дополнительным погрешностям в их определении.

Для того чтобы был возможен прямой ввод биологических жидкостей в хроматографическую колонку, поверхность сорбента должна быть инертна по отношению к белковым компонентам пробы. Таким требованиям отвечают сорбенты с привитыми гидрофильными группами (например, дипольными). Однако определение лекарственных препаратов, как правило, выполняется на гидрофобных сорбентах. Таким образом, для определения лекарственных препаратов в биологических жидкостях сорбент должен содержать группы различий природы, размещенные так, чтобы белки контактировали только с гидрофильными группами, а лекарственные вещества – преимущественно с гидрофобными группами сорбента. Эта задача может быть решена благодаря использованию различий в размерах молекул белков и лекарственных препаратов. В качестве исходной кремнеземной матрицы следует выбрать силикагель с размером пор, примерно равным размерам наименьших белковых молекул, содержащихся в пробе. Тогда после модифицирования поверхности органическими группами и соответственно уменьшения диаметров пор белки не смогут проникнуть в поры и будут взаимодействовать лишь с внешней поверхностью частиц силикагеля. Затем необходимо придать внешней, доступной белкам, поверхности гидрофильные, а внутренней, недоступной белкам, но доступной молекулам лекарственных препаратов, гидрофобные свойства.

Впервые это удалось Т. Пинкертону с сотр. [1]. Они модифицировали кремнеземный носитель трипептидом состава Gly – L – Phe – L – Phe, после чего вся поверхность приобретала гидрофобные свойства, а затем обрабатывали сорбент раствором фермента, карбоксипептидазы А, молекулы которой не могли проникать в узкие поры сорбента и «отстригали» гидрофобное покрытие только на доступной им внешней поверхности. Колонки, заполненные таким сорбентом с гидрофобной внутренней и гидрофильной внешней поверхностью, продаются под названием «колонок Пин-

кертона». Использование такого дифильного сорбента позволяет осуществлять прямой ввод биологических жидкостей в колонку при достаточно высокой эффективности разделения, однако характеристики удерживания на таком сорбенте отличаются от характеристик удерживания на обычных гидрофобных сорбентах [2].

Выпущенный в 1989 г. фирмой «Супелко» дифильный сорбент [3] был синтезирован иначе: на наружную поверхность гидрофобных частиц сорбента наносили полимерную сетку, содержащую гидроксильные группы. Такая сетка экранирует гидрофобную поверхность сорбента от белков и обеспечивает стабильность хроматографических свойств колонки при длительной эксплуатации, однако она затрудняет диффузию молекул лекарственных препаратов внутрь пор и снижает эффективность колонки. Вероятно, это происходит из-за значительной толщины полимерной сетки.

Довольно большое число работ (см., например, [4–6]) посвящено сорбентам с бычьим сывороточным альбумином (БСА), иммобилизованным на кремнеземе различными методами. Показано [7], что поверхность кремнезема, покрытая альбумином, не сорбирует белки.

Изложенные выше соображения мы использовали при синтезе дифильного сорбента на основе обычного обращенно-фазового сорбента, экранировав его внешнюю поверхность плотно упакованными и сшитыми между собой глобулами альбумина.

Экспериментальная часть. В работе использовали жидкостный хроматограф высокого давления, состоящий из насоса Бекман 114М, УФ-детектора Увикорд 2138 (254 нм), петлевого дозатора Реодайн 7125 с петлей объемом 100 мкл. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил – фосфатный буферный раствор, приготовленный нейтрализацией фосфорной кислоты 1 М раствором гидроксида натрия. Сорбент Силасорб С-18 и полученный на его основе дифильный сорбент ОФ-ЧСА (человеческий сывороточный альбумин) упаковывали суспензионным способом в колонки из нержавеющей стали (150×4 мм) производства НПКО «Диагностикум». Исследования проводили в изократическом режиме. Для синтеза дифильного сорбента применяли человеческий сывороточный альбумин производства «Реанал» (Венгрия) и Силасорб С-18 производства «Лахема» (ЧСФР). Синтез дифильного сорбента проводили в две стадии: сначала ЧСА сорбировали на поверхности Силасорба С-18, а затем сшивали глутаровым альдегидом.

Обсуждение результатов. Размер пор исходного Силасорба С-18 (их диаметр) меньше, чем диаметр глобул ЧСА, поэтому ЧСА не мог проникнуть в поры, а сорбировался только на внешней поверхности частиц Силасорба С-18. При сшивке глутаровый альдегид фиксировал глобулярную структуру молекул ЧСА [8] и, вероятно, соединял отдельные молекулы ЧСА в проницаемый для низкомолекулярных соединений экран, который надежно предохранял октадецильные группы сорбента от контакта с белковыми компонентами пробы. Такой сорбент (ОФ-ЧСА) является дифильным. При проведении анализов методом ВЭЖХ на хроматографической колонке, заполненной им, молекулы белков и других биополимеров не могут проникнуть в поры сорбента и взаимодействуют только с глобулами ЧСА, в то время как молекулы лекарственных веществ, имеющие значительно меньшие размеры, чем молекулы белков, свободно проникают в поры сорбента и взаимодействуют с находящимися там октадецильными группами.

В общем случае время удерживания может быть представлено как функция по крайней мере трех основных параметров подвижной фазы: pH, ионной силы и концентрации органического растворителя. При использовании ОФ-ЧСА варьирование pH подвижной фазы изменяет не только молекулярную форму разделяемых соединений, но и ионообменные свойства привитых белковых молекул ЧСА. Изменение ионной силы ослабляет или увеличивает ионообменные взаимодействия с молекулами пробы, а увеличение или уменьшение концентрации органического растворителя влияет на энергетику дисперсионных взаимодействий с привитыми гидрофобными группами.

Белок – полиэлектролитная молекула, поэтому в качестве тестовых веществ нами были выбраны как кислые, так и основные сорбаты: аспирин и бензойная кислота, содержащие COOH-группы, теофиллин и кофеин (их функциональные группы имеют основную природу).

На фиг. 1 приведена зависимость времен удерживания $t_{уд}$ перечисленных соединений от pH элюента. Очевидно, что времена удерживания кофеина и теофиллина в диапазоне pH от 3 до 7,5 изменяются весьма незначительно как на колонке с Силасорбом С-18, так и на колонке с ОФ-ЧСА, а кривые зависимости $t_{уд}$ от pH практически симбатны. Аналогичность свойств сорбентов в отношении удерживания аспирина и бензойной кислоты проявляется также заметно в диапазоне pH от 5 до 7,5, но при pH<5 удерживание на обоих сорбентах резко увеличивается, причем при pH=4 обнаруживается заметное поглощение кислых сорбатов, а их ко-

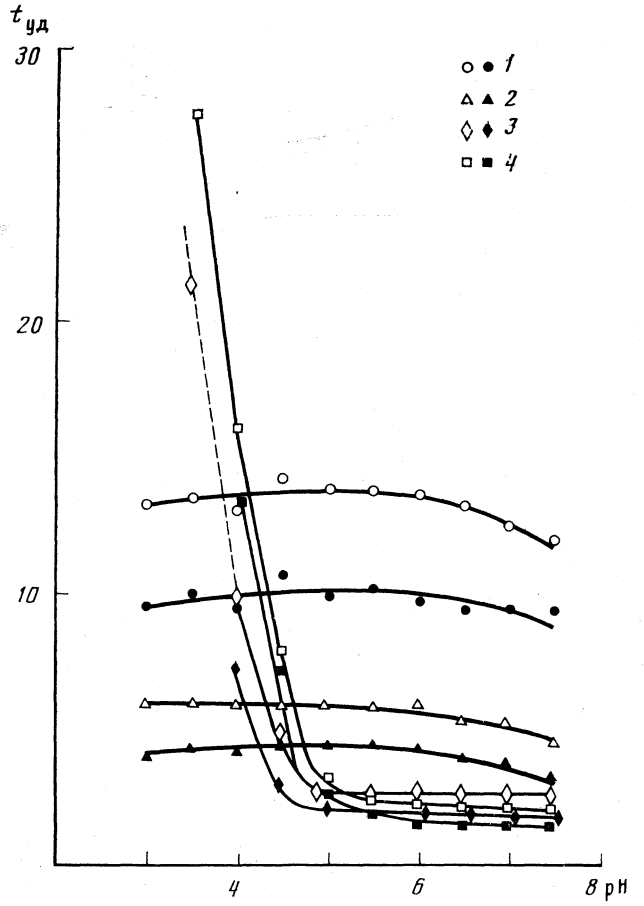


Рис. 1. Зависимости времени удерживания кофеина (*1*), теофиллина (*2*), аспирина (*3*), бензойной кислоты (*4*) от pH элюента на колонках (150×4,0 мм), заполненных сорбентами Силасорб С-18 (светлые символы) и ОФ-ЧСА (темные символы). Элюент 0,02 М натрийфосфатный буферный раствор – ацетонитрил (95 : 5); 1 мл/мин; $\lambda_{уф}$=254 нм

лонки с сорбентом ОФ-ЧСА при pH<4 аспирин (ацетилсалициловая кислота) вообще не выходит.

Такой эффект для обоих сорбентов объясняется изменением молекулярной формы сорбатов (при pH=4÷4,5 данные органические кислоты переходят в недиссоциированную форму) и анионообменным взаимодействием протонированных аминогрупп альбумина с молекулами этих сорбатов (в случае сорбента ОФ-ЧСА).

Варьирование концентрации NaH_2PO_4 в буферном растворе от 0,02 до 0,2 М (рис. 2) не влияет на удерживание теофиллина и кофеина. Это свидетельствует о незначительности ионообменных взаимодействий между молекулами сорбатов и поверхностью частиц сорбентов, в частности, с аминогруппами альбумина на сорбенте ОФ-ЧСА.

На рис. 3 представлена зависимость $t_{уд}$ кофеина и теофиллина от количества ацетонитрила в элюенте. При уменьшении содержания ацетонитрила от 20 до 15% изменения $t_{уд}$ практически не происходит на обеих колонках. Здесь, как и в предыдущих случаях, удерживание этих соединений на колонке с Силасорбом С-18 несколько больше, чем на колонке с ОФ-ЧСА. При дальнейшем уменьшении концентрации ацетонитрила до 5% наблюдается значительное увеличение $t_{уд}$ и теофиллина, и кофеина вследствие усиливающегося неспецифического взаимодействия этих молекул с привитыми октадецильными группами обоих сорбентов.

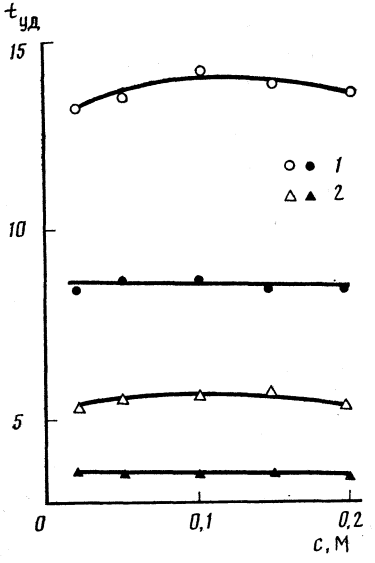


Рис. 2

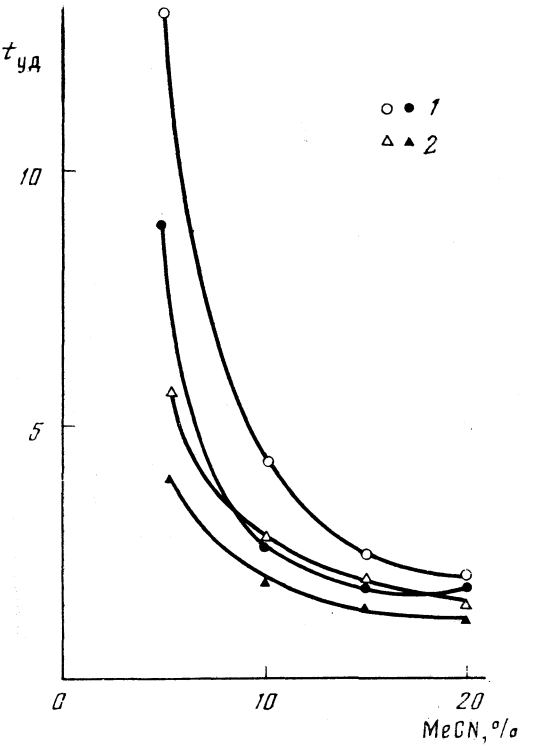


Рис. 3

Рис. 2. Зависимости времени удерживания кофеина (*1*) и теофиллина (*2*) от концентрации NaH_2PO_4 в буферном растворе. Колонки и условия элюирования см. рис. 1; элюент натрий – фосфатный буферный раствор (pH=6,50) – ацетонитрил (95 : 5)

Рис. 3. Зависимости времени удерживания кофеина (*1*) и теофиллина (*2*) от содержания ацетонитрила в элюенте. Колонки и условия элюирования те же, см. рис. 1

Практически важной характеристикой колонок, используемых для анализа биологических жидкостей, является стабильность их работы. На рис. 4 приведены хроматограммы разделения смеси плазмы крови с кофеином и теофиллином после 1-го и 60-го ввода пробы. Ниже представлены данные по временам удерживания этих лекарственных препаратов для 1-го, 20-го и 60-го разделения:

Разделение	1	20	60
Кофеин	5′01″	4′56″	5′02″
Теофиллин	2′50″	2′49″	2′49″

Как следует из приведенных данных, время выхода кофеина и теофиллина остается постоянным, т. е. необратимой адсорбции белков на сорбенте не происходит.

На рис. 5 приведена хроматограмма разделения более сложной смеси соединений в плазме крови. Видно, что фенобарбитал, кофеин, папаверин и фенацетин выходят из колонки отдельными, хорошо разделенными пиками, а аспирин и теобромин – неразделенным пиком, сразу после белков крови.

Судя по полученным результатам, применение дифильного сорбента ОФ-ЧСА позволяет вводить непосредственно сами биологические жидкости в хроматографическую колонку. Это дает возможность исключить нежелательные стадии предварительной подготовки пробы. Кроме того, дифильный сорбент обладает сходными характеристиками удерживания с широко используемыми гидрофобными сорбентами,

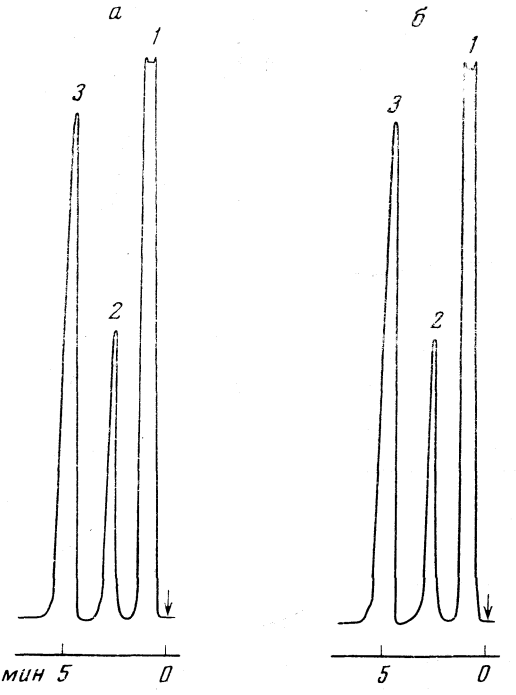


Рис. 4. Стабильность параметров удерживания при многократном определении (*а* — 1-й, *б* — 60-й анализ) теофиллина и кофеина в плазме крови (колонка с ОФ-ЧСА, 150×4,0 мм; элюент 0,02 М натрийфосфатный буферный раствор (pH=6,50) — ацетонитрил (90 : 10); 1 мл/мин, $\lambda_{уф}$=254 нм): *1* — белки плазмы крови, *2* — теофиллин, *3* — кофеин

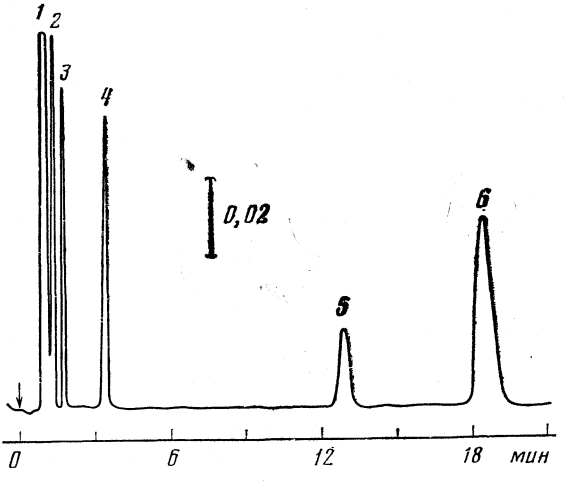


Рис. 5. Анализ лекарственных препаратов в плазме крови (колонка ОФ-ЧСА, 150× ×4,00 мм; элюент 0,1 М натрийацетатный буферный раствор (pH=6,85) — ацетонитрил (90 : 10); 1 мл/мин, $\lambda_{уф}$=254 нм): *1* — белки плазмы, *2* — аспирин+теобромин; *3* — фенобарбитал, *4* — кофеин, *5* — папаверин, *6* — фенацетин

что позволяет переносить отработанные на обращенно-фазовых сорбентах методики разделения на определение лекарственных препаратов в биологических жидкостях с помощью дифильного сорбента ОФ-ЧСА.

Список литературы

1. *Hagestam I. H., Pinkerton T. C.* // Anal. Chem. 1985. V. 57. № 8. P. 1757; *Pinkerton T. C., Hagestam I. H.* Пат. США № 4544485, 1985.
2. *Perry J. A., Glunz L. G., Czerba T. G., Chang M.* // Pittsburg Conf. and Expo. Anal. Chem. and Appl. Spectrosc. (New Orleans, La Febr. 22–26, 1988). Pittsburg, Pa. 1988. Abstr. P. 588.
3. *Gisch D., Hunter B., Feibush B.* // J. Chromatogr. 1988. V. 433. P. 264.
4. *Allenmark S., Bomgren B., Boren H.* // Ibid. 1983. V. 264. P. 63.
5. *Aubel M., Rogers L. B.* // Ibid. 1987. V. 392. P. 415.
6. *Erlandson P., Hansson L., Isaksson R.* // Ibid. 1986. V. 370. P. 475.
7. *Imai H., Yoshida H., Masujima T. et al.* // Anal. Letters. 1983. V. 16 (B 14). P. 1106.
8. *Morrissey R. W., Stromberg R. R.* // J. Interface Sci. 1974. V. 46. № 1. P. 152.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
Химический факультет

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 539.6:543.544

© 1991 г.

Бэ Ен Ил, Ланин С. Н., Никитин Ю. С.

УДЕРЖИВАНИЕ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ В НОРМАЛЬНО-ФАЗОВОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В ПРИСУТСТВИИ ПОЛЯРНЫХ МОДИФИКАТОРОВ ПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ

Показано влияние природы модификатора подвижной фазы на удерживание ароматических углеводородов разных классов и на селективность их разделения. Установлен разный характер зависимости удерживания ароматических углеводородов от природы модификатора (изопропанола, бутилбромида и бутилхлорида).

В высокоэффективной нормально-фазовой (жидкостно-адсорбционной) хроматографии (НФ ВЭЖХ) удерживание веществ определяется соотношением величин межмолекулярных взаимодействий: сорбат – сорбент, сорбат – подвижная фаза, подвижная фаза – сорбент [1, 2]. В настоящее время наибольшее признание среди хроматографистов получили модели удерживания веществ в НФ ВЭЖХ Снайдера, Сочевинского, Скотта [3–6]. Согласно этим моделям, поверхность полярного сорбента покрыта слоем молекул компонентов подвижной фазы, находящимся в динамическом равновесии с подвижной фазой. Состав адсорбционного слоя обогащен полярным компонентом по сравнению с подвижной фазой.

Адсорбция молекул сорбата на поверхности сорбента происходит с вытеснением из адсорбционного слоя одной или нескольких молекул компонентов подвижной фазы. Количество вытесненных молекул определяется составом подвижной фазы и их относительными геометрическими размерами по сравнению с молекулами сорбата. Удерживание сорбатов определяется энергией взаимодействия молекул сорбата и компонентов подвижной фазы с поверхностью сорбента. Кроме этого природа компонентов подвижной фазы определяет селективность удерживания сорбатов на данном сорбенте. Цель данной работы – изучение влияния природы и концентрации модифицирующей добавки в подвижную фазу – *н*-гексан на удерживание ароматических углеводородов разных классов и селективность их разделения.

Экспериментальная часть. Исследования проводили на микроколоночном хроматографе «Милихром» со шприцевым насосом (регулировка скорости потока подвижной фазы в интервале 2–600 мкл/мин) и спектрофотометрическим детектором (спектральный диапазон 190–360 нм). Стальную колонку 62×2 мм заполняли суспензионным способом гидроксилированным силикагелем силасорб-600 с удельной поверхностью 600 м^2/г и средним диаметром частиц ~5 мкм. Эффективность колонки 3000 теоретических тарелок по фенантрену.

В качестве подвижной фазы применяли двухкомпонентные смеси (от 99,995 : : 0,005 до 90 : 10 об.%) гексана с бутилбромидом, бутилхлоридом, пропанолом-2. В качестве адсорбатов использовали полиметил- и моноалкилбензолы, моноалкилнафталины и незамещенные полиароматические углеводороды.

Обсуждение результатов. Хроматографическое удерживание ароматических углеводородов на гидроксилированной поверхности силикагеля в основном определяется межмолекулярными взаимодействиями между силанольными группами адсорбента и π-электронной плотностью ароматических ядер сорбата. Удерживание ароматических углеводородов одного и того же класса (например, моноалкилбензолы и моноалкилнафталины, *орто*-замещенные полиметилбензолы, незамещенные полиароматические углеводороды (ПАУ) с разным числом колец в молекуле) подчиняется линейной зависимости [1, 7, 8]

$$\lg k' = A_1 n_C + A_0, \qquad (1)$$

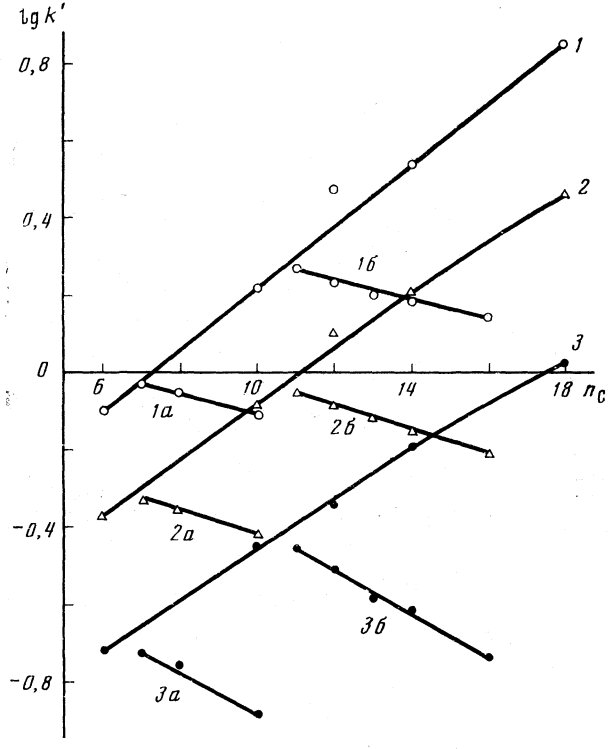


Рис. 1. Зависимости логарифма коэффициента емкости от числа атомов углерода молекулы сорбата для индивидуальных ароматических углеводородов. Подвижная фаза: *1* – осушенный *н*-гексан; *2*, *3* – осушенный *н*-гексан – бутилбромид при соотношениях (99 : 1) (*2*) и (95 : 5) (*3*). Сорбаты: *1–3* – незамещенные ПАУ; *1а–3а* – моноалкилбензолы; *1б–3б* – моноалкилнафталины

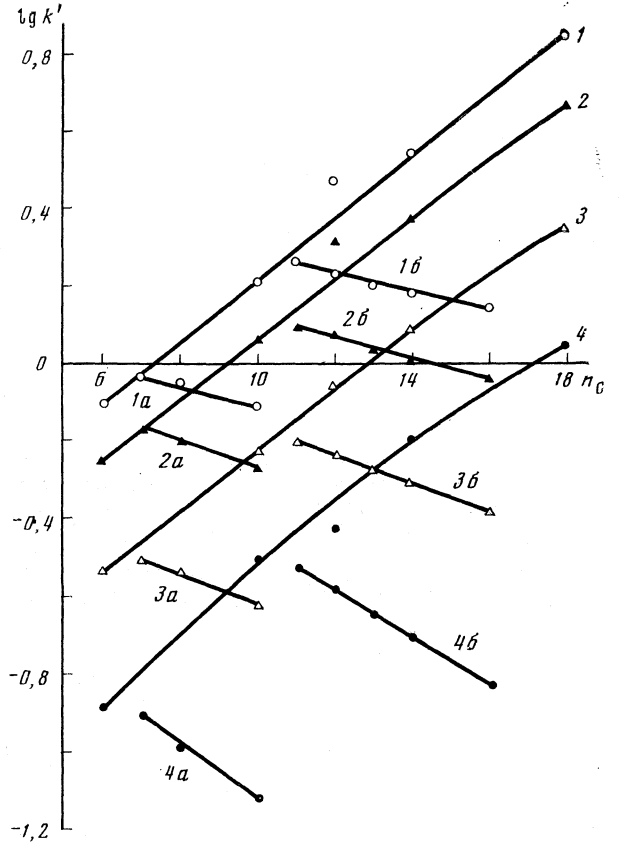


Рис. 2. Зависимости логарифма коэффициента емкости от числа атомов углерода молекулы сорбата для индивидуальных ароматических углеводородов. Подвижная фаза: *1* – осушенный *н*-гексан; *2–4* – осушенный *н*-гексан – бутилхлорид при соотношениях 99,5 : 0,5 (*2*), 98 : 2 (*3*) и 92 : 8 (*4*). Сорбаты: *1–4* – незамещенные ПАУ; *1а–4а* – моноалкилбензолы; *1б–4б* – моноалкилнафталины

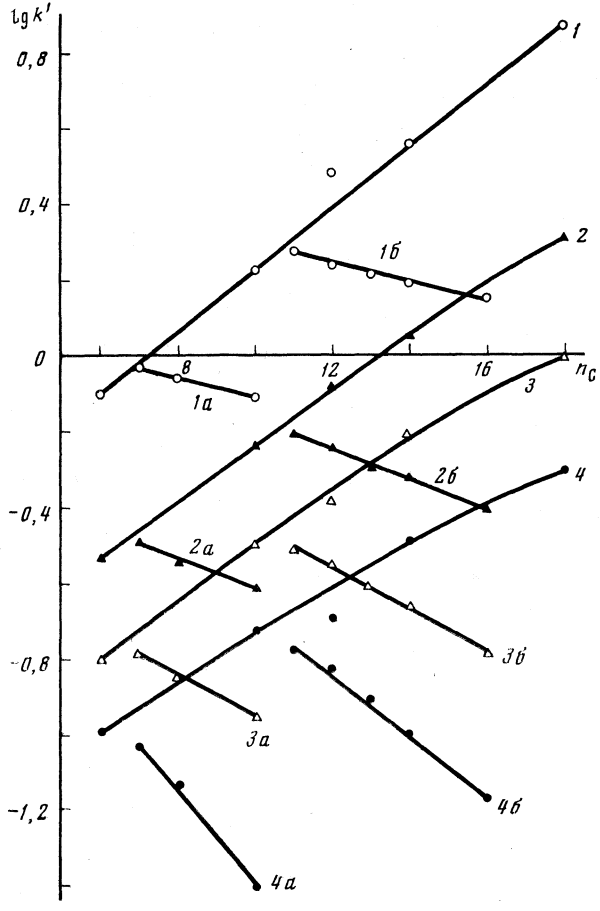


Рис. 3. Зависимости логарифма коэффициента емкости от числа атомов углерода молекулы сорбата для индивидуальных ароматических углеводородов. Подвижная фаза: *1* — осушенный *н*-гексан; *2–4* — осушенный *н*-гексан — изопропанол при соотношениях 99,995 : 0,005 (*2*), 99,985 : 0,015 (*3*), 99,95 : 0,05 (*4*). Сорбаты: *1–4* — незамещенные ПАУ; *1а–4а* — моноалкилбензолы; *1б–4б* — моноалкилнафталины

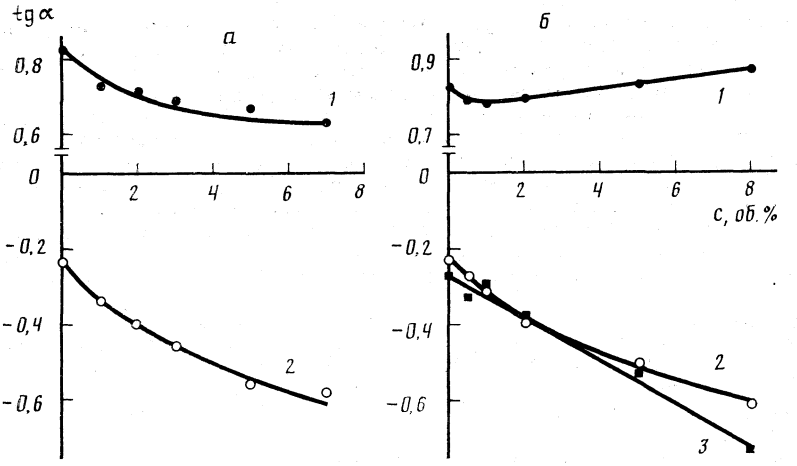


Рис. 4. Зависимость селективности удерживания ($tg\,\alpha=A_1$) сорбатов от содержания (c, об.%) модификатора бутилбромида ($а$), бутилхлорида ($б$) в подвижной фазе. Сорбаты: *1* — полиароматические углеводороды, *2* — моноалкилнафталины, *3* — моноалкилбензолы

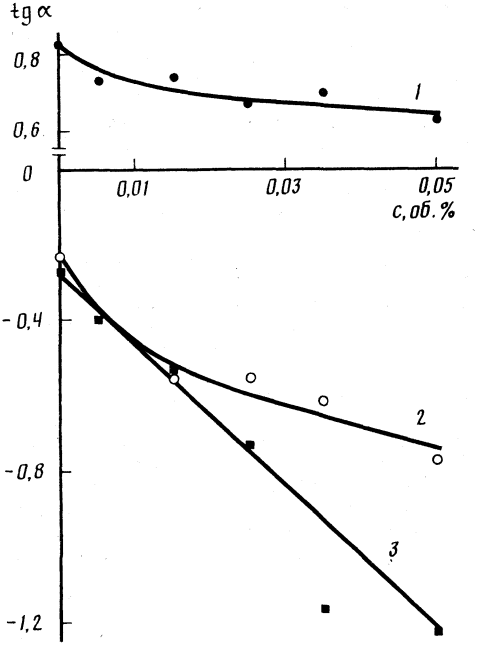


Рис. 5. Зависимости селективности удерживания ($tg\,\alpha=A_1$) сорбатов от содержания модификатора изопропанола в подвижной фазе. Сорбаты: *1* — полиароматические углеводороды, *2* — моноалкилнафталины, *3* — моноалкилбензолы

где k' — коэффициент емкости сорбата, n_C — число атомов углерода в молекуле сорбата, A_1 и A_0 — коэффициенты уравнения.

Как видно из рис. 1–3, коэффициенты A_1 для моноалкилбензолов, моноалкилнафталинов и ПАУ отличаются как по величине, так и по знаку, например для моноалкилбензолов и моноалкилнафталинов коэффициенты A_1 имеют не положительные, а отрицательные значения. Значения коэффициентов A_1 и A_0 зависят также от состава и природы подвижной фазы (рис. 1–3). Это связано как с различием в распределении электронной плотности в молекулах указанных сорбатов, так и с разным характером межмолекулярных взаимодействий молекул сорбата и полярного (слабополярного) компонента подвижной фазы.

Из рисунков видно, что с увеличением полярной добавки в подвижную фазу происходит существенное уменьшение удерживания всех ароматических углеводородов (АУ). При этом по-разному изменяется селективность удерживания АУ, относящихся к разным классам. Мерой селективности удерживания АУ является коэффициент A_1. Влияние природы и состава подвижной фазы на селективность удерживания ароматических углеводородов по отношению к ароматическому ядру, характеризуется наклоном прямой зависимости $\lg k'$ в ряду бензол – нафталин – фенантрен от числа атомов углерода n_C. Она уменьшается не так сильно, как селективность в ряду алкилзамещенных производных бензола и нафталина.

По сравнению с галогензамещенными модификаторами изопропанол значительно сильнее уменьшает удерживание АУ. Например, введение в подвижную фазу 0,015% изопропанола примерно соответствует 5–10% бутилхлорида или бутилбромида.

Селективность удерживания по ароматическому кольцу уменьшается с увеличением концентрации изопропанола и бутилбромида, а для бутилхлорида практически не изменяется (рис. 4, 5). Если же сравнивать селективности удерживания по CH_2-группе, то при уменьшении удерживания алкилзамещенных АУ с увеличением концентрации модификатора наблюдается увеличение селективности разделения гомологов.

При сравнении бутилхлорида и бутилбромида как модификаторов подвижной фазы видно (рис. 4*а*, *б*), что бутилбромид несколько сильнее уменьшает удерживание АУ. Бутилхлорид практически не влияет на селективность удерживания ПАУ, в то время как в случае бутилбромида селективность удерживания ПАУ заметно уменьшается.

Следует отметить, что если в случае модифицирования подвижной фазы бутилхлоридом селективности удерживания алкилбензолов и алкилнафталинов до 4 об.% содержания модификатора не отличаются и имеют заметное отличие только при 8 об.% (рис. 4, *б*), то при использовании модификатора изопропанола уже при содержании модификатора 0,015 об.% (рис. 5) начинают проявляться различия в удерживании указанных рядов ароматических углеводородов, а при содержании модификатора 0,05 об.% эти различия достигают значительных величин. С одной стороны, это связано с тем, что изопропанол в отличие от бутилхлорида не образует молекулярные π-комплексы с молекулами алкилбензолов и алкилнафталинов, но значительно сильнее дезактивирует поверхностные силанольные группы. С другой стороны, молекулы ароматических углеводородов, по-видимому, более чувствительны по сравнению с молекулярными π-комплексами к поверхностной концентрации недезактивированных силанольных групп.

Таким образом, из экспериментальных данных следует, что модифицирование подвижной фазы бутилбромидом или бутилхлоридом влияет на удерживание моноалкилбензолов практически одинаково. По-видимому, адсорбция этих модификаторов на силикагеле из растворов в гексане близка, а различие в их способности образовывать π-комплексы с моноалкилбензолами невелико из-за наличия всего одного ароматического кольца в молекуле сорбата. Однако следует отметить, что модифицирование бутилбромидом снижает удерживание моноалкилбензолов несколько больше.

В случае же удерживания ПАУ, имеющих два и более ароматических колец в молекуле, влияние модифицирования подвижной фазы бутилбромидом и бутилхлоридом различно. Так как бутилбромид имеет меньший потенциал ионизации, то, вероятно, он образует более прочные π-комплексы с молекулами ПАУ, что приводит к более резкому снижению селективности удерживания молекул ПАУ с увеличением содержания модификатора в подвижной фазе.

Список литературы

1. *Киселев А. В.* Межмолекулярные взаимодействия в адсорбции и хроматографии. М.: Высш. шк., 1986. 360 с.
2. *Snyder L. R.* Principles of Adsorption Chromatography. N. Y.: Marcel Dekker, 1968.
3. *Snyder L. R.* // Anal. Chem. 1974. V. 46. P. 1384.
4. *Soczewinski E.* // Ibid. 1969. V. 41. № 1. P. 179.
5. *Scott R. P. W.* // J. Chromatogr. 1976. V. 122. № 1. P. 35.
6. *Scott R. P. W., Kucera P.* // Ibid. 1977. V. 142. P. 213.
7. *Melander W. R., Horvath Cs.* // Chromatographia. 1982. V. 15. P. 86.
8. *Ageev A. N., Kiselev A. V., Yashin Y. I.* // Ibid. 1980. V. 13. P. 669.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
Химический факультет

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544.45:547:962

© 1991 г.

Рыбин В. К., Григорова Л. В., Макаров Н. В.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ БЕЛКОВ

Симплекс-метод в модификации Нелдера – Мида и факторное планирование эксперимента использованы для оптимизации препаративной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) основных ядерных белков – протаминов на колонке C_{18}. Факторами оптимизации служили скорость подвижной фазы и количество белка, нанесенное на колонку. Найдено сочетание факторов, позволяющее получить полное разделение протаминов. Установлено, что количество белка, нанесенное на колонку, оказывает существенное влияние на качество их разделения. Показано, что факторное планирование эксперимента имеет ряд преимуществ перед симплекс-методом при оптимизации условий препаративной обращенно-фазовой ВЭЖК протаминов.

В последние годы широкое применение для хроматографического разделения белков получила обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Для многих белков удалось подобрать условия проведения хроматографического процесса, позволяющие выделять белки высокой степени чистоты. Одной из наиболее сложных в хроматографическом отношении группой белков являются протамины – ядерные белки половых клеток. Образуя прочный комплекс с ДНК в хроматине половых клеток, эти белки играют ключевую роль в процессах хранения и переноса генетической информации [1].

Интерес к протаминам обусловлен также тем, что они проявляют ряд уникальных свойств: способны тормозить рост раковых клеток и являются пролонгаторами действия некоторых лекарственных препаратов. Кроме того в настоящее время протамины являются наиболее эффективными антагонистами гепарина после проведения экстракорпорального кровотока [2, 3].

Сложность хроматографического разделения протаминов связана с высоким содержанием (более 70%) основных аминокислот, вследствие чего изоэлектрическая точка этих белков находится при pH выше 12 [1]. Кроме того для каждого вида организмов характерен набор из нескольких компонентов протаминов, имеющих близкие физико-химические свойства.

Данная работа посвящена оптимизации препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ протаминов, выделенных из гонад Acipenser stellatus.

Экспериментальная часть

Суммарный протамин из гонад Acipenser stellatus выделяли по методу [4]. Концентрацию белка определяли по реакции Сакагуши [5]. Хроматографию проводили на приборе «Du Pont» модель 8800 (США). Использовали колонку Zorbax ODS

(4,6×250 мм). Подвижная фаза А: 0,2% раствор трифторуксусной кислоты (ТФК) в воде; подвижная фаза В: 70% раствор водного этанола, содержащий 0,2% ТФК. Использовали линейный градиент В (0,65% этанола/мин). Температура колонки 35±0,1° С. Детекцию белков осуществляли при 220 нм. Скорость элюции составляла 0,5–1,0 мл/мин. Используемые в эксперименте реактивы очищали по стандартным методикам.

Аминокислотный состав выделенных фракций определяли на приборе «Liquimat-3» (ФРГ) после гидролиза 6 н. HCl при 105° С.

Математическую обработку результатов экспериментов производили с помощью ЭВМ БЭСМ-6. Для графических построений использовали ЭВМ SP-4100. Применяемые программы были составлены авторами на языках программирования Фортран и Бейсик. Для рандомизации экспериментов при факторном планировании эксперимента использовали генератор случайных чисел ЭВМ SP-4100.

Обсуждение результатов

Протамин из гонад Acipenser stellatus состоит из двух компонентов — стеллинов А и В, которые могут быть получены хроматографически на катионите средней силы КМ-сефадексе С-25 [6]. Однако ионообменная хроматография протаминов является трудоемким и длительным процессом. Кроме того возникают значительные сложности при обессоливании белков, связанные с их высокой основностью и небольшими размерами (молекулярная масса — 3500 D). Ранее нами сообщалось об успешном аналитическом разделении протаминов с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Zorbax ODS [7].

Было показано, что в интервале температур от 25 до 45° С и концентрации ион-парного реагента — трифторуксусной кислоты от 0,05 до 0,3% эффективность разделения белков тем выше, чем большее значение принимают перечисленные факторы. Однако оказалось, что при концентрации ТФК выше 0,2% и температуре колонки более 35° С происходит частичная деструкция сорбента. Это приводит к появлению дополнительных силанольных групп, взаимодействие с которыми положительно заряженных боковых радикалов протаминов резко снижают эффективность колонки. Поэтому для препаративного разделения белков нами были выбраны следующие условия: температура колонки — 35° С, концентрация ТФК — 0,2%. Для элюции использовали линейный градиент этанола, использование которого позволяет достигать наилучшей селективности при разделении протаминов. Предварительные эксперименты показали, что в описанных условиях на разделение оказывают существенное влияние количество нанесенного на колонку белка и скорость подвижной фазы и практически не влияет объем, в котором нанесен образец. Перед нами стояла задача быстрого препаративного разделения как можно большего количества протаминов. Для достижения поставленной цели было решено использовать оптимизацию хроматографического разделения.

Из существующих методов оптимизации предпочтение первоначально было отдано последовательному симплекс-методу, который в последние годы широко применяется в хроматографии [8–10]. Несомненным достоинством этого метода является высокая эффективность при поиске оптимума нелинейных функций многих переменных и возможность создания автоматизированной системы оптимизации разделения в случае применения ЭВМ, связанной с хроматографом. В данной работе мы решили использовать последовательный симплекс-метод в варианте Нелдера — Мида [11]. Учет ограничений по интервалам варьирования факторов осуществлялся следующим образом: если какая-либо точка оказывалась за пределами области допустимых значений хотя бы по одному из факторов, она возвращалась на нарушенную границу. Кроме того в программе был реа-

лизован дополнительный критерий останова — поиск прекращался при выходе симплекса в почти стационарную область, т. е. если происходило последовательно три коллапса многогранника без какого-либо отражения, растяжения или сжатия.

Функция хроматографического отклика (CRF) была выбрана в следующем виде:

$$\mathrm{CRF}=\sum_{i=1}^{N} 2\frac{t_{i+1}-t_i}{W_{i+1}+W_i}-P_t, \qquad (1)$$

где N — число пиков; t_i — время удерживания i-го пика; W_i — ширина i-го пика на полувысоте; P_t -- штрафная функция. Штрафная функция была введена нами из-за необходимости учета времени выполнения разделения — оно не должно быть слишком большим.

Штрафную функцию по времени хроматографии задавали в виде линейной функции

$$P_i=\begin{cases} 0 & \text{при } t_{\text{п}}\leqslant 30, \\ 0{,}03(t_{\text{п}}-30) & \text{при } t_{\text{п}}>30, \end{cases} \qquad (2)$$

где $t_{\text{п}}$ — время удерживания последнего пика, мин. Как уже отмечалось выше, в качестве факторов оптимизации были выбраны: скорость подвижной фазы (v) и количество протамина, нанесенного на колонку (Q). Интервалы варьирования факторов: v=0,5—1,0 мл/мин, Q=0,2—1,0 мг. Исходный симплекс строился в соответствии с рекомендациями [12]. Начальная точка для старта симплекса была выбрана: скорость подвижной фазы — 0,75 мл/мин и загрузка колонки — 0,6 мг. Для нахождения оптимального сочетания факторов требовалось провести 12 экспериментов. Лучшее разделение было получено при загрузке колонки — 0,2 мг и скорости подвижной фазы — 0,75 мл/мин. Значение CRF при этом равнялось 2,0, что свидетельствовало о вполне удовлетворительном разделении двух протаминов стеллинов А и В.

Полученные оптимальные условия не устраивали нас по ряду причин. Во-первых, они находились на нижней границе факторного пространства по количеству белка, нанесенного на колонку. Во-вторых, существовала типичная для симплекс-метода проблема — находимся ли мы в глобальном оптимуме или нашли только локальный. Ее можно было бы разрешить, выбрав начальные точки для симплекса в других местах факторного пространства, но это требовало значительного количества дополнительных экспериментов. В-третьих, существовало опасение, что зависимость функции хроматографического отклика от загрузки колонки и скорости подвижной фазы не имеет экстремума внутри факторного пространства. Принимая во внимание сказанное выше, решили для нахождения оптимальных условий проведения хроматографии дополнительно использовать факторное планирование эксперимента. Аргументом в пользу применения факторного планирования эксперимента служило то, что в случае успеха — построения адекватной модели процесса, можно было выбрать значение скорости подвижной фазы, позволяющее разделять максимальное количество протаминов.

Предполагалась возможность построения математической модели в виде полинома второй степени

$$\overline{\mathrm{CRF}}=B_0+B_1x_1+B_2x_2+B_{12}x_1x_2+B_{11}x_1^2+B_{22}x_2^2, \qquad (3)$$

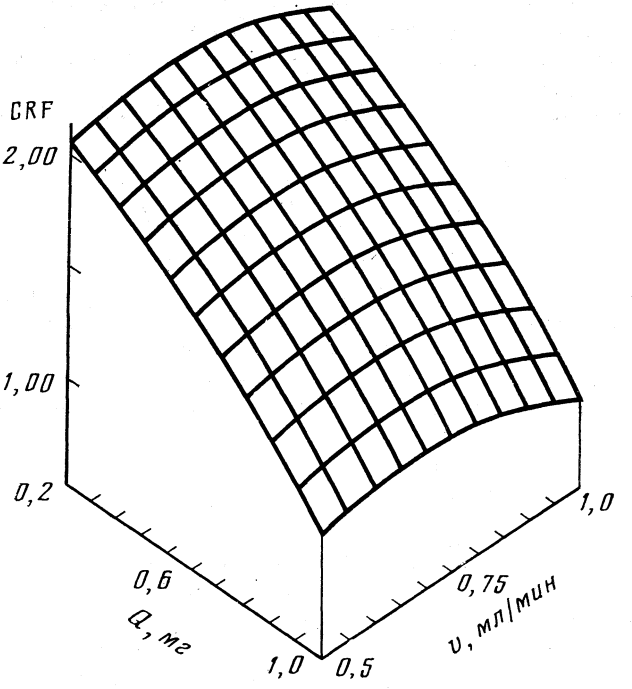


Рис. 1. Зависимость функции хроматографического отклика CRF от скорости подвижной фазы и количества белка введенного в колонку

где $\overline{CRF}$ — функция хроматографического отклика; x_1 — количество белка, нанесенное на колонку, мг (Q); x_2 — подвижной фазы, мл/мин (v).

Интервалы варьирования факторов были оставлены теми же, что и в случае симплекс-оптимизации. Эксперименты реализованы в соответствии с планом второго порядка, содержащем 9 экспериментальных точек в области варьирования двух переменных. Матрица планирования и результаты эксперимента представлены ниже:

Q, мг	0,2	1,0	0,2	1,0	0,2	1,0	0,6	0,6	0,6
v, мл/мин	0,5	0,5	1,0	1,0	0,75	0,75	0,5	1,0	0,75
CRF	2,04	1,17	1,82	0,93	2,24	1,02	1,57	1,61	1,75

Экспериментальное значение функции хроматографического отклика рассчитывали по формуле (1). На основании полученных данных по методу наименьших квадратов была построена модель вида

$$\overline{CRF}=1{,}136-0{,}441Q+3{,}240v-0{,}670Q^2-2{,}350v^2, \qquad (4)$$

которая адекватно описывала экспериментальные данные. Проверка адекватности модели проводилась по критерию Фишера [13]. Следует отметить, что член, содержащий произведение Qv, был отброшен после первоначальных расчетов, так как по критерию Стьюдента коэффициент B_{12} (см. уравнение (3)) оказался статистически незначим. После чего модель была перестроена в отсутствие этого члена, при этом произошло ее улучшение.

На рис. 1 приведена графическая интерпретация полученной модели. Видно, что большее влияние на качество разделения протаминов оказы-

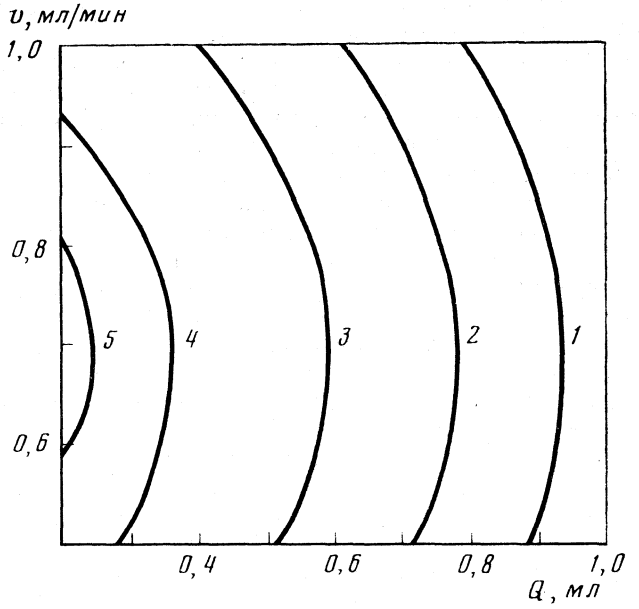


Рис. 2. Проекция линий равного значения функции хроматографического отклика (*1* — 1,25, *2* — 1,50, *3* — 1,75, *4* — 2,00, *5* — 2,10) на плоскость изменения варьируемых факторов

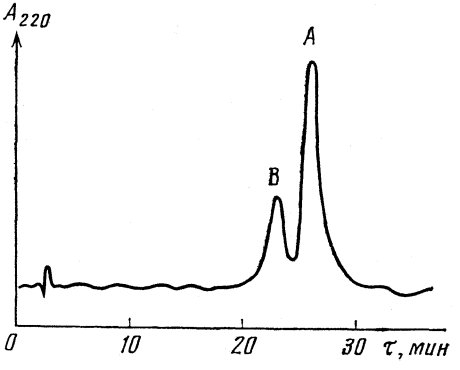


Рис. 3. Препаративное разделение 0,35 мг протамина (условия см. в тексте)

вает количество белка, введенное в колонку, причем при каждом уровне загрузки колонки по скорости движения подвижной фазы имеется оптимум. Обращает на себя внимание тот факт, что на колонке Zorbax ODS можно с хорошей эффективностью препаративно разделять лишь небольшие количества протаминов. По-видимому, основная причина — сильное взаимодействие гуанидиновых групп протаминов с силанольными группами сорбента. В пользу такого предположения свидетельствует тот факт, что при замене нами сорбента Zorbax ODS на Zorbax-C_8, который характеризуется более низким содержанием свободных силанольных групп [14], произошло возрастание эффективности колонки. Другая возможная причина — это малые размеры пор Zorbax ODS.

Для более точной локализации области оптимальных значений, полученная модель была представлена в виде проекции линий равного значения функции хроматографического отклика на плоскость $v-Q$ (рис. 2). Как следует из рис. 2 максимальной загрузки колонки при хорошем разрешении между пиками можно достигнуть при скорости подвижной фазы 0,65—0,75 мл/мин. Нами был проведен эксперимент по препаративному разделению 0,35 мг протамина при оптимальном значении скорости подвижной фазы (0,7 мл/мин). Как видно из рис. 3, было получено хорошее разделение компонентов стеллина. Гомогенность выделенных протаминов стеллинов А и В подтверждала данные аминокислотного анализа. Значение функции хроматографического отклика при этом равнялось 1,95. Следует отметить, что это находится в хорошем соответствии с ожидаемым значением, рассчитанным по формуле (4) — 2,02.

Проведенное исследование показывает, что как симплекс-метод, так и факторное планирование эксперимента с успехом могут быть использованы для оптимизации препаративной ВЭЖХ протаминов. Применение факторного планирования эксперимента оказалось более эффективным для нахождения условий разделения максимального количества белка. Эту задачу можно было бы решить и с помощью симплекс-метода, если ввести в функцию хроматографического отклика дополнительно штрафную функцию по количеству разделяемого белка. Но это могло привести к значительному увеличению числа экспериментов, необходимых для поиска оптимального решения.

Таким образом, для оптимизации условий препаративной обращенно-фазовой ВЭЖХ белков, особенно в тех случаях, когда ставится задача достижения максимальной производительности колонки, применение факторного планирования эксперимента представляется более предпочтительным.

Список литературы

1. *Ando T., Yamasaki K.* Protamines. B.: Springer Verlag, 1973. S. 109.
2. *Jagues L. B.* // Can. Med. Assoc. 1973. V. 108. P. 1291.
3. *Taylor S., Folkman J.* // Lancet. 1982. № 5. P. 1283.
4. *Ando T., Hashimoto C. J.* // J. Biochem. 1958. V. 45. P. 453.
5. *Satake K., Luck J.* // Bull. Soc. Biol. 1958. V. 40. P. 1743.
6. *Юликова Е. П., Рыбин В. К., Силаев А. Б.* // Биоорган. химия. 1979. Т. 5. № 1. С. 5.
7. *Рыбин В. К., Яглицкая Н. Н., Макаров Н. В.* // Химия природных соединений. 1986. № 4. С. 744.
8. *Sabate L. G., Diaz A. M., Tomas Y. M., Gassiot M. M.* // J. Chromatogr. Sci. 1983. V. 21. P. 439.
9. *Berridge J. C.* // J. Chromatogr. 1982. V. 244. P. 1.
10. *Berridge J. C.* // Anal. Proc. 1983. V. 20. P. 29.
11. *Nelder J. A., Mead R.* // Computer J. 1965. V. 7. P. 308.
12. *Химмельблау Д.* Прикладное нелинейное программирование. М.: Мир, 1976. С. 320.
13. *Box G. E. P., Hunter W. G., Hunter J. S.* Statistics for experiments. N. Y.: Wiley, 1978. P. 250.
14. *Goworek J., Nooitjedacht S., Rijkahof M., Poppe H.* // J. Chromatogr. 1986. V. 352. P. 399.

**Московский институт
прикладной биотехнологии**

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

Аборнев С. И., Сидельников В. Н.

ОПТИМИЗАЦИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ СВЕРХКРИТИЧЕСКОЙ ФЛЮИДНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА МИКРОНАСАДОЧНОЙ КОЛОНКЕ С ПЛАМЕННО-ИОНИЗАЦИОННЫМ ДЕТЕКТОРОМ

Предложена схема устройства деления потока сверхкритического диоксида углерода на выходе микронасадочной колонки, обеспечивающего представительный ввод пробы в детектор из колонок, заполненных 5 мкм сорбентом. Показано, что предложенная конфигурация делителя потока подвижной фазы обеспечивает устойчивое детектирование примесей при регистрации токов пламенно-ионизационного детектора порядка 10^{-12}–10^{-13} А. Приведены данные по влиянию температуры головки насоса высокого давления на воспроизведение результатов анализа в режиме сверхкритической флюидной хроматографии на микронасадочных колонках с программированием давления подвижной фазы. Представлены хроматограммы смесей полиароматических, кремнийорганических углеводородов.

Сверхкритическая флюидная хроматография (СФХ) – новый, быстро развивающийся физико-химический метод. Он основан на том, что некоторые соединения (углекислый газ, аммиак, пентан и другие), находясь при температуре и давлении выше критических для этих веществ значений, обладают рядом уникальных свойств: по плотностным характеристикам – это жидкости, а по вязкостным и диффузионным свойствам – занимают промежуточное положение между конденсированной фазой и газом [1]. Использование их в качестве подвижных фаз (ПФ) позволяет решать многие задачи газовой и жидкостной хроматографии, добиваясь в некоторых случаях лучших результатов, особенно при анализе термолабильных и высококипящих соединений [2–4]. Немаловажным достоинством СФХ является ее совместимость с универсальными детекторами [5]. Поэтому очень важен как опыт конструирования сверхкритического хроматографа, так и методики проведения экспериментов в СФХ.

В данной работе рассмотрены условия проведения сверхкритической хроматографии с CO_2 в качестве подвижной фазы на микронасадочных колонках с пламенно-ионизационным детектором (ПИД).

Мы используем сконструированный нами на базе насоса высокого давления «Varian 8500» сверхкритический хроматограф, в основных чертах описанный в [6]. Выбор углекислого газа в качестве подвижной фазы обусловлен низкими критическими параметрами CO_2 ($T_{кр}$=31,3° С, $p_{кр}$=72,9 атм [7]) и его инертностью.

Программирование давления ПФ. Одной из аппаратурных особенностей СФХ является организация специального режима подачи носителя, который обеспечивает изменение давления в колонке по желаемому закону. Такое программирование давления подвижной фазы аналогично по своему назначению программированию температуры в газовой или градиентному элюированию в жидкостной хроматографии [8]. Для обеспечения требуемого режима работы флюидного хроматографа мы используем разработанное нами устройство – программатор давления [9]. На рис. 1 приведены три группы экспериментальных кривых изменения давления на входе одной и той же колонки при охлаждении рабочей головки насоса до температуры 5° С (сплошные линии) и в условиях, когда ее температура поднималась до 27° С (пунктирные линии), при одинаковых в каждом случае стартовых условиях – давлении, температуре термостата 100° С и частоте управляющих про-

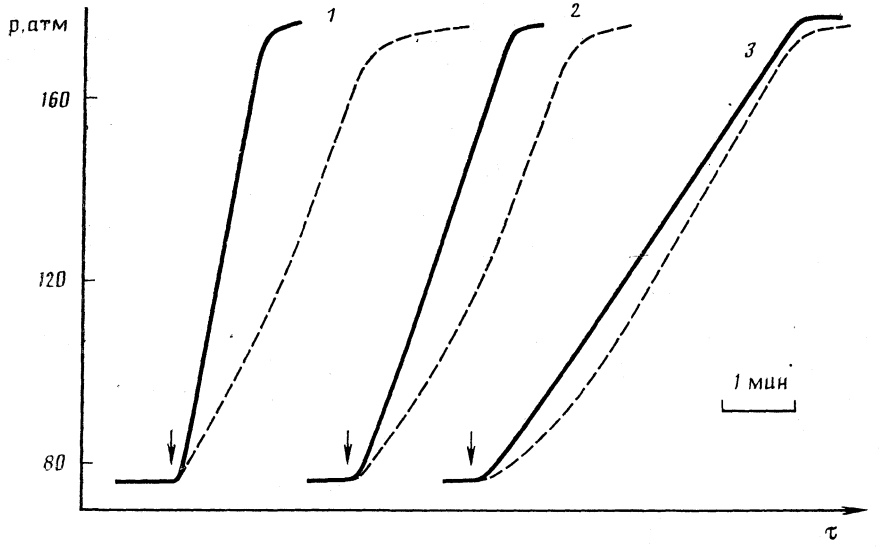


Рис. 1. Профили изменения давления CO_2 на входе колонки при охлаждении головки насоса (сплошные линии) и без (пунктирные линии) при f=50 (*1*), 25 (*2*), 12,5 Гц (*3*). Стрелками показан момент начала программирования давления подвижной фазы

грамматором импульсов f. Сильное отклонение во втором случае от ожидаемого линейного изменения профиля давления подвижной фазы связано, по-видимому, со значительной сжимаемостью CO_2 вблизи критической точки. Подтверждением этого может служить то, что профиль давления в этом случае меняется в зависимости от наполненности рабочего объема насоса жидкой углекислотой, становясь более линейным с уменьшением последнего. Подобного поведения при охлажденной головке не наблюдалось. Отсюда можно сделать вывод, что для воспроизводимости результатов СФХ с углекислотой в качестве подвижной фазы желательно охлаждать рабочую часть насоса высокого давления.

В таблице приведены усредненные по шести экспериментам данные по времени удерживания пирена в микронасадочной колонке длиной 20 см, внутренним диаметром 1 мм, заполненной сорбентом Nucleosil C18, 5 мкм, приготовленной по методике, изложенной в [10], при указанных параметрах экспериментов [11]. Они были получены в условиях ввода пробы с прерыванием потока подвижной фазы: проба вводилась при атмосферном давлении, колонка подключалась к рабочему объему насоса, находящемуся при давлении ~75 атм, потом давление в системе поднималось с помощью программатора до нужной величины, оставаясь затем постоянным. Тем не менее в столь неблагоприятных для СФХ экспериментальных условиях охлаждение головки насоса до ~5° С позволило добиться неплохой воспроизводимости результатов.

Ввод пробы в детектор. Комбинация уникальных физико-химических свойств инертных сверхкритических подвижных фаз с чувствительным универсальным пламенно-ионизационным детектором и микронасадочными колонками имеет практический интерес. Однако достаточно большие оптимальные потоки ПФ для коло-

Времена удерживания пирена на микронасадочной колонке

t°, С	p, атм	τ, с
70	175	780±8,7
70	255	205±3,9
100	255	250±5,6
100	175	1635±5,8

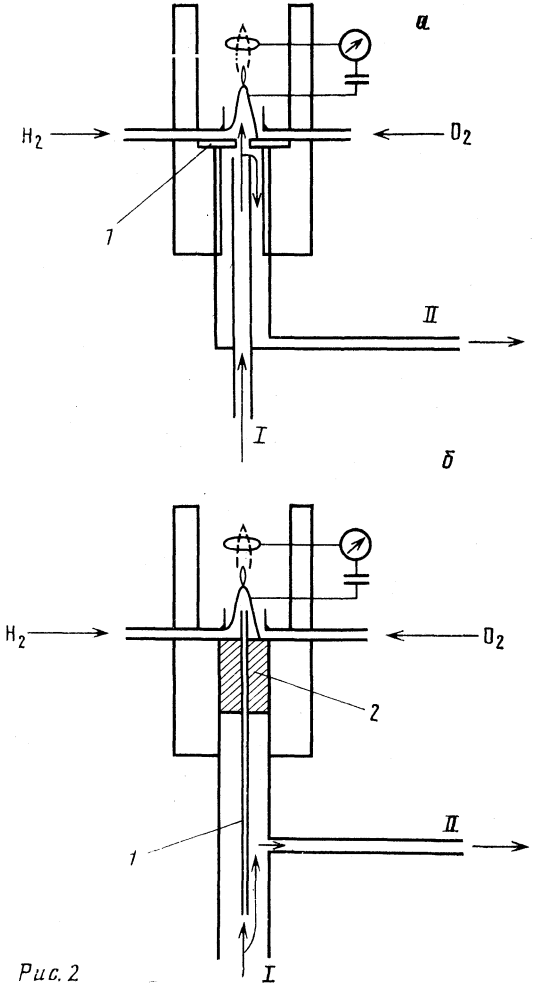


Рис. 2

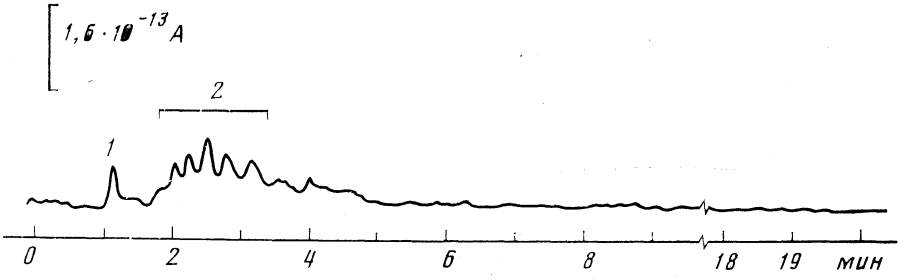


Рис. 3

Рис. 2. Схема ввода пробы в ПИД: *а* – *1* – отверстие диаметром 15 мкм, *б* – *1* – рестриктор, *2* – уплотнение рестриктора; I – из колонки, II – сброс

Рис. 3. Дрейф нулевой линии ПИД. Температура термостата 68° С, детектора – 360° С. Общий расход ПФ через колонку по жидкой углекислоте ~10 мл/ч: *1* – ацетон, *2* – углеводороды; давление подвижной фазы 140 атм

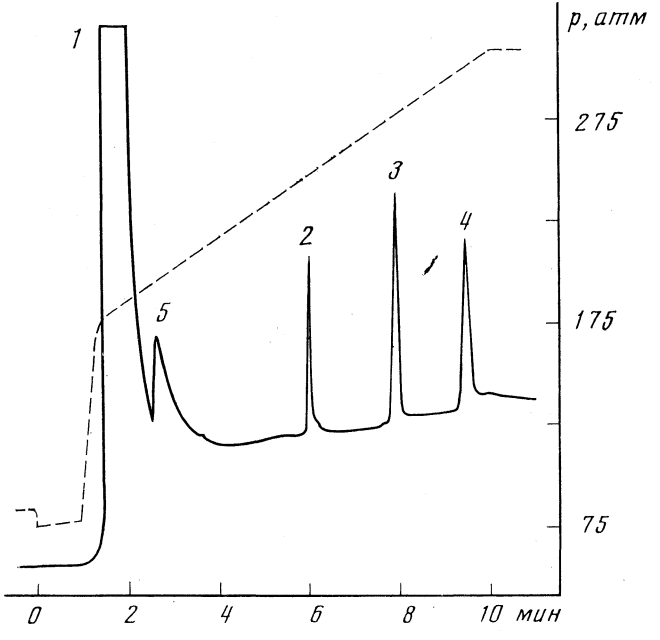


Рис. 4. Хроматограмма тестовой смеси полиароматических углеводородов при 100° С: *1* — бензол, *2* — антрацен, *3* — пирен, *4* — хризен, *5* — примесь, конденсирующаяся из углекислоты на входе колонки при вводе пробы с прерыванием потока ПФ. Расход по жидкому CO_2 при давлении 255 атм равен ~12 мл/ч

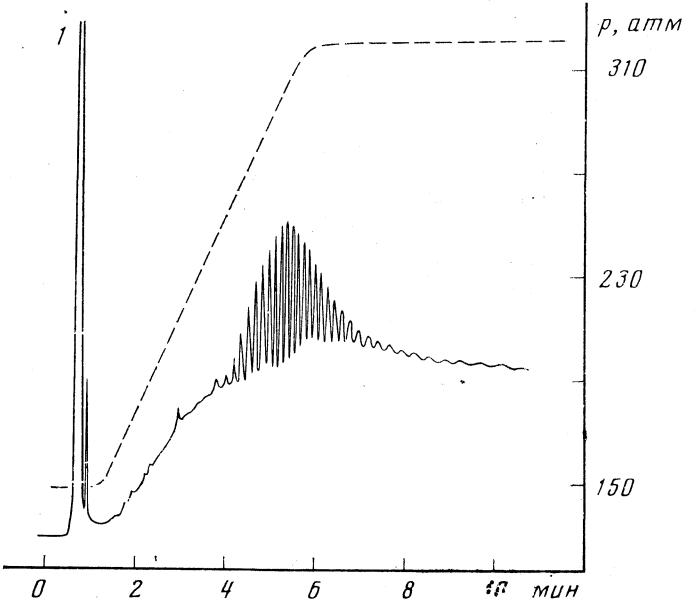


Рис. 5. Хроматограмма полимера ПМС-100 при 100° С в потоке сверхкритического CO_2. Расход по жидкой углекислоте при давлении 320 атм равен ~20 мл/ч: *1* — гексан

нок с внутренним диаметром более 0,5 мм требуют деления потока на входе в ПИД.

На рис. 2 приведено схематичное изображение делителя потока ПФ на выходе колонки, описанного в [12] (*а*), и применяемого нами устройства (*б*). Как нам представляется, непрямой ввод элюента с пробой из ограничителя давления (рестриктора) в пламя водородной горелки может приводить к значительному дрейфу нулевой линии, что и заметно на приведенных в статье хроматограммах.

Предложенная нами конфигурация делителя потока подвижного носителя на выходе колонки обеспечивает устойчивое детектирование примесей при регистрации токов ПИД порядка $10^{-12} - 10^{-13}$ А. На рис. 3 приведена хроматограмма углеводородов, записанная при очень высокой чувствительности электрометрического усилителя, характеризующая дрейф нулевой линии за период времени ~20 мин. Ввод элюента с пробой в детектор проводился с помощью рестриктора – тонкого кварцевого капилляра с внутренним диаметром 12 мкм и длиной 10 см, общий расход углекислоты через колонку задавался регулировочным вентилем высокого давления.

На рис. 4 приведена хроматограмма смеси полиароматических углеводородов, полученная на описанной выше колонке с программированием давления CO_2 (синхронный профиль давления показан пунктиром) при температуре головки насоса 5,6° С.

Одним из достоинств СФХ является возможность анализа сложных полимерных систем. На рис. 5 показан пример разделения полиметилсилоксановой жидкости ПМС-100 на составляющие ее олигомеры. Ввод пробы в колонку проводился краном с внутренним объемом $\sim 100 \cdot 10^{-9}$ л без прерывания потока CO_2, изготовленным СКБ ИОХ (Москва). Хроматограмма получена на микронасадочной колонке, подобной описанной выше, но с сорбентом Nucleosil NH_2, 5 мкм.

Таким образом, приведенные результаты свидетельствуют о важности оптимизации экспериментальных условий проведения сверхкритической флюидной хроматографии.

Список литературы

1. *Gere D. R.* // Science. 1983. V. 222. № 4621. P. 253.
2. *Gouw T. H., Jentoff R. E.* // Adv. Chromatogr. 1975. V. 13. P. 1.
3. *Руденко Б. А., Байдаровцева М. А., Агаева М. А.* // Журн. аналит. химии. 1975. Т. 30. № 6. С. 1191.
4. *Manninen P., Riekkola M.-L., Holm Y., Hiltunen R.* // HRC&CC, 1990. V. 13. № 3. P. 167.
5. *Novotny M.* // Ibid. 1986. V. 3. P. 137.
6. *Аборнев С. И., Сидельников В. Н.* // Научное приборостроение. Физика аналитических приборов. Л.: Наука, 1989. С. 56.
7. *Lee M. L., Markides K. E.* // Science. 1987. V. 235. P. 1342.
8. *Klesper E., Schmitz F. P.* // J. Chromatogr. 1987. V. 402. P. 1.
9. *Аборнев С. И., Малахов В. В., Сидельников В. Н.* // Научное приборостроение. Автоматизация научных исследований. Л.: Наука, 1988. С. 11.
10. *Аборнев С. И., Уткин В. А.* // Тез. докл. Всесоюз. конф. «Теория и практика газовой хроматографии». Горький, 1990. С. 41.
11. *Аборнев С. И., Малахов В. В., Сидельников В. Н.* // Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1990. № 2. С. 10.
12. *Engelhart H., Gross A.* // HRC&CC. 1988. V. 11. P. 38.

Академия наук СССР
Сибирское отделение
Институт катализа
Новосибирск

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

Агеев А. Н., Мигунов И. М., Орлов В. И., Радченко А. Ю., Яшин Я. И.

НОВЫЕ ЖИДКОСТНЫЕ ХРОМАТОГРАФЫ ДОКБА

Описаны разработанные Дзержинским ОКБА в последнее время жидкостные и ионные хроматографы. Даны технические характеристики приборов и рекомендации по их применению для определения различных веществ.

Дзержинским ОКБА в последнее время разработан ряд портативных и стационарных жидкостных хроматографов. В комплексе эти хроматографы могут быть использованы для разделения сложных смесей веществ и анализа широкого круга загрязнителей окружающей среды: воды, почвы, воздуха, пищи и фуража (малолетучих пестицидов, полиядерных ароматических соединений, нитрозоаминов, ароматических аминов, производных фенолов, в том числе полихлорфенолов, афлатоксинов, фталатов, хлорированных дифенилов и многих других малолетучих органических вредных веществ). Кроме того, возможно определение токсичных ионов: нитратов и нитритов, ионов тяжелых металлов, кислых газов в выбросах, состав аэрозолей методом ионной хроматографии.

Портативный жидкостной хроматограф ХПЖ-1 предназначен для определения веществ, обладающих электрохимической активностью, т. е. способных окисляться или восстанавливаться на электроде из стеклоуглерода при определенном потенциале. ХПЖ-1 может найти широкое применение для анализа загрязнителей питьевых, природных и сточных вод, в частности фенола и его производных (хлорфенолов, нитрофенолов, оксифенолов и др.); анилина и его производных, в том числе анилиновых красителей; пестицидов и гербицидов; серосодержание соединений; тяжелых металлов. Кроме того, на приборе возможно определение ряда биологических компонентов, в частности, катехоламинов (адреналин, норадреналин и т. д.). На рис. 1, 2 приведены хроматограммы определения фенолов и катехоламинов.

Хроматограф ХПЖ-1 конструктивно выполнен в едином переносном корпусе, в котором расположен блок питания от сети напряжением 220 В и от аккумулятора на 12 В, что дает возможность работать как в лабораториях, так и в полевых условиях. Хроматограф снабжен электрохимическим детектором, обладающим высокой селективностью и высокой чувствительностью (на уровне 10^{-11} г), микроколонками диаметром 1 и 2 мм, имеет возможность работать с двумя типами ячеек (рабочей и защитной) или ячейкой с двумя рабочими электродами.

Технические характеристики

Уровень шумов	– 0,05 нА
Максимальное рабочее давление насоса	– 20 МПа
Объем ячейки	– менее 1 мкл
Предел детектирования:	
по гидрохинону	– $5 \cdot 10^{-10}$ г/см^3
по фенолу	– $5 \cdot 10^{-9}$ г/см^3
Энергопотребление	– не более 15 Вт
Масса	– не более 18 кг

Жидкостной лабораторный хроматограф «Цвет-3003» предназначен для определения молекулярно-массового распределения (ММР) полимеров. Прибор снабжен диалоговым вычислительным комплексом ДВК-3 с программами расчета ММР, спектрофотометрическим детектором, может быть использован как универсальный лабораторный жидкостной хроматограф. «Цвет-3003» может быть использован для

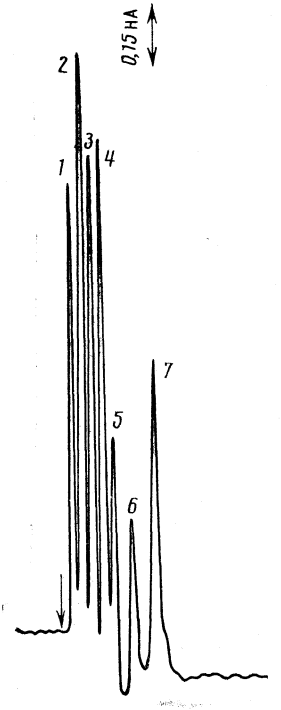


Рис. 1

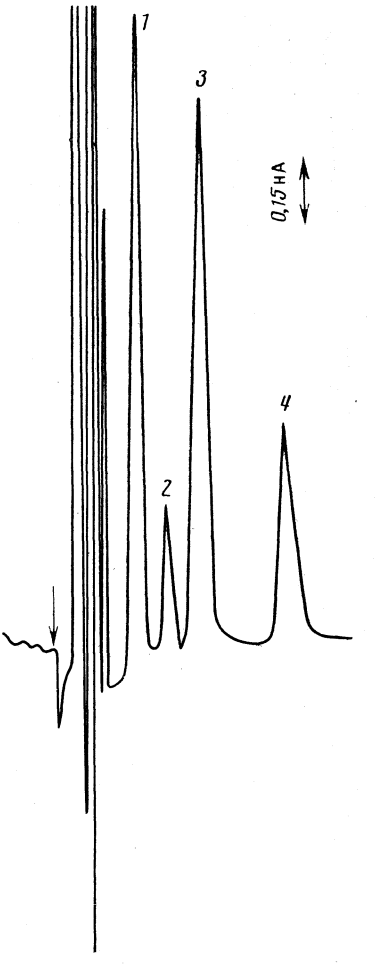


Рис. 2

Рис. 1. Анализ фенолов. Колонка 100×2 мм, силасорб С18, 5 мкм, элюент 0,002 М фосфатный буфер – изопропанол (8 : 2), pH 5, расход 50 мкл/мин, доза 1 мкл, потенциал +1,2 В; *1* – пирогаллокарбоновая кислота (11,25 ppm); *2* – *о*-аминофенол (8 ppm); *3* – *п*-крезол (12,75 ppm); *4* – 1-нафтол (14,5 ppm); *5* – 1-бром-2-нафтол (15,5 ppm); *6* – 2,4,6-трихлорфенол (12,45 ppm); *7* – 2,4,6-трибромфенол (17,9 ppm)

Рис. 2. Анализ катехоламинов. Колонка 100×2 мм, силасорб С18, 5 мкм, элюент: 0,03 М фосфатно-цитратный буфер – ацетонитрил (93 : 7) + 0,3 мМ Na_2ЭДТА + 3 мМ октилсульфонат натрия, pH 4,2, расход 100 мкл/мин, доза 30 мкл, потенциал +0,8 В; *1* – норадреналин (25 нг/мл); *2* – адреналин (25 нг/мл); *3* – 3,4-дигидроксибензиламин; *4* – дофамин (50 нг/мл)

определения в питьевых, природных и сточных водах фенолов, хлорорганики, фосфорорганики, капиллярной ароматики; применен для анализа качества пищевых продуктов и лекарств.

Технические характеристики

Рабочий диапазон длин волн спектрофотометра	– 200–700 нм
Уровень шумов	– $4 \cdot 10^{-4}$ ед. оптической плотности
Диапазон расходов элюента	– 0,1–5 $см^3$/мин
Максимальное давление насоса	– не менее 20,0 МПа
Температурный диапазон термостата колонок	– 20–70° С

Жидкостной лабораторный хроматограф «Цвет-3110» предназначен для определения в лабораторных условиях веществ, поглощающих излучение с длиной волны 325 нм. На приборе возможно определение афлатоксинов, полиядерных ароматических соединений (бензипрен и т. д.), аминокислот, витаминов, белков.

Хроматограф снабжен лазерным флуориметрическим детектором, термостатом колонок, автосамплером, системой градиентного элюирования, микропроцессорной системой обработки и управления. Жидкостные тракты хроматографа выполнены из титан-циркониевого сплава, наружный диаметр капилляров (1,6 мм) позволяет состыковать их с помощью соединений типа «свагелок» с зарубежными приборами. Колонки с внутренним диаметром 1, 2 и 4 мм, длиной 100, 200 и 250 мм выполнены из титан-циркониевого сплава.

Технические характеристики

Чувствительность по флуоресцеину	– $1{,}5 \cdot 10^{-12}$ г/см^3 ($1{,}5 \cdot 10^{-16}$ г)
Длина волны лазерного возбуждения	– 325 нм
Спектр флуоресценции (обеспечивается набором интерференционных фильтров)	– от 360 до 750 нм
Максимальное рабочее давление насосов	– 30 МПа
Погрешность задания градиента	– 10%
Температурный диапазон термостата колонок	– 40–100° С
Масса прибора	– не более 75 кг

Портативный ионный хроматограф ХПИ-1 позволяет проводить анализ смесей неорганических и органических катионов и анионов. Весьма удобен для определения нитратов в воде, почве и пищевых продуктах, особенно в овощах и мясных продуктах. После улавливания из воздуха, из выбросов промышленных предприятий на хроматографе можно анализировать кислые газы (SO_2, SO_3, NO_x, H_2S, HCl, HF). После перевода в ионную форму можно также анализировать в выбросах Cl_2, альдегиды, органические кислоты и другие соединения.

В основу принципа действия хроматографа положены методы ионной хроматографии. Прибор выполнен в виде компактного, удобного для переноски блока, на передней панели которого расположены органы управления и индикации данных. Внутри блока находятся устройства ввода пробы и подачи элюента, хроматографические колонки, кондуктометрический детектор, блок электрического питания. Узел обработки и отображения результатов анализа, выполненный с применением микропроцессорной техники, формирует и запоминает высоты, площади и времена удерживания 99 последовательных пиков и производит расчет концентрации ионов. Параметры и результаты расчетов отображаются на цифровом индикаторе. Имеется возможность вывода результатов на внешнее цифропечатающее устройство и самописец.

Технические характеристики

Диапазон измерения электропроводности	– 0–100 мкСм
Уровень флуктуационных шумов нулевого сигнала	– 0,05 мкСм
Диапазон расхода элюента	– 0,1–0,9 мл/мин
Максимальное давление насоса	– 5 МПа
Габаритные размеры	– 450×320×155 мм
Масса	– 12 кг
Энергопотребление	– 12 Вт

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

СОРБЕНТЫ И КОЛОНКИ ДЛЯ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

УДК 541.183.5

© 1991 г.

Трушин С. А., Мальцев В. Г., Кевер Е. Е., Виноградова Л. В., Беленький Б. Г.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОРБЕНТОВ ДЛЯ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ БЕЛКОВ

Исследовано влияние поверхностной плотности и длины привитых алкильных групп, способа модифицирования, пористой структуры и количества адсорбционно-активных силанольных гидроксилов на поверхности обращенно-фазовых сорбентов на удерживание, обратимость сорбции и селективность разделения белков, а также гидролитическую устойчивость сорбентов. Разработан простой микрохроматографический метод количественного определения адсорбционно-активных силанольных групп на поверхности обращенно-фазовых сорбентов, основанный на линейной зависимости коэффициентов емкости тестовых веществ (фенол, бензиловый спирт) от поверхностной концентрации силанолов. Исследована адсорбция белков на кремнеземных сорбентах в зависимости от pH и состава элюента.

Наиболее распространенными неподвижными фазами для обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) белков являются алкилированные широкопористые силикагели. Усовершенствование данного типа сорбентов имеет важное значение для развития жидкостной хроматографии.

С этой целью в настоящей работе были исследованы хроматографические свойства алкилированных кремнеземов, а именно влияние особенностей пористой структуры, поверхностной плотности и размера привитых алкильных групп, способа модифицирования, количества адсорбционно-активных силанольных гидроксилов на удерживание, обратимость сорбции и селективность разделения белков.

Экспериментальная часть

Для приготовления элюентов использовали трижды перегнанную воду, 2-пропанол, ацетонитрил («Lichrosorb», «Merck», ФРГ), трифторуксусную кислоту («Pierce», США); хлорную, уксусную, соляную, муравьиную, винную кислоты марки «х. ч.» («Реахим», СССР); дихлорметан, тетрахлорид углерода, бензол, фенол, бензиловый

спирт марки «х. ч.» («Реахим», СССР); рибонуклеазу А, миоглобин, цитохром *c*, овальбумин, бычий сывороточный альбумин («Serva», ФРГ) и лизоцим марки «Б» («Реахим», СССР).

Для получения обращенно-фазовых сорбентов и набивки микроколонок применяли неподвижные фазы: Лихросорб Si 100, Лихросфер Si 300 («Merck», ФРГ), Нуклеосил 300 C_4, Нуклеосил 500 C_4 («Macherey – Nagel», ФРГ) и макропористые стекла, любезно предоставленные Б. И. Вензелем (Институт химии силикатов АН СССР).

Сорбенты для ОФ ВЭЖХ получали путем обработки алкиллитиевыми соединениями хлорированного тионилхлоридом силикагеля или макропористого стекла в соответствии с методикой Унгера [1]. Средний диаметр пор, удельную поверхность и другие параметры пористой структуры определяли с помощью ртутной порометрии на порозиметре Auto-Pore 9200 («Micromeritics», США). Поверхностную плотность привитых алкильных групп рассчитывали по данным элементного анализа.

Микроколонки готовили из толстостенного фторопластового капилляра с внутренним диаметром 0,5 мм, наружным диаметром 1,5 мм, длиной 20–200 мм. На конце капилляра устанавливали пористый титановый фильтр диаметром 0,5 мм с порами 0,5 мкм. Заполнение колонок силикагелем и макропористым стеклом проводили из 3%-ной водной суспензии, а обращенно-фазовым сорбентом – из 3%-ной суспензии в четыреххлористом углероде при давлении 10 МПа. Испытание гидролитической устойчивости обращенно-фазовых сорбентов проводили в течение 14 дней при 50° С в кислом (pH=1,7; 0,36%-ный раствор трифторуксусной кислоты) или в щелочном (pH 11,1; 0,006%-ный раствор NaOH) водном растворе 2-пропанола (33%).

Хроматографические исследования проводили на макетной установке, состоящей из двух микрошприцевых насосов и блоков управления к ним от хроматографа ХЖ-1310 (НТО АН СССР), программатора градиента, спектрофотометрического детектора SPD 2M («Shimadzu», Япония), крана-дозатора «Valco» (США) с петлей 1 мкл, интегратора CI-100 (Лабораторные приборы, ЧСФР).

Для градиентной элюции белков использовали элюенты: А=0,1%-ная трифторуксусная кислота в воде (pH-1,9); В=0,1%-ная трифторуксусная кислота в ацетонитриле.

Обсуждение результатов

Микрохроматографическое определение адсорбционно-активных силанольных групп на поверхности обращенно-фазовых сорбентов. Одним из критериев качества обращенно-фазовых сорбентов является наличие на поверхности неэкранированных силанольных групп, приводящих к необратимой адсорбции белков, уширению хроматографических зон и снижению гидролитической стабильности сорбентов [2, 3]. Известные хроматографические тесты дают лишь качественное представление о наличии силанольных групп [4–7]. Для количественного хроматографического определения адсорбционно-активных силанольных групп были использованы в качестве тестовых веществ бензол, фенол, бензиловый спирт, а в качестве элюента – дихлорметан, насыщенный водой. В этих условиях фенол и бензиловый спирт адсорбируются исключительно на силанольных группах и на коэффициенты емкости k' пропорциональны поверхностной концентрации SiOH-групп (рис. 1).

Поверхностная концентрация α_x силанольных групп на исследуемом сорбенте определялась по изменению k' тестовых веществ относительно эталонного сорбента – немодифицированной кремнеземной матрицы с известной поверхностной концентрацией силанольных групп α_0 (определенной титрованием хлорированного тионилхлоридом силикагеля):

$$\alpha_x = (k_x'/k_0)/\alpha_0, \qquad (1)$$

где $(k_x'/k_0') = \theta$ – отношение факторов емкости тестовых веществ на исследуемом и эталонном сорбентах, названное силанольным индексом и показывающее долю адсорбционно-активных силанольных групп на поверхности обращенно-фазового сорбента.

Общая поверхностная концентрация функциональных групп обращенно-фазового сорбента представляет сумму поверхностных концентраций

привитых алкильных групп α_c, адсорбционно-активных α_x и экранированных, адсорбционно-неактивных α_s силанольных групп:

$$\alpha_0=\alpha_x+\alpha_s+\alpha_c. \quad (2)$$

Определяя α_c из результатов элементного анализа [8]:

$$\alpha_c=10^6[C][s(1200n_C-([C]M'))]^{-1} \quad (3)$$

(где [C] — процентное содержание углерода, n_C — число атомов углерода в привитом алкильном лиганде; s — удельная поверхность немодифицированного сорбента, м^2/г; $M'=M-M_{OH}$ — приведенная молекулярная масса привитой группы (в случае модифицирования октиллитием $M'=96$, бутиллитием — $M'=40$), M — молекулярная масса привитой группы, M_{OH} — молекулярная масса гидроксильной группы) и предполагая, что поверхностная концентрация α_s экранированных SiOH-групп пропорциональна концентрации привитых групп α_c:

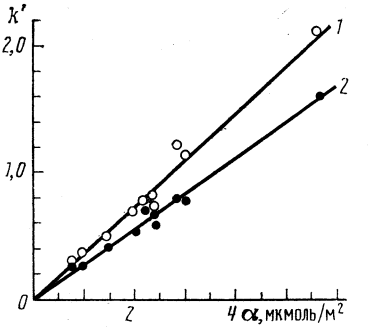


Рис. 1. Линейная зависимость коэффициента емкости k' от поверхностной концентрации силанольных групп для серии сорбентов Лихросорб-100 С8; *1* – бензиловый спирт, *2* – фенол

$$\alpha_s=\gamma\alpha_c \quad (4)$$

(где γ — коэффициент экранирования или число силанольных групп, экранированных одним алкильным лигандом; в действительности, в случае объемных заместителей γ может зависеть от α_c [9]), из (1)—(4) получаем

$$(1-\theta)\cdot 100\%=10^8(\gamma+1)[C]/[s\alpha_0(1200n_C-[C]M')]. \quad (5)$$

Левая часть формулы (5) соответствует степени покрытия поверхности сорбента и указывает ту долю его поверхности, которая при хроматографическом тестировании адсорбционно-неактивна.

Коэффициент экранирования можно определить из разности значений степени покрытия поверхности сорбента, определенной хроматографическим тестированием и рассчитанной теоретически по (5) при условии $\gamma=0$.

Экспериментальное подтверждение зависимости (5) получено на серии сорбентов Лихросорб Si 100 C_8 и Лихросфер Si 300 C_4, модифицированных литийоктилом и литийбутилом (рис. 2). Для Лихросорба Si 100 C_8 экспериментальные значения степени покрытия поверхности меньше, чем теоретические, что свидетельствует об отсутствии экранирующего эффекта привитых октильных групп в выбранных условиях хроматографии. Другой причиной этого может быть появление новых силанольных гидроксилов на поверхности сорбентов в результате реакции алкиллитиевых соединений с доступными силоксановыми группами [10]. Указанный эффект был обнаружен нами при исследовании сорбентов, модифицированных этил- и метиллитием.

При модификации сорбентов этиллитием степень покрытя не удавалось получить выше 30—40%, а в случае метиллития степень покрытия составляла — 20%, т. е. в модифицированном сорбенте было больше гидроксилов, чем в исходном. В случае использования алкиллитиевых соединений с более длинной алкильной цепью (C_4, C_8) вероятность этой побочной реакции резко уменьшается, однако при больших временах реакции (несколько су-

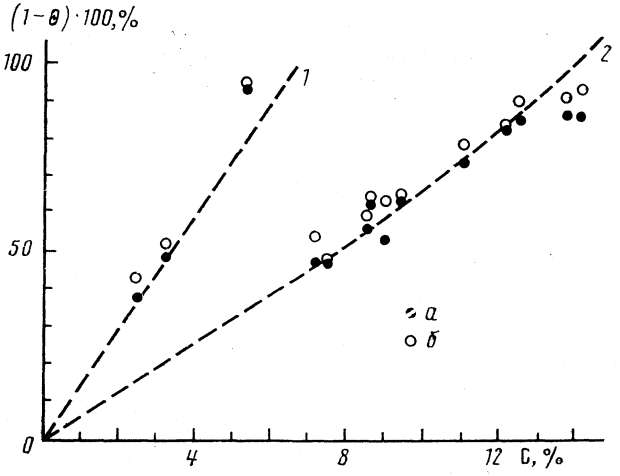


Рис. 2. Зависимость степени модифицирования (1−θ)·100% от содержания углерода, рассчитанные по формуле (5) для сорбентов: *1* **– Лихросфер Si 300 C4 ($\bar{s}$=250 м²/г, α_0=5,8 мкмоль/м²); *2* – Лихросорб Si 100 ($\bar{s}$=300 м²/г, α_0=5,7 мкмоль/м²) и результаты хроматографического тестирования: *а* – фенол, *б* – бензиловый спирт**

ток) полностью исключить ее нельзя. Для Лихросфера Si 300 C_4 возможно незначительное экранирование, но вследствие большой погрешности элементного анализа (очень низкое содержание углерода, обусловленное малой поверхностью сорбента и короткой цепью алкила) количественные оценки невозможны.

Адсорбция белков на немодифицированных кремнеземах. Обнаружено, что с увеличением доли адсорбционно-активных силанольных групп на поверхности обращенно-фазовых сорбентов возрастает неспецифическая ОФ ВЭЖХ адсорбция белков. Для выяснения характера взаимодействия белков с силанольными группами исследована их адсорбция на немодифицированных кремнеземах в элюентах для ОФ ВЭЖХ – водно-ограничесих средах с pH=1,5÷2,2.

Установлено, что адсорбционная активность макропористых стекол по отношению к белкам (лизоциму, химитрипсину, бычьему сывороточному альбумину) минимальна, когда концентрация ацетонитрила (изопропанола) в элюенте составляет 20—60% и полностью подавляется в этой области концентраций при pH=1,7 (рис. 3). Возрастание адсорбции белков при концентрациях выше 60% и при увеличении pH элюента связано с кулоновским взаимодействием катионов белка с заряженными силанольными группами на поверхности кремнезема, точка нулевого заряда которого зависит от степени полимеризации кремневой кислоты и находится в диапазоне pH=1,5÷2,2 [11].

Хлорная кислота, будучи более сильной кислотой в органических растворителях [12], чем соляная и трифторуксусная, сильнее подавляет ионизацию силанольных гидроксилов и расширяет «окно» десорбции белков. При концентрациях ацетонитрила менее 20% доминирующую роль в адсорбции белков играют гидрофобные взаимодействия (рис. 4), поскольку порядок элюции белков такой же, как и в ОФ ВЭЖХ. Как следует из приведенных данных, адсорбционная активность макропористых стекол выше, чем у силикагелей (кривые *1* и *2*), что свидетельствует о различиях в точках нулевого заряда кремнеземов. Вероятно, эта особенность макропористых стекол обусловлена присутствием на поверхности кремнезема значи-

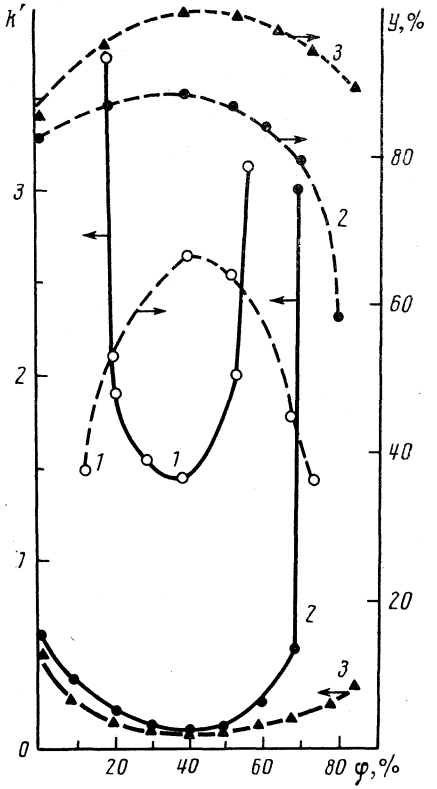


Рис. 3

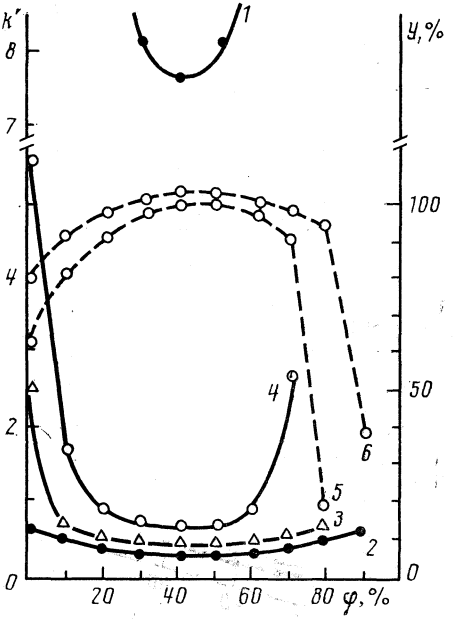


Рис. 4

Рис. 3. Зависимости коэффициента емкости и массового выхода десорбции лизоцима от концентрации ацетонитрила в элюенте при хроматографии на макропористом стекле МПС 400 при значениях pH: *1* – 1,9 (0,1%-ная трифторуксусная кислота); *2* – 1,7 (0,3%-ная соляная кислота); *3* – 1,7 (0,3-ная хлорная кислота)

Рис. 4. Зависимости от концентрации ацетонитрила коэффициента емкости для белков (*1*, *2* – бычий сывороточный альбумин, *3* – инсулин, *4* – лизоцим при хроматографии на макропористом стекле МПС 270 (*1*, *3*, *4*) и на силикагеле Лихросфер Si 300 (*2*) и выхода лизоцима на МПС 270 (*5*) и Si 300 (*6*)

тельного количества свободных силанольных групп, адсорбция на которых, как известно [13], сильнее, чем на связанных водородными связями силанолах.

Влияние поверхностной плотности и размера привитых алкильных групп на удержание белков в ОФ ВЭЖХ. Согласно модели многоцентровой адсорбции Дженга и Ренье [14], для десорбции молекулы белка с поверхности обращенно-фазового сорбента необходимо стехиометрическое количество молекул органического растворителя $Z=n+q$, причем n молекул растворителя расходуется на сольватацию адсорбционных центров, участвующих в многоточечном связывании, а q — на сольватацию контактной площадки белка.

Исследование влияния поверхностной концентрации привитых алкильных групп на хроматографическое удерживание белков позволило дискриминировать вклады каждого из слагаемых суммы Z в селективную десорбцию. В рамках указанной модели зависимость критической концентрации

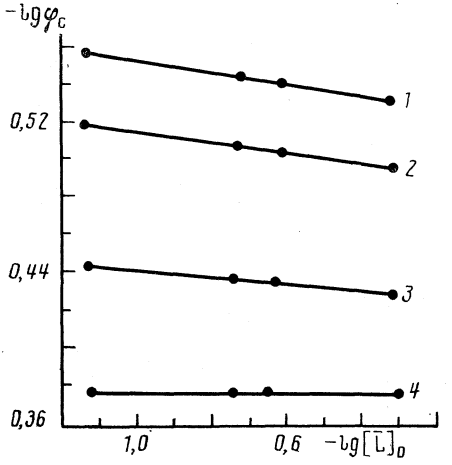


Рис. 5. Логарифмические зависимости критической концентрации десорбции от поверхностной концентрации лигандов С4 сорбента Лихросфер 300 С4 для различных белков: *1* – РНКаза А (рибонуклеаза), *2* – инсулин, *3* – лизоцим, *4* – бычий сывороточный альбумин. Условия градиентной элюции: крутизна градиента 2%/мин, объемная скорость элюента 20 мкл/мин.

десорбции белка φ_c от поверхностной плотности $[\bar{L}]_0$ алкильных групп была определена как

$$\lg\varphi_c = A + (n/q)\lg[\bar{L}]_0, \qquad (6)$$

где A – константа для данного белка и элюента. Экспериментальная зависимость, показанная на рис. 5, находится в хорошем соответствии с формулой (6). Исследование осуществлялось в условиях полного подавления неспецифической адсорбции белков на неэкранированных силанольных группах сорбента (pH=2,20–60% ацетонитрила).

Для всех белков наблюдается очень слабая зависимость, $\lg\varphi_c$ от $\lg[\bar{L}]_0$, а именно: отношение n/q для рибонуклеазы А (*1*), инсулина (*2*) и лизоцима (*3*) равно 0,033; 0,031 и 0,026 соответственно. В случае бычьего сывороточного альбумина данная зависимость отсутствует. Это означает, что для белков $n \ll q$, т. е. в адсорбции макромолекул белка участвует ограниченное число алкильных групп, и процесс десорбции определяется главным образом сольватацией гидрофобных участков на поверхности белка. Преобладание указанного фактора усиливается с ростом молекулярной массы белков. В пользу данного вывода свидетельствует также очень слабая зависимость критической концентрации десорбции от длины алкильной цепи привитой группы (табл. 1).

Было также обнаружено, что тип пористой структуры и размер пор сорбента не влияют на значение критической концентрации десорбции белков: φ_c для лизоцима и овальбумина оставалась практически постоянной при ОФ ВЭЖХ бутилсилинированных силикагелях и макропористых стеклах, диаметр пор которых изменялся в диапазоне 10–60 нм.

Незначительное влияние физико-химических свойств на удерживание и селективность разделения указывает на то, что основные события, приводящие к селективной десорбции, связаны с сольватацией белка органическим растворителем.

Обращенно-фазовые сорбенты на основе макропористых стекол. Была исследована возможность использования макропористых стекол для получения обращенно-фазовых сорбентов, которые в отличие от силикагелей имеют более узкое распределение пор по размерам [15, 16]. При одинаковых средних диаметрах пор доля микропор (с диаметром пор менее 8 нм) у силикагеля значительно выше, чем у макропористых стекол (образцы 2, 3 и 5 в табл. 2). Большая доля макропор у образцов 1 и 4 получена специально в результате неполного выщелачивания микропористой сетки

Таблица 1

Зависимость критической концентрации десорбции от длины привитой группы

Сорбент	α_c, мкмоль/м²	φ_c, %	
		лизоцим	овальбумин
МПС 400 С2	–	35,0	56,3
Силасорб С3	3,5	39,0	56,5
МПС 400 С4	5,6	43,0	63,0
Лихросфер 300 С4	2,7	41,5	58,5
ПМС 500 С8	3,7	44,0	59,0
Лихросорб 100 С8	4,8	41,8	59,4
Силасорб С18	2,0	42,0	60,5

Обозначения: φ_c — критическая концентрация вытесняющего агента (ацетонитрила) в элюенте, необходимая для десорбции белка, α_c — поверхностная концентрация привитых алкильных групп.

Таблица 2

Влияние микропор на выход белка при десорбции

№	Сорбент	δ, %	θ, %	Y_1, %	Y_2, %
1	МПС 270 С4	25,5	14,1	83	10
2	МПС 270 С4	10,5	7,1	100	84
3	МПС 400 С4	6,2	8,3	99	42
4	МПС 500 С4	36,0	13,6	80	10
5	Лихросфер Si 300 C_4	26,0	10,2	95	70

Обозначения: δ — доля микропор, θ — силанольный индекс, Y_1 и Y_2 — выходы лизоцима и овальбумина (выход определялся как отношение площадей пиков белка при элюировании с колонкой и пустым капилляром при том же составе элюента).

Таблица 3

Сравнение обращенно-фазовых сорбентов на основе МПС с лучшими аналогами на основе силикагеля

Сорбент	Y_2, %	ξ_1	ξ_2	K
МПС 270 С4	84	0,67	0,70	2,1
МПС 400 С4	42	0,72	0,77	2,3
Нуклеосил 300 С4	34	0,05	0,09	1,7
Нуклеосил 500 С4	33	0,03	0,08	1,6

Обозначения: Y_2 — выход овальбумина, ξ_1 и ξ_2 — гидролитическая стабильность при pH 1,7 и 11,1 (отношение силанольных индексов до и после форсированного гидролиза, (60° С, 15 суток); K — коэффициент разделения миоглобина и овальбумина при градиентной элюции (крутизна градиента 3%/мин) и объемной скорости 20 мкл/мин.

кремнезема. Из данных, представленных в табл. 2, следует, что с уменьшением доли поверхности микропор у модифицированных сорбентов снижается доля адсорбционно-активных силанольных групп и увеличивается массовый выход десорбции белков, причем в связи с более высокой адсорбционной активностью макропористых стекол этот эффект выражен

сильнее (образцы 1 и 4). Поэтому для получения качественных обращенно-фазовых сорбентов на основе макропористых стекол необходимо использовать носитель с минимальным количеством микропор (образцы 2 и 3).

Для получения обращенно-фазовых сорбентов на основе макропористых стекол использовались алкиллитиевые соединения. Особенности пористой структуры макропористых стекол (малая доля микропор, вогнутая поверхность поры) и прививка алкильных групп через связь кремний — углерод обеспечивают высокую гидролитическую устойчивость полученных сорбентов (табл. 3). Она на порядок выше, чем у лучших коммерческих аналогов, полученных силанизированием силикагеля. Кроме того полученные на основе макропористых стекол сорбенты обеспечивают лучшее разделение и снижение доли необратимо адсорбированного белка.

Список литературы

1. *Unger K., Thomas W. Adrian P.* // Kolloid. Z. und Z. Polymere. 1973. P. 251. S. 45.
2. *Mant C. T., Hodges R. S.* // Chromatographia. 1987. V. 24. P. 805.
3. *Sagliano N., Floyd (Jr) T. R., Hartwick R. A. et al.* // J. Chromatogr. 1988. V. 443. P. 155.
4. *Spahiro I., Kolthoff M.* // J. Amer. Chem. Soc. 1956. V. 72. P. 776.
5. *Unger K. K., Becker N., Roumeliotis P.* // J. Chromatogr. 1976. V. 125. P. 115.
6. *Verzele M., Devaele C.* // Chromatographia. 1984. V. 18. P. 84.
7. *Nondek L., Buszewski B., Berek D.* // J. Chromatogr. 1986. V. 360. P. 241.
8. *Berendsen G. E., Pikaart K. A., de Galan L.* // J. Liq. Chromatogr. 1980. V. 3. P. 1437.
9. *Buszewski B., Suprynowicz Z.* // Chromatographia. 1987. V. 24. P. 573.
10. *Ming J., Kenneth P., Serwis L., Weber W. P.* // Organometallics. 1986. V. 5. № 4. P. 683.
11. *Iler R. K.* // The Chemistry of Silica. N. Y.: J. Wiley, 1979. P. 184, 614.
12. *Coefzee J. F., Kothoft I. M.* // J. Amer. Chem. Soc. 1957. V. 79. № 3. P. 6110.
13. *Köhler J., Krkland J. J.* // J. Chromatogr. 1987. V. 385. P. 125.
14. *Geng X., Regnier F. E.* // Ibid. 1984. V. 296. P. 15.
15. *Zhdanov S. P., Koromaldi E. V., Vinogradova R. G. et al.* // J. Chromatogr. 1970. V. 53. P. 77.
16. *Киселев А. В., Никитин Ю. С., Сарахов А. И. и др.* // Коллоид. журн. 1968. Т. 30. С. 842.

Академия наук СССР
Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов
Саратов

Институт высокомолекулярных соединений
Ленинград

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

Нестеренко П. Н., Кротов В. В., Староверов С. М.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СИЛИКАГЕЛЯ С ПРИВИТЫМ ХИНИНОМ

Обработкой поверхности силикагеля триэтоксисилильным производным хинина получена новая хиральная неподвижная фаза для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Изучены возможности полученной неподвижной фазы по разделению оптических изомеров 2,2,2-трифтор-1-(9-антрил)этанола и β,β′-динафтола, а также гомологов диалкиловых эфиров *о*-фталевой кислоты, полиароматических углеводородов в варианте нормально-фазовой ВЭЖХ. Обсужден механизм удерживания.

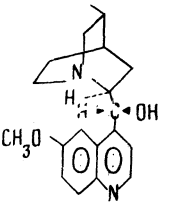
Закрепление хиральных молекул на поверхности кремнеземных носителей, варьирование структуры привитого слоя хиральных молекул с целью получения селективных неподвижных фаз для разделения оптических изомеров является выраженной тенденцией в развитии современной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [1, 2]. Среди многочисленных классов иммобилизуемых хиральных молекул большой интерес представляют природные алкалоиды, стереоселективные свойства которых хорошо изучены [3]. Наличие реакционноспособного винильного остатка в молекулах алкалоидов семейства Cinchona (хинин, цинхонин, хинидин и др.), не участвующего в образовании промежуточных диастереомерных комплексов, позволяет проводить ковалентное закрепление данных молекул на поверхности силикагеля без существенного изменения конфигурации хирального центра.

Ранее для закрепления молекул хинина использовали радикальную реакцию 3-меркаптопропилсиликагеля с винильной группой с образованием сульфидного мостика [4]. В работе [5] для прививки хинина применяли предварительную триметилсилильную защиту оксигруппы при хиральном атоме углерода хинина с последующей активацией винильного остатка обработкой бифункциональным тетраметилдисилоксаном и заключительной реакцией полученных производных хинина с винилсиликагелем. Более надежным и простым способом является получение трихлорсилильного производного *о*-ацетилхинина с последующей обработкой силикагеля [6]. В этом случае достигается наиболее высокая функциональная однородность привитого слоя молекул. Однако приведенные методы закрепления молекул хинина на поверхности силикагеля имеют ряд недостатков, связанных с функциональной неоднородностью получаемого привитого слоя или с необходимостью закрепления производных хинина, с измененным составом хирального центра. Поэтому хроматографические свойства таких сорбентов имеют различную энантиоселективность.

Нами предложен удобный способ закрепления молекул хинина на поверхности силикагеля, лишенный перечисленных выше недостатков и

включающий получение триэтоксисилильного производного с последующей обработкой силикагеля [7]:

$$Q{-}CH{=}CH_2 \xrightarrow{(C_2H_5O)_3SiH} Q{-}CH_2CH_2Si(C_2H_5O)_3 \xrightarrow{SiO_2} \equiv Si{-}O{-}Si{-}CH_2CH_2{-}Q,$$



Оптимальные условия получения триэтоксисилильного производного хинина и его прививки обеспечивают получение сорбента, содержащего 1,2—1,5 молекул хинина на 1 нм^2 поверхности, и сохранение неизмененного хирального центра. Представляет интерес изучение хроматографических свойств полученного сорбента, что и явилось основной целью данной работы.

Экспериментальная часть

Использовали жидкостной хроматограф, состоящий из насоса Constametric III, спектрофотометрического детектора Spectromonitor III (LDG, Milton Roy), петлевого дозатора Rheodyne 7125 с петлей объемом 20 мкл и самописца-интегратора Chromatopak CR1B. Применяли хроматографические колонки из нержавеющей стали (250×4,6 мм), заполненные сорбентами на основе силикагеля Силасорб Si300 (средний диаметр пор 10 нм, удельная поверхность 300 м^2/г) с размером частиц 7 мкм («Лахема», ЧСФР), модифицированными триэтоксисилильными производными хинина, при этом один из сорбентов был подвергнут дополнительной обработке триметилхлорсиланом.

Обсуждение результатов

Разделение оптических изомеров в условиях ВЭЖХ с использованием хиральной неподвижной фазы на основе силикагеля с привитым хинином должно отвечать принципу трехточечного взаимодействия Далглиша, которое в этом случае может включать π—π-взаимодействие ароматического фрагмента сорбата с хинолиновым кольцом хинина, образование водородной связи между оксигруппой при хиральном атоме углерода хинина и полярным заместителем сорбата, а также определенные стерические затруднения для одного из разделяемых оптических изомеров. Наиболее существенным, на наш взгляд, является образование водородной связи. Поскольку оксигруппа обладает как электронодонорными, так и акцепторными свойствами, то для разделения оптических изомеров требуется наличие в молекуле сорбата при хиральном атоме или в α-положении по отношению к нему функциональной группы с аналогичными свойствами (OH; C(O); OR; NH и др.). Отсюда следует, что разделение оптических изомеров наиболее успешно может быть осуществлено для арилалкилкарбинолов, бинафтолов, ариламидов, гидантоинов и др.

Нами была исследована расщепляющая способность хиральной неподвижной фазы с привитым хинином в отношении следующих арилалкилкар-

Таблица 1

Зависимость удерживания и селективности разделения энантиомеров (I – 2,2,2-трифтор-1-(9-антрил)-этанол, II – β,β′-динафтол) от содержания изопропанола в гексане (*c*)

c, об.%	k'_I	α_I	k'_{II}	α_{II}
0,5	13,92	1,10	19,6	1,07
1,0	6,33 (5,78)	1,08 (1,07)	9,55	1,05
2,5	2,29	1,05	5,24	1,02
5,0	1,23	1,04	2,25	1,00
10,0	–	–	1,18	1,00
20,0	–	–	0,50	1,00

Примечание. В скобках приведены данные, полученные для неподвижной фазы, дополнительно обработанной триметилхлорсиланом.

бинолов: метилфенилкарбинола, α- и β-метилнафтилкарбинолов, *n*-метилфенилтрифторметилкарбинола и 2,2,2-трифтор-1-(9-антрил)этанола (I).

Ранее [4, 8] было показано, что увеличение объема алкильного заместителя в фенилкарбинолах увеличивает энантиоселективность хроматографического разделения на хининсодержащих сорбентах. Перечисленные выше соединения подбирались таким образом, чтобы можно было оценить вклад в энантиоселективность разделения других фрагментов: ароматической системы (фенил, нафтил, антрил) и кислотности спиртовой группы (замена CH_3-заместителя при хиральном атоме на CF_3). Однако значения энантиоселективности $\alpha = k_2'/k_1'$ (k' – коэффициент емкости), отличные от единицы были получены только для I, при этом наблюдалась тенденция увеличения α от 1,00 до 1,10 при уменьшении содержания изопропанола в гексане от 5,0 до 0,5% (табл. 1). Вероятно, при увеличении содержания изопропанола в подвижной фазе происходит конкурентное взаимодействие оксигрупп привитых молекул хинина и молекул I с изопропанолом, что снижает возможность образования водородной связи между хинином и карбинолом и приводит к уменьшению α.

Аналогичная зависимость была получена для β,β′-динафтола, хотя в этом случае не удалось достичь полного разрешения пиков энантиомеров на хроматограмме (табл. 1). Если в качестве подвижной фазы использовать чистый бензол, растворитель со слабыми протонодонорными и протоноакцепторными свойствами и достаточно высокой элюирующей способностью, то энантиоселективность разделения I резко увеличивается до 1,46 (рис. 1). Определенным неудобством использования бензола является неприменимость УФ-детектора в спектральной области 230—290 нм, поэтому энантиоселективность разделения других карбинолов в этом случае не рассматривали.

Для оценки влияния остаточных силанольных групп на поверхности силикагеля на удерживание и селективность разделения энантиомеров I использовали колонку, заполненную силикагелем с привитым хинином, дополнительно обработанным триметилхлорсиланом. Как показал эксперимент (табл. 1), такая обработка практически не изменяет энантиоселективность разделения и незначительно снижает время удерживания.

В нормально-фазовом варианте ВЭЖХ при использовании хиральной неподвижной фазы, содержащей различные центры, способные к взаимодействию с сорбатами, трудно определить роль отдельных факторов в удерживании тех или иных молекул. Соответственно проблематичным пред-

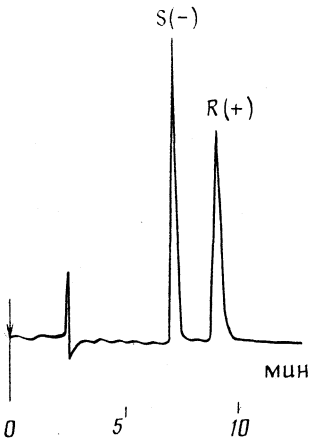


Рис. 1

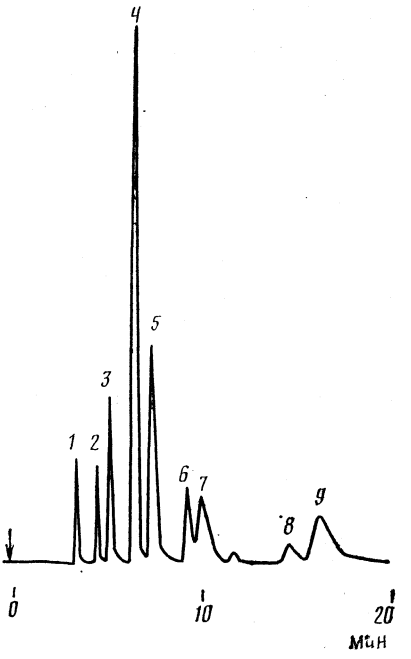


Рис. 2

Рис. 1. Хроматограмма оптических изомеров 2,2,2-трифтор-1-(9-антрил)этанола. Колонка 250×4,6 мм; сорбент – Силасорб Si300 с привитым хинином, размер частиц 7 мкм; подвижная фаза – бензол, расход 1 мл/мин; УФ-детектор 360 нм

Рис. 2. Хроматограмма смеси полиядерных ароматических углеводородов. Подвижная фаза – гексан, УФ-детектор 254 нм, остальные условия рис. 1; *1* – бензол, *2* – нафталин, *3* – аценафтен, *4* – флуорен, *5* – антрацен, *6* – терфенил, *7* – пирен, *8* – триптицен, *9* – хризен

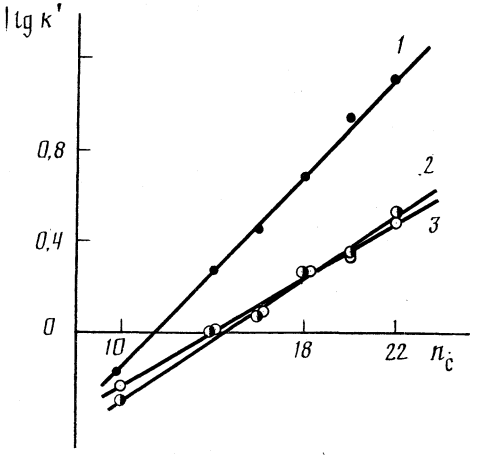


Рис. 3

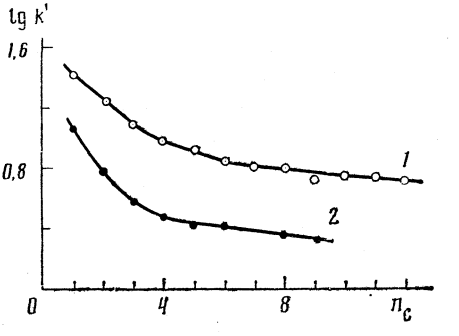


Рис. 4

Рис. 3. Зависимости логарифма коэффициента емкости от числа атомов углерода в молекулах полиядерных ароматических углеводородов. Сорбенты: *1* – Силасорб Si300 с привитым хинином, *2* – Микропак CN [9], *3* – Лихросорб Si60 [9]. Подвижная фаза – гексан

Рис. 4. Зависимости логарифма коэффициента емкости от числа атомов углерода в алкильном заместителе эфиров *о*-фталевой кислоты. Сорбенты: *1* – Силасорб Si300 с привитым хинином, *2* – КСС-4 по данным [10]

Таблица 2

Данные по селективности (α) и разрешающей способности (R_S) разделения нонил-, этил- и метилфталатов

Соединение	t_R	k'	α	R_S	t_R	k'	α	R_S
	A; t_0=1,4; N=32 456				*B*; t_0=1,20; N=30 178			
Нонилфталат	4,28	2,05	1,54	8,16	4,42	2,68	1,58	7,97
Этилфталат	5,83	3,16	1,39	6,66	6,28	4,24	1,36	5,76
Метилфталат	7,55	4,39			8,11	5,76		
	C; t_0=2,0; N=22 367				*D*; t_0=2,48; N=19 200			
Нонилфталат	4,49	1,24	1,47	4,87	3,73	0,50	1,86	8,33
Этилфталат	5,66	1,83	1,28	3,39	4,78	0,93	1,86	7,86
Метилфталат	6,7	2,35			6,76	1,73		

Примечания. t_0 и t_R — время удерживания несорбирующего компонента и соответствующего фталата, мин; $R_S = {}^1/_4 [k'/(1+k')] [N(\alpha-1)]^{1/2}$, где N — число теоретических тарелок на 1 м. Условия анализа: колонка 250 × 4,6 мм, элюент — гексан: изопропиловый спирт = 99,9:0,1, скорость потока 1 мл/мин, температура комнатная. Сорбенты: *A* — Partisil silica (Whatman), *B* — Partisil PAC (Whatman), *C* — Lichrosorb NH_2 (Alltech), *D* — Silasorb Si 300 с привитым хинином; размер частиц *D* — 7,5 мкм, остальных сорбентов — 10 мкм.

ставляется описание модели удерживания сорбатов на таких фазах. Поскольку проведенные исследования не позволили оценить значение ароматической системы сорбата в удерживании и расщеплении энантиомеров, то с целью более полной характеристики хроматографических свойств

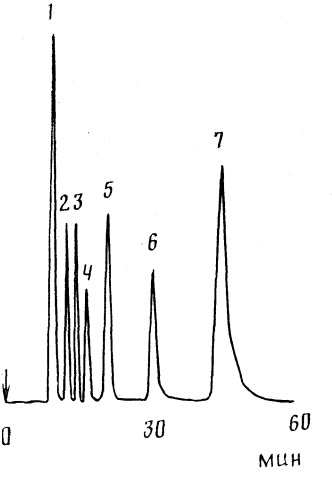


Рис. 5. Хроматограмма смеси диалкиловых эфиров *о*-фталевой кислоты, подвижная фаза: гексан – изопропанол (999 : 1); *1* – динонилфталат, *2* – дигептилфталат, *3* – диамилфталат, *4* – дибутилфталат, *5* – дипропилфталат, *6* – диэтилфталат, *7* – диметилфталат

силикагеля с привитым хинином было изучено удерживание полиядерных ароматических углеводородов (ПАУ). При использовании гексана в качестве подвижной фазы достигается хорошее разделение ароматических углеводородов (рис. 2), что, по-видимому, обусловлено наличием специфического $\pi-\pi$-взаимодействия ароматического фрагмента сорбатов с хинолиновым кольцом хинина. Высокая селективность фазы по отношению к ПАУ отражается наклоном зависимости $\lg k' = f(n_C)$ (рис. 3), где k' —

коэффициент емкости, а n_C — число атомов углерода в молекуле ПАУ. Как видно из рис. 3, селективность фазы с привитым хинином к ПАУ выше, чем у гидроксилированного силикагеля или цианопропилсиликагеля.

Высокая селективность фазы с привитым хинином проявляется и при разделении соединений, отличающихся длиной алкильной цепи, что показано нами на примере *о*-диалкилфталатов. Значения $\lg k'$ закономерно убывают с увеличением числа метиленовых звеньев в гомологическом ряду *о*-диалкилфталатов (рис. 4). Данная зависимость соответствует известной [10] для гидроксилированного силикагеля, хотя и более пологая. Селективность разделения гомологов с алкильными заместителями C_3—C_{12} на силикагеле с привитым хинином выше, чем для коммерческих неподвижных фаз Partisil PAC, Licrosorb NH_2. Partisil silica (табл. 2). Как видно из рис. 5, достигается практически полное разделение диалкилфталатов C_1—C_9, что может быть использовано для хроматографического определения этих соединений, широко применяемых в промышленности в качестве пластификаторов.

Полученные результаты могут характеризовать силикагель с привитым хинином не только как селективную хиральную фазу для разделения энантиомеров, но и универсальный сорбент для нормально-фазовой ВЭЖХ.

Список литературы

1. Chromatographic Chiral Separations./ Ed. by M. Zief, J. Crane. N. Y.: M. Dekker, 1988. (Chromatogr. Sci. V. 40).
2. *Даванков В. А.* // Журн. Всес. хим. о-ва. 1989. Т. 34. № 3. С. 377.
3. *Jacques J., Collet A., Willen S. H.* Enantiomers, Racemates and Resolutions. N. Y.: J. Wiley, 1981. P. 259.
4. *Rosini S., Bertucci C., Pini D. et al.* // Tetrahedron Letters. 1985. V. 26. № 28. P. 3361.
5. *Stuurman H. W., Köhler J., Schomburg G.* // Chromatographia. 1988. V. 25. № 4. P. 265.
6. *Petterson C., Gioelli C.* // J. Chromatogr. 1987. V. 398. P. 247.
7. *Староверов С. М., Кротов В. В., Нестеренко П. Н. и др.* А. с. № 1429016 СССР // Б. И. 1988. № 37.
8. *Pini D., Rosini C., Bertucci C. et al.* // Gazzetta Chim. Ital. 1986. V. 116. P. 603.
9. *Lanin S. N., Nikitin Yu. S., Pyatygin A. A., Staroverov S. M.* // Chromatographia. 1989. V. 27. № 2/3. P. 147.
10. *Агеев А. Н., Яшин Я. И.* // Журн. аналит. химии. 1989. Т. 44. № 9. С. 1632.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
Химический факультет

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 541.183 : 546.831—31 : 543.544

© 1991 г.

Шарыгин Л. М., Галкин В. М., Моисеев В. Е., Пономарев В. Г., Даванков В. А., Курганов А. А., Пономарева Т. М.

СОРБЕНТ НА ОСНОВЕ ДИОКСИДА ЦИРКОНИЯ ДЛЯ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Исследованы параметры пористой структуры, фазовый состав и другие свойства сорбента на основе диоксида циркония в зависимости от условий синтеза и температуры обработки от 300 до 1000° С. Образцы получены золь-гель-методом. Показано, что варьирование условий синтеза и температуры отжига позволяет в широких пределах изменять параметры пористой структуры сорбента: удельную поверхность (от 12 до 384 $м^2/г$), диаметр пор (от 3 до 26 нм) и удельный объем пор (от 0,05 до 0,97 $см^3/г$); с увеличением температуры отжига возрастают механическая прочность гранул и насыпная масса сорбента. Разделения органических веществ проведены на модифицированном полистиролом носителе ZrO_2 для трех различных классов соединений (основных, нейтральных и кислых) в трех различных элюентах (щелочном, нейтральном и кислом). Отмечена высокая гидролитическая устойчивость сорбента в растворах 0,13 М NaOH и 0,1 М HCl.

В последнее время все большее внимание исследователей привлекает поиск новых альтернативных силикагелю хроматографических материалов на основе труднорастворимых оксидов металлов, в частности диоксида циркония. Хотя диоксид циркония уже давно используют в качестве сорбента для ионообменных разделений [1—3], вплоть до настоящего времени известно ограниченное число публикаций по его применению в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [4—7]. Исключительно высокую гидролитическую стабильность микросферического пористого диоксида циркония по сравнению с известными хроматографическими носителями, продемонстрировали Ригней с сотр. [6]. По их данным, циркониевая матрица в статических условиях сохраняет свою стойкость при pH среды 1—14, а в динамических (1 моль/л растворе NaOH) — при 100° С. В последнем случае содержание циркония в элюате было ниже предела обнаружения, а растворению подверглось менее 0,001 масс.% циркония, содержащегося в колонке [6]. Аналогичные результаты были получены и после закрепления на этом носителе полибутадиеновой пленки [5]. Высокую стабильность микрогранулированных оксидов ZrO_2 и TiO_2 в сильнокислых (1 моль/л HCl) и сильнощелочных (0,5 моль/л NaOH) средах подтвердили японские ученые, показавшие, что эти материалы позволяют проводить хроматографические разделения биогенных веществ, которые невозможны на силикагеле [7].

В целом диоксид циркония является перспективным хроматографическим носителем не только в аналитике, но и для препаративных целей, например в химии и технологии биополимеров, где разделения проводятся

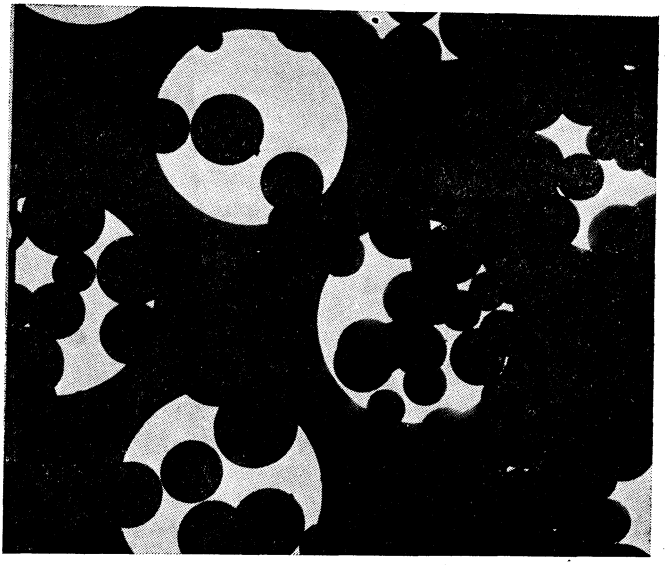


Рис. 1. Внешний вид гранул образца сорбента (величина отверстия в сетке 130 мкм)

обычно в средах с pH>7, а для регенерации колонн часто используют растворы химически агрессивных веществ при повышенных температурах. Однако применение ZrO_2 в ВЭЖХ сдерживается отсутствием эффективных методов синтеза его в микросферической форме с необходимым комплексом свойств. Неясными остаются вопросы, связанные с нанесением на носитель прочного полимерного покрытия.

В настоящей работе исследованы свойства сферических образцов на основе диоксида циркония, синтезированных золь-гель-методом; с использованием микросферического сорбента, покрытого органическим полимером, проведено хроматографическое разделение различных классов органических соединений.

Экспериментальная часть

Золь-гель-методом [8, 9] с применением различных приемов геометрического модифицирования пористой структуры были получены три серии образцов сорбентов на основе диоксида циркония. Высушенные до постоянной массы при 300° С продукты серии А и Б представляли собой сферические гранулы размером от 10 до 50 мкм (рис. 1), серии В – от 300 до 400 мкм. Термообработку образцов проводили на воздухе в области 300–1000° С в течение 6 ч. Для определения параметров пористой структуры образцов снимали полные изотермы адсорбции – десорбции паров бензола и изотермы низкотемпературной адсорбции азота в области наибольших относительных давлений. По адсорбционным данным рассчитывали [8] параметры переходно-пористой структуры образцов: удельную поверхность (s_{N_2}), удельный объем пор (V_s) и эффективный диаметр пор ($d_{эф}$), которые приведены в таблице. Там же приведены значения насыпной массы сорбента ($\gamma_н$) и механической прочности гранул (P_m), определенной по максимальному усилию при раздавливании гранулы как упруго-хрупкого тела между двумя жесткими опорами. Хроматографические испытания сорбента, модифицированного полистиролом, проводили на жидкостном хроматографе фирмы «Брукер» (ФРГ) с колонками размером 6×150 мм с фракцией сорбента 10–20 мкм.

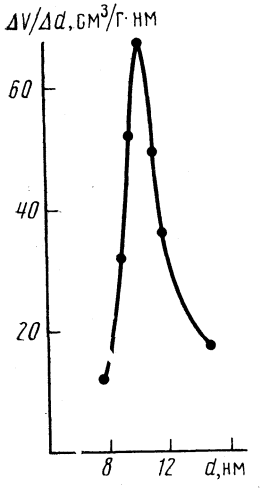


Рис. 2

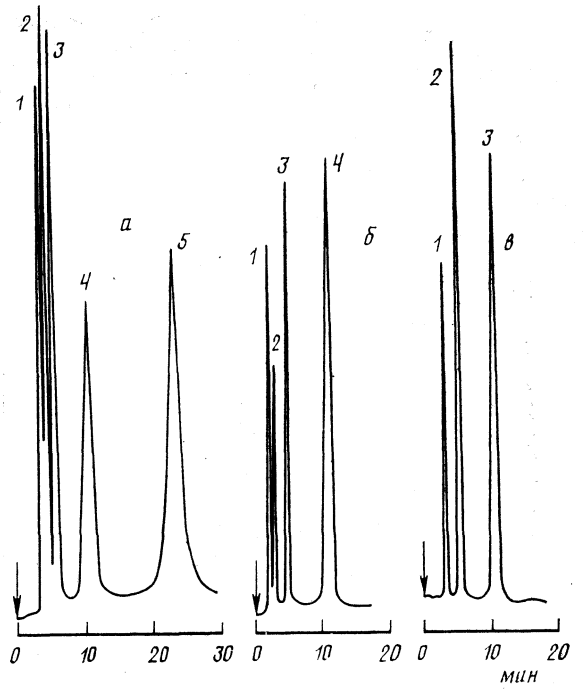


Рис. 3

Рис. 2. Распределение объема пор по величине диаметра на исходном носителе

Рис. 3. Разделение основных соединений при 20° С; *а* – элюент – $CH_3CN : H_2O = 1 : 9$, 0,1 моль/л HNO_3; скорость 0,5 мл/мин (*1* – пиридин, *2* – дипиридин, *3* – диметилпиридин, *4* – фенантролин, *5* – акридин); *б* – элюент – $CH_3CN : H_2O = 1 : 5$, скорость 1,0 мл/мин (*1* – аминопиридин, *2* – пиридин, *3* – анилин, *4* – *n*-нитроаналиин); *в* – элюент – $CH_3CN : H_2O = 1 : 1$, 0,13 моль/л NaOH; скорость 1,0 мл/мин (*1* – аминопиридин, *2* – анилин, *3* – *n*-нитроанилин)

Обсуждение результатов

Пористая структура трех серий образцов и продуктов их термообработки по классификации М. М. Дубинина представлена переходными порами (таблица), в их структуре отсутствуют микропоры. С повышением температуры отжига в области 300–1000° С происходит уменьшение удельной поверхности и увеличение размеров пор. Отмеченные изменения сопровождаются уменьшением объема пор и увеличением насыпной массы, что обусловлено процессом спекания [8]. Изменение условий синтеза и температуры отжига позволяет менять параметры пористой структуры в довольно широких пределах: удельную поверхность – от 12 до 384 м²/г, диаметр пор – от 3 до 26 нм и удельный объем пор – от 0,05 до 0,97 см³/г. Гранулы сорбента обладают высокой механической прочностью, которая возрастает с увеличением температуры отжига.

В соответствии с данными рентгеноструктурного анализа и КР-спектроскопии, твердая фаза сорбента при 300 и 400° С имеет аморфную структуру. При 500° С наблюдается кристаллизация с образованием для образцов серии А и В тетрагональной фазы ZrO_2 и для образцов серии Б – кубической типа флюорита.

Физико-химические свойства образцов в зависимости от температуры обработки

t, °С	$^{s}N_2$, м²/г	V_s, см³/г	$\overline{d_{эф}}$, нм	P_m, МПа	$\gamma_н$, г/см³
			Серия А		
300	222	0,23	3,0	–	1,43
500	108	0,16	4,8	–	1,76
800	24	0,13	9,8	–	1,93
1000	12	0,05	21,0	–	2,33
			Серия Б		
300	285	0,27	3,0	–	1,25
500	131	0,21	3,6	–	1,28
800	78	0,17	9,4	–	1,46
1000	28	0,15	21,0	–	1,67
			Серия В		
300	384	0,97	11,0	5	0,48
400	209	0,56	11,0	18±6	0,79
500	168	0,45	10,4	19±5	0,94
800	90	0,21	25,0	45±7	1,59
900	24	0,13	26,0	153±11	1,86

ИК-спектроскопические исследования [10] показали энергетическую неоднородность гидроксильных групп. По кривым титрования обнаружены [11] два типа сорбционных центров с константами диссоциации pK_1= =7,2 и pK_2=10,3. Увеличение температуры обработки приводит к уменьшению обменной емкости за счет дегидроксилирования поверхности, причем в большей степени меняется емкость второй ступени.

Приведенные, а также литературные данные [2, 10—12] позволяют отнести сорбент на основе диоксида циркония к высокодисперсным пористым телам, имеющим глобулярное строение. Первичные частицы (глобулы) при температуре отжига более 500° С имеют кристаллическую структуру. Поверхность микрокристаллов покрыта гидроксильными группами, диссоциирующими в кислой среде по основному, а в щелочной среде — по кислотному механизмам. В результате этого сорбент в щелочной среде проявляет катионообменные, а в кислой — анионообменные свойства.

Для хроматографических испытаний был использован сорбент с привитой фазой полистирола. Носитель имел следующие характеристики: диаметр частиц 10—20 мкм, удельная поверхность 24 м²/г, эффективный диаметр пор 10 нм. Узкий интервал распределения объема пор по размеру (рис. 2) свидетельствует об однородной пористой структуре носителя. Содержание привитой фазы в материале в пересчете на углерод составило 1,9 масс.%, что соответствует 4 мкмоль мономерных звеньев на 1 м² поверхности сорбента. Это сопоставимо со степенью модификации традиционных матриц на основе силикагеля, для которых эти значения составляют ~2—4 мкмоль/м² [13].

Хроматографические разделения на новом модифицированном сорбенте были сделаны в колонке длиной 150 мм для трех различных классов органических соединений (основных, нейтральных и кислых) в трех различных элюентах (щелочном, нейтральном и кислом). При разделении основных соединений (рис. 3) на новом сорбенте в отличие от силикагельных сорбентов отсутствуют хвостовые искажения пиков, несмотря на ис-

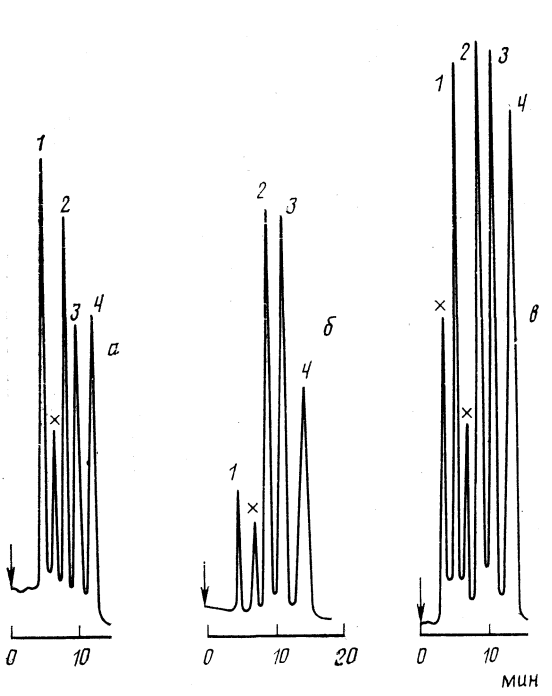


Рис. 4

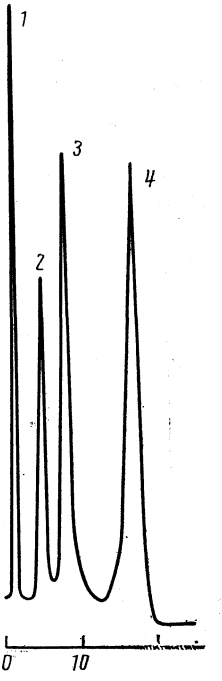


Рис. 5

Рис. 4. Разделение нейтральных соединений при 20° С; *а* – элюент – $CH_3CN : H_2O$= =1 : 1, 0,1 моль/л HNO_3; скорость 2,0 мл/мин; *б* – элюент – $CH_3CN : H_2O$=7 : 3; скорость 1,0 мл/мин; *в* – элюент – $CH_3CN : H_2O$=4 : 5; 0,13 моль/л NaOH; *1* – ацетон, *2* – бензол, *3* – толуол, *4* – этилбензол

Рис. 5. Разделение кислых соединений при 20° С; *а* – элюент $CH_3CN : H_2O$=1 : 9; 0,1 моль/л HNO_3, скорость 2,0 мл/мин; *1* – *n*-аминобензолсульфокислота, *2* – бензолсульфокислота, *3* – толуолсульфокислота, *4* – тринитробензолсульфокислота

пользование простых по составу элюентов. При разделении нейтральных соединений (рис. 4) сорбент демонстрирует свойства, сравнимые с разделяющими свойствами традиционных материалов. Разделение сульфокислот (рис. 5) может быть проведено как в кислой, так и в нейтральной средах. Для кислых соединений с карбоксильной или фосфорильной функциональными группами разделение может быть успешно проведено в щелочной среде. В кислой среде для этих соединений наблюдается сильное удерживание.

Механизм специфического сродства циркониевой матрицы к карбоксильной и фосфорильной группам до конца еще не выяснен (во всяком случае, это — не просто ионный обмен). При длительной эксплуатации сорбента в элюентах состава 0,1 моль/л HNO_3 или 0,13 моль/л NaOH не обнаружено изменений сорбционых свойств материала, что указывает на высокую гидролитическую устойчивость неорганической матрицы и привитого полимерного слоя.

Таким образом, сорбент на основе диоксида циркония с закрепленным на его поверхности полистиролом обеспечивает новый подход к стабильности неподвижной фазы и селективности разделения, что позволяет решать наиболее сложные задачи в хроматографии. Сорбент является особенно эффективным при использовании в щелочных средах (pH=8÷14).

Список литературы

1. *Fuller M. J.* // Chromatogr. Rev. 1971. V. 14. P. 45.
2. *Clearfield A., Nancollas G. H., Blessing R. H.* // Ion exchange and solvent extraction/ Ed. by J. A. Marinsky and Y. Marcus. N. Y., 1973. V. 5. P. 1.
3. *Shanks D. E., Noble E. G., Pierzchala A. M., Bauer D. Y.* // Rept. Invest. Bur. Mines. US Dep. INTER. 1983. № 8816. P. 1.
4. *Ghaemi Y., Wall R. A.* // J. Chromatogr. 1979. V. 174. P. 51.
5. *Rigney M. P., Weber T. P., Carr P. W.* // Ibid. 1989. V. 484. P. 273.
6. *Rigney M. P., Funkenbush E. F., Carr P. W.* // Ibid. 1990. V. 499. P. 291.
7. *Kawahara M., Nakamura H., Nakajima T.* // Ibid. 1990. V. 515. P. 149.
8. *Шарыгин Л. М., Галкин В. М.* // Адсорбция и адсорбенты. Киев: Наук. думка, 1983. Вып. 11. С. 40.
9. *Шарыгин Л. М., Гончар В. Ф., Моисеев В. Е.* // Ионный обмен и ионометрия. Л.: Изд-во ЛГУ, 1986. Вып. 5. С. 9.
10. *Филимонов В. Н.* // Основные проблемы теории физической адсорбции. М.: Наука, 1970. С. 116.
11. *Перехожева Т. Н., Шарыгин Л. М., Третьяков С. Я., Галкин В. М.* // Журн. прикл. химии. 1979. Т. 52. № 7. С. 1468.
12. *Рейнтен Х. Т.* // Строение и свойства адсорбентов и катализаторов. М.: Мир, 1973. С. 332.
13. *Сакодынский К. И., Леликов Ю. А.* // Сорбенты и колонки для высокоэффективной жидкостной хроматографии. М.: НИИТЭХИМ, 1989. С. 61.

Свердловский филиал НИКИЭТ
Академия наук СССР
Институт элементоорганических соединений
им. А. Н. Несмеянова
Москва

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 661.183.124:543.544.4

© 1991 г.

Новиков А. Г., Богомолова Н. Г., Николаев С. В., Постнов В. Н., Крашенюк А. И.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ И СОРБЦИОННЫЕ СВОЙСТВА КРЕМНЕЗЕМА, МОДИФИЦИРОВАННОГО β-ФЕНИЛЭТИЛТРИХЛОРСИЛАНОМ

Модифицированием поверхности кремнезема β-фенилэтилтрихлорсиланом получены сорбенты для жидкостной хроматографии. На основе силикагеля Силасорб-600 получен сорбент для обращенно-фазовой жидкостной хроматографии. Установлены высокие эффективность и селективность разделения ароматических соединений, а также биологически активных пептидов. На основе макропористого стекла МПС-2000 ВГХ получен сорбент для очистки вируса гриппа методом гель-проникающей хроматографии, что позволило провести эффективную очистку вирусного препарата, причем выход вируса по активности составил 177%. Высокая гидрофобность поверхности модифицированного кремнезема подтверждена путем измерения изотерм адсорбции паров воды.

Модифицирование поверхности кремнезема хлорсиланами широко используют при получении сорбентов для жидкостной хроматографии [1]. Несомненный интерес представляет применение ароматических силанов, так как в данном случае не происходит заметного уменьшения размера пор и удельной поверхности исходного кремнезема [2, 3]. В данной работе использовали β-фенилэтилтрихлорсилан, полученный по методике [4]. Сорбенты синтезировали на основе силикагеля Силасорб-600, а также макропористого стекла МПС-2000 ВГХ. Структурные характеристики кремнеземов приведены в табл. 1.

Удельную поверхность определяли методом тепловой десорбции аргона. Молекулярную площадку для аргона принимали равной 17,6 $Å^2$ [5]. Хемосорбцию β-фенилэтилтрихлорсилана на гидроксилированной поверхности проводили из бензольного раствора в присутствии триэтиламина по методике [6]. Содержание привитых групп на поверхности по данным элементного анализа на углерод составило 2,1 группы на 1 $нм^2$ для Силасорба-600 и 2,2 – для пористого стекла, что свидетельствует о близком к максимальному заполнению поверхности кремнезема [1].

Силасорб-600 дополнительно силанизировали триметилхлорсиланом по аналогичной методике. Было установлено, что при этом не происходит заметного увеличения содержания углерода в образце. Полученный сорбент упаковывали в колонку 250×4,6 мм сухим способом и испытывали в режиме обращенно-фазовой жидкостной хроматографии на хроматографе «Altex-332».

Для тестирования использовали смесь ароматических соединений (рис. 1). Основные параметры разделения приведены в табл. 2. Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности и селективности разделения. Хорошая симметрия пиков подтверждает эффективное экранирование силанольных групп поверхности кремнезема привитыми органическими группами. Данный сорбент испытывали также для разделения биологически активных пептидов при градиентном элюировании (рис. 2). Полученные результаты подтверждают перспективность практического применения сорбента для разделения органических соединений. В настоящее время его используют для очистки пептидов.

Сорбент на основе макропористого стекла МПС-2000 ВГХ, модифицированного β-фенилэтилтрихлорсиланом, применяли для очистки концентрата вируса гриппа от сопутствующих белковых примесей методом гель-проникающей хроматографии. В работе использовали штамм A_1 (Чили) 1/83 R=2 (H_1N_1), полученный накоплением на куриных эмбрионах. Хроматографическое разделение вирусного и белкового пиков регистрировали с помощью проточного денситометра РЭППС-1М. При

Таблица 1

Структурные характеристики кремнеземов (d_1 и d_2 – размер пор и частиц соответственно, V – объем пор)

Кремнезем	^{s}уд, м^2/г	d_1, нм	V, см^3/г	d_2, мкм
Силасорб-600	450±20	6	1	30
МПС-2000 ВГХ	29±2	180–260	1,7–2,5	150–310

Таблица 2

Параметры разделения ароматических соединений

№	k'	N	α	R_S
1	4,8	517	1,88	1,90
2	9,0	458		
3	16,1	335	1,80	2,15
4	31,1	323	1,93	2,63

Обозначения: k' — коэффициент емкости, N — число теоретических тарелок на колонку, α — селективность, R_S — разрешение пиков.

этом вирусный пик выходит первым; второй пик содержит в основном примесные белки. Процесс разделения проводили в следующих условиях: колонка с сорбентом – 1×23 см, объем пробы – 0,94 мл, элюент – 0,01 М фосфатный буфер, 0,15 М хлористый натрий, pH=7,2, скорость – 140 мл/ч.

Содержание белка в вирусном препарате определяли по методу Брэдфорда [7], гемагглютинирующую активность (ГА) вируса – в реакции гемагглютинации с 1%-ной взвесью куриных эритроцитов, которую ставили в микропанелях титратора Такачи. Содержание основного аллергена (овальбумина) определяли по реакции непрямой гемагглютинации. Выход вируса по активности определяется соотношением:

$$a, \% = \frac{V_в/c}{V_п/c_0} \cdot 100,$$

где $V_в$ – объем вирусного пика, $V_п$ – объем пробы, c – титр ГА, c_0 – титр ГА исходного препарата.

Свойства полученного в данной работе гидрофобного сорбента сравнивали со свойствами используемого в промышленности гидрофильного сорбента на основе пористого стекла, модифицированного поливинилпирролидоном [8]. Результаты представлены в табл. 3. Полученные результаты показывают, что применение гидрофобного сорбента на основе пористого стекла, модифицированного β-фенилэтилтрихлорсиланом (сорбент 1), позволяет проводить эффективную очистку вирусного препарата по общему белку и овальбумину. Активность очищенного вирусного препарата значительно выше, чем при использовании гидрофильного сорбента (сорбент 2). Выход вируса по активности превышает 100%. Такой результат, по-видимому, связан с тем, что в процессе гель-хроматографии происходит освобождение активных центров гемагглютинина, блокированных примесными белками.

С целью оценки влияния модифицирования поверхности кремнезема β-фенилэтилтрихлорсиланом на гидрофобные свойства поверхности проводили измерение изотерм адсорбции паров воды на весовой вакуумной установке (рис. 3, 4). Вид изотерм показывает, что они относятся ко второму типу по классификации Брунауэра и хорошо описываются уравнением Брунауэра – Эммета – Теллера (БЭТ) в области малых относительных давлений адсорбата [9]. Модифицирование поверхности приводит к заметному уменьшению сорбции воды. Изотерма адсорбции в координатах уравнения БЭТ для исходного пористого стекла при экстраполяции проходит вблизи начала координат, что указывает на высокое значение параметра C

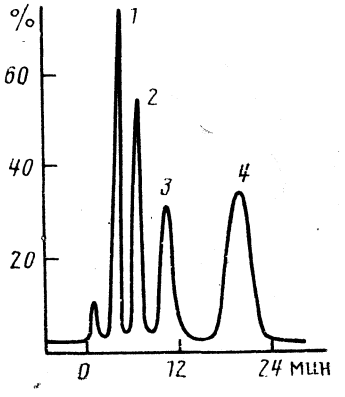


Рис. 1

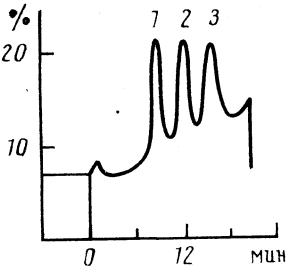


Рис. 2

Рис. 1. Хроматограмма смеси ароматических соединений; элюент – вода : ацетонитрил 68 : 32, скорость 2 мл/мин, детекция при 254 нм, температура комнатная; *1* – ацетофенон, *2* – бензол, *3* – толуол, *4* – нафталин

Рис. 2. Хроматограмма смеси пептидов; условия элюирования: градиент концентрации ацетонитрила (от 20 до 45% за 25 мин) в 0,1%-ном водном растворе трифторуксусной кислоты; детекция при 280 нм, температура комнатная; *1* – люлиберин, *2* – бомбезин, *3* – нейротензин

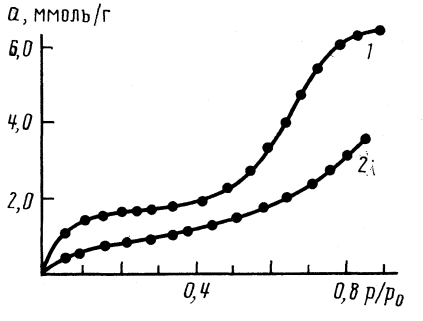


Рис. 3

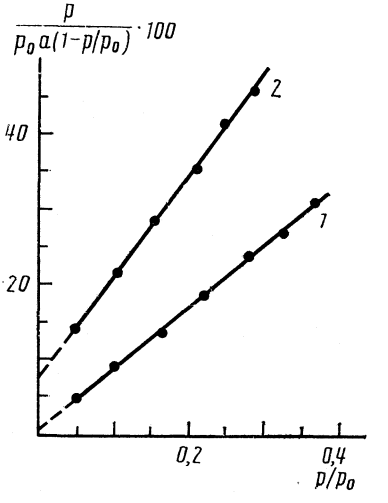


Рис. 4

Рис. 3. Изотермы адсорбции паров воды при 20° С; *1* – макропористое стекло МПС-2000 ВГХ; *2* – макропористое стекло, модифицированное β-фенилэтилтрихлорсиланом

Рис. 4. Изотермы адсорбции в координатах уравнения БЭТ; обозначения см. рис. 3

в уравнении БЭТ и характерно для локализованной адсорбции на поверхности твердых тел. Такой результат хорошо согласуется с данными [10], согласно которым адсорбция воды на гидроксилированной поверхности в области заполнения монослоя происходит за счет образования водородных связей с силанольными группами.

Для силанизированного кремнезема параметр C, вычисленный по уравнению БЭТ, равен 23, что соответствует слабому дисперсионному взаимодействию молекул воды с привитыми органическими группами и свидетельствует о значительном уменьшении количества доступных для адсорбции силанольных групп. Следует

Таблица 3

Параметры очистки вируса гриппа

Сорбент	$c_б$, мкг/мл	c_0, мкг/мл	Титр ГА	a, %
1	150	0,062	1:4096	177
2	135	0,125	1:2048	64

Примечание. Исходный препарат: титр ГА : 12 800, содержание белка $c_б$ =7600 мкг/мл, содержание овальбумина c_0=1000 мкг/мл; a — выход по активности.

отметить, что хорошее экранирование ≡SiOH-групп поверхности кремнезема является необходимым условием эффективного использования сорбентов для обращенно-фазовой жидкостной хроматографии, поскольку в противном случае происходят размывание пиков и снижение селективности разделения вследствие специфического взаимодействия органических молекул с силанольными группами [11]. Пониженная сорбционная активность сорбентов необходима также и для успешного проведения очистки вирусного препарата методом гель-проникающей хроматографии. В этом случае не происходит необратимой адсорбции вируса, а процесс хроматографического разделения можно проводить в элюентах, близких к физиологическому раствору, что весьма важно для обеспечения безвредности вакционного препарата и сохранения его активности [12].

Результаты проведенных исследований показывают, что высокая гидрофобность поверхности кремнезема, модифицированного β-фенилэтилтрихлорсиланом, обеспечивает возможность эффективного применения полученных сорбентов для обращенно-фазовой и гель-проникающей хроматографии.

Список литературы

1. Модифицированные кремнеземы в сорбции, катализе и хроматографии/Под ред. Г. В. Лисичкина. М.: Химия, 1986. 247 с.
2. *Berendsen G. E.* // J. Liquid Chromatogr. 1980. V. 3. № 10. P. 1437.
3. *Melander W. B., Huang J.-X., Horvath E. S. et al.* // Chromatographia. 1985. V. 20. № 11. P. 641.
4. *Андрианов К. А., Жданов А. А., Одинец В. А.* // Журн. общ. химии. 1962. Т. 32. № 4. С. 1126.
5. *Буянова Н. Е., Карнаухов А. П., Алабужев Ю. А.* Определение удельной поверхности дисперсных и пористых материалов. Новосибирск, 1978. 74 с.
6. *Постнов В. Н., Кольцов С. И.* // Журн. прикл. химии. 1983. Т. 56. № 10. С. 2387.
7. *Bradford M. M.* // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 12. P. 248.
8. *Молодкина Л. М., Мчедвишвили Б. В.* // Этиология и специфическая профилактика гриппа/Сб. научн. тр. Л.: Ин-т им. Пастера, 1979. Т. 52. С. 92—95.
9. *Брунауэр С.* Адсорбция газов и паров. М.: Изд-во иностр. лит., 1948. 781 с.
10. *Грег С., Синг К.* Адсорбция, удельная поверхность, пористость. М.: Мир, 1984. 310 с.
11. Bonded stationary phases in chromatography/Ed. by E. Grushka. Ann. Arbor.: Ann. Arbor. Sci., 1974. 237 p.
12. *Коликов В. М., Мчедлишвили Б. В.* Хроматография биополимеров на макропористых кремнеземах. Л.: Наука, 1986. 189 с.

Ленинградский государственный университет
Химический факультет

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 661.183.12, 577.152.01

© 1991 г.

Уткелов Б. А., Лесене И., Абдрахманова И. К., Марушка А., Ткаченко Р. Р., Кильдибеков Н. А.

ХЕЛАТНЫЕ СОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ 8-ОКСИХИНОЛИНА ДЛЯ ЛИГАНДООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Химической модификацией гранулированной целлюлозы и макропористого сополимера стирола с дивинилбензолом получены хелатные иониты с группами известного аналитического реагента – 8-оксихинолина. Результатами расчета состава комплексов ионов переходных металлов с лигандами, фиксированными в фазе сорбента, подтверждена координационная ненасыщенность ионов металлов, а следовательно, возможность их использования в качестве лигандообменников. С использованием синтезированных стирол-дивинилбензольных оксихинолиновых ионитов в медной форме разделены изомерные алкалоиды – эфедрин и псевдоэфедрин. Обнаружена высокая селективность целлюлозных сорбентов в молибденовой форме в извлечении из экстракта растительного сырья молибденосодержащего фермента.

Одним из интенсивно развивающихся в последние годы методов селективного разделения близких по структуре и свойствам веществ становится лигандообменная хроматография [1]. В качестве сорбентов широко используются хелатные иониты с иминодиацетатными группами, которые образуют комплексы с ионами переходных металлов за счет подвижных донорных атомов иминной и двух карбоксильных групп. Каждый из них участвует в хелатообразовании в зависимости от доступности, что может обусловить образование различающихся по структуре комплексов и соответственно уменьшить селективность лигандообменных процессов.

Большую функциональную однородность должны обеспечить иониты с хелатными группами бидентатного аналитического реагента – 8-оксихинолина. Он так же, как и иминодиацетатные реагенты, образует комплексы различной прочности с большим числом металлов, но донорные атомы жестко фиксированы в хинолиновых циклах.

Настоящая работа посвящена синтезу хелатных ионитов с группами 8-оксихинолина и оценке возможности использования их в процессах лигандного обмена.

Экспериментальная часть

Нитрование гранульных макропористых сополимеров стирола с дивинилбензолом (10% ДВБ) осуществляли перемешиванием гранул (10 г) в смеси концентрированных азотной (125 мл) и серной (92 мл) кислот в течение 7 ч. Восстановление нитропроизводных проводили при нагревании (100° С) смеси 10 г нитрополимера с 80 г хлорида олова (II) и 320 мл соляной кислоты в течение 12 ч. Анионообменная емкость полимера 3,6 ммоль/г.

Хелатный ионит на основе сополимера стирола и ДВБ получали перемешиванием 16,5 г свежеприготовленного аминосополимера и 66,0 г хлоргидрата 5-хлорме-

тил-8-оксихинолина с 400 мл дистиллированной воды при 100° С в течение 4 ч. Медную форму полимера готовили выдерживанием гранул ионита в избытке 0,2 М раствора сульфата меди в течение 3 сут.

Модельное соединение синтезировали добавлением к суспензии 2,29 г (0,01 М) хлоргидрата 5-хлорметил-8-оксихинолина в 100 мл этилацетата 2,8 мл (0,03 М) свежеперегнанного анилина при температуре кипения растворителя в течение 5 ч.

Синтез ионита на основе гранулированной целлюлозы осуществляли в две стадии.

1. Аминирование проводили при 50° С в течение 3,5 ч путем перемешивания смеси, содержащей 100 г целлюлозы Граноцел-Д (влажность 90%), 100 мл 8%-ного раствора NaOH, 15 г эпихлоргидрина и 10 г полиэтиленполиамина.

2. Влажную аминоцеллюлозу (10 г) и 4,05 г хлорметилоксихинолина растворяли в 50 мл воды и проводили реакцию при 100° С в течение 6 ч. Содержание хелатных групп 1,85 ммоль/г.

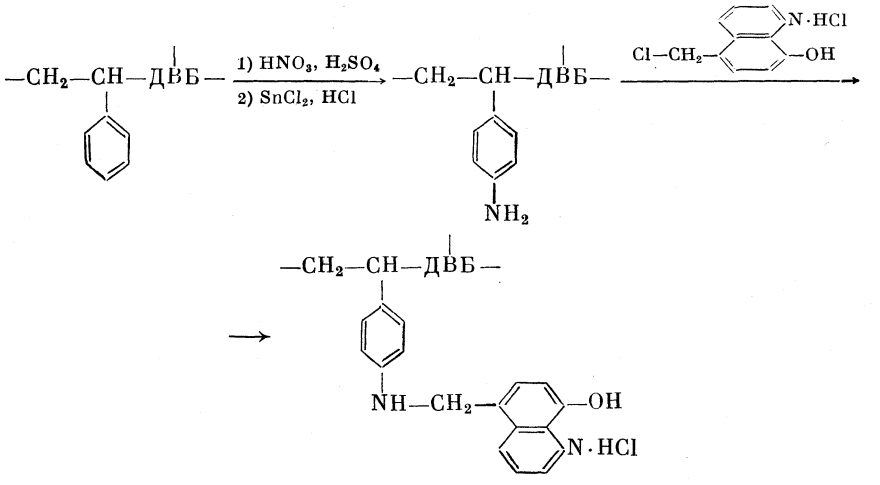
Сорбент в металлической форме получали пропусканием через колонку с целлюлозным ионитом 0,1 М раствора молибдата натрия.

При проведении хроматографических разделений использовали колонку диаметром 10 мм и высотой 5 см, элюент – 0,5 М NaCl в калий-фосфатном буфере (pH 7,5).

Обсуждение результатов

Иониты с оксихинолиновыми группами получены химической модификацией макропористых сополимеров стирола с ДВБ и гранулированной целлюлозы. Последние были испытаны на извлечение молибденсодержащего фермента — нитратредуктазы, а иониты на основе сополимеров стирола с ДВБ — в процессе разделения изомерных алкалоидов — эфедрина и псевдоэфедрина.

Хелатные группы в сополимеры стирола с ДВБ вводили следующими реакциями:



Количество фиксированных таким образом хелатных групп оценивали по способности ионитов связывать ионы металлов. Статическая обменная емкость сорбентов на основе сополимеров стирола с ДВБ по ионам двухвалентной меди 1,6 ммоль/г свидетельствует о том, что основная часть всех аминогрупп (до 90%), введенных в гранулы реакциями нитрования и восстановления, провзаимодействовали с хлорметилоксихинолином. Это позволяет сделать вывод об определенной функциональной однородности ионитов, получаемых этой реакцией.

Расчеты констант ионизации синтезированного полимерного реагента и его низкомолекулярного аналога, проведенные на основании данных потенциометрического титрования, показали, что кислотно-основная функ-

Константы ионизации 8-оксихинолиновых реагентов

pK	I	II	III [2]
pK_{OH}	4,00	4,25	3,97
pK_{NH}	11,15	11,10	11,54

Обозначения реагентов: I — ионит на основе сополимеров стирола и ДВБ, II — модельное соединение, III — 8-оксихинолин.

циональность полимерного реагента определяется хелатными группами. В таблице приведены значения констант ионизации функциональных групп оксихинолинового ионита, его низкомолекулярной модели и 8-оксихинолина — они мало отличаются друг от друга.

Данные потенциометрического титрования были использованы и для расчета состава хелатов, образующихся в фазе полимеров. Для расчета функции образования комплексов Нильса Бьеррума использовали следующие предложенные нами [3] выражения:

$$[MR]'=\{E[1-(\beta_1^{1/n}\alpha_1^{1/m}+\alpha_1^{1/m}+1)^{-1}-\alpha^{1/m}(\beta^{1/n}\alpha^{1/m}+\alpha^{1/m}+1)^{-1}-$$
$$-\beta^{1/n}\alpha^{1/m}(\beta^{1/n}\alpha^{1/m}+\alpha^{1/m}+1)^{-1}]+\Delta[H]\}/[1-(\beta_1^{1/n}\alpha_1^{1/m}+\alpha_1^{1/m}+1)^{-1}],$$

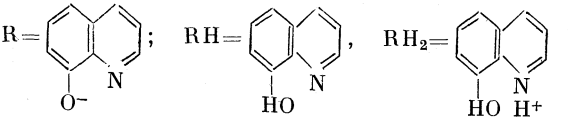
$$[R]'=(E-[MR]')/(\beta_1^{1/n}\alpha_1^{1/m}+\alpha_1^{1/m}+1), \quad \bar{n}=[MR]'/c_M,$$

Здесь $\alpha=[H]/K_{OH}$, $\alpha_1=[H]'/K_{OH}$, $\beta=[H]/K_{NH}$, $\beta_1=[H]'/K_{NH}$, E — общее количество хелатных групп в полимере, $[H]'$ — равновесная концентрация ионов водорода системы реагент — металл, $[H]$ — без металла; $[R]'$ и $[MR]'$ — концентрации свободных и связанных с металлом лигандных групп; K_{NH} и K_{OH} — константы ионизации основных и кислотных групп реагента, n и m — стерические коэффициенты, c_M — общая концентрация металла в системе.

Эти выражения являются решением системы уравнений, каждое из которых соответствует известным соотношениям для равновесных растворов:

$$[R]+[RH]+[RH_2]=E,$$
$$[R]'+[RH]'+[RH_2]'+[MR]'=E,$$
$$K_{NH}=[RH]^n[H]/[RH_2]^n,$$
$$K_{OH}=[R]^m[H]/[RH]^m,$$
$$K_{NH}=([RH]')^n[H]'/([RH_2]')^n,$$
$$K_{OH}=([R]')^m[H]'/([RH]')^m,$$
$$([RH]+[RH_2])-([RH]'+[RH_2]')=\Delta[H],$$

Здесь R — часть лиганда, свободная от ионов водорода, для 8-оксихинолина:



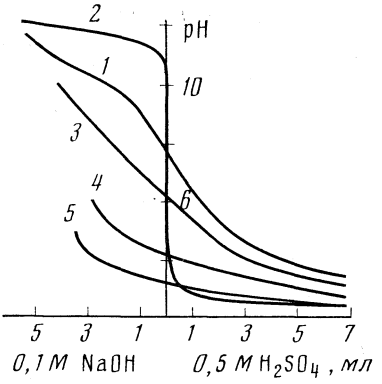


Рис. 1

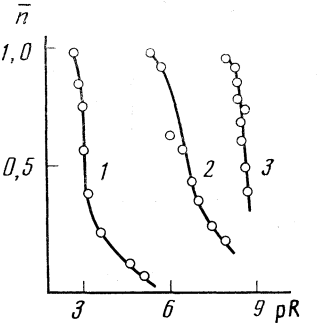


Рис. 2

Рис. 1. Кривые потенциометрического титрования ионита (*1*), кислоты (*2*) и ионита в присутствии солей металлов (*3* – Mg, *4* – Ni, *5* – Cu)

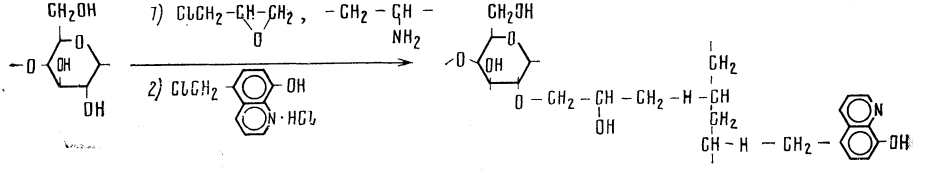
Рис. 2. Функции образования комплексов металлов (*1* – Mg, *2* – Ni, *3* – Cu) в фазе ионита в зависимости от концентрации свободных лигандных групп ионита

Снимали три кривые потенциометрического титрования (рис. 1): 1) кислоты — щелочью, 2) раствора, содержащего хелатный реагент и то же количество кислоты, 3) раствора, содержащего кроме реагента и кислоты ионы металла-комплексообразователя. Символ со штрихом соответствует последней системе — реагента с металлом, без штриха — второй системе без металла. По первым двум кривым рассчитывали константы ионизации функциональных групп хелатного реагента, по второй и третьей определяли разность $\Delta[H]$.

Рассчитанные с помощью предложенных выражений зависимости функций образования от концентрации свободных лигандов (рис. 2) свидетельствуют о том, что оксихинолиновые группы, фиксированные в сетчатом полимере, связывают по одному иону металла — кривые асимптотически приближаются к значению функции образования $\bar{n}=1$. Можно предположить высокую однородность лигандообменных групп: каждая оксихинолиновая группа образует строго определенную структуру комплекса — донорные атомы азота и кислорода жестко фиксированы в хинолиновых кольцах.

Функциональная однородность ионита подтвердилась в экспериментах по разделению изомерных алкалоидов (эфедрина и псевдоэфедрина) на колонке (10 см×5 мм) с ионитом в медной форме. Эфедрин из 1%-ного водного раствора, содержащего равные количества изомеров, полностью удерживался сорбентом, а псевдоэфедрин не связывался. В качестве элюента для эфедрина использовали 2%-ный раствор аммиака.

Оксихинолиновый ионит на основе гранулированной целлюлозы, полученный по схеме:



был использован для извлечения молибденсодержащего фермента из экстракта растительного сырья. Нами были проведены эксперименты по выделению ферментов на ионитах, заряженных ионами молибдена, без них и на ионитах с хелатными группами, частично насыщенными ионами металла, а также по сорбции на заряженном ионите ферментов, из которых металл был удален. Опыты показали, что все четыре варианта приемлемы, но наиболее эффективен третий, когда хелатные группы сорбента частично заряжены металлом и фермент содержит молибден. В этом случае использовали сорбент с содержанием хелатных групп 1850 мкмоль/г

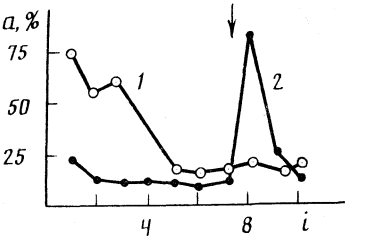


Рис. 3. Степень извлечения нитратредуктазы из экстракта растительного сырья на ДЭАЭ-целлюлозе (*1*) и Мо-оксихинолиновом ионите (*2*); *i* – номер фракции, *a* – активность нитратредуктазы в элюенте относительно экстракта, стрелкой показан момент добавления 0,5 М NaCl

и только 100 мкмоль из них были заряжены ионами молибдена. Как показали анализы, этот вариант обеспечивает наибольшую степень извлечения нитратредуктазы (72% по активности). В связывании белка, очевидно, участвуют хелатные группы и с металлом и без него. На оксихинолиновых группах без молибдена сорбируются молекулы белка с ионами металла, а на молибденовых хелатных ионитах — молекулы фермента с «потерянными» ионами молибдена, которые всегда присутствуют в экстракте (молибден не очень прочно связан в белке).

Сравнение полученных результатов по выделению нитратредуктазы на оксихинолиновых ионитах с полученными ранее с использованием диэтиламиноэтилцеллюлозы (ДЭАЭ), традиционно применяемой для этих целей, показывает существенное преимущество синтезированных сорбентов в селективности извлечения. Так, количество нитратредуктазы, вымытой из сорбентов (рис. 3) при пропускании буферного раствора через колонки с ДЭАЭ-целлюлозой и оксихинолиновым ионитом в молибденовой форме, в случае ДЭАЭ-целлюлозы на порядок меньше, чем в случае синтезированного лигандообменника.

Авторы выражают глубокую благодарность Н. П. Львову за консультации и помощь.

Список литературы

1. *Даванков В. А., Навратил Дж., Уолтон Х.* Лигандообменная хроматография. М.: Мир, 1989. 294 с.
2. *Johnston W. D., Freiser H.* // J. Amer. Chem. Soc. 1952. V. 74. P. 5339.
3. *Уткелов Б. А.* Синтез и изучение свойств новых хелатообразующих ионитов на основе некоторых полиаминов и производных 8-оксихинолина: Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Алма-Ата, 1980. 18 с.

Казахский государственный университет
им. С. М. Кирова
Химический факультет

Академия наук КазССР
Институт молекулярной биологии и биохимии
им. М. А. Айтхожина
Алма-Ата
Каунасский политехнический институт

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 541.64 : 543.544.42 : 546.284

© 1991 г.

Сабуров В. В., Муйдинов М. Р., Гурьянов С. А., Катаев А. Д., Туркин С. И., Зубов В. П.

ПЕРФТОРПОЛИМЕРСОДЕРЖАЩИЕ КРЕМНЕЗЕМНЫЕ СОРБЕНТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ БИОЛОГИЧЕСКИ-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Методом γ-инициированной постполимеризации тетрафторэтилена на поверхности дисперсных пористых тел синтезированы новые перфторполимерсодержащие кремнеземные сорбенты для обращенно-фазовой жидкостной хроматографии. Методом ртутной порометрии определены их структурные характеристики и показано, что в результате модификации кремнеземов слоем перфторполимера в целом сорбенты сохраняют пористую структуру, что весьма важно для реализации их хроматографических свойств. Установлено, что такие сорбенты обладают повышенной хемо- и термостойкостью, в частности, устойчивы в диапазоне pH=1÷10 и выдерживают длительную тепловую обработку до 200° С. При изучении адсорбции и десорбции биополимеров (тРНК) обнаружено, что перфторполимерсодержащие кремнеземные сорбенты обладают низкой необратимой сорбцией по отношению к нуклеиновым кислотам. Приведены примеры использования сорбентов для обессоливания, концентрирования и депротеинизации тРНК и анализа смеси модельных пептидов.

Современная обращенно-фазовая хроматография (ОФЖХ) является мощным методом анализа и выделения практически всех классов биологически-активных веществ. Наиболее часто для этих целей используются сорбенты с так называемыми «привитыми фазами», полученные путем химической модификации кремнеземной матрицы (обычно силикагелей) низкомолекулярными силанами, содержащими алифатические неполярные группировки. Однако, несмотря на высокую эффективность разделения, такие «фазы» достаточно стабильны в диапазоне pH=2÷8, но даже в этом диапазоне идет частичное вымывание «привитой фазы», что проявляется в изменении времени удерживания и селективности [1]. Чисто полимерные сорбенты, применяемые в высокоэффективной жидкостной хроматографии, практически снимают эти ограничения. В работе [2] описано применение сильно сшитых стиролдивинилбензольных смол для ОФЖХ пептидов и белков. Хотя такие сорбенты имеют меньшую механическую стабильность по сравнению с «привитыми фазами», они могут использоваться с подвижными фазами в диапазоне pH=1÷13.

Ранее в работах [3—12] были изучены адсорбционные и хроматографические свойства фторированных «привитых фаз», полученных путем модификации силикагелей фторуглеродсодержащими силанами. Показано, что такие сорбенты имеют селективность подобную обычным углеводородным «привитым фазам», однако с более слабым удерживанием низкомолекулярных соединений. Поскольку подобные «фазы» связаны с

кремнеземной матрицей посредством связи Si—O—Si, это накладывает определенные ограничения на величины pH используемых элюентов (от 2 до 8), что практически не отличает их по химической стабильности от традиционных обращенно-фазовых сорбентов типа «щеток».

Чисто полимерные ВЭЖХ-сорбенты практически снимают эти ограничения, так как стабильны при любом значении pH. Более того, известно [13], что фторуглеродные жидкости используются как кровезаменители и обладают более низкой денатурирующей способностью по отношению к белкам, чем углеводородные жидкости. Это позволяет надеяться, что и фторуглеродные сорбенты могут быть более совместимы с биополимерами, чем «привитые углеводородные фазы». Фирма «Du Pont» недавно предложила новый фторуглеродный сорбент «Poly F Column» для ОФ ВЭЖХ пептидов и белков [14]. Сорбент имеет размер частиц 20 мкм (диаметр пор 30 нм) и выдерживает давление до 135 бар. Однако низкая удельная поверхность и относительно низкий по сравнению с кремнеземными сорбентами предел рабочего давления не позволяет использовать его для препаративной ВЭЖХ.

Кремнеземные сорбенты, модифицированные фторполимерами, сочетают преимущества как полимерных, так и кремнеземных материалов. В данной работе в качестве модификатора поверхности кремнеземных носителей использовали политетрафторэтилен (ПТФЭ), обладающий высокой хемостойкостью и чрезвычайно низкой адсорбционной активностью ко многим классам соединений, в том числе и биополимерам. Создание на поверхности кремнезема сплошного полимерного покрытия дает возможность объединить в одном — композиционном — материале жесткость, механическую прочность и контролируемую пористость кремнеземов с адсорбционной инертностью, высокой емкостью и биосовместимостью, присущими мягким органическим гелям, традиционно используемым для хроматографии биополимеров.

Экспериментальная часть

В работе использовали макропористые стекла МПС-250 ГХ (средний диаметр пор 25 нм, удельный объем пор 1,2 $см^3/г$) и МПС-2000 ВГХ (средний диаметр пор 200 нм, удельный объем пор 2,0 $см^3/г$) производства Горьковского опытного завода ВНИИНП (фракция 0,25—0,5 мм). Силикагель «Армсфер Сил 50» (средний диаметр пор 50 нм, удельный объем пор 0,6 $см^3/г$, удельная поверхность 35 $м^2/г$) производства Ереванского отделения неорганических материалов НПО ИРЕА (фракция 10 мкм). Сорбент «Lichrospher RP-18» (Merck, ФРГ). Пропиловый спирт, ацетонитрил («о. с. ч.», для хроматографии) производства Львовского завода реактивов; *трис*-гидроксиметиламинометан, ЭДТА, уксусная и трифторуксусная кислоты («Fluka», Швейцария). Образцы тРНК, пептидов и белков были предоставлены различными лабораториями ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР. Эксперименты проводили используя ртутный порометр «Pore Sizer 9300» (Micromeritics, США), жидкостной хроматограф «Миллихром» (Орловское НПО «Научприбор», СССР), УФ-спектрофотометр «Specord UVvis» (Carl ZEISS Jena, ГДР), проточный УФ-спектрометр «Spectrochrom M» (Gilson, Франция), перистальтический насос «Varioperpex 2120» (LKB, Швеция).

Обсуждение результатов

Синтез и структура сорбентов. Для создания композиционных перфторполимерсодержащих сорбентов разработан метод γ-инициированной постполимеризации тетрафторэтилена (ТФЭ) на поверхности дисперсных пористых кремнеземов (силикагелей и макропористых стекол) с размерами пор от 6 до 200 нм и выше, аналог которого описан в работе [15]. В качестве исходного материала для приготовления такого рода сорбентов и изучения их структурных характеристик были взяты макропористые стекла МПС-2000 ВГХ и МПС-250 ГХ.

Принципиально важным является вопрос об изменении (или сохранении) пористой структуры кремнеземов в результате нанесения полимерного покрытия. Использование метода ртутной порометрии (РП) позволяет не только рассчитать объем пор, удельную поверхность и распределение пор по размерам, но и оценить характер и толщину полимерного покрытия. Чтобы исключить вклад межчастичного пространства в измеряемый удельный объем пор, были взяты крупные частицы МПС (размер частиц 0,25—0,5 мм). На рис. 1 представлены типичные дифференциальные кривые распределения пор по размерам для исходных и модифицированных ПТФЭ МПС. Как следует из рисунка, диаметр пор для МПС-250 — ПТФЭ примерно на 4 нм меньше, а диаметр пор для МПС-2000 — ПТФЭ примерно на 20 нм меньше, чем у исходных кремнеземов.

Таким образом, толщина полимерного покрытия составила от 2 до 10 нм, что свидетельствует о нанесении слоя перфторполимера собственно на поверхность пор, а не только на поверхность частиц. Одновременно за счет модификации кремнеземов ПТФЭ удельный объем пор снижается от 1,2 до 0,95 $см^3/г$ (на 13%) для МПС-250 и от 2,0 до 1,8 $см^3/г$ для МПС-2000 (на 10%). Указанное снижение удельного объема пор соответствует количеству нанесенной полимерной фазы. В целом же сорбенты сохраняют пористую структуру исходного кремнезема, что существенно для использования синтезированных материалов в качестве сорбентов в жидкостной хроматографии.

Свойства сорбентов. Перфторполимерсодержащие сорбенты оказались достаточно устойчивы в диапазоне pH среды от 1 до 10. В частности, в щелочной и сильнощелочной средах они превосходят по устойчивости немодифицированные кремнеземы, и значительно устойчивее коммерческих силилированных силикагелей, например с «LiChrospher RP 18». На рис. 2 приведены кинетические кривые растворения различных сорбентов (в пересчете на чистую окись кремния) в 1 М растворе NaOH. Как следует из рисунка, МПС, модифицированное ПТФЭ, гораздо медленнее растворяется в щелочи, чем МПС без модификации полимером. Промывание сорбентов органическими растворителями (спирты, ацетонитрил, хлороформ и т. д.), водными растворами солей с высокой ионной силой, а также 6 М мочевиной не влияет на их адсорбционные свойства. Сорбенты можно подвергать длительной тепловой обработке до 200° С (например, при стерилизации) без заметных изменений их адсорбционных свойств.

Известно, что немодифицированные кремнеземы обладают высоким уровнем необратимой сорбции по отношению к биополимерам, однако при их химической модификации ПТФЭ этот уровень должен снижаться. С этой целью была изучена зависимость сорбции тРНК E. coli от количества вводимых проб на колонки с МПС-2000 и МПС-2000 — ПТФЭ из водных (0,01 М *трис*-HCl. pH=7,5) и водно-спиртовых (содержащих 5% пропанола) буферов. Как и ожидалось, наблюдается заметная (2—3 мг/г сор-

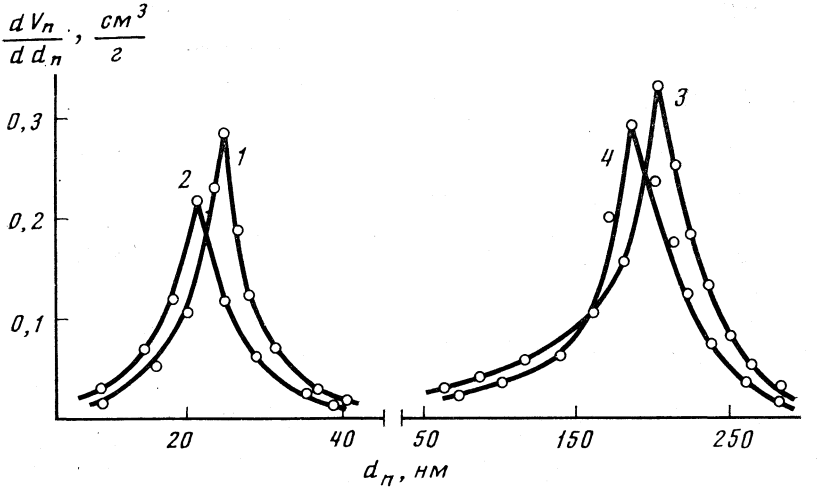


Рис. 1

Рис. 1. Дифференциальные кривые распределения пор по размерам: *1* – МПС-250; *2* – МПС-250 – ПТФЭ; *3* – МПС-2000; *4* – МПС-2000 – ПТФЭ

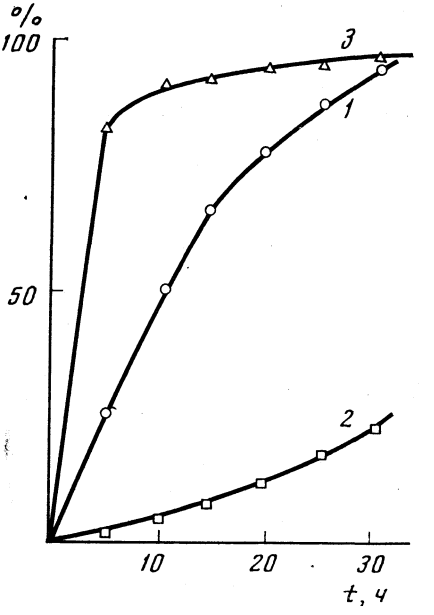


Рис. 2. Кинетические кривые растворения различных сорбентов в 1М растворе NaOH: *1* – МПС-2000; *2* – МПС-2000 – ПТФЭ; *3* – LiChrospher RP 18

Рис. 2

бента) необратимая сорбция тРНК на немодифицированном МПС. Причем количество сорбированной нуклеиновой кислоты практически не зависит от состава элюента; МПС – ПТФЭ сорбирует тРНК из водного буфера фактически количественно (65–80 мг/г сорбента). Однако, если сорбцию проводить из элюента, содержащего всего 5% пропанола необратимо сорбируется не более 5% введенной тРНК (0,03–0,05 мг/г сорбента), причем величина необратимой сорбции практически не меняется от пробы к пробе. Если использовать вместо пропанола другие добавки к элюенту, например, ацетонитрил или метанол, то наблюдается та же за-

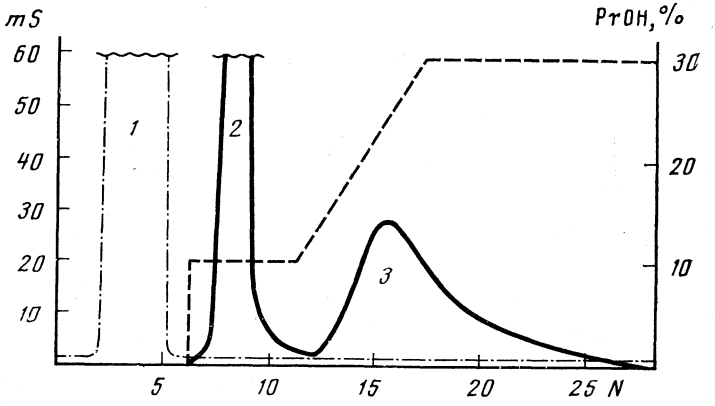


Рис. 3. Обессоливание, концентрирование и депротеинизация тРНК (колонка МПС-2000 – ПТФЭ (2×1 см); элюент 0,02М ТЕ-буфер (pH=7,5); градиент ступенчатый 0–10% пропанола, градиент линейный 10–30% пропанола): *1* – соли, *2* – тРНК, *3* – белки; *N* – номер фракции

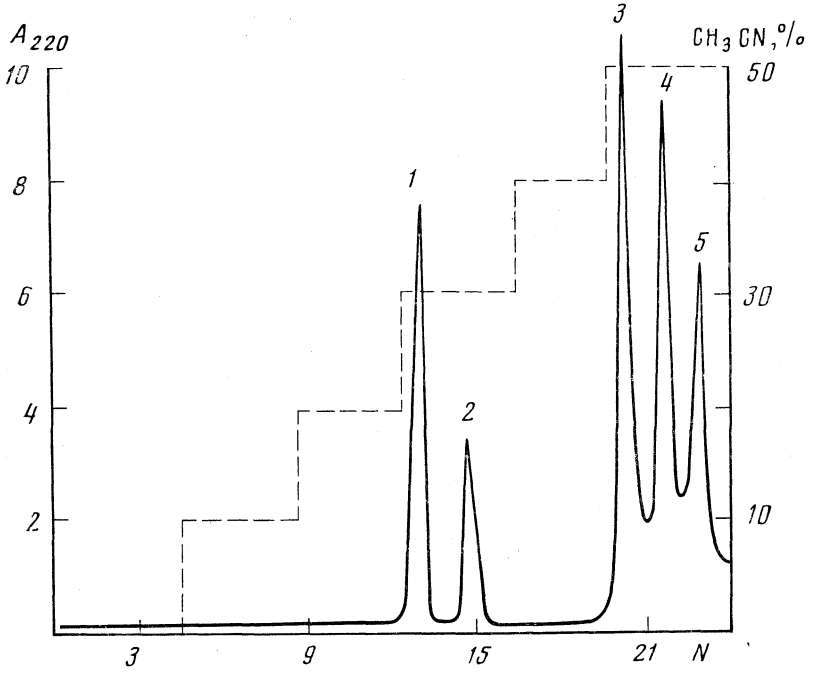


Рис. 4. ВЭЖХ пептидов (колонка «Армсфер Сил 50» – ПТФЭ (2×60 мм); элюент 0,1% трифторуксусная кислота; градиент ступенчатый 0–50% ацетонитрила (суммарный объем элюента 2400 мкл); скорость элюента 100 мкл/мин; объем фракции 100 мкл): *1* – А-цепь инсулина, *2* – брадикинин, *3* – В-цепь инсулина, *4* – лизоцим, *5* – нативный инсулин (свиной)

кономерность, хотя процентное содержание их в элюенте несколько иное (как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения).

Исходя из таких уникальных свойств ПТФЭ, а также из высокой чувствительности сорбентов к составу элюента, сорбенты применяли либо для избирательной фиксации биологических макромолекул, которые же-

лательно выделить или очистить, либо для избирательного задерживания примесей. Избирательная фиксация биополимеров может быть легко достигнута путем регулирования величины полярности элюента в соответствии с хорошо известными методами, применяемыми в обращенно-фазовой хроматографии.

Одним из важнейших процессов в генной инженерии является обессоливание нуклеиновых кислот. Обычно оно проводится при помощи гельфильтрации. Уникальные свойства синтезированных материалов по отношению к РНК можно использовать не только для ее обессоливания, но и для концентрирования и депротеинизации. Это демонстрирует следующий пример.

На колонку с МПС-2000 — ПТФЭ, уравновешенную 0,02 М ТЕ-буфером (pH=7,5), наносили 100 мл раствора тРНК с высокой ионной силой. При этом тРНК количественно сорбируется на колонке, а соли вымываются исходным буфером (рис. 3). После полного обессоливания адсорбированная тРНК вымывается 10%-ным раствором пропанола. Таким образом, одновременно происходит депротеинизация тРНК и ее концентрирование. Если же тРНК предварительно обработать РНКазой Т1 (15 единиц на 1 мг тРНК в течение 5 ч при 37° С), то большая ее часть не сорбируется из исходного буфера, а остальное количество введенной тРНК элюируется 10%-ным пропанолом. Следовательно низкомолекулярные фрагменты нуклеиновых кислот не сорбируются на перфторполимерсодержащих даже из водных буферов.

Отдельный интерес представляют перфторполимерсодержащие кремнеземные сорбенты для ВЭЖХ различных биомолекул. С этой целью были модифицированы ПТФЭ-силикагели «Армсфер Сил 50» и использованы для обращенно-фазовой хроматографии пептидов. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил — вода — трифторуксусная кислота. На рис. 4 приведена хроматограмма разделения ряда пептидов (инсулин, А- и В-цепи инсулина, брадикинин, лизоцим). В тех же условиях было проведено разделение бромцианового гидролизата бактериородопсина (хроматограмма не приводится). Следует отметить, что такое разделение на колонке с «Nucleosil C18» вообще не удается получить из-за сильной необратимой сорбции пептидов.

Таким образом, предложенные новые перфторполимерсодержащие кремнеземные сорбенты оказались весьма перспективными материалами для обращенно-фазовой хроматографии нуклеиновых кислот, пептидов и белков как в варианте ВЭЖХ, так и обычной колоночной хроматографии низкого давления.

Авторы выражают благодарность И. В. Назимову и Л. Л. Заваде (ИБХ АН СССР) за тестирование колонок и предоставление образцов нуклеиновых кислот и пептидов, а также МСЦ «Мост» (Москва) за оказанную финансовую поддержку в работе.

Список литературы

1. *Glajch J. L., Kirkland J. J., Kohler J.* // J. Chromatogr. 1987. V. 384. P. 81.
2. *Tweeten K. A., Tweeten T. N.* // Ibid. 1986. V. 359. P. 111.
3. *Berensen G. F., Pikaart K. A., Galan L.* // Anal. Chem. 1980. V. 52. P. 1990.
4. *Billiet H. A. H., Schoenmakers J. P., Galan L., Olieman C.* // J. Chromatogr. 1981. V. 218. P. 443.
5. *Haas A., Kohler J., Hemetsberger H.* // Chromatographia. 1981. V. 14. P. 341.
6. *Xindu G., Carr P. W.* // J. Chromatogr. 1983. V. 269. P. 96.
7. *Sadek P. C., Carr P. W.* // Ibid. 1984. V. 288. P. 25.

8. *Lander S. H., Hein D. T., Bolme M. W.* // Anal. Chem. 1979. V. 51. P. 1091.
9. *Rabee F. M., Butts E. T.* // LC & HPLC Magazine. 1983. V. 1. P. 42.
10. *Ecking W., Trung B., Radeglia R., Gross U.* // Chromatographia. 1982. V. 16. P. 178.
11. *Ecking W., Metzner K., Nehls I., Stanke Z.* // J. Chromatogr. 1981. V. 204. P. 29.
12. *Miguel I., Exbrayat S., Samain D.* // Chromatographia. 1987. V. 24. P. 849.
13. *Clark L. C., Wessel E. P., Miller M. L., Kaplan S.* // Microvasc. Res. 1974. V. 8. P. 320.
14. *Williams R. C., Vasta-Russell J. F., Glajch J. L., Golebowski K.* // J. Chromatogr. 1986. V. 371. P. 63.
15. *Брук М. А., Абкин А. Д., Демидович В. В. и др.* // Высокомолекуляр. соединения. Т. 17. А. С. 3.

Академия наук СССР
Институт биоорганической химии
им. М. М. Шемякина
Москва

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 541.183:546.28:547.7/.8

© 1991 г.

Королева С. К., Борисова Б. Н., Ахназарова С. Л.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СОРБЕНТОВ НА ОСНОВЕ КРЕМНЕЗЕМОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИВИНИЛПИРРОЛИДОНОМ

Изучено влияние различных факторов на процесс получения сорбентов на основе винилсилохрома и N-винилпирролидона. Выявлены роль растворителя, а также влияние концентраций мономера и инициатора и температурных режимов на сорбционные свойства модифицированного силохрома. Наличие привитого на поверхность винилсилохрома поливинилпирролидона подтверждено с помощью инфракрасной спектроскопии.

Кремнеземы, модифицированные химически связанным поливинилпирролидоном, являются перспективными сорбентами для хроматографической очистки многих биополимеров [1]. В настоящее время отечественной промышленностью выпускаются такие сорбенты на основе макропористых стекол — вирохромы МПС-1000/П, МПС-2000/П (г. Олайне). Технология получения подобных сорбентов как правило включает в себя ряд стадий.

В работе [2] рассмотрена первая стадия процесса получения сорбентов на основе кремнезема и N-винилпирролидона — винилирование исходной матрицы с целью оптимизации получения винилсилохрома на основе силохрома С-80 и винилтриэтоксисилана. В данной работе изучался непосредственный процесс получения сорбентов для гель-хроматографии биополимеров на основе винилсилохрома и N-винилпирролидона, причем исследовались как параметры оптимизации этого процесса, так и влияние растворителя на качество полученных сорбентов. В качестве растворителей были выбраны вода и N,N-диметилформамид: вода как наиболее удобный растворитель, а N,N-диметилформамид — как обладающий высокой удельной электропроводностью.

Оптимизацию эксперимента по получению сорбентов на основе винилсилохрома и N-винилпирролидона проводили многофакторным планированием по ортогональному плану второго порядка [3]: x_0 — продолжительность эксперимента, x_1 — концентрация инициатора, x_2 — концентрация мономера, x_3 — температура процесса, x_4 — соотношение масс мономера и винилсилохрома. Основной уровень эксперимента и интервалы варьирования факторов выбраны на основе предварительного эксперимента и приведены в табл. 1. Значения интервалов варьирования рассчитаны исходя из звездного плеча α ортогонального плана второго порядка при $K=4$, $n_0=3$, $\alpha^2=2{,}39$ (K — число факторов плана, n_0 — количество опытов в центре плана).

Модельным параметром оптимизации эксперимента, его критерием, выбрана способность полученных сорбентов в зависимости от степени мо-

Таблица 1

Основной уровень и интервалы варьирования факторов эксперимента

Фактор	z_0, ч	z_1, ммоль/л	z_2, моль/л	z_3, °С	z_4, г/г
z_i	5,0	1,1	0,55	75	1,75
Δz_i	1,933	0,582	0,291	13	0,809

дифицирования не адсорбировать модельный белок, т. е. работать в режиме гель-хроматографии.

Адсорбцию белка изучали в динамическом режиме в условиях наиболее применимых для очистки биополимеров [4]: 0,05 М *трис*-(гидроксиметил)-аминометан — HCl; 0,15 М NaCl: pH 7,6—7,8. В качестве модельного белка использовали бычий сывороточный альбумин (67 000 Д). Количество неадсорбированного белка определяли по светопоглощению в ультрафиолетовой области спектра при длине волны 280 нм [4].

Матрица планирования эксперимента и полученные результаты приведены в табл. 2, где план эксперимента представлен в безразмерном масштабе. При рассмотрении эксперимента, проведенного в N,N-диметилформамиде, получили дисперсию воспроизводимости, равную 1,896. При анализе полученных результатов значимость коэффициентов уравнения проверяли по критерию Стьюдента (табличное значение t-фактора при p=0,05 равно 4,3). Адекватность полученного уравнения регрессии проверяли по критерию Фишера (табличное значение F-отношения равно 19,5).

Полученное уравнение регрессии адекватно эксперименту и имеет вид:

$$\bar{y}_2=33{,}19-1{,}92x_1-3{,}53x_2+1{,}75x_3+3{,}09x_3^2. \qquad (1)$$

Из табл. 2 при сравнении $\bar{y}_1$ и $\bar{y}_2$ видно, что выход белка с колонки на сорбентах, полученных в воде, выше, чем в N,N-диметилформамиде. Таким образом, сорбенты, полученные по эксперименту, проведенному в воде, имеют лучшие характеристики по несорбируемости белка.

Анализ результатов эксперимента в воде позволил получить дисперсию воспроизводимости, равную 3,175, и уравнение регрессии следующего вида:

$$\bar{y}_1=70{,}58+4{,}03x_1+5{,}94x_3-5{,}45x_1x_4+11{,}81x_2x_4-4{,}55x_2^2. \qquad (2)$$

Полученное уравнение регрессии адекватно эксперименту. Оно было использовано для определения оптимальных условий процесса: длительность процесса 7 ч, концентрация инициатора 2,0 ммоль/л, концентрация мономера 0,55 моль/л, температура процесса 95° С; соотношение масс мономера и силохрома 0,55 г/г. В указанных условиях $y_{\text{расч}}$=99,03%.

Уравнение регрессии (2) было использовано для анализа взаимного влияния отдельных факторов на адсорбцию белка. При рассмотрении взаимного влияния факторов концентрации инициатора x_1 и соотношения мономера и силохрома x_4 на расчетный выход белка с колонки уравнение регрессии примет следующий вид:

$$\bar{y}_1'=70{,}58+4{,}03x_1-5{,}45x_1x_4. \qquad (3)$$

Таблица 2

План и результаты эксперимента

№	x_0	x_1	x_2	x_3	x_4	y_1	y_2
1	+1	+1	+1	+1	+1	65,08	50,79
2	+1	−1	−1	+1	+1	63,49	47,62
3	+1	+1	−1	−1	+1	68,25	39,68
4	+1	−1	+1	−1	+1	66,67	50,79
5	+1	+1	−1	+1	−1	58,73	39,68
6	+1	−1	+1	+1	−1	52,38	50,79
7	+1	+1	+1	−1	−1	79,37	30,16
8	+1	−1	−1	−1	−1	60,32	39,68
9	+1	+1	−1	+1	+1	73,02	30,16
10	+1	−1	+1	+1	+1	77,78	25,40
11	+1	+1	+1	−1	+1	46,03	15,78
12	+1	−1	−1	−1	+1	41,27	41,27
13	+1	+1	+1	+1	−1	100,00	23,81
14	+1	−1	+1	−1	−1	73,02	41,27
15	+1	+1	−1	−1	−1	77,78	41,27
16	+1	−1	+1	−1	−1	39,68	36,51
17	+1	0	0	0	0	79,37	36,51
18	+1	+1,546	0	0	0	68,25	47,62
19	+1	−1,546	0	0	0	74,60	33,33
20	+1	0	+1,546	0	0	73,02	22,22
21	+1	0	−1,546	0	0	52,38	46,03
22	+1	0	0	+1,546	0	77,78	53,97
23	+1	0	0	−1,546	0	52,38	39,68
24	+1	0	0	0	+1,546	68,25	44,44
25	+1	0	0	0	−1,546	73,02	31,75
26	0	0	0	0	0	76,19	33,33
27	0	0	0	0	0	73,02	36,51

Примечание. y_1 и y_2 — количество неадсорбированного белка, полученное на сорбентах из эксперимента, проведенного в водной среде и диметилформамиде соответственно, %.

При этом ряд параметров процесса имеет постоянные значения: концентрация мономера $x_2=0$ ($z_2=0{,}55$ моль/л), температура процесса $x_3=0$ ($z_3=75°$ С).

Аналогично уравнение регрессии при рассмотрении взаимного влияния факторов концентрации мономера x_2 и соотношения мономера и винилсилохрома x_4 на расчетный выход белка с колонки имеет вид:

$$\bar{y}_1''=70{,}58+11{,}81x_2x_4-4{,}55x_2^2. \qquad (4)$$

В данном случае параметры концентрации инициатора и температуры процесса имеют постоянные значения $x_1=0$ ($z_1=1{,}1$ ммоль/л) и $x_3=0$ ($z_3=75°$ С) соответственно.

Как следует из зависимостей, приведенных на рис. 1, для того чтобы получить сорбент, пригодный для гель-хроматографии (выход белка с колонки максимальный), необходимо вести процесс при малых соотношениях мономера и винилсилохрома (не менее 0,809), но при достаточно высоких концентрациях инициатора и мономера. Это, вероятно, можно объяснить тем, что лимитирующей стадией процесса гетерогенной полимеризации является диффузия реагентов к поверхности твердой частицы [5]. Кроме того, при достаточном количестве как инициатора, так и мономера образование активных радикалов на поверхности твердой частицы должно быть конкурентноспособно с реакциями в гомогенной фазе [6]. Например,

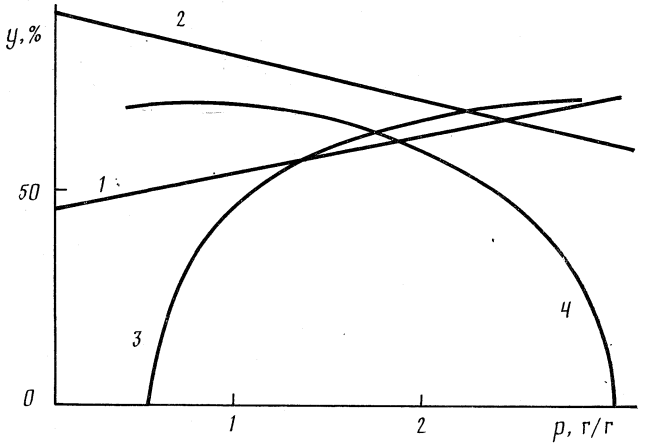


Рис. 1. Графическое выражение зависимостей, полученных из уравнений (3) и (4); *1* и *2* – зависимости расчетного выхода белка с колонки от концентрации мономера и соотношения мономера и винилсилохрома при z_1=0,2 (–α) и 2,0 ммоль/л (+α) соответственно; *3* и *4* – зависимости расчетного выхода белка с колонки от концентрации инициатора и соотношения мономера и винилсилохрома при z_2=0,1 (–α) и 1,0 моль/л (+α) соответственно

при малых концентрациях мономера и инициатора для получения сорбентов с необходимыми свойствами расход реагентов завышен.

При рассмотрении влияния температуры на процесс получения сорбентов получено уравнение регрессии следующего вида:

$$\bar{y}_1'''=70{,}58+5{,}94x_3. \qquad (5)$$

Из уравнения (5) следует, что повышение температуры с учетом влияния всех остальных параметров, включенных в уравнение регрессии, должно приводить к увеличению выхода неадсорбированного белка, т. е. к улучшению свойств сорбентов.

Из анализа взаимного влияния факторов следует, как и ожидалось, что изменение одного параметра ведет к соответствующему изменению остальных параметров процесса для получения сорбентов с необходимыми свойствами.

Таким образом, многофакторным планированием эксперимента определены оптимальные условия получения сорбентов для гель-хроматографии биополимеров на основе винилсилохрома и N-винилпирролидона.

Рассмотрено взаимное влияние параметров процесса на хроматографические свойства полученных сорбентов и выбран растворитель для проведения процесса получения синтетических макропористых кремнеземных сорбентов для хроматографии биополимеров.

Следующим этапом данной работы было количественное определение привитого поливинилпирролидона на поверхности винилсилохрома. Классические методы определения привитого водорастворимого полимера на поверхности минеральных частиц зачастую приводят к большим ошибкам. Кроме того, полимер невозможно выделить с поверхности кремнезема без изменения его структуры растворением подложки ни в плавиковой кислоте, ни в концентрированной щелочи.

Так как инфракрасная спектроскопия является наиболее широко применимым и доступным методом для определения изменений химической природы поверхности [7, 8], то был использован этот метод для количе-

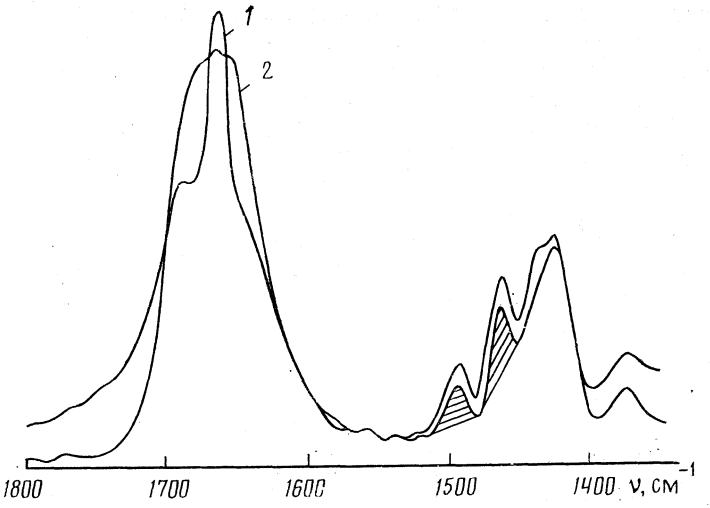


Рис. 2. Инфракрасные спектры силохрома, модифицированного поливинилпирролидоном (*1*) и поливинилпирролидона (*2*), масштаб по оси ординат для спектра *1* в 3 раза больше, чем для спектра *2*

ственной оценки привитого поливинилпирролидона на поверхности винилсилохрома.

ИК-спектры модифицированного поливинилпирролидоном винилсилохрома С-80 снимали на инфракрасном спектрофотометре с фурье-преобразованием IFS-45 фирмы «Bruker» (ФРГ) в таблетке. Таблетку прессовали из тщательно растертого вещества на гидравлическом прессе «Specac» (Англия) под вакуумом. Количество привитого поливинилпирролидона на поверхности винилсилохрома определяли по площади полос 1500 и 1470 $см^{-1}$ над базовыми линиями, как показано (заштрихованные полосы на спектре) на рис. 2. (Полосы 1500 и 1470 $см^{-1}$ соответствуют колебаниям лактамного кольца, ковалентно связанного с поверхностью винилсилохрома поливинилпирролидона [8].) Площади пиков рассчитывали при помощи программы «Calpeac» фирмы «Bruker».

Количество привитого поливинилпирролидона в точной навеске исследуемого вещества определяли при помощи интегрального коэффициента экстинкции, рассчитанного по калибровочному графику для поливинилпирролидона. Для построения калибровочного графика для поливинилпирролидона снимали ИК-спектры таблеток, для которых брали точную навеску поливинилпирролидона (от 0,5 до 1,5 мг) и 200 мг бромида калия. По результатам анализа содержание привитого поливинилпирролидона на поверхности винилсилохрома составило в среднем 1,37—1,71 ммоль/г сорбента [9].

Была рассмотрена возможность косвенного определения привитого органического слоя с помощью метода динамического термогравиметрического анализа. Сам кремнезем (силохром С-80) термостабилен до 1100° С [10]. Содержание привитого органического слоя по данным динамического термогравиметрического анализа составило в винилсилохромах в среднем до 4 масс.%, причем содержание привитого поливинилпирролидона с учетом содержания винильных групп на поверхности составило в среднем 16—19 масс.%.

Данные элементного анализа (определение содержания азота в образцах) довольно хорошо согласуются как с результатами, полученными из

ИК-спектров, так и с данными динамического термогравиметрического анализа и соответствуют 1,17—1,56 ммоль/г сорбента. Сорбент, полученный в оптимальных условиях, использован в препаративной гель-хроматографии вирусной суспензии гепатита В, причем выход белка с колонки составил 99,20%, а специфическая активность вируса — 95,00%.

Из изложенного следует, что можно соотнести хроматографические свойства полученных сорбентов, т. е. параметры процесса их получения, с количеством привитого поливинилпирролидона.

Таким образом, оптимальными условиями получения сорбентов с привитым поливинилпирролидоном, пригодных для гель-хроматографии, являются следующие: длительность процесса 7 ч, концентрация инициатора 2,0 ммоль/л, концентрация мономера 0,55 моль/л; температура процесса 95° С, соотношение масс мономера и винилсилохрома 0,55 г/г.

Список литературы

1. *Борисова В. Н., Мчедлишвили Б. В., Нахапетян Л. А.* Синтетические макропористые кремнеземные сорбенты в хроматографии биополимеров. М.: ОНТИТЭИМикробиопром, 1979. Серия V. Вып. 4. С. 57.
2. *Ахназарова С. Л., Королева С. К., Борисова В. Н. и др.* // Журн. прикл. химии. 1988. № 7. С. 1663.
3. *Ахназарова С. Л., Кафаров В. В.* Оптимизация эксперимента в химии и химической технологии. М.: Высш. школа, 1985. С. 320.
4. *Остерман Л. А.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. С. 536.
5. *Иванчев С. С.* Радикальная полимеризация. Л.: Химия, 1985. С. 280.
6. *Брык М. Т.* Полимеризация на твердой поверхности неорганических веществ. Киев: Наук. думка, 1981. С. 288.
7. *Киселев А. В., Лыгин В. И.* Инфракрасные спектры поверхностных адсорбированных соединений. М.: Высш. школа, 1972. С. 459.
8. *Зубакова Л. Б., Борисова В. Н., Королева С. К. и др.* // Журн. прикл. химии. 1987. № 7. С. 1491.
9. *Сидельковская Ф. П.* Химия N-винилпирролидона и его полимеров. М.: Химия, 1970. С. 150.
10. *Айлер Р.* Химия кремнезема. В 2 т. М.: Мир, 1982. С. 1128.

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 541.183

© 1991 г.

Хохлова Т. Д., Никитин Ю. С., Детистова А. Л., Гаркавенко Л. Г.

ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИИ ПОВЕРХНОСТИ МОДИФИЦИРОВАННЫХ КРЕМНЕЗЕМОВ С ПОМОЩЬЮ АДСОРБЦИИ КРАСИТЕЛЕЙ

Адсорбция красителей из воды использована для оценки эффекта модифицирования поверхности кремнеземов: дегидроксилирования, катионирования, введения триметилсилильных и аминопропильных групп. Установлено, что адсорбция основных красителей (родаминов С и 6Ж, метиленового синего, катионного бирюзового 23, катионного красного С) увеличивалась в результате дегидроксилирования и триметилсилирования кремнезема и уменьшалась после введения кальция на поверхность; адсорбция кислотных красителей (кислотного оранжевого, конго красного, ализаринового красного С) увеличивалась пропорционально содержанию аминогрупп на поверхности кремнезема, модифицированного γ-аминопропилтриэтоксисиланом. Показано, что содержание алюминия, адсорбированного на поверхности кремнезема, можно оценить по спектрам диффузного отражения алюминированных кремнеземов, содержащих координационно связанный ализариновый красный С.

Свойства модифицированных кремнеземов, используемых в качестве хроматографических сорбентов, носителей иммобилизованных молекул или биомакромолекул, определяются содержанием и распределением модифицирующих групп на поверхности [1]. Адсорбция красителей из водных растворов сильно зависит от химии поверхности сорбентов [2] и в частности кремнеземов [3]. В настоящей работе адсорбция красителей из водных растворов использована для оценки эффекта модифицирования поверхности кремнеземов: силикагелей и силохромов. Исследовано влияние дегидроксилирования, катионирования, модифицирования триметилхлорсиланом и γ-аминопропилтриэтоксисиланом на адсорбцию основных, кислотных, а также образующих координационные комплексы красителей.

Экспериментальная часть. В работе использовали кремнеземы отечественного производства: силикагели КСС-3, КСК-2 и КСК-1 с удельными поверхностями (s) 560, 340 и 74 м^2/г соответственно и силохром С-120 (s=110 м^2/г). Кремнеземы предварительно размалывали, отмывали от примесей железа и алюминия нагреванием в 15%-ной соляной кислоте при 90° С, потом промывали водой до отсутствия ионов хлора.

Для гидроксилирования кремнеземы кипятили в воде и высушивали при 140° С. Дегидроксилирование кремнезема проводили прокаливанием на воздухе в течение 3 ч. При этом удельная поверхность кремнезема, измеренная по тепловой десорбции азота, не изменялась. Для гидрофобизации кремнезема его кипятили в растворе триметилхлорсилана в хлороформе, предварительно добавив в качестве катализатора триэтиламин. Кальций вводили на поверхность кремнезема обработкой его водными растворами гидроксида кальция разной концентрации, а алюминий – обработкой хлористым алюминием в 1 М растворе ацетата натрия.

Использовали отечественные красители: родамины С и 6Ж, метиленовый синий, катионный бирюзовый 23, катионный красный С, кислотный оранжевый, конго красный, ализариновый красный С. Адсорбцию проводили встряхиванием кремнезема в водном растворе красителя. После этого раствор центрифугировали и определяли концентрацию красителя спектрофотометрически по оптической плотности раствора. Адсорбцию рассчитывали по убыли красителя из раствора. Так как гидрофобизированный силикагель не смачивался водой, то перед адсорбцией красителя к навеске (20 мг) такого силикагеля добавляли по 50 мкл этанола для заполнения пор.

Образцы алюминированного силохрома после встряхивания в растворе ализаринового красного С отмывали водой до отсутствия красителя, высушивали при

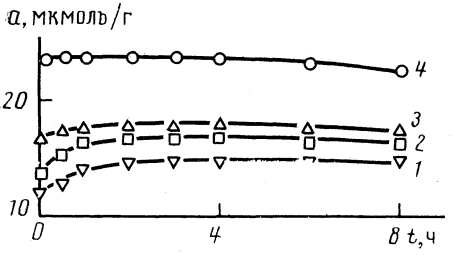


Рис. 1

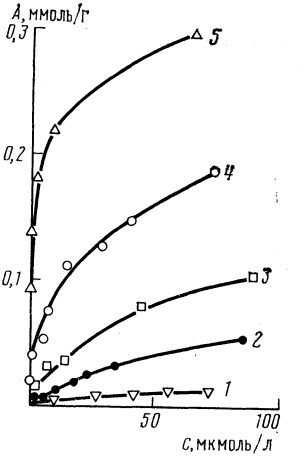


Рис. 2

Рис. 1. Кинетика адсорбции катионного бирюзового 23 из воды на образцах силикагеля КСК-1 (s=74 м²/г), прокаленного при 140 (*1*), 380 (*2*), 550 (*3*) и 800° С (*4*). Условия опыта: объем раствора V=5 мл, начальная концентрация красителя c_0= =10^{-4} М, навески силикагеля m=20 мг, размер частиц d=20÷40 мкм

Рис. 2. Изотермы адсорбции родамина С из воды на силикагеле КСС-3 (s=560 м²/г); *1* – гидроксилированный, *2–5* – триметилсилированные образцы, для получения которых было взято 0,06; 0,10; 0,15 и 0,30 мл триметилхлорсилана на 1 г силикагеля соответственно. Условия: V=25 мл, m=10 мг, d=10÷20 мкм, время адсорбции t= =6 ч

140° С. На полученных таким образом алюминированных силохромах с координационно связанным красителем снимали спектры диффузного отражения на фотоколориметре «Спектротон».

Обсуждение результатов. На рис. 1 представлена кинетика адсорбции катионного бирюзового 23 из воды на гидроксилированном и дегидроксилированных образцах силикагеля. Адсорбция растет с увеличением степени дегидроксилирования поверхности. На гидроксилированном образце (высушенном при 140° С) адсорбция становится максимальной через 2 ч встряхивания и затем не изменяется в течение 8 ч. На наиболее дегидроксилированном силикагеле, прокаленном при 800° С, адсорбция достигает максимальной величины через 10 мин и начинает медленно уменьшаться через 4 ч встряхивания. На прокаленных при 380 и 550° С силикагелях адсорбция становится максимальной через ~1 и 0,5 ч соответственно и практически не изменяется в течение 4–6 ч. Таким образом, по величине адсорбции данного красителя, измеренной через 2–4 ч (в области плато на кинетических кривых), можно оценить степень дегидроксилирования поверхности кремнезема. Дегидроксилирование поверхности кремнезема увеличивало адсорбцию из воды также других основных красителей: родаминов, метиленового синего, катионного красного С.

Изотермы адсорбции родамина С на силикагеле КСС-3 с разным содержанием триметилсилильных групп на поверхности приведены на рис. 2. По сравнению с адсорбцией на гидроксилированном силикагеле адсорбция красителя на образце с наиболее плотным триметилсилильным покрытием увеличилась более чем на порядок. Гидрофобизация кремнезема увеличивала адсорбцию родамина С больше, чем дегидроксилирование его поверхности.

Введение кальция на поверхность кремнезема уменьшало адсорбцию родамина С. Из изотерм адсорбции на силикагеле КСК-2 видно, что адсорбция уменьшается с увеличением содержания кальция на поверхности (рис. 3).

Таким образом, гидрофобизация поверхности кремнезема триметилсилированием или дегидроксилированием увеличивает адсорбцию, а увеличение полярности поверхности замещением водорода силанольных групп на кальций уменьшает адсорбцию основных красителей из воды. По изменению величины адсорбции можно оценить эффект модифицирования поверхности кремнеземов.

Алюминий, адсорбированный на кремнеземе, образует на поверхности координационный комплекс с ализариновым красным С. Спектры диффузного отражения

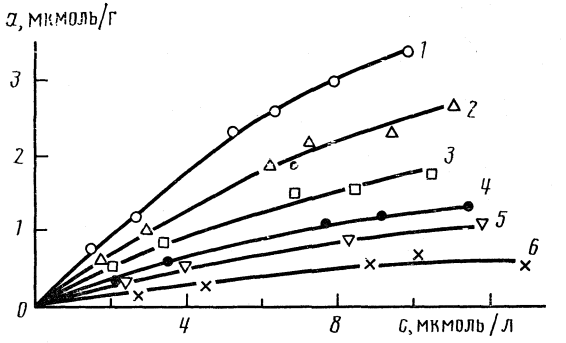


Рис. 3. Изотермы адсорбции родамина С из воды на силикагеле КСК-2 (s=340 м^2/г), содержащем кальций: *1* – 0; *2* – 0,5; *3* – 1,0; *4* – 2,0; *5* – 4,0; *6* – 7,9 мкмоль/м^2. Условия: V=5 мл, m=10 мг, d=40÷60 мкм, t=3 ч

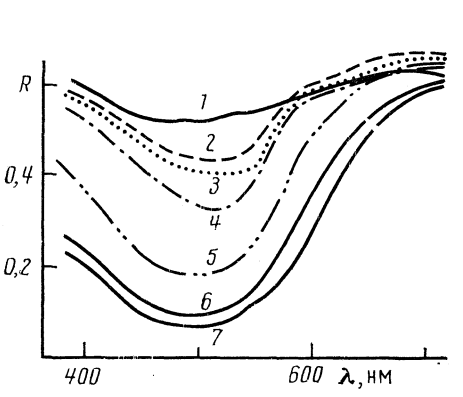


Рис. 4

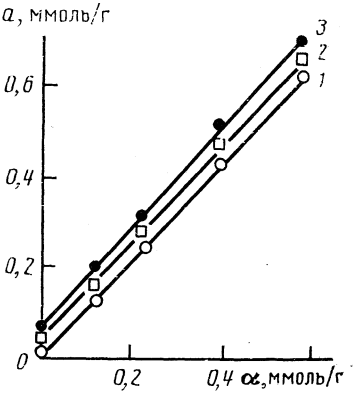


Рис. 5

Рис. 4. Спектры диффузного отражения образцов алюминированного силохрома С-120 (s=110 м^2/г), содержащих алюминий (*1* – 0; *2* – 0,033; *3* – 0,041; *4* – 0,083; *5* – 0,124; *6* – 0,166; *7* – 0,21 ммоль/г), после адсорбции ализаринового красного С. Условия: V=5 мл, m=1 г, c_0=0,1%, t=1 ч; 0,2 М ацетатный буфер, pH 4,0

Рис. 5. Зависимости адсорбции красителя от содержания аминопропильных групп в силикагеле КСК-2 при равновесной концентрации в растворе 10^{-4} М: *1* – конго красного из 0,025 М фталевокислого буфера, pH 5,7, m=5 мг; *2* – кислотного оранжевого из 0,02 М глицинового буфера, pH 2,0, m=0,2 мг; *3* – ализаринового красного С из 0,005 М глицинового буфера, pH 3,0, m=0,4 мг

образцов силохрома С-120, содержащих на поверхности разные количества алюминия, после обработки раствором ализаринового красного С представлены на рис. 4. Положение максимумов после поглощения при 510 нм в спектрах диффузного отражения адсорбированных комплексов и в спектрах поглощения растворенных комплексов совпадает. По спектрам диффузного отражения можно определить содержание алюминия на поверхности силохрома С-120 от 0,04 до 0,2 ммоль/г.

Содержание аминопропильных групп, ковалентно связанных с поверхностью, можно определять по изотермам адсорбции кислотных красителей: кислотного оранжевого, конго красного, ализаринового красного С. Зависимость адсорбции этих красителей от содержания аминопропильных групп на поверхности силикагеля КСК-2 линейна (см. рис. 5). Так как чувствительность определения концентрации красителя довольно велика, а величины адсорбции большие, то для определения аминопропильных групп можно использовать малые количества модифицированного кремнезема от нескольких десятков до нескольких миллиграмм.

Таким образом, с помощью адсорбции красителей хорошо обнаруживаются изменения химии поверхности кремнеземов, происходящие при дегидроксилировании, катионировании, введении триметилсилильных или аминопропильных групп, что позволяет оценить эффект модифицирования поверхности кремнеземов. В ряде случаев возможна количественная оценка степени модифицирования поверхности кремнезема.

Список литературы

1. *Киселев А. В.* Межмолекулярные взаимодействия в адсорбции и хроматографии. М.: Высш. шк., 1986. 360 с.
2. *Джайлс Ч.* // Адсорбция из растворов на поверхностях твердых тел. М.: Мир, 1986. С. 368.
3. *Хохлова Т. Д., Никитин Ю. С., Гаркавенко Л. Г., Детистова А. Л.* // Химия и технология воды. 1990. Т. 12. № 6. С. 517.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
Химический факультет

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

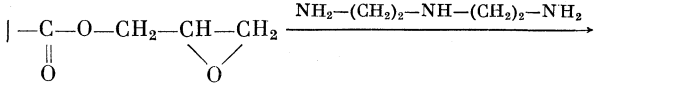
Градил И., Швец Ф., Белякова Л. Д., Аратскова А. А., Орлов В. И., Яшин Я. И.

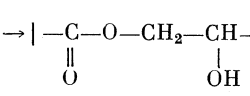
ПОРИСТЫЕ МЕТАКРИЛАТНЫЕ ПОЛИМЕРЫ С АМИНОГРУППАМИ КАК АНИОНООБМЕННИКИ В ИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

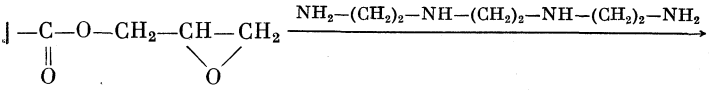
Пористые метакрилатные полимеры, модифицированные диэтилентриамином и триэтилентетрамином, исследованы как анионообменники в ионной хроматографии. Изучена зависимость удерживания анионов F^-, Cl^-, SO_4^{2-} и NO_3^- от состава элюента. Показано, что с разбавлением элюента, содержащего карбонат и бикарбонат натрия, удерживание анионов увеличивается, в результате чего в разбавленном элюенте наблюдается полное разделение исследованных анионов. Во всех случаях установлено сильное удерживание аниона NO_3^-, что представляет большой практический интерес.

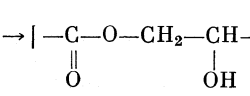
В последнее время большой интерес вызывают пористые полимеры как сорбенты в жидкостной хроматографии, в частности пористые метакрилатные сополимеры, содержащие активные эпоксигруппы, легко подвергающиеся химическому модифицированию, что открывает большие возможности для регулирования их адсорбционных и селективных свойств. Ранее нами методом высокоэффективной жидкостной хроматографии были исследованы пористые метакрилатные полимеры с эпоксигруппами, а также химически модифицированные различными аминами и аминоспиртами [1, 2]. Они проявили интересные закономерности удерживания полярных производных бензола как из неполярного, так и полярного элюентов. Представляло интерес изучить закономерности удерживания анионов на таких полимерах, т. е. применить их в ионной хроматографии.

Экспериментальная часть. Для синтеза химически активных полимеров использовали макропористый сополимер 2,3-эпоксипропилметакрилата (ЭПМА) (60 масс.%) и этилендиметакрилата (ЭДМА) (40 масс.%), полученный в процессе суспензионной радикальной сополимеризации с использованием смеси циклогексанола и додеканола (91 : 9) как порообразователей [3]. Модифицирование проводили таким образом, что 7 г сополимера ЭПМА – ЭДМА (диаметр частиц 10–16 мкм) суспендировали в диэтилентриамине (ДЭТА) или триэтилентетрамине (ТЭТА) (30 мл) и нагревали 8 ч при 80° С, промывали водой, спиртом и сушили при 78° С и 1,3 кПа. Реакции идут по схемам:









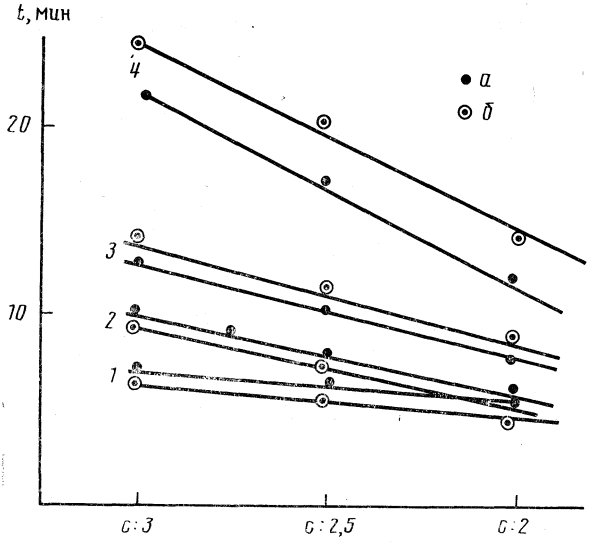


Рис. 1

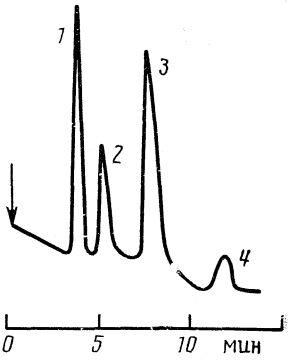


Рис. 2

Рис. 1. Зависимости времен удерживания анионов F^- (*1*), Cl^- (*2*), SO_4^{2-} (*3*) и NO_3^- (*4*) от состава элюента (0,0024 М Na_2CO_3 и 0,003 М $NaHCO_3$), разбавленного в 2, 2,5 и 3 раза, на метакрилатных полимерах, содержащих ДЭТА (*а*) и ТЭТА (*б*)

Рис. 2. Хроматограмма разделения анионов F^- (*1*), Cl^- (*2*), SO_4^{2-} (*3*) и NO_3^- (*4*) на метакрилатном полимере, модифицированном ТЭТА. Расход элюента 2,5 см³/мин, стандартный раствор разбавлен в 3 раза

В результате модифицирования поверхность содержит наряду с аминогруппами также ОН-группы.

Хроматографические исследования проводили на ионном хроматографе «Цвет-3006» с кондуктометрическим детектором. Колонки имели размер 20×0,6 см, их заполняли сорбентами ЭПМА – ЭДМА – ДЭТА и ЭПМА – ЭДМА – ТЭТА. Данные сорбенты устойчивы в щелочной и кислой средах. Использовали следующий состав элюента: смесь растворов 0,0024 М Na_2CO_3 и 0,003 М $NaHCO_3$, его разбавляли в 2, 2,5 и 3 раза. Расход элюента 1,0 см³/мин. Объем дозы 50 мкл. Состав смеси анионов, мг/л: F^- – 5, Cl^- – 5, SO_4^- – 30, NO_3^- – 15.

Обсуждение результатов. По пористости исследованные образцы имеют мезопористую структуру [4]. Удельная поверхность сорбентов была оценена методом тепловой десорбции азота, она составляла 63 м²/г для исходного сополимера и 68 м²/г – для модифицированного ДЭТА. Общий объем пор определен методом ртутной порометрии и по адсорбции пара пер-фтор-*н*-октана, он составлял 1,03 см³/г для исходного образца и 0,97–1,03 см³/г – для модифицированного ДЭТА; эффективный диаметр пор составлял 60 и 70 нм соответственно. Таким образом, при модифицировании сополимера амином пористая структура практически не изменилась.

Обычные анионообменники, используемые для анализа анионов, содержат очень небольшое количество четвертичных аммониевых групп (~0,1 мг-экв/г). Введение такого малого количества функциональных групп представляет сложность и трудно воспроизводимо. Образцы, модифицированные ДЭТА и ТЭТА, содержали большое количество функциональных групп. Так, полимер ЭПМА – ЭДМА – ДЭТА содержал 7,89 масс.% азота, что соответствует концентрации функциональных групп 1,9 ммоль/г, т. е. 5,7 ммоль/г аминогрупп.

Изучена зависимость удерживания анионов F^-, Cl^-, SO_4^{2-} и NO_3^- от состава элюента (рис. 1). Как видно из рис. 1, во всех случаях наблюдается сильное удерживание NO_3^--аниона. При разбавлении элюента удерживание анионов увеличивается (особенно NO_3^-), в результате чего в разбавленном элюенте наблюдается полное разделение исследованных анионов. При использовании наиболее сильного элюента (стандартного, разбавленного в 2 раза) полного разделения не наблюдается, но время анализа составляет всего 10 мин. Это позволяет использовать такие

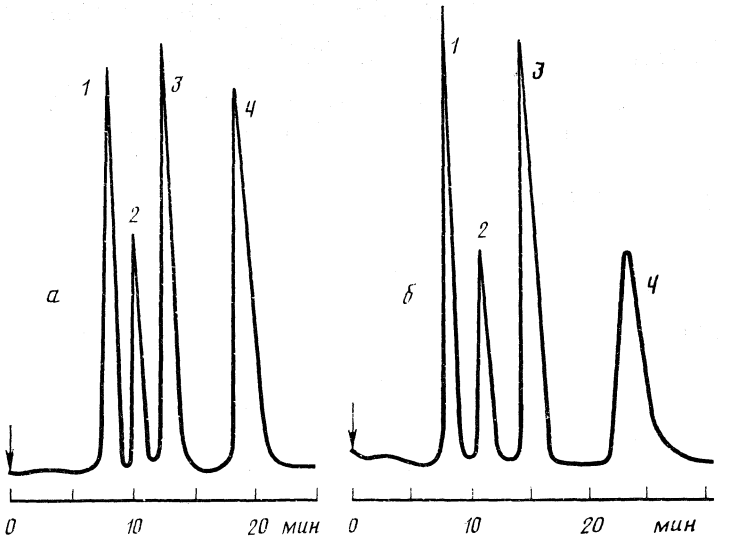


Рис. 3. Хроматограммы разделения анионов F^- (*1*), Cl^- (*2*), SO_4^{2-} (*3*) и NO_3^- (*4*) на метакрилатном полимере, модифицированном ДЭТА (*а*) и ТЭТА (*б*). Расход элюента 1 см^3/мин, стандартный раствор разбавлен в 2,5 раза

сорбенты в указанных условиях хроматографирования при рутинном анализе нитратов в смесях со сложной матрицей, когда нитрат выходит отдельно от всех анионов.

На рис. 2, 3 приведены хроматограммы разделения исследованных анионов на полимерах ЭПМА – ЭДМА – ДЭТА и ЭПМА – ЭДМА – ТЭТА. Как видно, для достижения полного разделения анионов анализ возможно проводить уже при стандартном элюенте, разбавленном в 2,5 раза. Особенность метакрилатного полимера с аминогруппами проявляется в том, что на нем удерживание исследованных анионов происходит в необычном порядке [5], а именно нитрат-анион выходит последним. Такой порядок выхода характерен для метакрилатных полимеров, он наблюдался при разделении анионов на анионообменнике ЭПМА – ЭДМА, содержащем четвертичные аммониевые группы [6]. Очевидно, такой необычный порядок выхода обусловлен тем, что на поверхности данного полимера наряду с аминогруппами имеются также COO- и OH-группы, которых нет, например, в анионообменнике, полученном на основе сополимера стирола с дивинилбензолом.

При сравнении двух образцов с различной природой аминогрупп (ДЭТА и ТЭТА) было установлено, что удерживание на образце с ТЭТА-группами для более удерживаемых компонентов более сильное, чем на образце с ДЭТА-группами, для менее удерживаемых – слабее, чем на ДЭТА. Следовательно, на образце с ТЭТА-группами можно осуществлять более селективное разделение анионов (рис. 3). Различие в поведении данных образцов можно объяснить тем, что образец с ТЭТА-группами содержит наряду с первичными и вторичными аминогруппами также большее (по сравнению с ДЭТА-образцом) количество третичных аминогрупп.

Большое удерживание NO_3^--аниона исследованными полимерами дает возможность проводить разделение нитратсодержащих проб без мешающих компонентов, например при анализе почв на содержание азота, анализе продуктов питания, растений, биологических жидкостей на содержание нитратов, причем возможно одновременное разделение органических и неорганических соединений.

Список литературы

1. *Ageev A. N., Aratskova A. A., Belyakova L. D. et al.* // Chromatographia. 1983. V. 17. P. 545.
2. *Арацкова А. А., Белякова Л. Д., Яшин Я. И. и др.* // Коллоидн. журн. 1988. Т. 50. С. 1176.

3. *Svec F., Hradil J., Conpek J., Kadal J.* // Angew. Makromol. Chem. 1975. B. 48S. P. 135.
4. *Белякова Л. Д., Шевченко Т. И., Блега М. и др.* // Коллоидн. журн. 1987. Т. 49. С. 847.
5. *Фритц Дж., Гьерде Д., Поланд К.* Ионная хроматография. М.: Мир, 1984.
6. *Hradil J., Svec F., Aratskova A. A. et al.* // J. Chromatogr. 1989. V. 475. P. 209.

Академия наук ЧСФР
Институт макромолекулярной химии
Прага

Академия наук СССР
Институт физической химии
Москва
Дзержинское ОКБА

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 662.18

© 1991 г.

Нахапетян Л. А., Мотина Л. И., Швец Ф., Градил И., Коробков И. В., Хусаинов М. Р., Кузнецов В. П.

ИММУНОСОРБЕНТЫ НА ОСНОВЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ БИОПОЛИМЕРОВ

Показана возможность использования иммуносорбентов, полученных на основе сферической целлюлозы с аминоэтильными и диэтиламиноэтильными группами, для иммуноаффинной очистки лейкоцитарного интерферона и бактериальной α-амилазы. Иммунологическим методом подтверждено, что удаление антигенов вируса индуктора и куриной аллантоисной жидкости при очистке интерферона было полным; удельная активность α-амилазы после очистки повысилась в 3,5 раза.

В последние годы для очистки биополимеров широко используется аффинная хроматография, позволяющая выделять их в гомогенном состоянии с проведением минимального количества стадий. Одной из разновидностей аффинных сорбентов являются иммуносорбенты, созданные на основе современных успехов в области иммунохимии и обладающие уникальной избирательностью [1].

Для получения аффинных сорбентов специфические антитела иммобилизуют на каком-либо нейтральном сорбенте, чаще всего для этой цели используют сефарозу [2, 3]. Один из главных недостатков сефарозы, ограничивающих ее применение в колонках, — подверженность сжатию. В качестве активатора сефарозы применяют бромциан, что вызывает необходимость дополнительной обработки сорбента для закрытия непрореагировавших активных групп после иммобилизации лиганда.

В Институте макромолекулярной химии АН ЧСФР были разработаны сорбенты на основе сферической целлюлозы, представляющие собой жесткие шарики диаметром 0,05—1,00 мм, что позволяет использовать их в технологических установках колонного типа без большого сопротивления. Вследствие наличия на поверхности гранул аминоэтильных групп можно использовать глутаровый альдегид в качестве сшивающего агента [4, 5].

В настоящей работе изучена возможность получения иммуносорбентов на основе сферической целлюлозы и специфических антител для иммуноаффинной очистки человеческого лейкоцитарного интерферона и бактериальной α-амилазы.

Экспериментальная часть

Для иммобилизации использовали влажную сферическую целлюлозу с диэтиламинооксипропильными (0,91 ммоль/г, влажность 5,4 г воды/г сухого вещества, зерно 100 мкм) – ДЭАО-целлюлоза – или с аминоэтильными группами (0,2 ммоль/г сухого вещества, зерно 315 мкм) – АЭ-целлюлоза. Влажную целлюлозу (3 г) суспендировали в 10 мл 5%-ного раствора глутарового альдегида в 0,5 М фосфатном буфере с pH 7,0 в течение 1 ч при 25° С. Избыток глутарового альдегида отмывали водой до полного отсутствия запаха.

Сыворотку гипериммунизированных кроликов предварительно осаждали 9%-ным раствором ПЭЭГ-6000, затем проводили сорбцию на белок – А-сефарозу 4В («Фармация») с последующей элюцией 1 М CH_3COOH. Суммарную фракцию концентрировали на фильтре РМ-30 («Амикон») и концентрат, содержащий антитела к антигенам вируса болезни Ньюкасло и куриной аллантоисной жидкости, использовали для иммобилизации. ДЭАО-целлюлозу, обработанную глутаровым альдегидом, заливали раствором антител, содержащим 53 мг/мл белка [6] – 8 мл в 22 мл 0,1 М раствора $NaHCO_3$ с pH 8,34. Смесь инкубировали при 25° С в течение 2 ч на качалке. Затем надосадочную жидкость сливали и сорбент промывали 0,1 М $NaHCO_3$ (150 мл), 1 М NaCl (100 мл) и 0,1 М ацетатным буфером с pH 4,1 (100 мл). В надосадочной жидкости и в промывных водах определяли содержание белка и по разности вычисляли содержание белка на сорбенте, которое составляло 41,3 мг/г сухого сорбента. В случае АЭ-целлюлозы содержание белка в сыворотке, используемой для иммобилизации, составляло 29 мг/мл, а количество иммобилизованного белка равнялось 4,07 мг/г сухого сорбента. Сорбент с лигандом помещали в колонку (1×20 см) и изучали наличие неспецифической сорбции интерферона и степень его очистки.

При получении иммунсорбентов для очистки α-амилазы использовали либо непосредственно сыворотку кроликов, иммунизированных α-амилазой из *Bac. subtilis* (содержание белка 35 мг/мл) [1], либо предварительно проводили выделение глобулиновой фракции путем ее осаждения из сыворотки сульфатом натрия с последующей хроматографией на колонке с целлюлозой ДЭАЭ-52 (содержание белка 10 мг/мл). Иммобилизацию лиганда проводили так же как и в случае с интерфероном. Полученные иммуносорбенты использовали для выделения и очистки α-амилазы из препарата амилосубтилина Г10х с активностью 3000 ед/г препарата (за единицу активности принято такое количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 г растворимого крахмала в стандартных условиях: 30° С, pH 6,0, 60 мин, концентрация субстрата в реакционной среде 0,66%, постоянное соотношение фермент – субстрат, обеспечивающее гидролиз крахмала на 30% за 10 мин) и содержанием белка 100 мг/г препарата.

Обсуждение результатов

Путем иммунизации баранов препаратом человеческого лейкоцитарного интерферона, очищенным роданид-этанольным методом нами было показано, что в препарате содержится примесь антигенов вируса болезни Ньюкасло (ВБН) и куриной аллантоисной жидкости (вирус культивируется в куриных эмбрионах). Препараты интерферона применяются длительными курсами, присутствие в них иммуногенных примесей крайне нежелательно, так как может привести к сенсибилизации. Для полного удаления чужеродных антигенов рекомендовано использование иммуноаффинной хроматографии [7]. Концентрат интерферона после роданид-этанольной очистки пропускали через колонку (1,5×20 см) с иммуносорбентом, уравновешенную 0,01 М фосфатным буфером с pH 7,8, с 0,5 М NaCl со скоростью 50 мл/ч. При этом интерферон проходил через колонку, не связываясь. На иммуносорбенте удерживались нежелательные примеси: антигены вируса-индуктора и куриной аллантоисной жидкости (рис. 1). Иммуносорбент регенерировали пропусканием раствора 0,15 М CH_3COOH (pH 3,5) с 0,5 М раствором NaCl. Без дополнительной обработки колонка может быть использована не менее 40 раз.

Эффективность удаления иммунологически активных примесей была подтверждена двумя методами: иммуноферментным методом Elisa (табл. 1) и иммунизацией кроликов препаратами интерферона до стадии иммуноадсорбционной очистки и после нее (табл. 2). Из данных табл. 2 видно, что выбранная схема иммунизации достаточно эффективна: уровень антител к присутствующему в обоих препаратах человеческому альбумину был достаточно высоким (5000) и одинаковым в обеих группах. Вместе с тем при введении препарата до иммуноадсорбционной очистки

[1] Авторы благодарят А. М. Егорова, Г. Г. Орлову, А. П. Жердева, за любезно предоставленную сыворотку кроликов, иммунизированных α-амилазой.

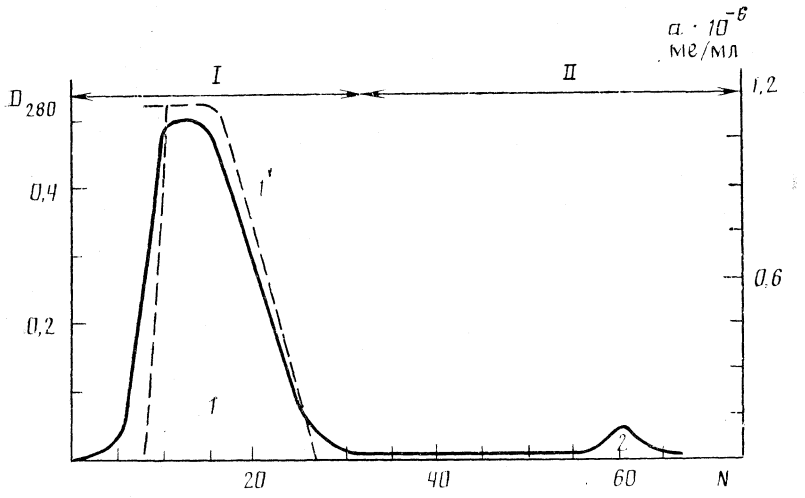


Рис. 1. Иммуноаффинная хроматография интерферона; I – 0,01 М фосфатный буфер (pH 7,8)+0,5 М NaCl, II – 0,15 М CH_3COOH (pH 3,5)+0,5 М NaCl; *N* – номер фракции, объем фракций 3 мл; *1'* – профиль элюции противовирусной активности, *1* – проходящая фракция, *2'* –элюат примесей

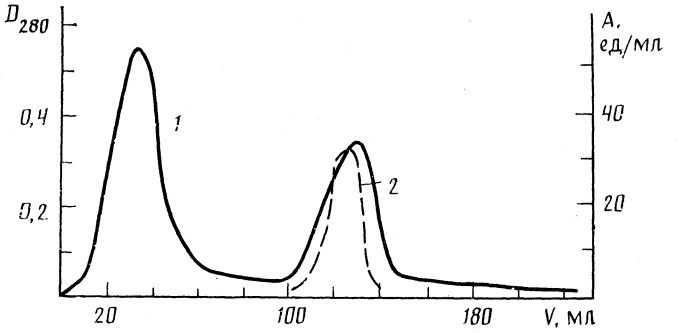


Рис. 2. Иммуноаффинная хроматография амилосубтилина Г10х. Колонку (1×20 см) с иммуносорбентом (13,5 мг белка/г сухого носителя) уравновешивали 0,17 М фосфатным буфером с pH 6,34. На колонку наносили 50 мл раствора амилосубтилина Г10х (0,118 г) со скоростью 25 мл/ч. Объем фракций 3 мл. Элюция в градиенте KCl; *1* – поглощение при 280 нм, *2* – амилолитическая активность

в сыворотке животных обнаружено развитие антител к антигенам вируса-индуктора и куриной аллантоисной жидкости, тогда как в препаратах, прошедших иммуноадсорбционную очистку, развития антител к антигенам обнаружено не было. В последующем при клиническом применении прапарата у инфекционных (более 30 инъекций за 1 месяц) или онкологических (более 50 инъекций в течение 2 лет) больных и изучении образцов плазмы крови развития антител к этим антигенам ни в одном случае обнаружено не было, что подтверждает высокую эффективность разработанного метода очистки.

При хроматографии амилосубтилина на иммуносорбентах адсорбировалась α-амилаза, а примесные белки выходили, не связываясь. Элюцию фермента проводили в градиенте KCl (рис. 2). Выход фермента по активности составлял 80%. Удельная активность α-амилазы повысилась в

Таблица 1

Уровень ВБН-аллантоисных антигенов на разных стадиях очистки интерферона

Препарат	$a \cdot 10^{-6}$, ме/мл	c, нг/мл
Неочищенный полуфабрикат	0,04	60
Концентрат перед иммуносорбцией	1	12
Препарат после иммуноадсорбции и осаждения	5	0

Примечание. Концентрация ВБН-аллантоисных антигенов (c) определялась иммуноферментным методом, чувствительность метода 3 нг/мл.

Таблица 2

Результаты иммунизации кроликов препаратами интерферона

Препарат	τ, сут	I	II	III
Концентрат до иммуноадсорбции	50	40	160	–
	57	80	320–640	–
	64	160	1280	5000
Препарат после иммуноадсорбции	50	10	10	–
	57	20	20	–
	64	20	20–40	5000

Обозначения: τ — время после начала иммунизации. Взрослым кроликам массой 3 кг первоначально вводили по 0,1 мл препарата во вскрытый подколенный лимфоузел, через 1 месяц подкожно по 1 мл в области этого лимфоузла, а затем еженедельно в ушную вену дважды по 1 мл и дважды по 0,5 мл; всего каждому кролику сделано шесть инъекций, суммарно 4,1 мл препарата; I, II и III — титры антител к различным антигенам: нормальной аллантоисной жидкости, ВБН-аллантоисной жидкости и человеческому альбумину соответственно.

3,5 раза. Электрофорез в ПААГ показал наличие одной полосы, соответствующей стандартной α-амилазе.

Таким образом, нами показана возможность использования иммуносорбентов на основе сферической целлюлозы для выделения и очистки различных биополимеров.

Список литературы

1. *Скоупс Р.* Методы очистки белков. М.: Мир, 1985. С. 173.
2. *Schell H. D., Mateescu M., Bentia T., Jifcu A.* // Analyt. Lett. 1981. V. 14. No. 17–18. P. 1501.
3. *Comoglio S., Massaglia A., Rolleri E., Rosa U.* // Biochim. Biophys. Acta. 1976. V. 420. No. 2. P. 246.
4. A. os. No. 247995. Zpusob pripravy immunosorbentu. *Nachapetjan L. A., Motina L. J., Kuznecov V. P. et al.* CSFR. zv. 12.06.86, V. 15. 12.87.
5. A. os. No. 256821. Immunosorbenty proizolázy a zpusob jejich pripravy. *Motina L. J., Hradyl J., Nachapetjan L. A. et al.* CSFR. zv. 17.09.87, V. 01.02.89.
6. *Hartree E. F.* // Analyt. Biochem. 1972. V. 48. P. 422.
7. *Kuznetsov V. P., Mekhedov L. V., Soloviev V. D.* // Acta biol. med. germ. 1979. V. 38. P. 801.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
биотехнологии
Москва

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

Нестеров В. В., Мальцев В. Г., Красиков В. Д., Беленький Б. Г.

НОВЫЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ КОЛОНКИ ДЛЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ И БИОПОЛИМЕРОВ

Изучена возможность применения макропористых стекол (МПС) в качестве сорбентов для высокоэффективной жидкостной хроматографии синтетических полимеров и белков. Макропористые стекла получены путем последовательной обработки исходного натриевоборосиликатного стекла растворами кислоты и щелочи, при этом размеры заданы условиями термической обработки исходного стекла. Показано, что высокая однородность порового пространства в МПС позволяет химически модифицировать практически все гидроксильные группы на его поверхности.

Разработана новая конструкция хроматографических колонок на основе титанциркониевого сплава. Показано, что новые колонки, обладающие высокой коррозионной стойкостью, заполненные модифицированными МПС, в свою очередь отличающимися повышенной гидролитической стабильностью, позволяют реализовать анализ объектов в агрессивных растворителях, в том числе в широком диапазоне изменения их pH и ионной силы. Приведены примеры применения новых колонок для экспрессного анализа белковых смесей и стандартных полистиролов (колонки не уступают лучшим мировым аналогам).

Интенсивное развитие высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), связанное с усложнением задач химического анализа, а также бурным развитием биотехнологии, все больше привлекает для использования в качестве сорбентов пористые кремнеземы. Одним из наиболее интересных представителей пористых кремнеземов являются макропористые стекла (МПС), в том числе и химически модифицированные органическими, элементоорганическими и неорганическими соединениями. Недостаточное использование МПС в качестве сорбентов в ВЭЖХ связано, по-видимому, с гораздо большими технологическими трудностями их приготовления по сравнению, например, с силикагелями. Однако затраты на преодоление этих трудностей с лихвой оправдываются возможностью получения сорбентов с замечательными хроматографическими характеристиками и открывают широкие возможности использования МПС в качестве высокоэффективного сорбента нового поколения.

Исходным продуктом для получения МПС являются отливки стекла ДВ-1 ОСТ 3-1899-73 со следующим химическим составом: SiO_2 – 66, B_2O_3 – 27, Na_2O – 7, Al_2O_3 – 1%. Основные этапы технологической обработки стекла ДВ-1 с целью получения МПС можно представить пятью стадиями: 1) термообработка в режиме, обеспечивающем заказанный размер пор r; 2) дробление, выделение фракции 100–500 мкм; 3) обработка 1 н. HCl в течение 4 ч, отмывка 6 ч, сушка при 120° С; 4) обработка 0,5 н.

КОН в течение 16 ч, отмывка 5—6 сут, сушка при 120° С; 5) дробление, выделение фракций 5±1, 7±1,5, 10±2, 15±3 мкм.

Вначале проводят термическую обработку отливок в специальных печах с объемом кубической камеры не менее 2,0 м^3 и градиентом температуры по диагонали куба не более ±1 К/м. Температуру обработки (T, К) и ее длительность (t, ч) выбирают в зависимости от радиуса пор (r, Å) в конечном продукте, исходя из эмпирического соотношения [1]

$$r^3/t = 1{,}2 \cdot 10^{27} \exp\left[-8{,}6 \cdot 10^4/RT\right],$$

где R — универсальная газовая постоянная (1,98 кал/моль·К).

Термообработанные отливки ДВ-1 дробят до размеров частиц 100—500 мкм и подвергают последовательной обработке растворами кислоты и щелочи по известной методике [2]. Отмытое и высушенное МПС дополнительно дробят и выделяют фракции по размерам частиц 5±1, 7±1,5, 10±2, 15±3 мкм и др.

Следует отметить, что при дроблении МПС в отличие от силикагелей не удается получить основную целевую фракцию (5—10 мкм) в количестве более чем 15% от исходного. Последнее связано с особенностью поровой структуры МПС. Наиболее подходящий для дробления метод электрогидравлического удара [3], с выходом целевой фракции любого сорбента до 70—80%, позволяет получить частицы МПС с размерами не менее 15—20 мкм из-за технических ограничений отечественной аппаратуры. Дробление на механических дезинтеграторах следует проводить постадийно, поддерживая относительную влажность дробимого МПС в интервале 30—40%.

Макропористые стекла перед модификацией кипятят в концентрированной соляной кислоте, тщательно отмывают водой и вакуумируют. Вначале свободные силанольные гидроксилы на поверхности МПС замещают атомами хлора по реакции

$$\equiv Si{-}OH + SOCl_2 \rightleftharpoons \equiv Si{-}Cl + HCl + SO_2.$$

Затем, используя литийорганические соединения, замещают атомы хлора на нужный радикал R, по схеме

$$\equiv Si{-}Cl + LiR \longrightarrow \equiv Si{-}R + LiCl.$$

И наконец, оставшиеся по тем или иным причинам после первой реакции силанольные гидроксилы связывают дополнительной обработкой триметилхлорсиланом с использованием в качестве акцепторов HCl, пиридина или гексаметилдисилазана

$$\equiv Si{-}OH + (CH_3)_3SiCl \longrightarrow \equiv Si{-}O{-}Si(CH_3)_3 + HCl.$$

Макропористые стекла обладают более узкими (рис. 1, *а*) по сравнению с силикагелями распределениями пор по размерам и почти не содержат микропор (рис. 1, *б*). Последнее оказывается решающим фактором для приготовления на основе модифицированных МПС сорбентов с высокой степенью обратимости сорбции белков (табл. 1) и высокой гидролитической стабильностью (табл. 2). В табл. 1, 2 приняты следующие обо-

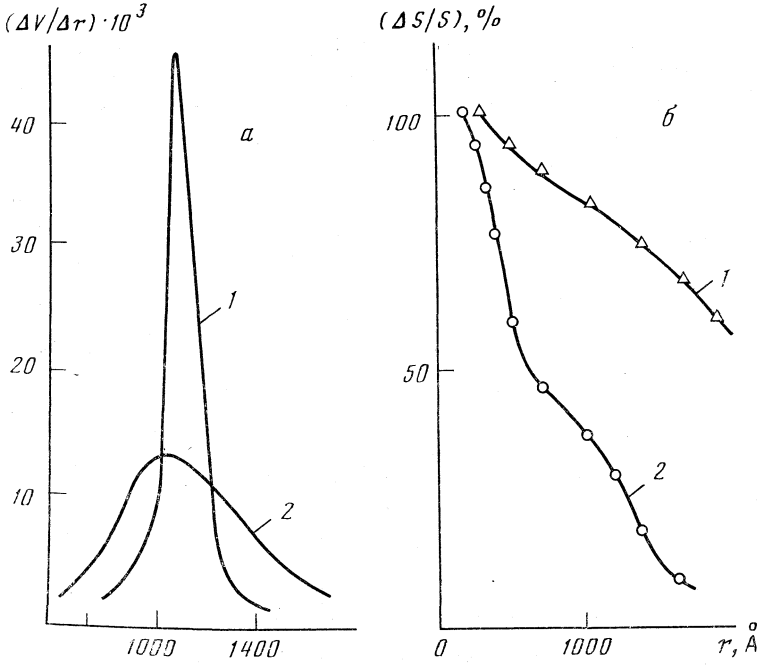


Рис. 1. Сравнительные дифференциальные (*а*) и интегральные (*б*) распределения пор по размерам в МПС (*1*) и силикагеле (*2*). Доля микропор в МПС и силикагеле составляет <10% и >40% соответственно (*б*)

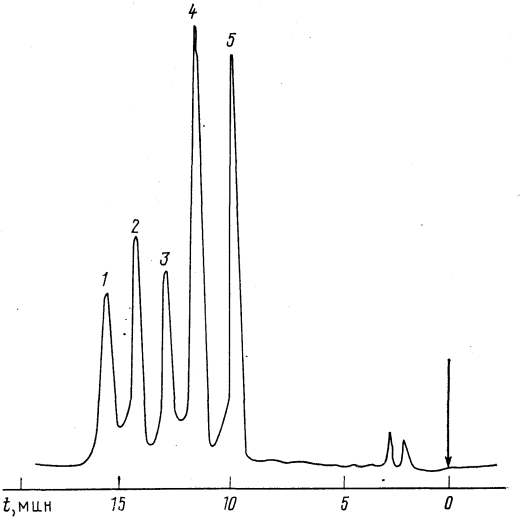


Рис. 2. Обращенно-фазовая ВЭЖХ белков (*1* – химотрипсиноген А, *2* – лизоцим, *3* – лактальбумин, *4* – цитохром С, *5* – рибонуклеаза А) на МПС-270-C_4 (10 мкм). Колонка 50×4 мм², скорость потока 1 мл/мин, линейный градиент В в А за 15 мин: А – 10% CH_3CN+0,1% ТФУК, В – 90% CH_3CN+0,1% ТФУК. Стрелкой отмечен ввод пробы

значения: C — обменная емкость, $C_б$ — емкость по белку, α — выход десорбции, МСУ — механическая стабильность упаковки, β — гидролитическая стабильность — относительная доля адсорбционно-активных силанольных гидроксилов после гидролиза при 50° С в течение 15 дней.

Продемонстрированные в табл. 1, 2 отличные характеристики модифицированных МПС вряд ли удастся реализовать, если использовать обыч-

Таблица 1

Сравнение характеристик катионо-обменного сорбента МПС-диол-сульфопропил с лучшими зарубежными аналогами

Сорбент	C, мг-экв/мл	$C_б$, мг/мл	α, %	МСУ
МПС-диол-сульфопропил (ИВС АН СССР)	0,22	66	98	+
Mono S (Фармация)	0,16	50	90	–
TSK-SP (Тойо Сода)	0,06	25	91	–
TSK-CM (Тойо Сода)	0,12	30	98	–

Таблица 2

Сравнительная гидролитическая стабильность сорбентов для обращенно-фазовой ВЭЖХ биополимеров

Сорбент		β	
		pH-1,7	pH-11,1
МПС-300-C_4	(ИВС АН СССР)	0,62	0,66
МПС-400-C_4	(ИВС АН СССР)	0,70	0,76
Нуклеосил-300-C_4	(Махерей Нагель, ФРГ)	0,05	0,10
Нуклеосил-500-C_4	(Махерей Нагель, ФРГ)	0,03	0,09

Таблица 3

Коррозионная стойкость титанциркониевого сплава (температура и продолжительность испытания – 20° С и 200 ч)

с, н.	v, г·м²·ч	v, мм/год	с, н.	v, г·м²·ч	v, мм/год
	HNO_3			KOH	
0,5	0,001	0,001	0,5	0,001	0,001
1,0	0,001	0,001	2,0	0,001	0,001
4,0	0,001	0,001			
				NaOH	
	HCl				
			0,5	0,001	0,0014
0,5	0,001	0,001	2,0	0,001	0,001
1,0	0,001	0,001			
2,0	0,001	0,002		NH_3	
	H_2SO_4		0,5	0,001	0,001
			2,0	0,001	0,002
0,5	0,001	0,001			
1,0	0,001	0,002		NH_4Cl	
4,0	0,200	0,500			
			1,0	0,001	0,001

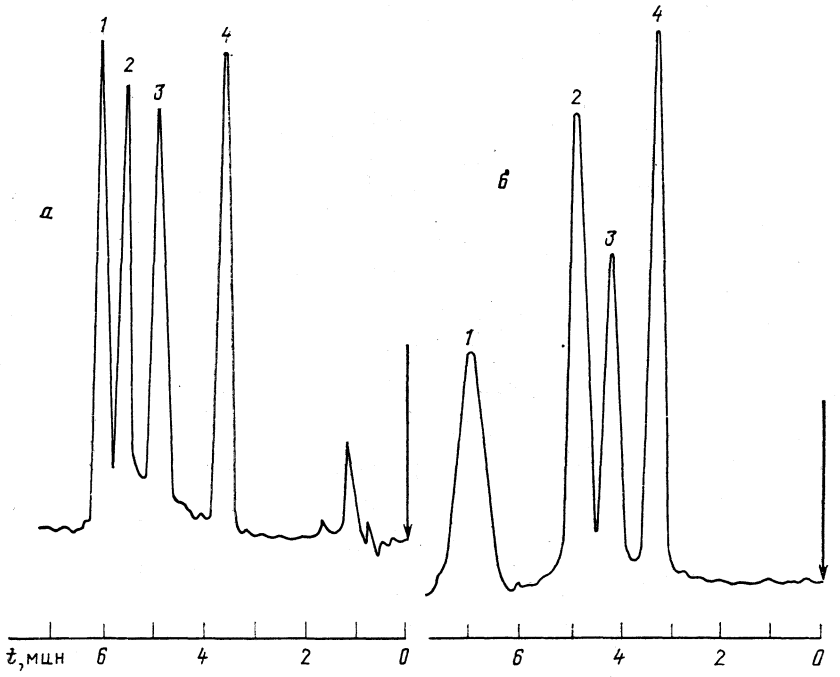


Рис. 3. Сравнительный скоростной анализ белков (*1* – лизоцим, *2* – химотрипсиноген, *3* – цитохром С, *4* – трипсиноген) на сорбенте Mono S, Фармация (*а*) и на МПС-350-диол-сульфопропил, ИВС АН СССР (*б*). Линейный градиент от 0 до 50% В в А: А – 0,002 М Na_2HPO_4 (pH=6,7), В – 1,0 М NaCl в А

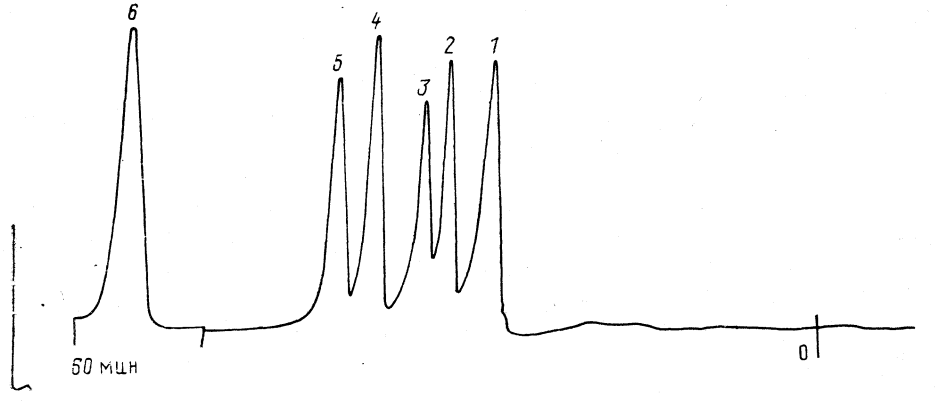


Рис. 4. Эксклюзионная микропрепаративная хроматография смеси белков на МПС-300-сибиол. Колонка 300×8 мм², скорость потока 0,2 мл/мин: *1* – ферритин (440 000), *2* – альдолаза (140 000), *3* – овальбумин (45 000), *4* – химотрипсиноген (24 000), *5* – рибонуклеаза (11 000), *6* – азид натрия (65)

ные хроматографические колонки (стеклянные или из нержавеющей стали). Нами был предложен новый тип хроматографических колонок, изготавливаемых из титанциркониевого сплава. Характеристики коррозионной стойкости такого сплава приведены в табл. 3 (*с* — концентрация, *v* — скорость коррозии).

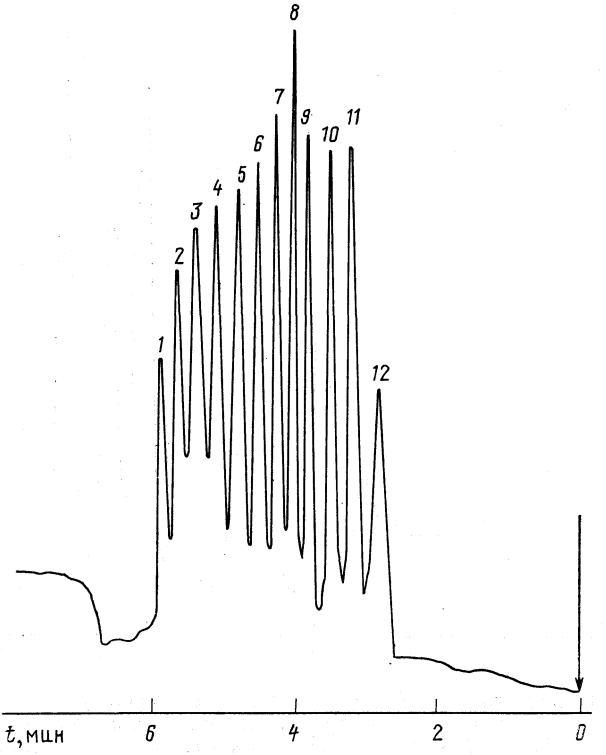


Рис. 5. Пример скоростного разделения смеси узкодисперсных полистиролов на линейном сорбенте на основе МПС (колонка 300×0,4 мм², элюент – метилэтилкетон, скорость потока – 0,5 мл/мин): *1* – 0,078, *2* – 0,480, *3* – 2,02, *4* – 4,9, *5* – 13, *6* – 34,5, *7* – 51, *8* – 100, *9* – 196, *10* – 402, *11* – 830 К, *12* – $3 \cdot 10^3$ кДа

Дополнительные испытания сплава в трифторуксусной кислоте (ТФУК) показали, что после месяца выдерживания в ТФУК свойства изделия из сплава не изменялись. Трубка же из нержавеющей стали (1Х18Н9Т), подверженная таким же испытаниям, рассыпалась в порошок при слабом механическом воздействии. Таким образом, сплав титана и циркония представляет перспективный материал для высокоэффективных коррозионно-стойких хроматографических колонок.

На рисунках приведены примеры использования таких колонок, заполненных модифицированными МПС в обращенно-фазовой хроматографии белков (рис. 2), в ионообменной хроматографии белков (рис. 3), эксклюзионной хроматографии белков (рис. 4) и в скоростной эксклюзионной хроматографии полистиролов (рис. 5). В последнем случае использовали композицию на основе МПС (МПС-Л), обладающую мультимодальным распределением пор по размерам и позволяющую реализовать линейную молекулярно-массовую калибровочную зависимость в широком диапазоне молекулярных масс полистиролов [4].

Из совокупного рассмотрения результатов, представленных на рис. 2—4 и в таблицах следует, что МПС являются перспективными сорбентами для ВЭЖХ, успешно соперничают с лучшими мировыми аналогами, а по некоторым характеристикам превосходят эти аналоги.

Список литературы

1. *Вензель Б. И., Жданов С. П.* // Физика и химия стекла. 1975. Т. 1. № 2. С. 122.
2. *Вензель Б. И.* // Wiss. Friedrich – Shiller – Univ. Jena, Naturwiss. 1987. B. 36. № 5/6. S. 381.
3. *Нестеров В. В., Чубарова Е. В., Беленький Б. Г., Лупал С. Д.* // Журн. аналит. химии. 1982. Т. 37. № 9. С. 1665.
4. *Нестеров В. В., Красиков В. Д., Жданов С. П. и др.* // Высокомолекуляр. соединения. 1984. Т. 26. Б. № 3. С. 163.

Академия наук СССР
Институт высокомолекулярных соединений
Ленинград

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

ПРИМЕНЕНИЯ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМЕРОВ

УДК 543.544

© 1991 г.

Клинских А. Ф., Кузаев А. И., Соколов М. И.

САМОСОГЛАСОВАННАЯ ПРОЦЕДУРА ДЛЯ КАЛИБРОВКИ ГЕЛЬ-ХРОМАТОГРАФА ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК ПОЛИМЕРОВ

Показано, что из данных гель-проникающей хроматографии (ГПХ) и вискозиметрии можно найти постоянные Марка – Куна (K и a) и постоянные частной калибровки (C_1, C_2). Получено уравнение для нахождения C_2, обобщающее уравнение Лоу на случай проведения калибровки при неизвестных молекулярных массах образца, учитывающее особенности хроматографической системы и позволяющее проверить соотношения универсальной калибровки для образцов с широким молекулярно-массовым распределением. С использованием предложенной процедуры проведено сравнение данных ГПХ-анализов, выполненных для различных хроматографических систем.

Обладая рядом преимуществ перед традиционными методами исследования молекулярно-массового распределения (ММР) полимеров гель-проникающая хроматография (ГПХ) является, к сожалению, относительным методом. Чтобы воспользоваться им для определения средних молекулярных масс, требуется калибровка хроматографической системы, т. е. установление зависимости между объемом удерживания и молекулярной массой исследуемого полимера. Эта операция осуществляется с помощью охарактеризованных по молекулярным массам стандартов или узких фракций полимеров. Существует универсальная зависимость между объемами удерживания V_R и гидродинамическими размерами макромолекул [1], но точность ее построения и определения констант C_1' и C_2' уравнения

$$V_R = C_1' - C_2' \lg M[\eta], \qquad (1)$$

связывающего гидродинамический объем макромолекул $M[\eta]$ и V_R зависит от точности измерения $\bar{M}$ и $[\eta]$. Так, измерения параметров ММР и средних значений молекулярных масс одних и тех же полимерных образцов, проведенные в различных лабораториях мира, дали расхождение до 50–100% [2]. При сравнении трех различных хроматографических систем значения молекулярных масс разошлись на величины, существенно превышающие ошибку опыта [3].

В некоторых случаях традиционные способы калибровки непригодны, например для бутадиен-нитрильных карбоксилсодержащих каучуков [4]. Нельзя воспользоваться и методами калибровки по широким стандартам с известным ММР [5], так как все эти методы предполагают знание значений $\overline{M}_n$ или $\overline{M}_w$ для используемых образцов. Предлагаемая самосогласованная процедура позволяет производить калибровку гель-хроматографических систем по образцам с известными вязкостями $[\eta]$.

Результаты ГПХ-эксперимента представляют в виде зависимости счета n_i от величины элюционного объема V_i (N — число отсчетов):

$$n_i=n(V_i), \quad i=1, 2, \ldots, N. \tag{2}$$

Искомое ММР $n(M)$ находится с помощью соотношения (линейная калибровочная зависимость)

$$\lg M_i=C_1'-C_2'V_i, \tag{3}$$

где постоянные частной калибровки C_1', C_2' характерны для данной хроматографической системы и данного образца. Значения C_1', C_2' определяют молекулярную массу:

$$\overline{M}_n=\exp(C_1)S_1/S_2, \tag{4}$$

$$\overline{M}_w=\exp(C_1)S_3/S_1, \tag{5}$$

$$\overline{M}_V=\exp(C_1)(S_4/S_3)^{1/a}, \tag{6}$$

где

$$S_1=\sum_{i=1}^{N} n_i, \qquad S_{2,3}=\sum_{i=1}^{N} n_i \exp(\pm C_2V_i), \tag{7}$$

$$S_4=\sum_{i=1}^{N} n_i \exp[-C_2(a+1)V_i], \tag{8}$$

$$C_j=C_j' \ln 10, \quad j=1, 2. \tag{9}$$

Постоянные Марка — Куна в уравнении для характеристической вязкости $[\eta]$

$$[\eta]=KM_V^a \tag{10}$$

зависят от полидисперсности и в общем случае неизвестны так же, как и постоянные C_1, C_2.

Целью самосогласованной процедуры является найти K, a, C_1, C_2, используя значения характеристической вязкости образцов (величины $\overline{M}_n$ и $\overline{M}_w$ неизвестны). Решение задачи разобьем на два этапа.

Вначале по итерационной схеме, предложенной в [5], зная для двух образцов $[\eta]_1$ и $[\eta]_2$, находим постоянные K и a:

$$a=\lg(\varkappa)/[G(V_1)-G(V_2)-\lg(\varkappa)], \tag{11}$$

где

$$\varkappa=[\eta]_1/[\eta]_2, \qquad G(V)=\sum_{k=1}^{m} b_kV^{k-1}. \tag{12}$$

Уравнение (12) — уравнение универсальной калибровочной зависимости, которая выполняется для отдельной фракции:

$$\lg [\eta_i] M_i = G(V), \tag{13}$$

$$V_j = G^{-1}\left[\frac{a+1}{a}\lg\left(\sum_{i=1}^{N} n_i^{(j)} \cdot 10^{aG(V_i)/(a+1)}\right)\right], \tag{14}$$

где $n_i^{(j)}(V)$ хроматограмма j-го образца. Постоянная K равна

$$K = \lg [\eta]_1 + a[\lg [\eta]_1 - G(V_1)]. \tag{15}$$

Второй этап заключается в согласовании полученной величины a и постоянной C_2. Отметим, что обычно используемое соотношение

$$C_2(a+1) = b_2 \tag{16}$$

в общем случае несправедливо. Уравнение согласования для нахождения C_2 по известному значению a и хроматограмме $n(V)$ следует из равенства:

$$(\overline{M}_V/\overline{M}_n)^{2/(a+1)} = \overline{M}_w/\overline{M}_n, \tag{17}$$

которое справедливо для самого общего вида ММР — логнормального распределения. Подставляя (4)—(6) в (17), имеем

$$(S_3 S_2/S_1^2)^{(a+1)/2} - (S_4/S_3)^{1/a} S_2/S_i = 0.$$

Ввиду зависимости величин S_i от C_2 получаем трансцендентное уравнение для нахождения постоянной C_2 частной калибровки, которое необходимо решать численно.

Уравнение (17) обобщает известное уравнение Лоу [6] на случай проведения калибровки по вискозиметрическим измерениям, учитывает особенности конкретной хроматографической системы (через $n_i = n_i(V_i)$) и позволяет проверить справедливость соотношения (16).

Постоянную C_1 находим из (6):

$$C_1 = \ln ([\eta] S_3/KS_4)^{1/a}$$

и тем самым определяем частную калибровку в (3). Следует отметить, что предложенная процедура позволяет согласованно откалибровать различные хроматографы, причем показания различных систем будут лежать в пределах ошибок метода ГПХ, в то время как сейчас сравнение ГПХ-данных затруднено [3].

Рассмотрим практическую реализацию предложенной процедуры для ГПХ-анализа для трех хроматографических систем: I — ХЖ-1307, II — Уотерс-200 (10^5, 10^4, 10^3), III — Уотерс-200 (МПС-1200, 10^4, 10^3) и пары полибутадиен — тетрагидрофуран. Для каждой хроматографической системы были определены постоянные частной калибровки, приведенные в табл. 1. Отметим, что соотношение (16) для этих систем не выполняется. Поэтому при общепринятом подходе последовал бы вывод о неприменимости двух последних систем для проведения ГПХ-анализа пары полибутадиен — тетрагидрофуран. Противоположный вывод следует при использовании предложенной процедуры: ГПХ-анализ для всех трех систем дает совпадающие результаты по нахождению M в пределах 10—20%, что лежит в пределах практически допустимой погрешности анализа. Это следует из данных табл. 2 (эксперимент на трех промышленных образцах полибутадиена).

Таблица 1

Система	C_1	C_2
I	8,5800	0,0578
II	10,115	0,2968
III	8,8860	0,2263

Таблица 2

Экспериментальные значения $\overline{M}_n$ и $\overline{M}_w$, найденные методом ГПХ-анализа для хроматографических систем I–III

Полибутадиен	$\overline{M}_n$			$\overline{M}_w$		
	I	II	III	I	II	III
1	65 414	49 787	60 328	145 500	105 860	121 060
2	42 916	45 310	56 728	104 550	102 590	114 240
3	60 728	63 222	65 450	150 730	142 060	136 600

Вывод о том, что разные по эффективности системы (такие как Уотерс-200 и ХЖ-1307) дают удовлетворительные в практическом отношении результаты ГПХ-анализа, представляется весьма важным для проведения оперативного ГПХ-анализа в промышленных условиях, так как время анализа на системах Уотерс-200 в ~3 раза больше, чем на ХЖ-1307. Предложенная процедура калибровки гель-хроматографа также удобна при исследовании малоизученных и новых полимеров, для которых константы Марка — Куна — Хаувинка неизвестны.

Для образцов с широким ММР, когда калибровочная зависимость $V=V(\lg M)$ нелинейна [7], искомое распределение $F(M)$ можно представить в виде разложения

$$F(M)=\sum_{j=1}^{N} f_j(M)\,\varepsilon_j$$

при условии, что имеется N стандартов с ММР, перекрывающими ММР образца. Пусть для каждого стандарта справедлива линейная калибровка

$$\lg M_i=C_1^{(j)}-C_2^{(j)}V_i,\quad j=1, 2, \ldots, N,$$

где $C_{1,2}^{(j)}$ находят в соответствии с изложенным выше. Тогда коэффициенты разложения ε_j определяются в результате минимизации функции невязки

$$N(\varepsilon)=\sum_i \left\{F(V_i)-\sum_{j=1}^{N}\varepsilon_j n_j(V_i)\right\}^2$$

где $F(V_i)$, $n_j(V_i)$ — гель-хроматограммы образца и стандартов соответственно, причем

$$n_j(V)=f_j(M)M\ln 10C_2^{(j)},$$

где $f_j(M)$ — ММР стандартов. Предложенный подход особенно удобен при ГПХ-анализе смесей полимеров и обработке хроматограмм сложной формы.

Список литературы

1. *Grabisic Z., Rempp P., Benoit H.* // J. Polym. Sci. 1967. Pt B. V. 5. № 11. P. 753.
2. *Strzeille C., Benoit H.* // Pure Appl. Chem. 1971. V. 26. № 3. P. 451.
3. *Кузаев А. И., Соколов М. И.* Зависимость жесткости каучука от параметров молекулярно-массового распределения. Препринт. Черноголовка: ОИХФ АН СССР, 1989. 8 с.
4. *Соколов М. И., Клинских А. Ф., Котова В. А. и др.* // Тез. докл. V Всесоюз. симп. по молекулярной жидкостной хроматографии. Рига, 1990.
5. *Szewczyk P.* // Appl. Polym. Sci. 1981. V. 26. № 8. P. 2727.
6. *Loy B. R.* // J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed. 1976. V. 14. P. 2321.
7. *Беленький Б. Г., Виленчик Л. З.* Хроматография полимеров. М.: Химия, 1978. С. 189.

Воронежский филиал
Всесоюзного научно-исследовательского института
синтетического каучука
им. С. В. Лебедева

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

Подосенова Н. Г., Лебедев Ю. Я.

О КОРРЕКТНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ СИТОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ К АНАЛИЗУ МОЛЕКУЛЯРНО-МАССОВОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИМЕРОВ

Приведены соотношения для определения области допустимых значений параметров хроматографического процесса, обеспечивающих квазиравновесный и неперегруженный режимы движения зоны по объему и концентрации вводимой пробы. Рассмотрены практические примеры влияния концентрации пробы и скорости элюмирования на форму хроматограмм.

Корректность применения ситовой хроматографии (СХ) к анализу молекулярно-массового распределения (ММР) полимеров не вызывает сомнений, если эффективность разделения полимеров по размерам молекул достаточно высока и известно однозначное соответствие между характеристиками выходной зоны и параметрами ММР [1, 2]. Оба условия выполняются, когда в хроматографическом эксперименте сведены до минимума факторы, порождающие неравновесность межфазового массораспределения [3] и перегрузку колонки по объему вводимой пробы [4, 5] и концентрации полимеров [5]. Для определения области допустимых значений параметров пробы воспользуемся представлениями о режимах движения хроматографической зоны [3–5].

Вначале рассмотрим, при каких условиях эксперимента можно исключить объемную перегрузку в колонке. Для характеристики режимов движения зоны с точки зрения объемной нагрузки воспользуемся безразмерным параметром [4, 5]:

$$T_0 \equiv 2\sqrt{2}V_{доз}/\overline{W}, \qquad (1)$$

где $V_{доз}$ — объем вводимой пробы (объем дозатора); $\overline{W}$ — ширина выходной зоны в отсутствие объемной перегрузки. Так, при движении зоны в квазиравновесном режиме уширение $\overline{W}$ неперегруженной зоны обусловлено размыванием $\overline{W}_{in}$ за счет внутренней диффузии (с коэффициентом D_a) полимера в порах зерна, размыванием $\overline{W}_{ex}$ за счет внешней диффузии (с коэффициентом D) полимера в неперемешиваемой пленке около зерна, размыванием $\overline{W}_{пр}$ за счет продольного перемешивания раствора в подвижной фазе колонки (с коэффициентом продольного перемешивания $D_{пр}$)

$$\overline{W}^2 = \overline{W}_{in}^2 + \overline{W}_{ex}^2 + \overline{W}_{пр}^2. \qquad (2)$$

Явные выражения для $\overline{W}_{in}$, $\overline{W}_{ex}$, $\overline{W}_{пр}$ известны [6, 7] (см. также [4]):

$$\overline{W}_{in}^2=16R^2K_dvV_{st}/15D_a,$$

$$\overline{W}_{ex}^2=16\,R\delta K_d^2vV_{st}/3D,$$

$$\overline{W}_{пр}^2=16\alpha^2s^2[1+(1-\alpha)\alpha^{-1}K_d]^2D_{пр}V_{св}/v.$$

Для выявления зависимости $\overline{W}_{пр}$ от скорости элюции нами учтена связь коэффициента $D_{пр}$ от u:

$$D_{пр}=u^2d^2/48D, \qquad (3)$$

где d — средний радиус каналов в пористой среде колонки; D — коэффициент молекулярной диффузии полимера. Формула (3) аналогична формуле Туницкого [7] для капилляра. Поскольку для системы из капилляра установлено согласие результатов эксперимента и выводов теории, в том числе соотношения (3) [5], то можно априори надеяться, что формула справедлива и для колонки. С учетом этого предположения размывание $\overline{W}_{пр}$ для колонки может быть преобразовано в следующее:

$$\overline{W}_{пр}=4[1+(1-\alpha)\alpha^{-1}K_d]\times \times[d^2vV_{св}/48D]^{1/2}. \qquad (4)$$

Здесь α — порозность; K_d — коэффициент равновесного распределения полимера между фазами; v — объемная скорость элюции ($v=\alpha us$, s — площадь поперечного сечения колонки); $V_{св}$ и V_{st} — объемы подвижной и неподвижной фаз в колонке.

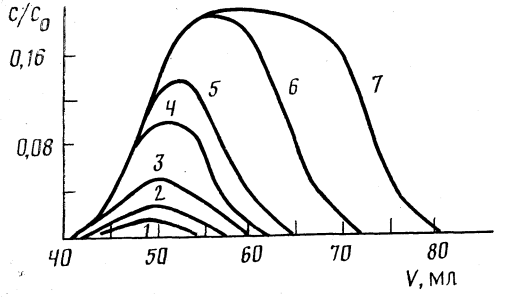


Рис. 1

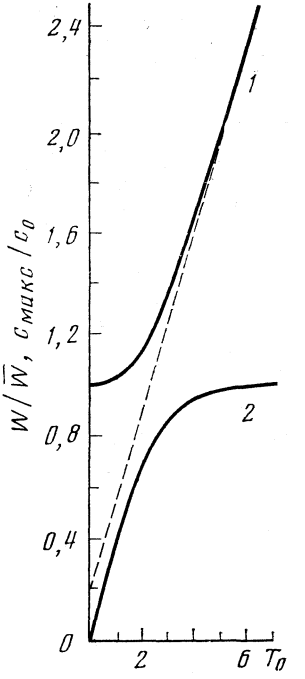


Рис. 2

Рис. 1. Влияние объема дозирования на форму хроматограмм полистирола с $M_w=4{,}8\cdot10^5$. Хроматограф GPC-501; элюент — метилэтилкетон; $v=1$ мл/мин; система четырех колонок со стирогелем типа 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 Å (параметры колонки: $h=60$ см, $s=0{,}5$ см^2); один счет соответствует 5 мл; T_0: *1* — 0,05; *2* — 0,15; *3* — 0,25; *4* — 0,5; *5* — 0,75, *6* — 1; *7* — 2

Рис. 2. Зависимость относительной ширины хроматограмм $W/\overline{W}$ (*1*) и относительной концентрации вещества в максимуме хроматограмм $c_{макс}/c_0$ (*2*) от относительного объема дозатора (T_0)

Выражение (4) для колонки переходит в ранее полученное соотношение $\overline{W}_{пр}=4(d_{кп}^2 v V_{кп}/48D)^{1/2}$ для капилляра при $\alpha\to 1$, $V_{св}\to V_{кп}$, $d\to d_{кп}$, подтвержденное экспериментально [5].

Влияние объемной нагрузки на форму выходных элюционных кривых и ход зависимостей высоты $c_{макс}$ и ширины W зоны отчетливо прослеживается из рис. 1 (экспериментальные результаты [5]) и рис. 2 (теоретические результаты) [1]. Анализ экспериментальных и теоретических зависимостей позволил выделить три характерные области значений T_0, которым присущи различные режимы движения зоны с точки зрения объемной нагрузки: $T_0\leqslant 0{,}15$ — неперегруженный режим; $0{,}15<T_0<5{,}5$ — слабо перегруженный режим; $T_0\geqslant 5{,}5$ — перегруженный режим [4, 5].

В неперегруженном режиме форма зоны изображается кривой Гаусса; высота зоны линейно зависит от объема $V_{доз}$ ($c_{макс}=c_0 T_0/\sqrt{2}\pi$, c_0 — концентрация вводимой пробы); ширина зоны описывается выражениями (2) и (4), т. е. не зависит от объема $V_{доз}$. В области $0{,}15<T_0<5{,}5$ наблюдается отклонение профиля зоны от гауссовой кривой, возрастающее с ростом T_0. Однако симметричность кривых сохраняется. Ширина хроматограммы и ее высота возрастают с увеличением T_0, причем темп роста прогрессирует для первой и спадает для второй характеристик (рис. 2). Наконец, в области $T_0\geqslant 5{,}5$ высота зоны достигает своего предельного значения c_0, а ширина W зоны неограниченно возрастает с ростом $V_{доз}$ по линейному закону.

Аналогичные исследования были проведены для определения условий выбора объема подводящих шлангов (капилляров) $V_{кп}$. Показано, что отсутствие объемной перегрузки в подводящих шлангах, присоединенных к выходу колонки, будет иметь место, когда объем подводящих шлангов (капилляров) $V_{кп}$ удовлетворяет соотношению

$$V_{кп}\leqslant 0{,}107\,(D/d_{кп}^2 v)\,W^2,$$

где W — ширина зоны на выходе колонки.

Таким образом, отсутствие объемной перегрузки для движения зоны (с первоначальной шириной $V_{доз}$) в системе колонка+капилляр будет иметь место при выполнении критериев

$$V_{доз}\leqslant 0{,}053\overline{W},\quad V_{кп}\leqslant 0{,}107\,(D/k_{кп}^2 v)\,\overline{W}^2, \qquad (5)$$

где $\overline{W}$ определяется соотношениями (2), (4). Допустимые объемы $V_{доз}$ и $V_{кп}$ могут быть довольно значительными для системы с большими параметрами V_{st}, v, K_d. Так, при увеличении v и V_{st} в n раз объемы $V_{доз}$ и $V_{кп}$ также увеличиваются в n раз.

Далее рассмотрим при каких условиях СХ-эксперимента можно исключить концентрационную перегрузку колонки. Для характеристики режимов движения зоны с точки зрения концентрационной перегрузки воспользуемся безразмерным параметром [5]

$$П\equiv V_{эф}/V_{дост}=[\eta]\,c_0 V_{доз}/K_d V_{st}, \qquad (6)$$

где $[\eta]$ — характеристическая вязкость образца полимера. Он равен отношению двух физических величин: объема, занимаемого молекулами с данной величиной $[\eta]$ в дозируемой пробе ($V_{эф}=[\eta]c_0 V_{доз}$), и доступного объема пор геля для полимера данной молекулярной массы M ($V_{дост}=K_d V_{st}$).

[1] Теоретический анализ выполнен на основе решений уравнений хроматографии для широких зон с учетом «внутренней» и «внешней» диффузии полимера и продольного перемешивания вдоль колонки [4].

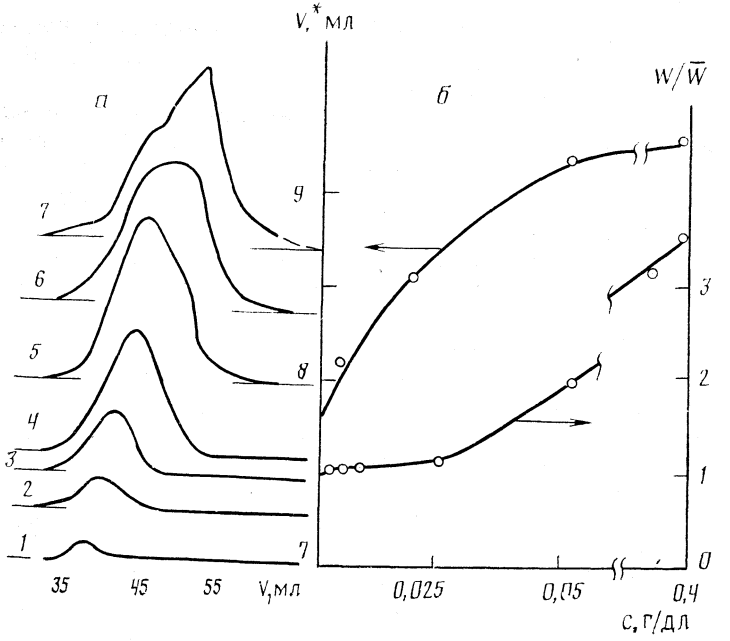


Рис. 3. Влияние концентрации полимера (M_w=4,8·10^5, M_w/M_n=1,04) в пробе на форму (*а*) и характеристики V^* и W (*б*) выходной зоны. Хроматограф GPC-1: элюент – толуол, три колонки (h=30 см, s=0,5 см^2) μ-стирогелем в последовательности; 10^4, 10^5, 10^6 Å; v=0,5 мл/мин; c_0: *1* – 0,005; *2* – 0,01; *3* – 0,025; *4* – 0,05; *5* – 0,1; *6* – 0,15, *7* – 0,2 г/дл; *а* – по оси ординат – относительная концентрация

При выводе (6) были использованы результаты исследования концентрационного эффекта в СХ-эксперименте при анализе полистирола и полиалкилметакрилатов [5] на стирогелях в широком интервале варьирования концентрации пробы 0,01–1 г/дл, $M \in 10^2$–10^7, $M_w/M_n \in$1,01–4, длины колонки 0–500 см, типа геля 10^2–10^6 Å, размера частиц геля 2–40 мкм, типа элюента (хороший и θ-растворитель для анализируемого вещества). Степень влияния концентрации пробы на результаты хроматографического анализа характеризовалась шириной хроматограммы (W) на высоте $c_{макс}/e$, выраженной в единицах объема элюента, высотой хроматограммы в точке максимума ($c_{макс}$) в массовых долях и величиной удерживаемого объема в точке максимума (V^*).

На рис. 3 приведены характерная динамика искажения формы хроматограммы и смещение ее по шкале удерживаемых объемов. Анализ влияния концентрации c_0 на ширину хроматограммы и величину V^* позволил выделить две области концентраций пробы, различающихся характером проявления «концентрационного» эффекта на результирующей хроматограмме. В области малых c_0 (ниже 0,01 г/дл) преобладает сдвиг максимума хроматограмм в область больших значений объемов V. Для этой области концентраций характерно возрастание $c_{макс}$ с ростом c_0. Увеличение молекулярной массы образца усиливает этот эффект в то время, как рост длины системы хроматографических колонок и размера пор сорбента ослабляет его. В области высоких концентраций (c_0>0,1 г/дл) значения V^* и $c_{макс}$ не зависят от c_0 и наблюдается деформация формы хроматограмм: уширение, проявление бимодальности. Такие закономерности носят общий характер, но степень концентрационного эффекта зависит от молекулярной

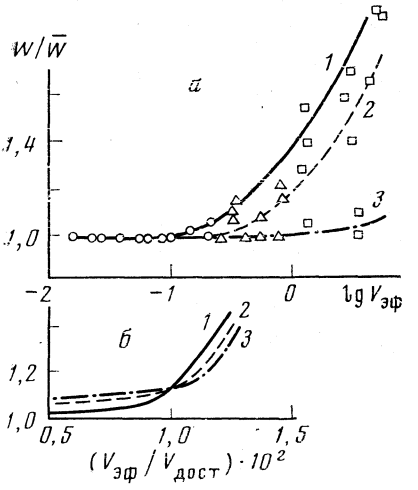


Рис. 4

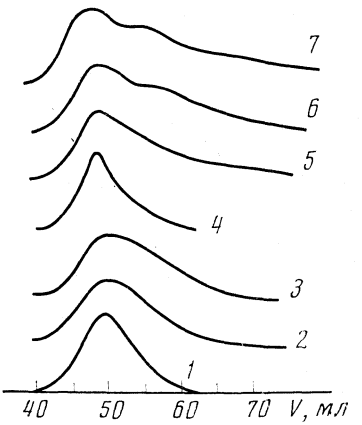


Рис. 5

Рис. 4. Зависимости относительной ширины хроматограмм от $V_{эф}$ (*а*) и $V_{эф}/V_{дост}$ (*б*). Цифры на кривых соответствуют системам хроматографических колонок, заполненных стирогелем (R зерна 30 мкм) типа: 10^5, 10^4, 10^3 Å (*1*); 10^3, 10^4, 10^5 Å (*2*), 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 Å (*3*). Условия хроматографирования: метилэтилкетон, u=0,033 см/с, $V_{доз}$=1 мл, c_0∈0,05–1,5 г/дл, [η]∈0,06–15 дл/г

Рис. 5. Влияние условий хроматографирования полистирола на форму хроматограмм. Хроматограф G PC-501: элюент – метилэтилкетон, четыре колонки (h=60 см, s=0,5 см²) со стирогелем с последовательностью: 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 Å. Параметры образца: $M_n=3\cdot10^6$, M_η/M_n=1,04, [η]=2,6 дл/г, $D=10^{-8}$ см²/с. Параметры хроматографической системы: R=37÷75 мкм, V_{st}=95 мл, $V_{св}$=35 мл, K_d=0,12, $V_{доз}$=1 мл; u=0,008 (*1–3*) и 0,026 см (*4–7*), λ=10 (*1–3*) и 3 (*4–7*), c_0=0,01 (*1*, *4*), 0,03 (*2*, *5*), 0,07 (*3*), 0,2 (*6*) и 0,3 г/дл (*7*); $П\cdot10^2$=0,3 (*1*, *4*); 0,7 (*2*); 1,8 (*3*); 0,8 (*5*), 5,7 (*6*) и 8,5 (*7*)

массы полимера (M), коэффициента распределения (K_d) и длины колонок [5].

Доказательством того, что П определяет увеличение W с ростом c_0 является (см. рис. 4) обобщение всех экспериментальных закономерностей в координатах с абсциссой $V_{эф}/V_{дост}$. Проведенный анализ позволил выделить две области значений П, которым присущи различные режимы движения зоны с точки зрения концентрационной перегрузки. Область П< <0,01 соответствует режиму движения зоны, закономерности которого хорошо описываются классической теорией хроматографии:

$$c_{макс}\sim c_0,\quad W=\text{const}\,(c_0).$$

В области П>0,01 наблюдается отклонение профиля зоны от гауссовой кривой, возрастающее с ростом П (рис. 3, *б*). При П>0,01 концентрация пробы c_0 не влияет на $c_{макс}$, но ширина хроматограмм возрастает с ростом c_0. Концентрационная зависимость ширины W определяется перегрузкой колонки вследствие того, что объем макромолекул больше, чем доступный объем пор. При этом закономерности движения зоны полимера определяются наличием свободных и занятых пор и гидродинамическим сжатием макромолекул. Отсутствие свободных пор приводит к «проскакиванию» макромолекул, уменьшению времени их пребывания в колонке, а гидродинамическое сжатие — к затруднению десорбции, что было доказано экспериментально путем измерения молекулярной массы фракций полистирола, элюируемых в разных удерживаемых объемах.

Таким образом, отсутствие концентрационной перегрузки при движении зоны в колонке будет иметь место при выполнении критерия $\Pi \leqslant 0{,}01$, что соответствует концентрации вводимой пробы, определяемой соотношением

$$c_0 \leqslant c_0' = 0{,}01 K_d V_{st} / [\eta] V_{доз}. \qquad (7)$$

Однако и в области $c_0 < c'$ может еще наблюдаться концентрационный эффект. Для этой области концентраций предложена модель, учитывающая концентрационную зависимость коэффициента диффузии D в подвижной фазе колонки [8].

Наконец, отсутствие искажения хроматограмм вследствие неравновесности межфазного массообмена в колонке наблюдается при элюмировании в условиях [3, 9]:

$$\lambda \geqslant 30. \qquad (8)$$

Безразмерный параметр λ имеет смысл (с точностью до множителя 0,2) отношения среднего времени задержки полимера ($K_d V_{st}/v$) к среднему времени диффузии его в порах зерна ($R^2/15D_a$), т. е. [3]:

$$\lambda \equiv 0{,}2 K_d V_{st} v^{-1} / R^2 (15 D_a)^{-1} = 3(1-\alpha) K_d D_a h / \alpha u R^2, \qquad (9)$$

где R — средний радиус сферических зерен пористого материала, h — длина колонки. Соотношения (8), (9) позволяют оценить скорость элюции, радиус зерна или длину колонки, при которых реализуется квазиравновесный режим движения зоны с заданными параметрами (K_d, D_a) системы:

$$v \leqslant 0{,}1 K_d D_a V_{st} / R^2, \quad R \leqslant 0{,}3 (K_d D_a V_{st}/v)^{1/2},$$

$$h \geqslant 10 \alpha u R^2 / (1-\alpha) K_d D_a. \qquad (10)$$

Анализ теории неравновесной хроматографии [3, 9] показал, что при $\lambda \geqslant 30$ форма выходной кривой полимера соответствует реализуемой в классической хроматографии. При $\lambda < 30$ зоны движутся в условиях переходного и неравновесного режимов [3, 9]. В этом случае форма зоны асимметрична с крутым передним и размытым задним фронтами. Концентрация элюируемого вещества заднего фронта зоны медленно асимптотически приближается к нулю, что может привести к неполному элюированию вещества из колонки за конечный промежуток времени. Такая картина движения зоны обусловлена неблагоприятными кинетическими условиями массообмена между фазами — очень медленной диффузией в зерно и из зерна [3].

На рис. 5 приведены практические примеры взаимосвязи формы хроматограмм с режимом движения зоны хроматографируемого вещества. Исследован образец полистирола со значениями M_n и M_w, равными $3{,}1 \cdot 10^6$ и $3{,}37 \cdot 10^6$. Варьирование концентрации и скорости элюирования позволило реализовать переход от перегруженного и переходно-неравновесного режимов движения зоны хроматографируемого вещества к неперегруженному и квазиравновесному. Классификация последних выполнена с использованием соотношений (1)—(9). Прослеживается общая закономерность: форма хроматограмм, полученных в переходно-неравновесном (кривые *3*—*7*) или перегруженном (*3*, *6*, *7*) режимах асимметрична. При этом увеличение концентрации проб (кривые *2*, *3*) приводит к возрастанию асимметричности и вытянутости задней границы. Далее, если анализ выполняется и в неравновесном, и перегруженном режимах (кривые *6*, *7*), то результирующая хроматограмма может принимать бимодальную фор-

му. В то же время в квазиравновесном и в неперегруженном режимах результирующая хроматограмма имеет симметричную форму.

Отмеченные закономерности с учетом относительности метода СХ будут существенным образом влиять на достоверность результатов анализа ММР полимеров, а именно: вытянутая задняя граница приведет к снижению величины молекулярной массы, а сдвиг максимума хроматограмм в область низких объемов — к увеличению молекулярной массы высокой степени усреднения. Поскольку повышение концентрации и скорости элюирования искажает ММР исследуемой пробы, то форма хроматограммы связана с характером режима движения последней. Так как отсутствует метод интерпретации хроматограмм, полученных в неравновесном и перегруженном режимах, то единственный путь получения достоверной информации о ММР полимеров — хроматографический анализ в условиях, позволяющих избежать нарушение равновесности процесса.

Предложенная система соотношений позволяет классифицировать режимы движения пробы вдоль колонки и определять область допустимых значений параметров хроматографического процесса, обеспечивающих проведение анализа в квазиравновесном и неперегруженном по объему и концентрации режимах.

Список литературы

1. *Беленький Б. Г., Виленчик Л. З.* Хроматография полимеров. М.: Химия, 1978. С. 342.
2. *Нефедов П. П., Лавренко П. П.* Транспортные методы в аналитической химии полимеров. Л.: Химия, 1979. С. 231.
3. *Елькин Г. Э., Лебедев Ю. Я., Самсонов Г. В.* // Высокомолекуляр. соединения. 1975. Т. 17. № 8. С. 1870.
4. *Лебедев Ю. Я.* // Хроматография в биологии и медицине. Сб. научн. тр. М.: 2-ой МОЛГМИ им. Н. И. Пирогова, 1985. С. 71.
5. *Подосенова Н. Г., Лебедев Ю. Я.* // Анализ полимерных материалов, сырья и сточных вод в производстве полимеризационных пластмасс/Под редакцией Г. С. Поповой. Л.: ОНПО «Пластполимер», 1986. С. 82–95.
6. *Бреслер С. Е., Уфлянд Я. С.* // Журн. техн. физики. 1953. Т. 23. № 8. С. 1443.
7. *Туницкий Н. Н., Каминский В. А., Тимашев С. Ф.* // Методы физикохимической кинетики. М.: Химия, 1972. С. 158.
8. *Подосенова Н. Г., Лебедев Ю. Я.* // Тез. IV Всесоюз. симп. по молекулярной жидкостной хроматографии. Алма-Ата, 1987. С. 194–196.
9. *Лебедев Ю. Я.* // Журн. физ. химии. 1990. Т. 69. № 3. С. 755. С. 761.

ОНПО «Пластполимер»
Ленинград

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 678.664.002.3:543.544.42:543.869

© 1991 г.

Петракова Е. А., Окунева А. Г., Балкова Е. В.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОНОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПРИМЕСЕЙ В ЛИНЕЙНЫХ АЛИФАТИЧЕСКИХ ПОЛИКАРБОНАТАХ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В КРИТИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Разработана методика количественного определения монофункциональных примесей в линейных алифатических поликарбонатах при их содержании от 0,5 до 50%, основанная на использовании тонкослойной хроматографии в критических условиях. Подобраны системы растворителей, в которых длина пробега пятна по пластинке не зависит от молекулярной массы олигомера, а определяется только его функциональностью. Разработанный метод использован для изучения кинетики реакции переэтерификации с целью выбора оптимальных условий синтеза поликарбонатов с минимальным содержанием (не более 2%) монофункциональных компонентов, а также для контроля качества готового продукта, применяемого для получения полиуретановых термопластов.

Поликарбонаты на основе 1,6-гександиола и диэтилового эфира угольной кислоты (диатола) являются перспективным гидроксилсодержащим сырьем для получения термопластичных полиуретановых материалов (ТПУ) с улучшенными гидролитическими и физико-механическими свойствами [1, 2]. Поликарбонаты получаются путем реакции переэтерификации 1,6-гександиола с диатолом, проводимой при 170–200° С с использованием в качестве катализатора титантетрабутилата (ТТБ). Реакцию переэтерификации при получении поликарбонатов можно представить следующим образом:

$$C_2H_5O\overset{\overset{O}{\|}}{C}OC_2H_5 + HO(CH_2)_6OH \rightarrow C_2H_5O\overset{\overset{O}{\|}}{C}O(CH_2)_6OH + C_2H_5OH, \quad (1)$$

$$C_2H_5O\overset{\overset{O}{\|}}{C}O(CH_2)_6OH + HO(CH_2)_6OH \rightarrow HO(CH_2)_6O\overset{\overset{O}{\|}}{C}O(CH_2)OH + C_2H_5OH. \quad (2)$$

Синтез поликарбонатов протекает через образование монофункциональных соединений (1) с различной молекулярной массой (ММ). Для получения бифункциональных поликарбонатов необходимо добиться 100%-ной конверсии реакции переэтерификации по этиловому спирту. Известно, что монофункциональные примеси (МФП), содержащиеся в сложных полиэфирах, снижают молекулярную массу ТПУ, о величине которой судят по характеристической вязкости. Было установлено, что для достижения высокой характеристической вязкости ТПУ массовая доля МФП в поликарбонате не должна превышать 2% [3].

Для анализа распределения по типам функциональности (РТФ) реакционноспособных олигомеров, в том числе и для определения МФП в сложных полиэфирах широко используется метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) [4, 5]. Однако условия, при которых наблюдается четкое разделение по функциональности сложных олигоэфиров на основе адипиновой кислоты и гликолей разной длины, для поликарбонатов не являются критическими. В этих условиях реализуется эксклюзионный режим, а при меньшем содержании полярного компонента в бинарной смеси толуол – этиловый спирт, которая используется для определения МФП в сложных олигоэфирах, длина пробега пятен поликарбоната недостаточна для проведения количественного определения МФП. В связи с этим была разработана методика определения МФП специально для поликарбонатов.

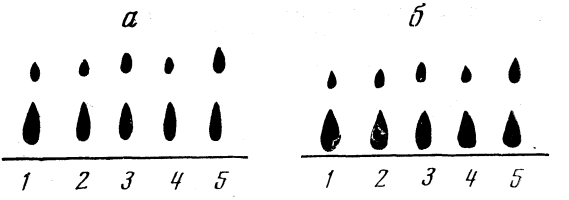


Рис. 1

Рис. 1. Тонкослойные хроматограммы поликарбонатов (верхние пятна – МФП): *1*, *3*, *5* – реперные образцы с содержанием МФП соответственно 10, 15, 20%; *2*, *4* – анализируемые образцы. Системы растворителей: толуол – этилацетат в соотношении 4 : 1 по объему (*а*) и толуол – металэтилкетон в соотношении 7 : 3 по объему (*б*)

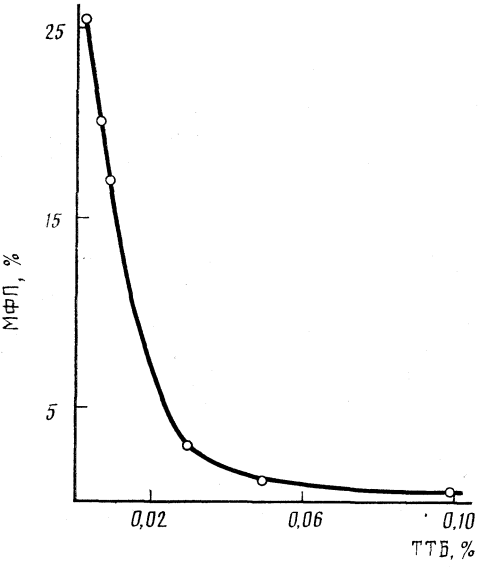


Рис. 2. Зависимость содержания МФП в поликарбонате от концентрации катализатора – титантетрабутилата

Рис. 2

В основе предлагаемого метода лежит тонкослойная хроматография в критических условиях, при которых длина пробега пятна по пластинке не зависит от молекулярной массы, что позволяет наиболее четко выявить другой тип молекулярной неоднородности – распределение по типам функциональности. Разделение в этом случае основано на различии в силе адсорбционного взаимодействия молекул олигоэфира с поверхностью силикагеля в зависимости от числа концевых гидроксильных групп в макромолекуле. Монофункциональные компоненты, имея одну гидроксильную группу на молекуле, адсорбируются слабее бифункциональных и имеют большую длину пробега по хроматографической пластинке.

Хроматографию осуществляли на аналитических тонкослойных пластинках на стеклянной подложке размеров 6×6 см, покрытых слоем силикагеля КСКГ с силикозолевым связующим (разработаны в ИВС АН СССР, выпускаются р/к Ляэне Калур, г. Хаапсалу, Эстония). В качестве подвижной фазы использовали две системы растворителей: толуол – этилацетат в соотношении 7 : 3 по объему (толуол «ч. д. а.», ГОСТ 5789-78, этилацетат «ч. д. а.», ГОСТ 22300–76) и толуол – метилэтилкетон («ч. д. а.», ТУ 6-09-782-81). Хроматографирование осуществляли в камере, насыщенной парами элюента. Для проявления хроматограмм пластинки последовательно обрабатывали реактивом Драгендорфа [6] и парами иода.

Анализируемые образцы олигоэфиров (5%-ный раствор в толуоле) наносили калиброванным капилляром емкостью 1 мкл между реперными образцами, содержащими известное количество МФП. Для приготовления реперных образцов использовали моно- и бифункциональные компоненты, выделенные из поликарбоната методом препаративной колоночной жидкостной хроматографии, которую осуществляли на колонке размером 1×100 см, заполненной силикагелем КСК-1 с размером зерна 50 мкм при использовании в качестве элюента смеси толуол – этилацетат переменного состава. Выделенные фракции идентифицировали по молекулярной массе методом эбулиоскопии и по содержанию концевых гидроксильных групп ИК-спектро-

Характеристика поликарбонатов и термопластичных полиуретанов на их основе

Номер	H_2O, %	КЧ	[OH], %	ММ(OH)	$\eta^д$, мПа·с	$m_{МФП}$	η^x(ТПУ)
1	0,041	0,25	6,47	526	73	18–20	0,33
2	0,072	0,18	6,11	550	78	10–12	0,40
3	0,054	0,11	6,47	526	68	7–8	0,35
4	0,042	0,22	6,57	518	105	3–5	0,40
5	0,065	0,29	6,17	550	110	1–2	0,90
6	0,04	0,30	6,90	490	91	0,5–1	0,87
7	0,07	0,21	6,81	499	99	0,5–1	0,95

Примечание. КЧ — кислотное число, мг КОН/г; [OH] — содержание OH-групп; ММ(OH) — молекулярная масса по OH-группам; $\eta^д$ — динамическая вязкость при 75° С; $m_{МФП}$ — массовая доля МФП; η^x (ТПУ) — характеристическая вязкость ТПУ.

скопией. Поликарбонаты проявляются на пластинке в виде темно-коричневых пятен на светло-желтом фоне. Количество МФП определяется визуально сравнением пятен монофункциональных компонентов в анализируемом и реперных образцах по размеру и интенсивности окрашивания (рис. 1). Ошибка определения МФП не превышает шага реперных образцов.

Используя предложенный метод, изучали влияние массовой доли ТТБ на содержание в поликарбонате МФП сразу после окончания реакции переэтерификации (рис. 2). Как следует из анализа кривой на рис. 2, содержание МФП в поликарбонате снижается по мере увеличения концентрации катализатора. При использовании 0,05–0,10% ТТБ реакция переэтерификации при температуре 200° С проходит на 99–99,5%.

Было изучено влияние МФП на свойства поликарбонатов и ТПУ, полученных на их основе (см. таблицу). Как видно из таблицы, динамическая вязкость поликарбонатов и характеристическая вязкость ТПУ на их основе снижаются по мере увеличения содержания МФП в олигоэфире. Только при содержании МФП не более 2% удается получить ТПУ с воспроизводимой высокой характеристической вязкостью.

Данные, полученные с помощью этой методики, были использованы при выборе оптимальных параметров технологического процесса получения линейных алифатических поликарбонатов.

Список литературы

1. *Аояма М., Окумура М., Йосида Т.* // Кокай токкё кохо. 1989. Сер. 3(3). № 11. С. 245.
2. Mod. Plast. Int. 1989. V. 19. № 6. P. 108.
3. *Окунева А. Г., Техриц К., Страхов В. В. и др.* // Пластические массы. 1979. № 9. С. 28.
4. *Вахтина И. А., Широкова Г. В., Окунева А. Г.* // Высокомолекуляр. соединения. 1982. Т. 24А. № 9. С. 2002.
5. *Вахтина И. А., Тихонова Т. З.* Методы анализа и контроля качества продукции. М.: Изд. НИИТЭХИМ, 1988. № 7. С. 11.
6. *Беленький Б. Г., Ганкина Э. С.* Тонкослойная хроматография. Л.: Изд. ИВС АН СССР, 1970. С. 4.

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544 : 541.64

© 1991 г.

Федоров Е. К.

ПРИМЕНЕНИЕ ГРАДИЕНТНОЙ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПО СОСТАВУ СТАТИСТИЧЕСКИХ СОПОЛИМЕРОВ 4-ВИНИЛПИРИДИНА И N-ВИНИЛПИРРОЛИДОНА

Предложена методика анализа распределения по составу статистических сополимеров 4-винилпиридина и N-винилпирролидона путем перекрестного хроматографического фракционирования методами гель-проникающей хроматографии и обращенно-фазовой градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии с учетом влияния молекулярно-массовой неоднородности на фракционирование по составу. Написана программа обработки результатов таких анализов с построением контурных диаграмм в координатах состав – молекулярная масса. Проведено сравнение распределения по составу сополимеров, полученных разными способами.

Экспериментальному исследованию распределения сополимеров по составу (РС) в последнее время уделяется возрастающее внимание, что нашло отражение в недавно вышедшей монографии [1].

Достигнут значительный прогресс в хроматографических методах исследования РС. Наиболее перспективным, по-видимому, является сочетание эксклюзионной хроматографии (или гель-проникающей хроматографии, ГПХ) с градиентной нормально- или обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) [2–8]. Этот способ получил название «перекрестного хроматографического фракционирования» (ПХФ) [2–6]. Кроме того применялся термин «ортогональная хроматография» [9, 10]. Действительно, предварительное фракционирование по молекулярной массе (ММ) в условиях ГПХ, а затем градиентное элюирование полученных фракций, приводящее к преимущественному делению по составу, позволяет после соответствующей математической обработки и учета калибровки получить контурные диаграммы распределения в координатах состав – ММ. Достоинства и слабые стороны этого подхода подробно изучены на примере статистического сополимера стирола и 2-метоксиэтилметакрилата [5]. Сравнение с теоретически рассчитанным РС указывает на адекватность данного метода и на его пригодность для изучения отклонений от законов радикальной сополимеризации на глубоких степенях превращения мономеров [6].

В то же время при обработке результатов не учитывалось влияние молекулярно-массового распределения (ММР) на фракционирование в условиях градиентной ВЭЖХ, которое в других системах может значительно

Характеристики образцов сополимеров 4-винилпиридина и N-винилпирролидона, использованных для калибровки

Шифр образца	Состав	[η]	$M_n \cdot 10^{-3}$	$M_w \cdot 10^{-3}$	α	$-\lg K$
4ВП1Н	16,6	0,094	5,3	10,3	0,682	3,714
4ВП1В	19,3	0,226	16,3	34,6		
4ВП2Н	31,8	0,087	4,3	6,7	0,677	3,618
4ВП2В	31,7	0,204	12,0	22,2		
4ВП3Н	44,4	0,280	11,9	31,1	0,520	2,854
4ВП3В	44,2	0,322	15,0	40,2		
4ВП4Н	58,3	0,119	4,8	9,2	0,616	3,306
4ВП4В	59,2	0,295	13,3	33,0		
4ВП5Н	70,9	0,343	13,2	41,2	0,549	2,944
4ВП5В	72,3	0,488	28,4	70,8		
4ВП6Н	83,3	0,412	21,4	55,4	0,571	3,038
4ВП6В	84,0	0,518	28,5	73,7		

искажать результаты, смещая на контурной диаграмме низкомолекулярный «шлейф» в область низких составов [2, 4]. Именно это влияние не позволяет, в принципе, использовать анализ всего образца полимера в условиях градиентной ВЭЖХ для количественного анализа его РС. Для получения полной картины РС образца сополимера необходимо провести его ПХФ в подходящих условиях ГПХ и градиентной ВЭЖХ, обработать результаты с учетом предварительной калибровки, связывающей объем элюирования в градиентной ВЭЖХ с составом и объемом элюирования ГПХ-фракций, и затем сложить полученные РС каждой ГПХ-фракции.

Цель данной работы — разработка методики анализа РС статистических сополимеров 4-винилпиридина (4-ВП) и N-винилпирролидона (N-ВПД) способом ПХФ. Для этого были проведены соответствующие калибровочные эксперименты с использованием специально синтезированных образцов сополимеров с узким распределением по составу (таблица). В таблице состав приведен в мол.% звеньев 4-ВП; $[\eta]$ — характеристическая вязкость; M_n и M_w — среднечисленная и средневесовая молекулярные массы; величины M_n, M_w, α и $\lg K$ получены по универсальной калибровке.

Была написана программа для микро-ЭВМ, позволяющая интерпретировать результаты ПХФ с учетом следующих зависимостей: 1) зависимости объема элюирования в градиентной ВЭЖХ от состава сополимера и объема элюирования ГПХ-фракции; 2) линейной зависимости отклика УФ-дефектора, применяемого в градиентной ВЭЖХ, от состава сополимера; 3) зависимости молекулярно-массовой калибровки в ГПХ от состава. Кроме того, скорректированная по составу ВЭЖХ-хроматограмма ГПХ-фракции масштабируется в соответствии с ГПХ-хроматограммой. Результатом работы программы является контурная диаграмма распределения сополимера в координатах состав — логарифм ММ и дифференциальная кривая РС всего образца.

Экспериментальная часть

Синтез образцов сополимеров проводили на установке с автоматическим контролем поддержания состава реакционной смеси (что необходимо ввиду большого различия в реакционной способности 4-ВП и N-ВПД) [11].

Для хроматографических элюентов использовали метанол («HPLC grade», «ROMIL Chemicals», Англия), изопропанол («х. ч.»), нитрат лития трехводный («х. ч.)» и дистиллированную воду. Все элюенты после приготовления фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм («Sartorius», ФРГ).

Хроматографические эксперименты проводили на приборе LC-21C («Bruker», ФРГ) с системой автоматического ввода пробы LC-51, УФ-детектором с переменной длиной волны LC-313, рефрактометрическим детектором LC-311 и колоночным отделением LC-211. Для калибровки в ГПХ был также использован вискозиметрический детектор («Viscotek», США).

Все колонки и вискозиметрический детектор термостатировали при 40° С, УФ-детектирование проводили при 258 нм. Обработку результатов перекрестного фракционирования проводили на микро-ЭВМ IBM-XT-286 (IBM, США), программы написаны на языке Форт-ASYST в среде программирования для инструментальных исследований ASYST версия 1.51 («ASYST software», США).

Для ГПХ использовали колонку TSK-G4000–PW («Toyo-Soda», Япония) 600× ×7,8 мм, элюент состава 80% метанола, 20% воды и 0,02 М $LiNO_3$ прокачивали со скоростью 1 $см^3$/мин. Объем проб составлял 100–200 $мм^3$ при концентрации ~4 $мг/см^3$. Для градиентной обращенно-фазовой ВЭЖХ использована колонка с сорбентом URP-1 (10 мкм, «Hamilton», США), 150×4,6 мм, которая работала в циклическом режиме: элюент состава 20% изопропанола, 80% воды, 0,1 М $LiNO_3$ в течение 15 мин (уравновешивание); линейный градиент до 50% изопропанола при постоянной концентрации соли в течение 35 мин (рабочий участок); 50% изопропанола, 50% воды, 0,1 М $LiNO_3$ в течение 5 мин (промывка). Скорость прокачивания элюента, 0,5 $см^3$/мин. Оба элюента постоянно дегазировали слабым потоком гелия. Объем проб составлял 100 $мм^3$.

Фракции ГПХ для последующего ВЭЖХ-анализа отбирали с интервалом 0,5 мин, всего 12–16, в зависимости от ширины ММР образца, в микропробирки для устройства ввода пробы LC-51.

Для калибровки градиентной ВЭЖХ по составу в зависимости от объема элюирования ГПХ-фракции использовали хроматограммы, полученные в результате перекрестного фракционирования двух смесей, содержащих по три образца разного состава. Первая состояла из образцов 4ВП1В, 4ВП3В и 4ВП5В, а вторая – из 4ВП2В, 4ВП4В и 4ВП6В. Разрешение по составу в градиентной ВЭЖХ позволяло объединить все эти образцы в одну пробу, что ускорило бы процесс калибровки вдвое, однако это не было сделано, чтобы не перегружать колонку для ГПХ.

Для калибровки использовали по шесть ГПХ-фракций каждой смеси, собранных с интервалом в одну минуту. В расчетах использовали положение максимума пика для каждого состава.

Обсуждение результатов

Результаты калибровки градиентной ВЭЖХ по составу для двух крайних ГПХ-фракций представлены на рис. 1. Характерно, что при линейном градиенте в системе вода – изопропанол полученные для каждой фракции положения максимумов пиков образцов разного состава удовлетворительно ложатся на прямую линию. Это позволило выразить калибровочную зависимость в градиентной ВЭЖХ в виде

$$X = A(V_{\text{гпх}})\,[V_{\text{вэжх}} - B(V_{\text{гпх}})], \qquad (1)$$

где $V_{\text{вэжх}}$ – объем элюирования пробы в градиентной ВЭЖХ, $A(V_{\text{гпх}})$ и $B(V_{\text{гпх}})$ – коэффициенты, зависящие от времени элюирования ГПХ-фракции.

Зависимость $A(V_{\text{гпх}})$ удовлетворительно аппроксимируется прямой линией, а $B(V_{\text{гпх}})$ – параболой. Примененный подход является чисто эмпирическим и определялся удобством применения соотношения (1) в обработке результатов перекрестного фракционирования. Использование для дальнейших расчетов соотношения, предложенного Глекнером с соавторами [2, 3, 5]

$$\psi = P(X) + Q(X) M^{-0,5}, \qquad (2)$$

где ψ – объемная доля плохого растворителя в элюенте, а $P(X)$ и $Q(X)$ – зависящие от состава коэффициенты, затруднительно, так как требуется решение уравнения (2) относительно состава сополимера X.

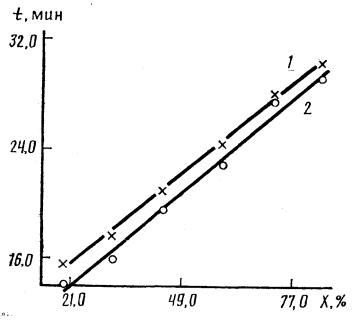


Рис. 1

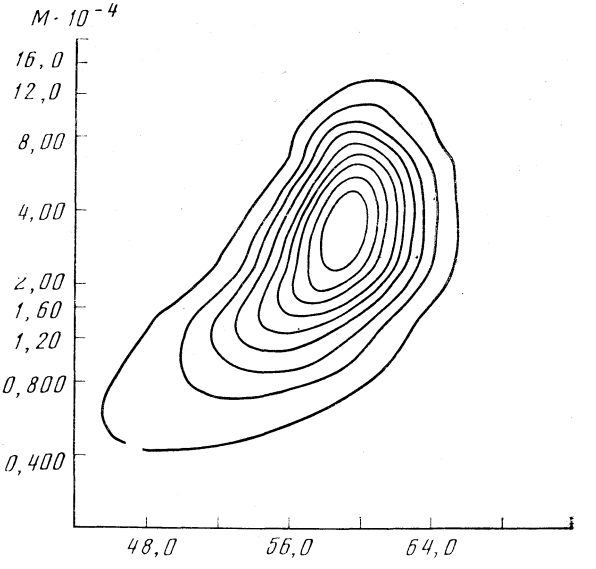


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость от состава X (содержания звеньев 4-ВП) времен элюирования в режиме градиентной ВЭЖХ максимумов пиков калибровочных образцов для ГПХ-фракций с временем элюирования 13 (*1*) и 18 мин (*2*)

Рис. 2. Контурная диаграмма распределения образца 4ВП4В, полученная без учета влияния ММР на деление по составу (принята калибровка, соответствующая ГПХ-фракциям с временем элюирования 15 мин)

Необходимость учета молекулярно-массовой зависимости калибровки по составу в градиентной обращенно-фазовой ВЭЖХ сополимеров 4-ВП и N-ВПД подтверждается и результатами перекрестного фракционирования образца 4ВП4В.

Сравнение контурной диаграммы, полученной без учета этой зависимости (рис. 2), с контурной диаграммой, построенной с ее учетом (рис. 3), показывает, что в области ММ$<$20 000 наблюдается заметное искажение картины распределения по составу со смещением низкомолекулярного «шлейфа» в область малого содержания 4-ВП.

Важным условием корректности проведенной калибровки является постоянство среднего состава ГПХ-фракций использованных стандартов. Это было проверено в предварительных экспериментах с помощью ГПХ с двумя детекторами — рефрактометрическим (неселективным) и ультрафиолетовым (селективным к звеньям 4-ВП). В пределах ошибки эксперимента хроматограммы совпадают.

В связи с этим можно предложить альтернативный подход к учету влияния ММР на фракционирование по составу: определять таким же образом зависимость $A(V_{\text{ГПХ}})$ и корректировать средний состав по результатам двухдетекторной ГПХ. Правда, точность определения среднего состава на «крыльях» хроматограммы резко падает, что может привести к еще большей ошибке [12], хотя при этом уменьшается чувствительность к невоспроизводимости условий градиентной ВЭЖХ.

Что касается учета влияния состава сополимеров на молекулярно-массовую калибровку ГПХ, то, как видно из данных по $\lg K$ и α, полученных по универсальной калибровке с применением вискозиметрического детек-

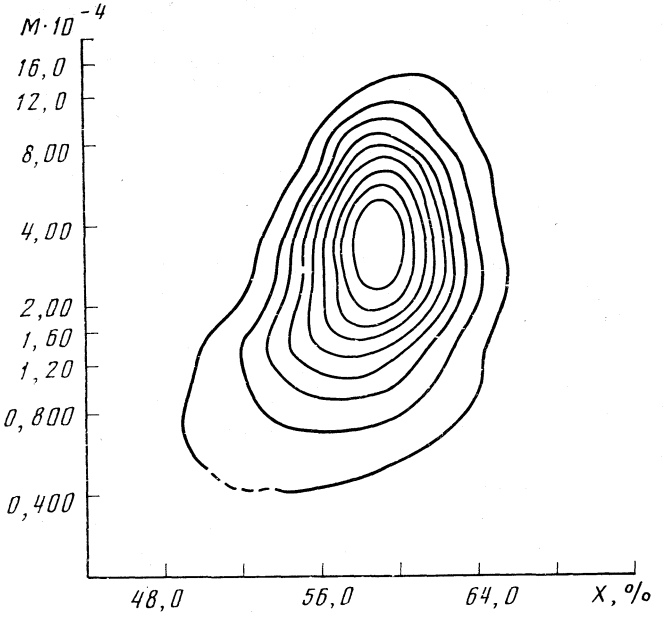


Рис. 3. Контурная диаграмма распределения образца 4ВП4В с учетом влияния ММР на деление по составу

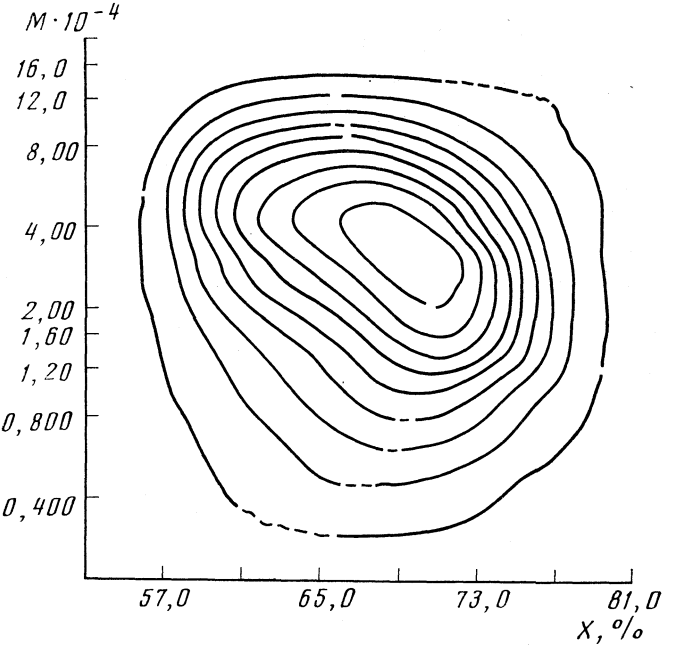


Рис. 4. Контурная диаграмма распределения образца сополимера 4-ВП и N-ВПД, полученного без поддержания постоянства состава реакционной смеси

тора и приведенных в таблице, точность эксперимента оказалась недостаточной для выявления достоверной зависимости этих параметров от состава. Ввиду этого было решено в первом приближении ограничиться молекулярно-массовой калибровкой для поли-4-ВП. В дальнейшем предполагается уточнить влияние состава сополимера на молекулярно-массовую калибровку ГПХ следующим путем.

1. Использовать для молекулярно-массовой калибровки ГПХ образцы разных составов с ММ, перекрывающими возможно более широкий интервал (насколько позволяет колонка).

2. Прибегнуть для калибровки по всем составам к ГПХ с рефрактометрическим детектором и детектором малоуглового рассеяния света, что позволит вообще не использовать универсальную калибровку.

Разработанная методика анализа статистических сополимеров 4-ВП и N-ВПД позволяет показать, что из мономеров с сильно различающимися константами сополимеризации на установке с автоматическим контролем и поддержанием состава реакционной смеси [11] можно получить сополимеры с узким распределением по составу (ср. рис. 3 и 4). Кроме того, предложенные методические подходы и программа обработки результатов перекрестного фракционирования позволяют разрабатывать аналогичные методики для анализа других сополимеров.

Список литературы

1. *Мягченков В. А., Френкель С. Я.* Композиционная неоднородность сополимеров. Л.: Химия, 1988. 248 с.
2. *Glöckner G., Stickler M., Wunderlich W.* // Fresenius Z. Anal. Chem. 1987. B. 328. S. 76.
3. *Glöckner G., Stickler M., Wunderlich W.* // Ibid. 1988. B. 330. S. 46.
4. *Glöckner G.* // TrAC. 1988. V. 7. № 5. P. 169.
5. *Glöckner G., Stickler M., Wunderlich W.* // J. Appl. Polym. Sci. 1989. V. 37. P. 3147.
6. *Glöckner G., Stejskal J., Kratochvil P.* // Macromol. Chem. 1989. B. 190. S. 427.
7. *Mori S.* // Analyt. Sci. 1988. V. 4. № 8. P. 365.
8. *Mori S.* // Analyt. Chem. 1988. V. 60. P. 1125.
9. *Balke S. T., Patel R. D.* // Polymer News. 1983. V. 9. P. 6.
10. *Красиков В. Д., Нестеров В. В., Беленький Б. Г. и др.* // Высокомолекуляр. соединения. 1989. Т. 31А. № 1. С. 204.
11. *Svergun V. I., Kedik S. A., Lobanov O. E., Fyodorov E. K.* // Non-traditional methods of polymer synthesis. International school-seminar for young scientists. Alma-Ata, 1990. P. 105.
12. *Mori S.* // J. Chromatogr. 1987. V. 411. P. 355.

Министерство здравоохранения СССР
Институт биофизики
Москва

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 678.84.01 : 543.54

© 1991 г.

Михальский А. И., Тетенок Н. А., Мирошникова И. И., Курапова Т. Ю.

АНАЛИЗ ТРЕХФУНКЦИОНАЛЬНОГО МЕТИЛФЕНИЛСИЛОКСАНОВОГО ОЛИГОМЕРА В РЕЖИМАХ ЭКСКЛЮЗИОННОЙ И АДСОРБЦИОННОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Проведен анализ трехфункционального метилфенилсилоксанового олигомера (МФСО) со свободными OH- и OCH_3-группами в различных режимах хроматографического разделения – нормально-фазовом и эксклюзионном. Установлено, что наиболее реакционноспособной в составе МФСО является фракция со средней молекулярной массой $M=1000$ (в шкале олигостирольных стандартов), которая нацело расходуется при 120° С; наряду с ней частично расходуется фракция с невысокой молекулярной массой (600), образуя новую фракцию, которая в дальнейшем (при $\geqslant 160$° С) взаимодействует с исходной фракцией МФСО ($M=1300$).

Анализу органосилоксановых олигомеров методом жидкостной хроматографии посвящен ряд работ, в которых исследовались полимеризационные превращения органоциклосилоксанов [1–3], изучался состав циклических [2, 4] и линейных [4–6] олигоорганосилоксанов на основе дизамещенных силановых производных, определялись молекулярные характеристики модельных сетчатых структур, полученных в результате соконденсации α, ω-дигидроксиполидиметилсилоксанов с тетраэтоксисиланом [7], рассматривалось влияние длины цепи α, ω-дигидроксиорганосилоксанов на параметры удерживания силоксанов с концевыми полярными группами [8]. В указанных работах исследования проводились в режиме эксклюзионной (гель-проникающей) хроматографии (ГПХ); объекты исследования представляли собой дизамещенные силановые производные, в некоторых случаях [7, 8] содержащие в молекуле не более двух функциональных групп.

Органосилоксановые олигомеры на основе тризамещенных силановых производных существенно отличаются по своим свойствам от дизамещенных аналогов и могут образовывать в процессе взаимодействия распределенных по цепи функциональных групп сильноразветвленные и пространственные или сетчатые структуры. Однако исследований их фракционного состава методами жидкостной хроматографии, насколько известно авторам, не проводилось.

Объект настоящего исследования – трехфункциональный метилфенилсилоксановый олигомер $[(CH_3SiO_{1,5})_m(C_6H_5SiO_{1,5})_n]_p$ (где $m=1$, $n=2$, $p=2\div 8$), содержащий в цепи реакционноспособные OH- и OCH_3-группы. Получали МФСО путем соалкоголиза производных метил- и фенилтрихлорсиланов и последующей соконденсации продуктов алкоголиза. Для большей информативности наряду с традиционным гель-хроматографическим анализом силоксановых молекул [1–8] дополнительно проводили их анализ при разделении по адсорбционному механизму. Разделение молекул по двум независимым параметрам – размеру и адсорбционной активности – в максимально приближенных условиях хроматографирования (идентичность всего набора оборудования, включая хроматографическую колонку и детектор) позволяло соотнести наблюдавшиеся в составе МФСО фракции по различным структурным особенностям.

Анализ МФСО проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе LC-4A («Шимадзу», Япония). Сорбент – «Зорбакс» PSM-60S/PSM-1000 S, детектор – УФ-спектрофотометр (254 нм), скорость элюирования – 0,5 мл/мин. Элюент в адсорбционном режиме разделения – хлороформ, в эксклюзионном (ГПХ) – метанол. Обработка хроматограмм проводилась автоматически на микрокомпьютере «Хроматопак»

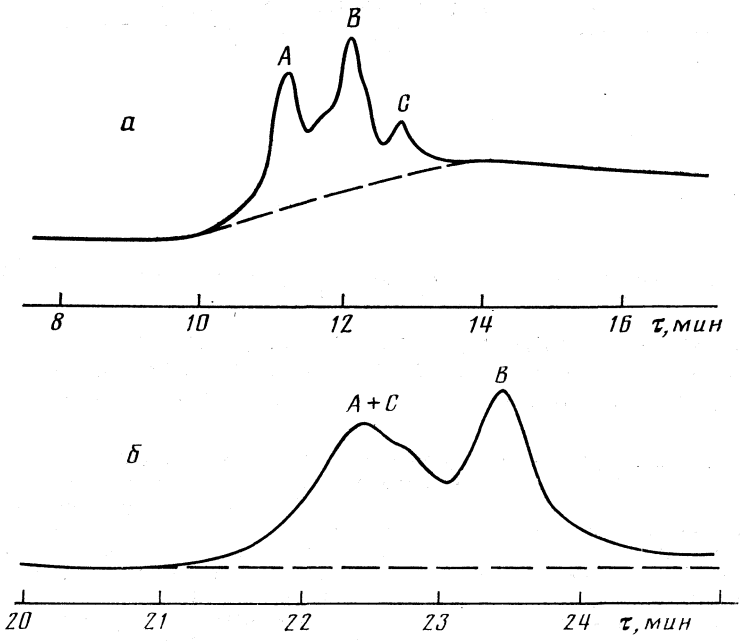


Рис. 1. Хроматограммы метилфенилсилоксанового олигомера в адсорбционном (*а*) и эксклюзионном (*б*) режимах разделения, τ – время удерживания

С-R3A. Молекулярные массы определяли по калибровочной зависимости в шкале олигостирольных стандартов производства «Тойо Сода», Япония [1].

На рис. 1, *а* представлены хроматограммы МФСО в адсорбционном режиме разделения, на рис. 1, *б* – в эксклюзионном. Поскольку, кроме состава элюента, все остальные параметры хроматографирования при переходе от нормально-фазовой жидкостной хроматографии (НФЖХ) к ГПХ сохранялись без изменения, правомочно сравнение относительных площадей хроматографических пиков между двумя различными хроматограммами (рис. 1, *а* и *б*). Результаты этого сравнения, а также воспроизводимость данных, полученных на разных образцах МФСО и в параллельных определениях, представлены в табл. 1. Основываясь на совпадении площадей второго пика на рис. 1, *а* и третьего пика на рис. 1, *б*, можно считать, что они соответствуют одному и тому же виду молекул МФСО (фракция *B*). Действительно, из табл. 1 следует довольно близкое совпадение площадей S_B на хроматограммах, полученных в адсорбционном и эксклюзионном режимах разделения, например 49,4–50,2 и 48,4–48,7% соответственно. Наблюдается также симбатность изменения значений S_B с переходом к другому образцу МФСО, синтезированному с целью воспроизведения: величина S_B снижается до 45,4–45,8 и 45,6–46,2% соответственно, но корреляция между значениями сохраняется.

К сожалению, в режиме ГПХ не удалось получить лучшего разделения: второй пик на рис. 1, *б* выходит в виде плеча. Тем не менее его заведомо меньшая по сравнению с предыдущим пиком площадь позволяет отнести этот слабо разрешенный пик к фракции *C*, которой, действительно, в режиме НФЖХ соответствует хроматографический пик с площадью в 2–4 раза меньшей, чем в случае фракции *A* (табл. 1). Установленное между хроматографическими пиками соответствие обозначено буквенными символами на рис. 1, *а* и *б*. Из хроматограмм (рис. 1) следует, что фракция *A*, имеющая наибольшую молекулярную массу (1300), отличается наименьшей адсорбционной активностью, так как имеет минимальное время удерживания. Следующая за ней по молекулярной массе (1000) фракция *C* наиболее активна по функциональ-

[1] Приводимые значения молекулярных масс составляющих фракций МФСО носят ориентировочный характер, так как в шкале олигостирольных стандартов не учитываются конформационные особенности силоксановых молекул.

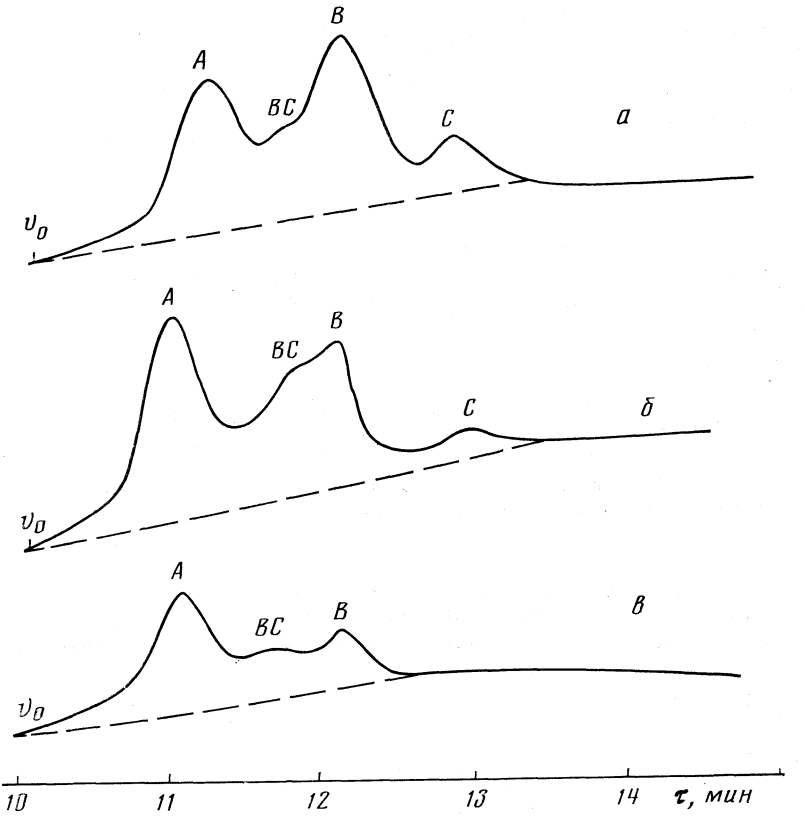


Рис. 2. Хроматограммы метилфенилсилоксанового олигомера в исходном состоянии (*а*) и после выдержки в течение 3 ч при 100 (*б*) и 120° С (*в*). Режим разделения – НФЖХ

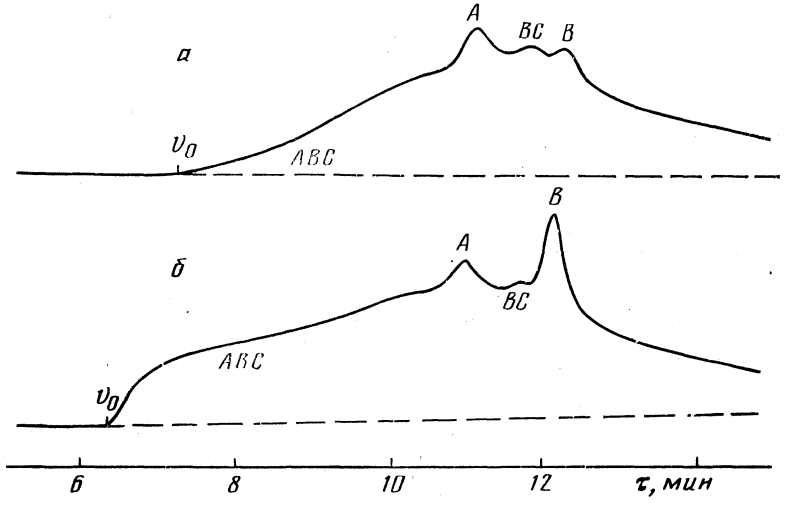


Рис. 3. Хроматограммы золь-фракций метилфенилсилоксанового олигомера, подвергнутого термообработке в течение 3 ч при 160 (*а*) и 200° С (*б*)

Таблица 1

Хроматографические характеристики МФСО в различных режимах разделения

Режим	τ_A	τ_B	τ_C	S_B	S_A	S_C
			Образец I			
НФЖХ	11,3	12,1	12,9	49,4	39,8	10,8
	11,2	12,0	12,8	50,2	38,6	11,2
Эксклюзионный	22,3	23,3	22,7 (плечо)	48,4		(51,6)
	22,3	23,4	22,7 (плечо)	48,7		(51,4)
			Образец II			
НФЖХ	11,2	12,8	12,0	45,4	36,4	18,2
	11,0	12,6	11,9	45,8	36,2	18,0
Эксклюзионный	22,4	23,4	22,7 (плечо)	46,2		(53,5)
	22,4	23,4	22,7 (плечо)	45,6		(53,4)

Обозначения: τ_i — время удерживания фракции i, мин; S_i — относительная площадь соответствующего хроматографического пика, %. В скобках приведены значения $S_A + S_C$.

Таблица 2

Изменение фракционного состава трехфункционального метилфенилсилоксанового олигомера в процессе термообработки

Фракции	τ, мин	S_0	S_{t_1}	δ_{t_1}	S_{t_2}	δ_{t_2}	S_{t_3}	S_{t_4}	δ'_{t_4}
ABC	10,3	–	–	–	–	–	28,8	47,1	65
A	11,2	38,6–39,8	39,6	0	65,6	65	20,6	14,8	–30
BC	11,8	Следы	23,2	$\sim 10^3$	15,5	–35 (δ_2')	11,9	7,8	–35
B	12,1	49,4–50,2	29,4	–40	19,0	–60	38,6	30,9	–20
C	12,8	10,8–11,2	7,8	–30	0	–100	–	–	–

Обозначения: S_0 и S_{t_i} — относительные площади (%) хроматографических пиков для исходного образца и образцов, прогретых при температурах t_i ($t_1 = 100°$ С, $t_2 = 120$ °С, $t_3 = 160°$ С, $t_4 = 200°$ С); τ — время удерживания; $\delta_{t_i} = (S_{t_i} - S_0)/S_0$, $\delta'_{t_i} = (S_{t_i} - S_{t_{i-1}})/S_{t_{i-1}}$.

ным группам, так как выходит последней (рис. 1, *а*). Что касается фракции *B*, то она имеет низкую молекулярную массу (600) и занимает промежуточное положение по активности функциональных групп. Понятие активность при этом включает в себя тип функциональных групп, их доступность и относительное содержание в молекуле для каждой отдельной фракции.

В дальнейшем было прослежено изменение характера хроматограмм (в режиме НФЖХ) и площадей пиков в процессе конденсационных превращений олигомера после нагревания, сопровождающихся образованием разветвленных и сетчатых силоксановых структур. На рис. 2 приведены хроматограммы МФСО после термообработки (100–120° С), когда образцы сохраняли еще полную растворимость, на рис. 3 – хроматограммы растворимой части (золь-фракции) образцов, поскольку при высоких температурах (160–200° С) в олигомере образовывались сетчатые, нерастворимые полиорганосилоксановые структуры. Как видно, после нагревания МФСО изменялась как относительная площадь пиков, так и сам характер хроматограмм. Судя по относительному изменению площадей хроматографических пиков (табл. 2), наибольшей активностью обладает фракция *C*, которая на первой стадии нагревания (100° С) расходуется на 30%, а на второй (120° С) – уже целиком. Такое поведение согласуется с порядком ее выхода в режиме НФЖХ (рис. 1, *а*; 2), так как обусловлено одной и той же причиной – повышенной активностью содержащихся в ней функциональных групп.

Фракция *B*, имеющая наименьшую в МФСО молекулярную массу, расходуется частично, сохраняясь во всем диапазоне рассмотренных температур (табл. 2). За счет расходования фракций *B* и *C* при 100° С образуется фракция *BC*, едва намеченная в хроматограмме исходного МФСО (рис. 2). В дальнейшем же (при 120–200° С) фракция BC также расходуется. Вначале это приводит к увеличению содержания фракции *A*: на 65% после термообработки при 120° С. С последующим повышением температуры до 160–200° С фракции *BC* и *A*, расходуясь, приводят к образованию полисилоксановых молекул нового типа *ABC* (рис. 3), сильно разветвленных или, возможно, частично сшитых.

Таким образом, тризамещенный метилфенилсилоксановый олигомер с функциональными группами в цепи содержит разнородные по своей активности фракции, реакционная способность которых не находится в какой-либо зависимости от молекулярной массы. Высокоэффективная жидкостная хроматография позволяет проследить расходование и накопление отдельных фракций в процессе конденсационных превращений МФСО на этапах образования как сильно разветвленных, так и сетчатых полиорганосилоксановых структур.

Список литературы

1. *Андрианов К. А., Жданов А. А., Завин Б. Г., Сунеканц Т. И.* // Высокомолекуляр. соединения. 1970. Т. 12А. № 1. С. 20.
2. *Андрианов К. А., Завин Б. Г., Саболина Г. Ф.* // Там же. 1978. Т. 20А. № 5. С. 1099.
3. *Chojowshi J., Lasocki Z.* // Int. Union Pure and Appl. Chem. 28th Macromol. Symp. Amherst, Mass. July 12–16, 1982. P. 19.
4. *Dodason K., Sympson D., Semlyen J. A.* // Polymer. 1978. V. 19. № 11. P. 1285.
5. *Зислина С. С., Нефедов П. П., Юльчевская С. Д., Терман Л. М.* Химия элементоорганических соединений. Горький, 1983. С. 49–52.
6. *Соболевский М. В., Гилязетдинов А. Л., Бережанова С. И.* // Пласт. массы. 1981. № 9. С. 59.
7. *Müller G., Schimmel K.-H., Voigt D.* // Plaste und Kautshuk. 1985. B. 32. No. 4. S. 124.
8. *Кононов О. В., Карташева Г. Г., Лазарев С. Я., Лобков В. Д.* // Высокомолекуляр. соединения. 1990. Т. 32Б. № 10. С. 756.

Научно-производственное объединение
«Всесоюзный институт авиационных материалов»
Москва

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 678,84,01 : 543

© 1991 г.

Михальский А. И., Новиков Д. Д., Тетенок Н. А., Мирошникова И. И.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОДНОРОДНОСТИ ФРАКЦИОННОГО СОСТАВА ОЛИГООРГАНОСИЛОКСАНОВ ПУТЕМ СИНХРОННОГО СЕЛЕКТИВНОГО ДЕТЕКТИРОВАНИЯ В РЕЖИМЕ ЭКСКЛЮЗИОННОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Проведено синхронное детектирование олигоорганосилоксанов, полученных соалкоголизом производных метил-, фенил- и карборансодержащих силанов, в процессе гель-хроматографического анализа на трех типах детекторов (рефрактометр, УФ- и ИК-спектрофотометр). Установлена однородность распределения метил- и фенил-силоксизвеньев в олигометилфенилсилоксановых цепях. Оценена степень участия карборансиланов («карбосилов») в гетерофункциональной конденсации с трехфункциональными метил- и фенилсиланами в зависимости от химического строения «карбосилов». Установлено, что «карбосилы» с трихлорсилильными группами в молекуле активно участвуют в конденсационных процессах.

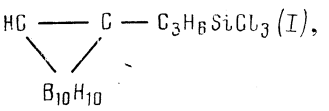
Цель данной работы – в отработке эффективного метода анализа органокарборансилоксановых олигомеров, полученных соалкоголизом фенил-, метил- и карборазамещенных силанов и последующей гетерофункциональной конденсацией их производных. Такая постановка задачи обусловлена тем, что при синтезе с использованием набора соединений, обладающих различной реакционной способностью, существенное влияние на конечные свойства полученного олигомера оказывает однородность распределения структурных звеньев по его фракционному составу и относительная степень участия каждого из них в формировании олигомерных фракций. В связи с этим необходимые свойства олигомера могут быть достигнуты только при наличии в его составе определенных структурных звеньев и с соблюдением некой однородности их распределения по фракциям. Для синтеза олигоорганокарборансилоксанов были использованы карборансилоксановые соединения – карбосил-1Т (I), карбосил-2 (II), карбосил-3Т (III), структурные формулы которых приведены ниже.

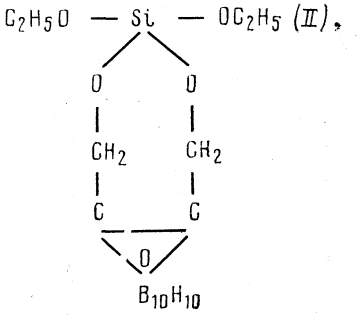
Для контроля за однородностью фракционного состава органосилоксановых олигомеров [1] $[(CH_3SiO_{1,5})_m(C_6H_5SiO_{1,5})_n(RSiO_{1,5})_p]_q$, содержащих функциональные OH- и OCH_3-группы (где R – карборансодержащий фрагмент в соответствии с приведенными выше структурными формулами, $m=0\div1$, $n=0\div2$, $p=0{,}2\div0{,}4$, $q=4\div8$), и распределением составляющих их структурных звеньев олигомеры исследовали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в эксклюзионном режиме разделения с синхронным селективным детектированием на каждое из составляющих силоксизвеньев.

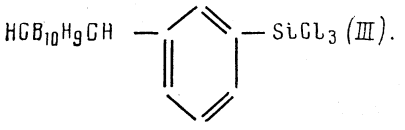
Анализ проводили на жидкостном хроматографе марки ALC/GPC-244 фирмы «Уотерс» (США), снабженном рефрактометрическим и УФ-спектрофотометрическим детекторами. Кроме того при хроматографическом анализе автономно использовали ИК-спектрофотометрический детектор фирмы «Дюпон» (США). Разделение проводили на наборе из двух колонок, заполненных ультрастирогелем с размером пор 100 и 1000 Å для первой и второй колонок соответственно. Скорость элюирования тетрагидрофурана составляла 1 мл/мин.

Поскольку в состав олигомеров наряду с метильными могут входить фенильные группы у атома кремния, селективное детектирование последних обеспечивали с

[1] Олигоорганокарборансилоксаны синтезированы Т. Ю. Кураповой.







помощью УФ-спектрофотометра, настроенного на длину волны 254 нм, в области которой наблюдается максимальное поглощение арильных групп. Регистрируемые этим детектором хроматограммы сопоставляли с хроматограммами, синхронно записанными по показаниям дифференциального рефрактометра. На рис. 1 представлены хроматограммы олигометилфенилсилоксана, из которых одна регистрировалась с помощью УФ-спектрофотометра, другая – с помощью рефрактометра. Практически полное совпадение хроматограмм, записанных на разных детекторах, свидетельствует о том, что фенильные группы распределены статистически однородно по составляющим фракциям олигомера. Таким образом, получение олигометилфенилсилоксана из метил- и фенилтрихлорсиланов через стадию соалкоголиза с последующей гетерофункциональной конденсацией обеспечивает однородность распределения звеньев $MeSiO_{1,5}$ и $PhSiO_{1,5}$ по всем составляющим фракциям олигомера.

Для установления характера распределения карборановых групп по отдельным фракциям олигомера детектирование образцов в процессе хроматографического разделения проводили с помощью ИК-спектрофотометрического детектора по полосе 2600 $см^{-1}$, соответствующей B–H-колебаниям карборанового ядра. При этом синхронно регистрировали хроматограмму образца на рефрактометре. На рис. 2, *а* представлены хроматограммы фенилкарборансилоксанового олигомера на основе карбосила-1Т. Как видно, сигналы от ИК-спектрофотометрического и рефрактометрического детекторов обеспечивают получение довольно близких хроматограмм. Такое же совпадение последних при работе на двух детекторах наблюдалось и в случае олигометилкарборансилоксана на основе карбосила-1Т (рис. 2, *б*). Таким образом, селективное детектирование по связи B–H в карборановом ядре показало, что при синтезе метил- и фенилкарборансилоксановых олигомеров на основе карбосила-1Т карборанильные группы входят в состав олигомеров и по всем фракциям распределяются практически равномерно.

Олигометилфенилкарборанилсилоксан, синтезированный на основе карбосила-3Т, характеризуется наличием двух фракций, причем обе из них содержат карборанильные группы (рис. 3). Учитывая, что фракции $V_m=14$ соответствует более интенсивный сигнал ИК-спектрофотометрического детектора, чем фракции $V_m=17$, можно считать, что основная доля карбосила-3Т при синтезе образца вошла в его олигомерную часть ($V_m=14$) и гораздо меньшая доля осталась в низкомолекулярной фракции ($V_m=17$).

Таким образом, для олигоорганокарборансилоксанов на основе карбосила-1Т и карбосила-3Т наблюдалось включение карборанильных групп в структуру олигомерных фракций. При этом, если в случае карбосила-1Т низкомолекулярных карборанилсодержащих продуктов в образце не наблюдалось, то в случае метилфенилсилоксанового олигомера на основе карбосила-3Т отмечалась низкомолекулярная карборанилсодержащая фракция. Последняя, однако, по относительному содержанию в олигомере значительно уступала основной олигомерной фракции.

Иная картина наблюдалась для олигометилфенилкарборансилоксана на основе карбосила-2. Для этого олигомера, как показало суммарное детектирование на диф-

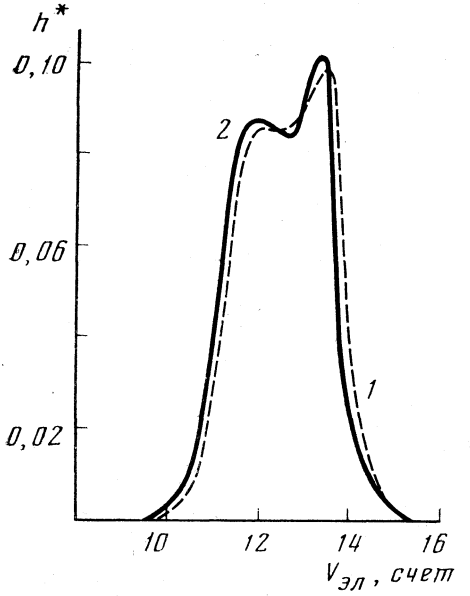


Рис. 1

Рис. 1. Хроматограммы олигометилфенилсилоксана на двух типах детекторов: *1* – рефрактометре, *2* – УФ-спектрофотометре (254 нм)

Рис. 2. Хроматограммы олигофенилкарборанилсилоксана (*а*) и олигометилкарборанилсилоксана (*б*) на основе карбосила-1Т на двух типах детекторов: *1* – рефрактометре, *2* – ИК-спектрофотометре (2600 $см^{-1}$)

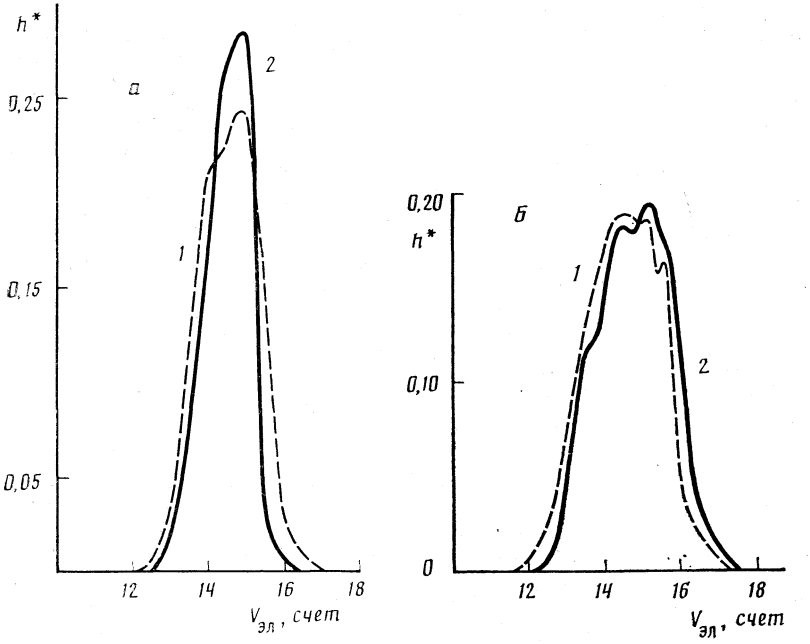


Рис. 2

ференциальном рефрактометре (рис. 4, *а*, кривая *1*), характерно наличие нескольких фракций (V_m=14 и V_m=15) в олигомерной области. Селективное же детектирование по связи B–H показало, что практически все карборановые группы содержатся в другой, низкомолекулярной, фракции (V_m=16,5), поскольку сигнал ИК-спектрофотометра наблюдался преимущественно в этой области и не проявлялся при V_m=14 и 15 (рис. 4, *а*, кривая *2*).

Таким образом, из соотнесения хроматограмм, полученных на рефрактометрическом и ИК-спектрофотометрическом детекторах (рис. 4, *а*), следует, что карбосил-2

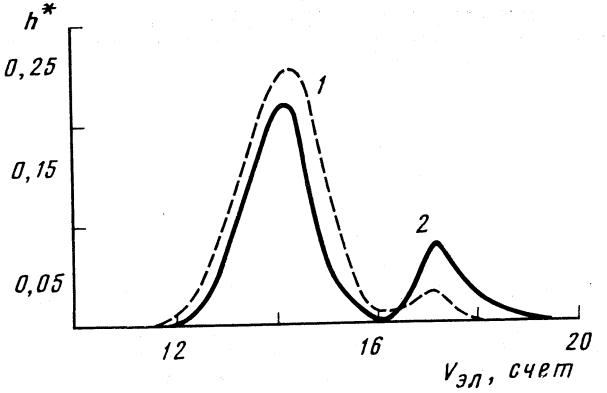


Рис. 3. Хроматограммы олигометилфенилкарборанилсилоксана на основе карбосила-3Т на двух типах детекторов: *1* – рефрактометре, *2* – ИК-спектрофотометре (2600 $см^{-1}$)

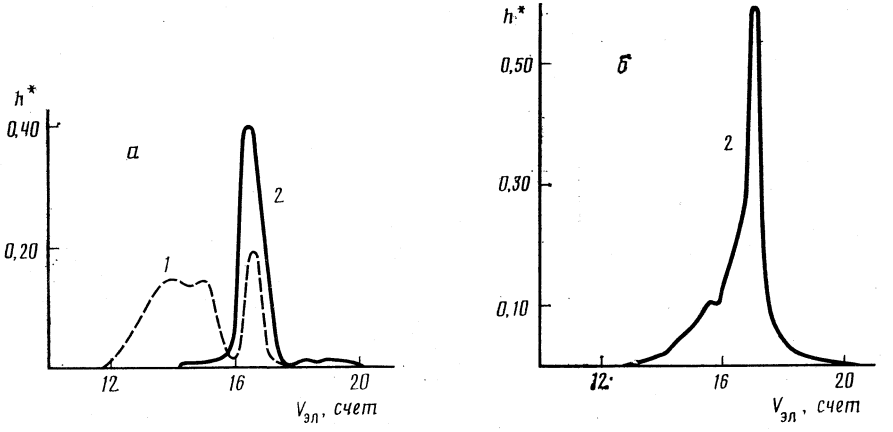


Рис. 4. Хроматограммы олигометилфенилкарборансилоксана на основе карбосила-2 (*а*) и исходного продукта карбосил-2 (*б*) на двух типах детекторов: *1* – рефрактометре, *2* – ИК-спектрофотометре (2600 $см^{-1}$)

не принимает участия в формировании олигомера. Значение же элюентных объемов низкомолекулярной фракции образца, при синтезе которого был использован карбосил-2, в первом приближении соответствует исходному продукту карбосил-2 (рис. 4, *б*). Это дает основание считать, что последний не принимает участия в гетерофункциональной конденсации с остальными компонентами смеси и не олигомеризуется, оставаясь практически в исходном состоянии.

Таким образом, синхронное селективное детектирование олигоорганокарборансилоксановых молекул в процессе гель-хроматографического анализа позволило установить, что метил- и фенилсилоксизвенья в олигометилфенилсилоксановых цепях распределены равномерно, а вхождение карборанзамещенных силанов в структуру олигомера определяется их химическим составом. Прямое детектирование по полосе карборановых групп показало, что продукт карбосил-1Т полностью входит в состав синтезированного олигомера, карбосил-3Т – преимущественно, но не полностью, вероятно, вследствие стерических затруднений; карбосил-2 почти целиком остается в низкомолекулярной части, т. е. в реакцию гетерофункциональной конденсации практически не вступает.

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

Федосеевский В. В., Тихонов В. С., Ларионов О. Г.

ГЕЛЬ-ПРОНИКАЮЩАЯ И ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ РЕАКЦИОННОСПОСОБНЫХ ОЛИГОФЕНИЛ(ДИМЕТИЛ)СИЛОКСАНОВ

С помощью методов гель-проникающей и высокоэффективной жидкостной хроматографии определены оптимальные условия синтеза низкомолекулярных реакционноспособных олигофенил(диметил)силоксанов с узким молекулярно-массовым распределением и малым содержанием гидроксильных групп. Показано, что на основе указанных олигомеров возможно получение полимеров с более упорядоченной, менее дефектной структурой молекул.

В данной работе хроматографическими методами исследованы оптимальные условия синтеза реакционноспособных олигофенил(диметил)силоксанов (ОФДМС). Особенности гель-проникающей хроматографии (ГПХ) заключались в том, что стиролдивинилбензольный гель подвергали термообработке в вакууме в течение 8—10 ч для предотвращения сорбции ОФДМС. Абсолютированный элюент (толуол) хранили в атмосфере инертного газа. Для стабилизации работы колонки через нее пропускали растворы индивидуальных реперных соединений (5—8 раз) органоциклосилоксанов (ОСЦ) I-III, близких по структуре I (см. ниже). Концентрация ОЦС в пробе составляла 20±3%. Хроматографировали на стеклянной колонке длиной 1 м и диаметром 13 мм, оптимальный объем пробы — 0,4—0,6 мл. Эффективность колонки составила 900 т. т./м, что по данным [1] достаточно для анализа низкомолекулярных олигомеров.

Наряду с ГПХ для анализа нерастворимых в толуоле фракций I применяли высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) в различных условиях. В табл. 1 приведены характеристики исследованных хроматографических систем. Эксперименты по ВЭЖХ выполняли на хроматографе «Цвет-304» (система 2). Высота колонки 25 см, диаметр 4,6 мм. Система 3 включала в себя хроматограф фирмы «Алтекс» (США), сорбент зернением 5 мкм; скорость потока 0,5 мл/мин, давление 90 бар. Расчет хроматограмм проводили с помощью интегратора «Шимадау» (Япония) C-RIB. В качестве растворителя использовали хлороформ, объем пробы — 2,5 мкл. Детектирование в системе 1 осуществляли с помощью прибора РИ-02 и проточной кюветы специальной конструкции к интерферометру ИТР-2 [2].

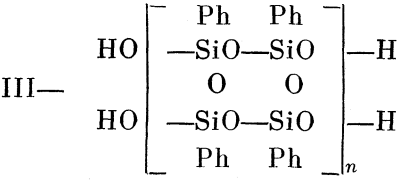
В качестве реперных соединений использовали бифункциональные I, II и гидроксилсодержащие ОЦС (III) следующих составов:

$$I - (R'RSiO)_m(PhSiO_{1,5})_n,\ II - [RSiO_{0,5}]_m[PhSiO]_n,$$

R=R′=Me, R=Me, R′=Vi, R=Me, R′=Ph;

Таблица 1

Система	Метод	Сорбент	Подвижная фаза	Детектор
1	ГПХ	гель СДВ-40	толуол	проточный рефрактометр
2	ВЭЖХ	Сепарон С-18	тетрагидрофуран	УФ, λ=254 нм
3	ВЭЖХ	Ультрасфер С-18	вода/метанол (25 : 75)	УФ, λ=254 нм



Среднечисловые молекулярные массы M_n, определенные методом криоскопии, лежат в интервале 550—3000. Содержание ОН-групп в ОФДМС определяли методов Чугаева — Церевитинова.

Объектами исследования служили ОФДМС, полученные гидролитической соконденсацией органохлорсиланов (ОХС) различной функциональности (фенилтрихлорсилана и диметилдихлорсилана). Эта реакция является первой стадией получения теплостойких полимерных материалов. Известно, что в полимерах на основе ди- и трифункциональных мономеров содержатся «дефектные» звенья, нарушающие упорядоченность структуры макромолекул. На основании современных представлений [3] можно утверждать, что теплостойкость полимеров на основе ОФДМС зависит от степени упорядоченности структуры макромолекул при одинаковом их составе. На степень упорядоченности, очевидно, влияют условия получения ОФДМС: температура реакции, концентрация исходных органохлорсиланов, их мольное соотношение и степень гомогенности среды [4]. По данным [5], «дефектность» структуры макромолекул зарождается уже непосредственно на начальных стадиях проведения соконденсации. Поэтому важно исследовать состав и молекулярно-массовое распределение (ММР) низкомолекулярных реакционноспособных ОФДМС в зависимости от условий их синтеза, что ранее практически не изучалось.

Калибровочная процедура в ГПХ заключалась в исследовании элюационного поведения индивидуальных ОЦС I-III с известными величинами M_n. На рис. 1 представлена калибровочная кривая для определения ММР соединений ОФДМС. Из рис. 1 видно, что колонка работает в ситовом режиме, и калибровочная зависимость в линейной области хорошо описывается уравнением Мура вида

$$V=C_1-C_2 \lg M_n,$$

где C_1=173,4; C_2=47,6. Поскольку в низкомолекулярной области удерживаемый объем не зависит от структуры бифункциональных I, II и гидроксилсодержащих III органоциклосилоксанов, в работе в качестве дополнительного метода оценки упорядоченности структур сложных полифункциональных ОФДМС разработаны номограммы, связывающие содержание ОН-групп в олигомерах и их M_n для граничных видов структур: «бездефектных» (лестничных) в максимально разветвленных (рис. 2).

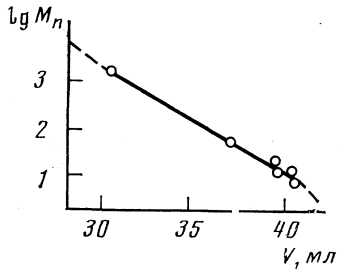


Рис. 1

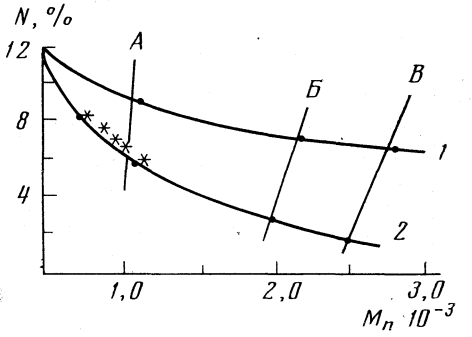


Рис. 2

Рис. 1. Калибровочная кривая для анализа молекулярно-массового распределения ОФДМС

Рис. 2. Номограммы зависимостей содержания ОН-групп (N) от M_n при n=2 (А), 4 (Б), 5 (В) для максимально разветвленных (*1*) и полициклических «бездефектных» (лестничных) структур (*2*). Звездочками отмечены экспериментальные значения для ОФДМС

В табл. 2 приведены условия синтеза некоторых ОФДМС и данных их ММР, полученных с помощью метода ГПХ. Для сравнения приведены также данные по получению олигомера в гетерогенной водно-толуольной среде (опыт 6), во всех остальных случаях растворитель — ацетон. Во всех опытах температура синтеза составляла 0—5° С; α — выход от теоретического; $c_i^{\text{макс}}$ — содержание компонента с $M_i^{\text{макс}}$.

При малом мольном соотношении (m)$Me_2SiCl_2/PhSiCl_3$ от 0,067 до 0,143 получены наряду с растворимыми в толуоле фракциями кристаллические вещества, не растворимые в толуоле. При использовании метилхлорсилана вместо диметилхлорсилана (опыт 3) значение M_n выше по сравнению с опытом 4, что указывает на большую «сшивающую» способность молекул метилтрихлорсилана в реакциях гидролитической соконденсации. Из табл. 2 также следует сложный характер зависимости величины M_n от мольного соотношения $Me_2SiCl_2/PhSiCl_3$:

m	0,067	0,143	1,75
M_n	648	573	1045

Следует отметить, что и в случае гетерогенной гидролитической соконденсации фенилтрихлорсилана с диметилдихлорсиланом также имеет место сложная зависимость значения M_n от мольного соотношения органохлорсиланов [4].

Интересно сравнить данные опытов 5 и 6: в случае гетерогенной соконденсации (проводимой также и при повышенной концентрации органохлорсиланов) степень полидисперсности M_w/M_n значительно выше, а значение M_n — ниже. Эти результаты можно объяснить с точки зрения диффузионной модели гидролиза органохлорсиланов, предложенной ранее [6]. В случае гетерогенной среды скорость образования молекул олигомеров будет лимитироваться диффузионным фактором, что затрудняет получение молекул с большой молекулярной массой и способствует большей неоднородности молекул по размеру.

Состав нерастворимых в толуоле фракций (опыты 2 и 4) определяли с помощью ВЭЖХ (табл. 1, системы 2, 3). В качестве стандарта исполь-

Таблица 2

Опыт	[ОХС], масс. %	m	α, %	M_n	M_w/M_n	$M_i^{макс}$	$c_i^{макс}$, %
1	1,5	0	51,4	–	–	–	–
2	1,6	0,067	36,2 *	648	1,37	1300	40
3	1,5	0,143 **	71,5*	674	1,36	1350	43
4	1,6	0143	69,9*	573	1,53	1340	35
5	1,4	1,750	61,5	1045	1,25	1500	60
6	18,7	1,750	79,5	650	1,58	1200	30

* Для растворимой в толуоле фракции. ** Вместо диметилдихлорсилана в реакции использован метилтрихлорсилан.

Таблица 3

Данные дифрактометрии для нерастворимых в толуоле фракций

2θ	d, Å	I, %	S, мм
		опыт 1	
5,58	15,84	70,49	1,5
6,20	14,26	100	1,2
18,96	4,68	17,83	2,5
19,60	4,53	20,08	4,0
		опыт 2	
5,60	15,78	100	2,0
6,26	14,12	20,73	1,2
18,66	4,72	54,47	1,5
19,96	4,45	45,53	2,0
		опыт 3	
5,44	15,24	100	1,5
6,20	14,26	19,23	1,2
18,66	4,75	45,88	1,5
19,86	4,47	46,39	1,9
		опыт 4	
5,56	15,89	100	2,0
6,18	14,30	26,86	1,0
18,64	4,76	68,59	1,2
19,82	4,48	55,16	2,0

зовали индивидуальное соединение — тетрагидроксителрафенилциклотетрасилоксан (тетрол), полученный в опыте 1 (табл. 2).

На рис. 3 приведена типичная хроматограмма фракции олигомеров, растворенных в хлороформе. Из хроматограммы видно, что время удерживания ОФДМС составляет 22,52 мин, это очень близко по времени выхода тетрола, равного 23—25 мин в зависимости от условий ВЭЖХ (система 2 или 3).

Для более детального изучения структур нерастворимых в толуоле фракций ОФДМС в работе применили рентгенофазовый анализ, это позволило определить межплоскостные расстояния (d, Å), дифракционное

отражение (I, %) и ширину пика (S, мм) на полувысоте пика. Наиболее характерными для дифрактограмм являются четыре пика, данные приведены в табл. 3. Данные дифрактометрического анализа свидетельствуют о том, что молекулы нерастворимых веществ содержат в своем составе, наряду с фенилсилоксановыми структурными группами, также, в небольших количествах, и диметилсилоксановые структурные группы.

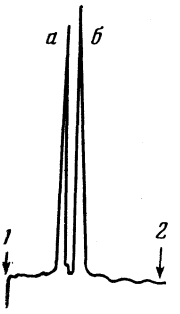
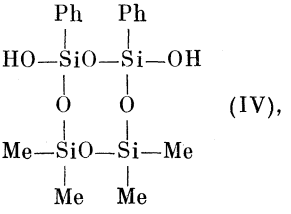
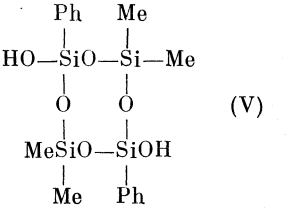


Рис. 3. Типичная хроматограмма (*1* – начало, *2* – конец) нерастворимых в толуоле фракций ОФДМС (*а*) и тетрола (*б*), полученная методом ВЭЖХ. Время удерживания образцов 22,52 (*а*) и 23,0 мин (*б*)

Полученные результаты позволяют сделать некоторые выводы о влиянии условий проведения гидролитической соконденсации фенилтрихлорсилана с диметилдихлорсиланом на состав, степень полидисперсности и другие показатели ММР ОФДМС. Так, определенно можно считать, что низкая температура согидролиза и осуществление его в водноацетоновой среде при невысоких концентрациях органохлорсиланов способствуют образованию низкомолекулярных соединений, достаточно однородных по составу и строению, например



(IV),



(V)

и продуктов их конденсации. При этом соотношение диметилсилоксановых и фенилсилоксановых звеньев в молекулах ОФДМС соответствует в основном соотношению исходных диметилдихлорсилана и фенилтрихлорсилана. В свою очередь это обстоятельство сказывается на том, что полимеры на основе ОФДМС, синтезированных в рассмотренных условиях, обладают преимущественно менее дефектной структурой по сравнению с полимерами на основе ОФДМС, синтезированных в гетерогенной среде, при повышенных концентрации и температуре.

Список литературы

1. *Энтелис С. Г., Евреинов В. В., Кузаев А. И.* Реакционноспособные олигомеры. М.: Химия, 1985. С. 197.
2. *Курнанбеков Э., Ларионов О. Г., Чмутов К. В.* // Журн. физ. химии. 1970. Т. 44. С. 286.
3. *Коршак В. В.* // Успехи химии. 1973. Т. 42. № 4. С. 695.
4. *Тихонов В. С., Бобкова И. Г., Бурмистрова Ж. П. и др.* Деп. в ОНИИТЭХим. Черкассы, 1990. № 114-хп 90.
5. *Твердохлебова И. И.* Исследования в области молекулярных и конформационных превращений полиорганосилоксанов: Автореф. дис. ... докт. хим. наук. М.: ИНЭОС АН СССР, 1978. 40 с.
6. *Соколов Н. Н.* Методы синтеза полиорганосилоксанов. М.: ГЭИ, 1959. С. 15.

Академия наук СССР
Институт физической химии
Москва

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 541.64 : 543.544 : 547.422

© 1991 г.

Тихонова Т. З., Петракова Е. А.

ТРИ РЕЖИМА ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ПРОСТЫХ И СЛОЖНЫХ ОЛИГОЭФИРОВ

Найдены критические условия хроматографии в тонких слоях силикагеля при переходе от адсорбционного к эксклюзионному режиму хроматографии для простых олигоэфиров – полиоксипропиленгликолей, сложных олигоэфиров – полидиэтиленгликольадипинатов и поликарбонатов на основе диэтилового эфира угольной кислоты и 1,6-гександиола.

Переход от адсорбционного к эксклюзионному режиму хроматографии через критические условия впервые был осуществлен авторами [1, 2] методами хроматографии в тонких слоях (ТСХ) и колоночной хроматографии. Теми же авторами даны теоретические выкладки, объясняющие существование критических условий в рамках единого механизма хроматографии макромолекул. Дальнейшими исследованиями по разделению функциональных олигомеров методом жидкостной хроматографии доказана теоретически и подтверждена экспериментально связь между множеством факторов, влияющих на разделение олигомеров по молекулярной массе (ММ) или по функциональности, и режимом хроматографии. В работах [3–5] представлены теоретические обоснования возможности реализации трех режимов в жидкостной хроматографии с учетом химической природы олигомера, его ММ и функциональности, химической природы и размера пор адсорбента, элюирующей силы растворителя. И, тем не менее, точного теоретического описания взаимосвязи всех факторов пока не существует.

В настоящее время деление по функциональности осуществляется в основном жидкостной хроматографией в критических условиях, при которых изменение коэффициента распределения K_d от числа звеньев цепи $\partial K_d/\partial N=0$, т. е. величина K_d не зависит от молекулярной массы. В связи с недостаточным обеспечением приборами и сорбентами, позволяющими проводить такие исследования в широких масштабах, мы предлагаем использовать для этих целей ТСХ. Метод прост в исполнении, не требует больших затрат времени, позволяет анализировать значительное количество образцов одновременно. Его целесообразно применять на стадиях отработки различных технологических процессов, а также на стадии контроля производства. Использование этого метода дает возможность детектировать вещества с большими величинами K_d, что неосуществимо в жидкостной хроматографии вследствие необратимой адсорбции в колонке.

Была предпринята попытка реализовать ТСХ сложных и простых олигоэфиров, а также олигокарбонатов в режиме адсорбционной хроматографии $\partial K_d/\partial N>0$, где отношение длины пробега пятна к длине пробега растворителя по пластинке R_f увеличивается с уменьшением ММ, эксклюзионной хроматографии $\partial K_d/\partial N<0$ (R_f увеличивается с ростом ММ) и на границе их раздела $\partial K_d/\partial N=0$ в критических условиях, где R_f не зависит от ММ, а определяется только числом функциональных групп в макромолекуле.

Для ТСХ использовали готовые отечественные пластины, разработанные в ИВС АН СССР (выпускаемые в р/к Ляэне-Калур, Эстония), на стеклянной подложке со слоем силикагеля КСКГ, размер пор 160 Å, а также фирмой «Sorbfil ПБК Пластмаш» со слоем силикагеля СТХ-1А, размер пор 100 Å. Хроматографирование осуществляли в камере, стенки которой выложены фильтровальной бумагой, с предварительным насыщением в течение одного часа. Увеличение времени насыщения приводит к размыванию границ хроматографической зоны, затрудняя детектирование. После хроматографирования пластинки высушивали в токе теплого воздуха и детектировали реактивом Драгендорфа [6] с последующим проявлением парами иода.

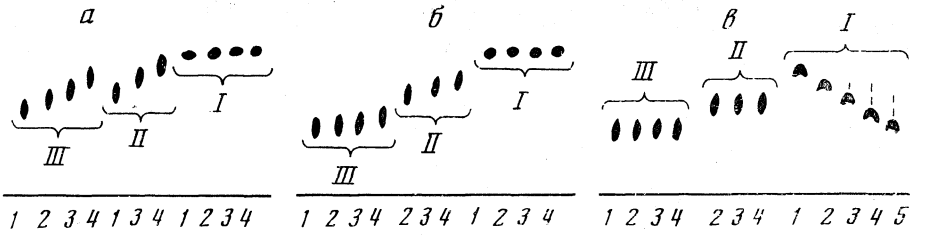


Рис. 1. ТС-хроматограммы ПОПГ с ММ, равными 370 (*1*), 500 (*2*), 1000 (*3*), 3000 (*4*), 4500 (*5*) и функциональностью f=0 (I), f=2 (II), f=3 (III). Элюент – гептан – ТГФ, содержание ТГФ составляло 50% ($\partial K/\partial N<0$) (*а*), 45% ($\partial K/\partial N\sim0$) (*б*), 33% ($\partial K/\partial N>0$). Пластинки фирмы «Sorbfil» со слоем силикагеля СТХ-1А, аналогичные результаты получены на пластинках со слоем силикагеля КСКГ (Ляэне-Калур)

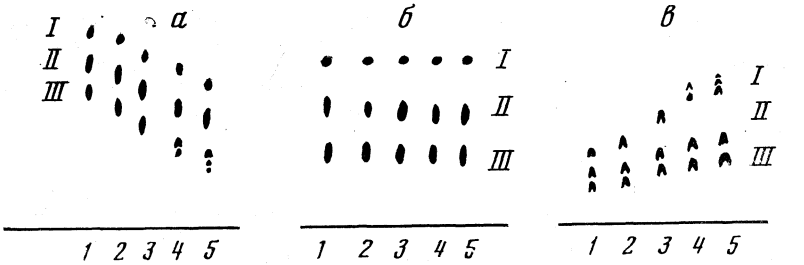


Рис. 2. ТС-хроматограммы олигокарбонатов, номера образцов соответствуют номерам фракций рис. 3 с функциональностью f=0 (I), 1 (II), 2 (III). Элюент – толуол – этилацетат, содержание толуола составляло 33% ($\partial K/\partial N<0$) (*а*), 60% ($\partial K/\partial N\sim0$) (*б*), 80% ($\partial K/\partial N>0$) (*в*). Пластинки со слоем силикагеля СТХ-1А, аналогичные результаты получены на пластинках со слоем силикагеля КСКГ

Объектом исследования и изучения служили следующие модельные системы. а) Простые олигоэфиры – полиоксипропиленгликоли (ПОПГ) с ММ, равными 300, 500, 1000, 3000, 4500 и функциональностью f=1, 2, 3, 0. Бесфункциональные ПОПГ получали ацетилированием диолов соответствующей массы.

б) Поликарбонаты с различными значениями ММ и f, полученные препаративным фракционированием на гель-хроматографе «Waters-200» с системой из четырех стирогелевых колонок проницаемостью 500, 1000, 1000, 3000 Å в этилацетате.

в) Сложные олигоэфиры – полидиэтиленгликольадипинаты (ПДЭГА) с ММ=380, 800, 1200, 1800 и f=0, 1, 2.

Наиболее сложной задачей явился выбор пары растворителей для реализации ТСХ простых олигоэфиров в трех режимах хроматографии на силикагеле. ПОПГ может адсорбироваться по центральным звеньям, содержащим простые эфирные связи (–О–), и по концевым гидроксилсодержащим звеньям. Были опробованы такие смеси растворителей как: этилацетат – метилэтилкетон, этилацетат – муравьиная кислота, хлороформ – этанол, гептан – тетрагидрофуран. Для всех перечисленных систем были найдены соотношения компонентов, при которых R_f для бесфункциональных ПОПГ не зависит от ММ, а би- и трифункциональные ПОПГ имеют очень слабую зависимость R_f от ММ. Такие системы практически могут быть использованы для разделения последних по функциональности. Но ни для одной из этих пар не найдены условия, при которых бы осуществлялся эксклюзионный режим для бесфункциональных соединений. На рис. 1 приведены ТС-хроматограммы ПОПГ в системе гептан – тетрагидрофуран (ТГФ). При соотношении (67/33) для бесфункциональных макромолекул R_f уменьшается с увеличением ММ, т. е. реализуется адсорбционный режим ТСХ, при этом R_f макромолекул с f=2 и 3 практически не зависит от ММ.

Критические условия для бесфункциональных ПОПГ получены при содержании тетрагидрофурана 45% и более. Деление простых олигоэфиров по функциональности наиболее выгодно проводить при соотношении гептан – тетрагидрофуран, равном 55/45, так как в этой области би- и трифункциональные компоненты имеют слабую зависимость R_f от ММ. Дальнейшее увеличение содержания ТГФ приводит к более

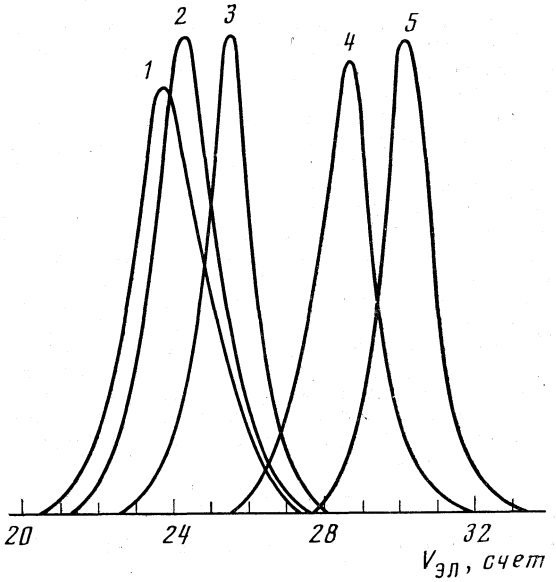


Рис. 3. Гель-хроматограммы фракций олигокарбонатов, анализируемых методом ТСХ. Сняты на гель-хроматографе «Waters-200» с системой стирогелевых колонок проницаемостью 500, 1000, 1000 и 3000 Å в этилацетате, детектор – дифференциальный проточный рефрактометр, скорость элюирования 1,2 мл/мин, 1 счет=5 мл

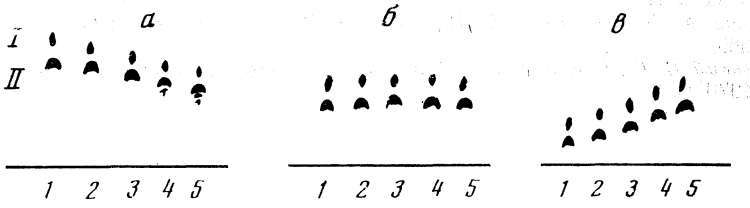


Рис. 4. ТС-хроматограммы ПДЭГА с ММ, равными 1700 (*1*), 1200 (*2*), 800 (*3*), 380 (*4*), 170 (*5*) и функциональностью f=1 (I), f=2 (II). Элюент – толуол – этанол, содержание этанола составило 20% ($\partial K/\partial N<0$) (*а*), 10% ($\partial K/\partial N=0$) (*б*), 7% ($\partial K/\partial N>0$) (*в*). Пластинки со слоем силикагеля КСКГ, аналогичные результаты получены на пластинках со слоем силикагеля СТХ-1А

резкой молекулярно-массовой зависимости. Не обнаружено элюента, в котором бы реализовался адсорбционный режим ТСХ для функциональных макромолекул и эксклюзионный – для бесфункциональных. По-видимому, такое поведение ПОПГ связано со специфическими взаимодействиями между силикагелем и молекулами простых олигоэфиров.

Тонкослойная хроматография в трех режимах для олигокарбонатов, в состав молекул которых входят центральные звенья, содержащие карбонатные группы (–О–COO^-), и концевые звенья с гидроксильными группами, реализована в системе толуол – этилацетат. Переход от адсорбционного к эксклюзионному режиму через критические условия осуществлялся за счет изменения элюирующей силы растворителя при варьировании соотношения входящих в него компонентов. На рис. 2 представлены ТС-хроматограммы фракций олигокарбонатов, гель-хроматограммы которых приведены на рис. 3. При составе элюента толуол – этилацетат в соотношении равном 33/67, значение R_f возрастает с увеличением ММ – эксклюзионный режим, в котором низкомолекулярные фракции (*4, 5*) делятся на отдельные гомологи. Это объясняется тем, что в эксклюзионном режиме наличие у макромолекул функциональных групп, адсорбирующихся сильнее, чем группы цепи, приводит к увеличению разделения по ММ, и чем короче молекулярная цепь, тем сильнее влияние концевых групп.

Увеличение содержания толуола в бинарной смеси до 60%, т. е. уменьшение активности элюента, приводит к независимости R_f от ММ – критические условия. Для моно- и бифункциональных макромолекул сохраняется очень слабая зависимость R_f от ММ. При соотношении толуол – этилацетат, равном 75/25, для бесфункциональных компонентов вновь появляется молекулярно-массовая зависимость R_f, но в адсорбционном варианте: R_f уменьшается с увеличением ММ. Для моно- и бифункциональных компонентов R_f не зависит от ММ. Адсорбционный режим ТСХ макромолекул всех функциональностей проявляется при содержании толуола 80%.

Аналогичная картина перехода от эксклюзионного варианта ТСХ к адсорбционному через критические условия наблюдается для сложных ПДЭГА (рис. 4), которые могут адсорбироваться по сложноэфирным связям центральных звеньев и по гидроксилам концевых звеньев цепи макромолекулы, в системе толуол – этанол. Величина R_f не зависит от ММ в интервале от 10 до 20% этанола в бинарной смеси растворителей. Адсорбционная зависимость R_f от ММ наблюдается при содержании этанола менее 10%, а эксклюзионная – при содержании этанола более 20%.

Таким образом, в данной работе показана возможность реализации критической ТСХ, позволяющей разработать методики распределения по типам функциональности, которые благодаря простоте и надежности могут быть рекомендованы для контроля качества промышленных реакционноспособных олигомеров.

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., Френкель С. Я.* // Высокомолекуляр. соединения. 1977. Т. 19А. № 3. С. 657.
3. *Цветковский И. Б., Валуев В. И., Шляхтер Р. А.* // Журн. аналит. химии. 1980. Т. 35. № 1. С. 117.
4. *Горшков А. В., Филатова Н. Н., Росина Д. Я. и др.* // Журн. физ. химии. 1982. Т. 56. № 11. С. 2641.
5. *Горшков А. В., Евреинов В. В., Энтелис С. Г.* // Там же. 1983. Т. 57. № 11. С. 2665.
6. *Беленький Б. Г., Ганкина Э. С.* Тонкослойная хроматография полимеров. Л.: Наука, 1970. С. 7.

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 678.762.3.023.01

© 1991 г.

Пискарева Е. П., Карташева Г. Г.

СОЧЕТАНИЕ ГЕЛЬ-ПРОНИКАЮЩЕЙ ХРОМАТОГРАФИИ И СВЕТОРАССЕЯНИЯ КАК МЕТОД ОЦЕНКИ РАЗВЕТВЛЕННОСТИ ПОЛИМЕРОВ

Предложен метод исследования разветвленности полимера, основанный на сочетании гель-проникающей хроматографии и светорассеяния. Гель-хроматограф использован на этапе получения фракций, а также для характеристики их молекулярно-массового распределения. Средние размеры и масса макромолекул во фракциях определены методом светорассеяния. Метод применен для изучения молекулярной структуры промышленного *цис*-1,4-полиизопрена.

Разветвленность макромолекул относится к основным характеристикам молекулярной структуры, которыми определяется вязкоэластическое поведение эластомеров. Количественная оценка степени разветвленности базируется на сравнении размеров макромолекулы разветвленного полимера и его линейного аналога с такой же молекулярной массой, что требует предварительного разделения полимера на фракции. Обычно для этой цели применяется весьма трудоемкая и длительная процедура фракционирования методом дробного осаждения.

В данной работе предложена экспрессная методика исследования разветвленности, основанная на сочетании методов гель-проникающей хроматографии (ГПХ) и светорассеяния. При этом гель-хроматограф используется на этапе получения фракций каучука, которые отбираются по мере прохождения анализируемого образца через колонки, а их молекулярные параметры — средние размеры и молекулярная масса — определяются затем методом светорассеяния.

Светорассеяние является абсолютным методом определения молекулярной массы и практически единственным прямым методом измерения размеров макромолекул (среднеквадратичного радиуса инерции $\overline{R^2}$). Принципиальное значение имеет высокая чувствительность современных приборов, позволяющая надежно измерять светорассеяние в области концентраций, недоступной другим методам. С применением новой методики проведено исследование строения молекулярных цепей промышленного *цис*-1,4-полиизопрена (ПИ).

Экспериментальная часть

Исследовали два типичных промышленных образца (1, 2) и нестандартный образец (3) с низкими физико-механическими показателями. Значения среднечисленной молекулярной массы образцов, полученные методом ГПХ, равны соответственно $160 \cdot 10^3$, $230 \cdot 10^3$, $220 \cdot 10^3$, индекс полидисперсности – 5,2; 4,0; 4,8.

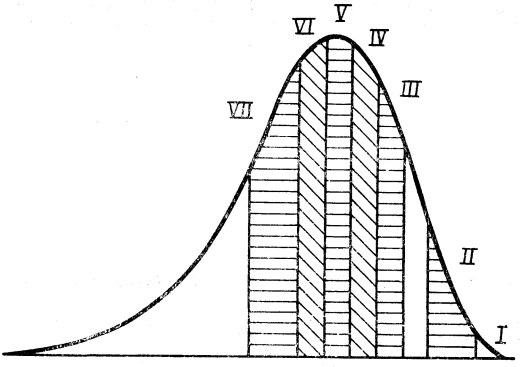


Рис. 1. Нормированная хроматограмма образца 1, штриховкой показаны отобранные фракции

Гель-хроматограф «Waters-200», снабженный четырьмя колонками со стирогелем (10^3, 10^4, 10^5, 10^6 А), был калиброван по стандартным образцам полистирола. Растворитель – толуол, температура колонок 30° С, скорость потока 1 мл/мин. При расчете величин средних молекулярных масс M_n^r, M_w^r, M_z^r использовали уравнение Марка – Куна для ПИ в толуоле $[\eta]=1{,}9\cdot10^{-4}\,M^{0{,}745}$ [1].

Светорассеяние отобранных фракций, отмеченных штриховкой на рис. 1, измеряли на фотоэлектрическом нефелометре «Fica-50» (вертикально поляризованный свет, интервал углов 20–150°, длина волны $\lambda_0=546$ нм). Высокая чувствительность прибора позволяла исследовать растворы с концентрацией $\sim10^{-5}$ г/мл. Отобранные из хроматографа фракции не содержали пыли и не требовали дополнительной очистки перед измерениями светорассеяния. Однако интенсивность рассеяния ПИ в толуоле слишком мала из-за близости показателей преломления полимера и растворителя. Поэтому растворы фракций были переведены в более подходящие для этой цели растворители – изопентан (образец 1), тетрагидрофуран (образец 2) и гексан (образец 3) – в условиях, исключающих возможность попадания пыли в кюветы.

Молекулярная масса M_w и z-средние размеры макромолекул $\langle\overline{R^2}\rangle_z$ рассчитывали по обычной методике [2, с. 30] непосредственно из графика угловой зависимости рассеяния

$$\frac{Hc}{I(\theta, c)} = f\left(\sin^2\frac{\theta}{2}\right)$$

в связи с весьма низкой концентрацией растворов c. Здесь H – оптическая константа, θ – угол рассеяния, $I(\theta, c)$ – интенсивность рассеяния раствора.

Обсуждение результатов

Результаты измерений молекулярных масс и размеров макромолекул во фракциях полиизопрена представлены в табл. 1. Однако этих данных еще не достаточно для того, чтобы судить о структуре макромолекул по соотношению их размеров и массы, так как полученные значения молекулярных параметров имеют разный тип усреднения. Необходимый переход от z-средних размеров молекул к средневесовым размерам с некоторым приближением можно сделать, приняв $\langle\overline{R^2}\rangle_w=\langle\overline{R^2}\rangle_z M_w/M_z$, если известен еще один параметр молекулярно-массового распределения (ММР) – z-средняя молекулярная масса M_z.

Недостающая информация о ММР фракций была получена методом ГПХ. С этой целью был проведен трехкратный запуск образца в хроматограф с отбором проб, что позволило накопить достаточное количество каждой фракции для последующего ГПХ-анализа. Найденные таким образом значения средних молекулярных масс приведены в табл. 1. Следует

Таблица 1

Фракция	Масс. доли	Светорассеяние		ГПХ			
		$M_w \cdot 10^{-3}$	$\langle R^2 \rangle_z^{1/2}$, нм	$\langle R^2 \rangle_w^{1/2}$, нм	$M_n^{\Gamma} \cdot 10^{-3}$	$M_w^{\Gamma} \cdot 10^{-3}$	$M_z^{\Gamma} \cdot 10^{-3}$
		Образец 1					
I	0,005	11000	100	–	3300	3600	4000
II	0,069	3600	85	–	1400	2300	3000
III	0,108	1800	69	60	1200	1800	2400
IV	0,111	1400	62	52	850	1500	2100
V	0,120	1100	56	47	660	1200	1700
VI	0,120	790	44	35	570	960	1500
VII	0,190	500	39	31	360	620	1000
		Образец 2					
I	0,087	3300	100	–	1700	2400	2800
II	0,075	1500	87	80	1200	1600	1900
III	0,160	720	68	56	440	800	1200
IV	0,084	580	61	48*	–	–	–
V	0,217	300	43	33	160	320	550
		Образец 3					
I	0,005	50000	160	–	–	–	–
II	0,050	17000	150	–	–	–	–
III	0,084	4200	90	–	–	–	–
IV	0,160	1300	57	–	–	–	–
V	0,074	750	48	–	–	–	–
VI	0,176	560	47	–	–	–	–

* При расчете $\langle \overline{R^2} \rangle_w$ предполагали, что полидисперсность фракции близка к таковой для фракций IV и VI.

отметить хорошую сходимость значений средневесовой молекулярной массы M_w^{Γ} с величинами M_w, определенными абсолютным методом, что свидетельствует о достаточно высоком качестве колонок и надежности калибровки гель-хроматографа.

Располагая данными о параметрах ММР фракций, можно перейти к средневесовым размерам молекул $\langle \overline{R^2} \rangle_w$ и построить график зависимости $\lg \langle \overline{R^2} \rangle_w = f(\lg M_w)$. Как видно из рис. 2, графики являются прямолинейными, им соответствуют следующие уравнения:

$$\overline{R^2} = 11 \cdot 10^{-18}\ M^{1,04},\ \text{ПИ} - \text{изопентан}, \quad (1)$$

$$\overline{R^2} = 4{,}6 \cdot 10^{-18}\ M^{1,16},\ \text{ПИ} - \text{тетрагидрофуран}. \quad (2)$$

Точки, соответствующие наиболее высокомолекулярным фракциям, заметно отклоняются вниз от общей зависимости, что прямо указывает на более компактную, разветвленную структуру этих фракций. Это подтверждается также формой графика обратной функции рассеяния фракций $P(\theta)^{-1} = f(x)$, имеющего значительную кривизну (см. рис. 3), характерную для разветвленных структур [2, с. 89]. Здесь x – обобщенный аргумент. Для сравнения на этом же рисунке приведен график, отвечающий линейным макромолекулам.

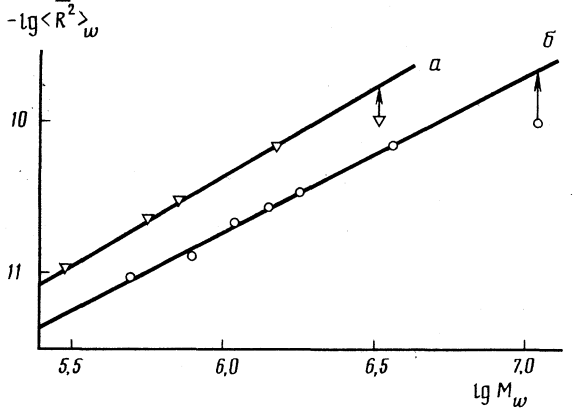


Рис. 2

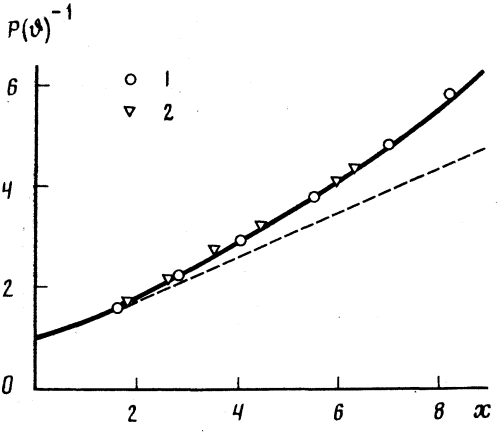


Рис. 3

Рис. 2. Зависимости размеров макромолекул полиизопрена от молекулярной массы в системах ПИ – тетрагидрофуран (*а*) и ПИ – изопентан (*б*)

Рис. 3. График обратной функции рассеяния фракции I образцов 1 и 2

Разветвленность макромолекул приводит к нарушению корреляции между гидродинамическим размером макромолекул и их молекулярной массой, что проявляется в сильном расхождении величины $M_w^г$, полученных на основе гель-хроматографического анализа, с их истинными значениями M_w. Так, для I фракции образца 1 рассчитанная из данных ГПХ средневесовая масса оказалась заниженной втрое (см. табл. 1).

Общепринятым параметром, характеризующим степень разветвленности полимера, является параметр g, определяемый как отношение среднеквадратичных размеров разветвленной и линейной макромолекул с одинаковой молекулярной массой: $g = \overline{R^2}/\overline{R^2_{лин}}$. Располагая данными о размерах и массе молекул разветвленных фракций, а также зная связь этих параметров для линейного ПИ, выраженную соотношениями (1), (2), легко рассчитать значения g. Они указывают (табл. 2) на значительную разветвленность высокомолекулярных фракций ($M > 3 \cdot 10^6$) промышленного ПИ.

Переход к более наглядной характеристике степени разветвленности — среднему числу точек ветвления на молекулу m — возможен, если для исследуемого полимера приемлема одна из моделей разветвленных структур, рассмотренных теоретически. Наличие в изопреновом каучуке раз-

Таблица 2

Характеристика разветвленных фракций полиизопрена

Образец	Фракция	$M_w \cdot 10^{-6}$	$\langle \overline{R^2} \rangle_z^{1/2}$, нм	$(\overline{R^2})^{1/2}_{\text{лин}}$, нм	g	m
1	I	11	100	150	0,44	8
2	I	3,3	100	130	0,59	3
3	I	50	160	400	0,16	50
	II	17	150	220	0,48	7
	III	4,2	90	100	0,80	1

ветвленных макромолекул обусловлено, по-видимому, процессами сшивки полимерных цепей по катионному механизму [3]. Приняв модель статистической тетрафункциональной разветвленности и воспользовавшись результатами расчетов, выполненных для этой модели [4], мы нашли значения m, отвечающие приведенным в табл. 2 значениям параметра g. Оказалось, что разветвленные фракции ПИ имеют от 3 до 8 узлов ветвления на молекулу. Следует иметь в виду, что учет полидисперсности разветвленных фракций привел бы к значительно меньшим величинам g и, соответственно, еще более высоким значениям m.

Нестандартный образец 3, как следует из данных табл. 2, отличается повышенной разветвленностью макромолекул (до 50 узлов), причем разветвленное строение, судя по форме графиков рассеяния, имеют также фракции II—V, что составляет более половины полимера. Аномальная степень разветвленности и обусловила ухудшение физико-механических показателей данного образца.

Разработанный и апробированный нами метод может быть применен для количественной оценки разветвленности макромолекул и установления корреляций между молекулярной структурой и свойствами полимеров.

Список литературы

1. *Chirico A.* // Chim. e. ind. 1964. V. 46. P. 53.
2. *Эскин В. Е.* Рассеяние света растворами полимеров. М.: Наука, 1986.
3. *Гречановский В. А., Поддубный И. Я.* // Докл. АН СССР. 1971. Т. 197. № 3. С. 647.
4. *Yamakawa H.* Modern Theory of Polymer Solutions. N. Y.: Harper Row. 1971 P. 420.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
синтетического каучука
им. С. В. Лебедева
Ленинград

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

Конкина Л. Н., Таганов Н. Г., Ермакова В. Д., Морозов В. А.

ПРИМЕНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИИ С КОМБИНИРОВАННЫМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АЗОТА В НИТРАТАХ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Методом жидкостной хроматографии с использованием рефрактометра и ИК-спектрофотометра изучено влияние природы исходной целлюлозы на распределение азота в нитрате целлюлозы (коллоксилине). Показано, что хроматография с двойным детектированием может использоваться для определения содержания азота в растворимой части образцов коллоксилинов.

Создание варианта эксклюзионной жидкостной хроматографии (ЭЖХ) с использованием комбинированного детектирования позволяет непрерывно измерять как массовую долю макромолекул определенного размера, так и концентрацию в них различных типов неоднородностей. В работе [1] рассматривается возможность применения в качестве дополнительной детектирующей системы ИК-спектрофотометра для получения данных о концентрации функциональных групп как функции молекулярного размера.

В данной работе предложен методологический подход к изучению распределения азота в нитрате целлюлозы (коллоксилине) с помощью двухдетекторной хроматографии.

Экспериментальная часть. Эксперимент проводили на жидкостном хроматографе фирмы «Spectra Physics» с применением рефрактометрического и ИК-спектрофотометрического детекторов. Для детектирования использовали полосу, обусловленную асимметричными валентными колебаниями нитратных групп в области 1650–1670 $см^{-1}$. Выбор данной полосы основан на результатах работы [2], в которой показано, что мольная экстинкция и интегральная интенсивность $\nu_{as}(NO_2)$ пропорциональны содержанию азота (в пределах 9,5–13,3%).

Для хроматографического разделения использовали систему, состоящую из двух колонок, заполненных силикагелем марки «Zorbax-PSM-S-trimodal» с размером пор 60.300.3000 Å. В качестве элюента использовали тетрагидрофуран, скорость подачи элюента – 0,5 мл/мин, объем петли – 100 мкл, концентрация вещества в пробе – 0,3 масс.%.

Обсуждение результатов. При интерпретации данных ЭЖХ нитратов целлюлозы (НЦ) с двойным детектированием возникают две задачи: 1) построение градуировочной зависимости, позволяющее на основании соотношения высот двух хроматограмм, соответствующих одному элюентному объему, рассчитать степень нитрации НЦ с соответствующей молекулярной массой; 2) сопоставление данных двух детекторов с целью совмещения участков двух хроматограмм, соответствующих одному и тому же инкременту элюата.

Для градуировки детекторов по содержанию азота можно использовать интегральные площади двух хроматограмм, проводя коррекцию между соотношением площадей с независимо измеренным содержанием азота в образцах. Площадь под хроматограммой от рефрактометра можно представить в следующем виде:

$$f = c(a + b\gamma), \qquad (1)$$

где c – концентрация НЦ, a, b – коэффициенты, характеризующие зависимость показателя преломления НЦ от степени замещения; γ – степень замещения.

Площадь под хроматограммой от ИК-детектора:

$$g=kc\gamma, \tag{2}$$

где k – коэффициент, характеризующий чувствительность детектора.

Связь между процентным содержанием азота в НЦ и степенью замещения можно записать в общем виде:

$$N=\alpha\gamma/(1+\beta\gamma), \tag{3}$$

где α, β – коэффициенты.

Разделив соотношение (1) на (2) и подставив γ из (3), получим

$$f/g=(b-\beta a)/k+\alpha a/kN. \tag{4}$$

Как следует из выражения (4), калибровочная зависимость в координатах f/g от $1/N$ носит линейный характер.

На рис. 1 представлены экспериментальные значения соотношений площадей хроматограмм двух детекторов от величины обратной содержанию азота ($1/N$), измеренного методом Лунге. Как видно из уравнения (4), отношение отсечения к тангенсу угла наклона теоретической зависимости f/g от $1/N$

$$d=b/\alpha a-\beta/\alpha \tag{5}$$

носит универсальный характер. Коэффициенты α и β универсальны и не зависят от чувствительности детекторов. Коэффициенты a и b зависят от чувствительности рефрактометра, но их отношение не зависит, так как соотношение рефракций отдельных групп атомов для всех рефрактометров одинаково. Для градуировки хроматографической системы были использованы промышленные образцы с содержанием азота 11,1–12,4%. Для уточнения градуировочной зависимости нами были привлечены данные работы [3], посвященной двухдетекторной хроматографии НЦ.

Корректировку прибора на дополнительное приборное уширение можно проводить, используя хроматограммы полистиролов. Связь между ИК-хроматограммой ($F(v)$) и хроматограммой от рефрактометра ($W(y)$) можно записать в общем виде:

$$F(v)=\int_{-\infty}^{+\infty} W(y)\,G^*(v, y)\,dy, \tag{6}$$

где $G^*(v, y)$ – дополнительное приборное уширение. Дополнительное приборное уширение представляет собой свертку экспоненты с функцией Гаусса, поэтому взаимосвязь между хроматограммами можно записать следующим образом:

$$F(v)=\int_{-\infty}^{+\infty} W(y)\,q\left(\frac{h}{\pi}\right)^{1/2}\int_{y}^{\infty}\exp[-q(x-y)-h(x-v-a)^2]\,dx\,dy, \tag{7}$$

где a – элюентный объем запаздывания ИК-хроматограммы относительно хроматограммы от рефрактометра.

Найдя параметры дополнительного приборного уширения, можно перейти к определению распределения азота во фракциях НЦ. Распределения азота во фракциях образцов НЦ, рассчитанные по разработанной программе, приведены на рис. 2. Из приведенных данных можно сделать вывод о том, что в образцах НЦ из древесной целлюлозы наблюдается более равномерное распределение азота во всем диапазоне молекулярных масс.

Хроматографию с двойным детектированием можно успешно использовать как метод количественного определения азота в растворимой части образца НЦ. Ниже приведены значения содержания азота в образцах коллоксилина из хлопковой и древесной целлюлоз, полученные по методу Лунге (N_1) и из данных хроматографии (N_2):

НЦ	хлопковая			древесная			
Образец	71	66	77	392	382	378	549
N_1, %	12,1	12,0	12,2	11,9	11,9	11,9	11,5
N_2, %	11,9	12,1	12,3	12,0	12,5	12,7	12,0

Из приведенных данных следует, что значения содержания азота в коллоксилине из хлопковой целлюлозы, полученные двумя различными методами (Лунге и хро-

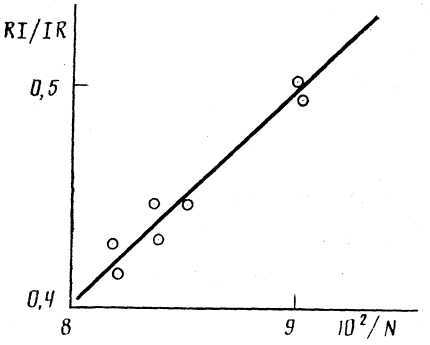


Рис. 1

Рис. 1. Градуировочная зависимость в режиме двухдетекторной хроматографии

Рис. 2. Распределение азота во фракциях коллоксилинов: *1* – хлопковая целлюлоза, *2* – древесная

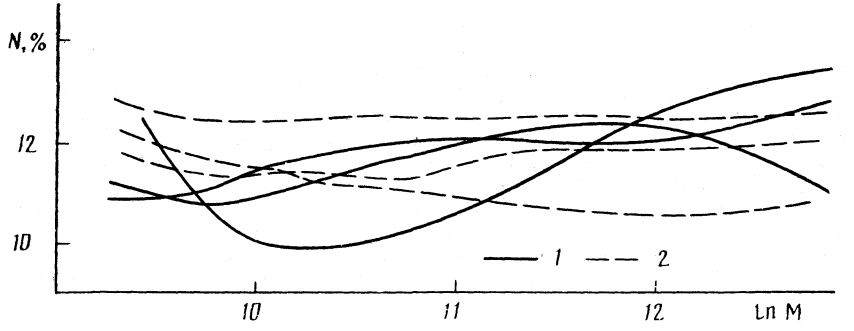


Рис. 2

матография) совпадают, а для коллоксилина из древесной целлюлозы (РБ) – существенно различаются. Это, вероятно, связано с наличием нерастворимой слабонитрованной части образца.

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать вывод о возможности использования хроматографии для изучения как распределения азота в образцах НЦ, так и для определения содержания азота в растворимой части образца.

Список литературы

1. *Terry S. L., Rodrigner F.* // J. Polym. Sci. 1968. V. 6. № 1. P. 191.
2. *Панов В. Н., Жбанков Р. Г., Малахов Р. А.* // Высокомолекуляр. соединения. 1970. Т. 12А. № 7. С. 1527.
3. *Wirsen A.* // Makromol. chem. 1988. B. 189. № 4. S. 833.

Академия наук СССР
Институт химической физики
им. Н. Н. Семенова
Москва

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

ХИМИЯ И НЕФТЕХИМИЯ

УДК 543.8 : 665.7

© 1991 г.

Стахина Л. Д., Томсон Г. А., Прозорова И. В., Манакова Р. А., Савиных Ю. В.

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ НЕФТИ

Сопоставлены данные об эффективности использования различных методов жидкостной хроматографии для выделения, анализа и изучения свойств кислых компонентов нефти. Показана высокая информативность этих методов для установления состава и свойств нефтяных кислот и фенолов.

Анализ компонентов нефти включает процессы выделения концентратов целевых продуктов, их последующее разделение и идентификацию. Все эти этапы включают хроматографические методы.

Колоночная хроматография получила наибольшее распространение для выделения кислых компонентов нефти — кислот и фенолов. Это связано с наличием в них активных групп, селективно адсорбирующихся на поверхностях, имеющих основные свойства. В качестве модифицирующих добавок, придающих основные свойства поверхности адсорбента, используются натриевые или калиевые соли слабых кислот — угольной, фосфорной, кремниевой [1] или непосредственно щелочь [2].

На примере деасфальтизата самотлорской нефти проведено сравнение методов выделения кислых компонентов (таблица). Как показывают полученные результаты, ионообменная хроматография позволяет раздельно выделить концентраты: фенолов, при использовании толуола и спирт-толуольной смеси, кислот — при использовании сильнополярных элюентов. Степени извлечения кислот и фенолов близки к 100%. При извлечении из нефти кислых компонентов на силикагеле, модифицированном щелочью, дополнительно образуется ~40% кислот, вероятно, за счет омыления сложных эфиров, содержащихся в нефти. Специальными опытами (перколяцией модельной смеси через обработанный щелочью силикагель) обнаружено, что фенолы необратимо сорбируются на носителе, видимо, за счет реакции окислительного сочетания; сложные эфиры подвергаются омылению (на 20% за 1 ч контакта с сорбентом).

С целью уменьшения побочных реакций, катализируемых щелочью, в качестве модифицирующих веществ апробированы менее основные неорганические соединения: карбонат натрия, гидрофосфат и фосфат калия, силикат калия. На основании данных тонкослойной и колоночной хроматографии модельных смесей установлено, что наиболее высокой об-

Элюент	Ваход, масс.%	Содержание, масс.%		Степень извлечения, отн.%	
		кислот	фенолов	кислот	фенолов
		Анионит			
1	98,0	0,00	0,00	0,0	0,0
2	1,4	0,00	0,40	0,0	56,0
3	0,4	0,00	1,10	0,0	44,0
3[a]	0,1	4,80	0,00	24,0	0,0
4	0,1	14,00	0,00	70,0	0,0
		Силикагель, модифицированный K_2SiO_3			
1	94,4	0,00	0,00	0,0	0,0
2	1,0	0,00	0,08	0,0	8,0
3	2,3	0,26	0,18	29,9	41,4
4	0,3	7,67	0,00	115,1	0,0
		Силикагель, модифицированный K_2SiO_3			
1	95,1	0,00	0,00	0,0	0
2	3,1	0,00	0,18	0,0	56,0
3	1,7	0,44	0,25	37,3	43,8
4	0,1	11,80	0,00	59,0	0

Элюенты: 1 — гексан, 2 — толуол, 3 — спирт — толуол (1 : 1), 3а — угольная кислота в растворе спирт — толуол, 4 — муравьиная кислота в растворе спирт — толуол

менной емкостью и селективностью к кислотам и фенолам обладает силикагель, модифицированный силикатом калия. Применение такого сорбента позволяет обеспечить практически полное извлечение кислот и фенолов из нефти.

Концентраты, выделенные на анионите или модифицированном силикагеле, характеризуются высоким содержанием кислот в кислых концентратах и довольно низким содержанием фенолов в фенольных концентратах. Наличие в них примесей свидетельствует, что адсорбция фенольных компонентов на основной поверхности происходит не в виде отдельных молекул, а в виде ассоциатов, имеющих избыточный отрицательный заряд.

Для очистки концентратов от сопутствующих примесей использована градиентно-вытеснительная хроматография на силикагеле с элюентом, состоящим из смеси семи растворителей различной полярности. Работу проводили на хроматографе «Градиент» (опытный образец БашНИИНП) с транспортным детектором [3]. При введении концентрата на сухой силикагель колонки и дальнейшем элюировании происходит последовательная десорбция компонентов, причем каждый растворитель десорбирует определенную группу соединений меньшей полярности, чем этот растворитель. В результате концентрат разделяется на семь фракций: насыщенных, ароматических (моно-, би-, полициклических) углеводородов, смол нейтральных и кислых, асфальтенов. Препаративный отбор фракций кислых и нейтральных смол позволил получить образцы кислот и фенолов достаточной чистоты для масс-спектрального анализа. Этот вариант градиентно-вытеснительной хроматографии применен также для предварительной оценки содержания кислых компонентов во вновь исследуемых нефтях.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) использована как для выделения концентратов кислых компонентов из нефтей, так и для их последующего анализа.

На хроматографе GPC (ЧСФР) на колонке с Сепароном с градиентным элюированием проведено выделение кислот и фенолов из самотлорской нефти. Первоначально носитель в колонке модифицируется обработкой в проточном режиме гидроокисью тетрабутиламмония в смеси с гексан — хлороформ — метанолом с концентрацией реагента 0,015%, соотношение растворителей 5 : 4 : 1 (элюент А). После такой обработки поверхность сорбента приобретает основные свойства и при нанесении образца связывает содержащиеся в нем кислые компоненты. Последующее элюирование слабополярной смесью растворителей гексан — хлороформ (9 : 1) приводит к десорбции неполярных компонентов нефти. В результате на сорбенте остаются только фенолы и кислоты. Фенолы десорбируются смесью гексан — хлороформ — метанол (7 : 2 : 1), кислоты — элюентом А. ВЭЖХ-анализ концентратов кислых компонентов проводили на колонках Сепарон-CN, Сепарон-NH_2, Сепарон-С-18.

Для разделения нефтяных кислот на цианофазе наиболее эффективен элюент циклогексан — хлороформ (4 : 1) с добавкой по 0,2% метанола и пропионовой кислоты. При отсутствии пропионовой кислоты все соединения кислого характера имеют большие времена удерживания, без метанола пики компонентов несимметричны, имеют «хвосты». С использованием этого элюента удалось провести разделение концентрата кислот самотлорской нефти и дистиллированных кислот бакинской нефти.

Для разделения нефтяных кислот и фенолов на аминофазе наиболее эффективными элюентами, обеспечивающими разделение смеси на максимальное число компонентов, являются хлороформ — метанол (1 : 5) с добавкой 2% пропионовой кислоты и вода — тетрагидрофуран — метанол (7 : 2 : 1) с добавкой 0,1% хлорида аммония. На циано- и аминофазах с подобранной системой элюентов наблюдается различный порядок выхода компонентов модельной смеси — на цианофазе порядок выхода компонентов определяется полярностью молекул — большее время удерживания имеют более полярные молекулы; на аминофазе порядок выхода компонентов определяется величиной органического радикала — молекулы с большим радикалом имеют большие времена удерживания. Поэтому для разделения нефтяных кислот и фенолов предпочтительнее использование аминофазы, так как эти соединения малополярны (по сравнению с голоядерными кислотами и фенолами).

Подбор условий обращенно-фазовой хроматографии на Сепароне-С-18 проводился раздельно для кислот и фенолов. Оптимальные условия разделения смеси фенолов: элюент метанол — вода (65 : 35), скорость подачи элюента 1 мл/мин. Сопоставление хроматограмм модельной смеси, концентрата фенолов каменно-угольной смолы и нефтяных фенолов позволило идентифицировать в концентратах фенолов ряд индивидуальных соединений.

Для разделения нефтяных кислот на Сепароне-С-18 наиболее оптимальной подвижной фазой является метанол — вода — тетрагидрофуран (8 : 1 : 1) с добавкой 5% 15%-ного водного аммиака. Однако исследованный концентрат кислот самотлорской нефти при этих условиях удается разделить только на три группы соединений, что не соответствует значительно большему типу кислот, определяемых масс-спектрометрией. Использование ион-парной хроматографии с противоионом тетрабутиламмония позволило разделить концентраты кислот на большее число групп,

причем хроматограммы концентрата кислот, выделенных на анионите, отличаются от концентрата кислот, выделенных на модифицированном силикагеле.

Эффективность извлечения нефти из недр зависит от взаимодействия ее компонентов с породой пласта. Жидкостная хроматография представляет удобный метод для моделирования динамических адсорбционных взаимодействий в пористых средах. Нами проведено изучение динамической адсорбции из органических сред нефтяных кислот и фенолов на породе нефтевмещающих пластов с использованием жидкостного хроматографа «Милихром». Полученные значения обратимой и необратимой адсорбции свидетельствуют, что при взаимодействии как фенолов, так и кислот с минеральной матрицей образуются полимолекулярные слои, причем при формировании первого монослоя адсорбция фенолов выше, чем кислот. Это свидетельствует о том, что энергия взаимодействия между молекулами нефтяных фенолов в растворе меньше, чем с активными центрами адсорбента. Для кислот получена обратная зависимость. При формировании второго и последующих слоев адсорбция кислот выше, чем фенолов. Это связано с тем, что адсорбция идет уже на слой адсорбированных молекул. Данные по адсорбции, а также расчет эффективного диаметра адсорбированных молекул и ориентация их на поверхности, позволяют создать модель граничного слоя, образованного нефтяными кислотами и фенолами.

Обобщая изложенное выше, можно отметить, что каждый из использованных методов обладает присущими ему достоинствами и недостатками. Однако совокупность методов позволяет проводить выделение и детальное исследование гетероорганических соединений нефти с получением обширной информации как по их строению, так и по свойствам.

Список литературы

1. *Стахина Л. Д., Савиных Ю. В., Сироткина Е. Е.* // Изв. СО АН СССР. 1986. Вып. 5. № 8. С. 86.
2. *Amat M., Arpino P., Orrit J. et al.* // Analysis. 1980. V. 8. № 5. P. 179.
3. *Соколова В. И., Колбин М. А.* Жидкостная хроматография нефтепродуктов. М.: Химия, 1984. С. 98–100.

Академия наук СССР
Сибирское отделение
Институт химии нефти
Томск

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.54 : 547.912

© 1991 г.

Коржов Ю. В., Головко А. К.

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В ИССЛЕДОВАНИИ СОСТАВА НЕФТЯНЫХ БИАРЕНОВ

Предложена схема двухступенчатой жидкостной хроматографии для выделения и концентрирования биароматических углеводородов из сырой нефти на Al_2O_3 и в тонком слое на силикагеле, позволяющая получить концентрат с содержанием основных компонентов не менее 95–97%. Показана эффективность разделения концентрата методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на обращенно-фазовом сорбенте для получения фракций алкилнафталинов, бифенилов, бифенилалканов, нафтенонафталинов. Приведен состав ВЭЖХ-фракций, определенный методом газо-жидкостной хроматографии, масс- и хромато-масс-спектрометрии.

Сведения об ароматических углеводородах (АрУВ) необходимы для совершенствования процессов нефтепереработки и нефтехимии, в геохимических исследованиях. Успех в изучении нефтяных ароматических УВ определяется эффективностью применяемых методов для их выделения и разделения на узкие структурно-однородные группы.

В данной работе продемонстрирована возможность использования хроматографических методов для выделения и разделения биароматических углеводородов из сырых нефтей с целью углубленного исследования их состава различными физико-химическими методами.

Экспериментальная часть

Выделение концентрата биаренов из сырой нефти проводили жидкостно-адсорбционной хроматографией на оксиде алюминия (γ-форма, активность II по Брокману) в стеклянной колонке 1000×10 мм. Соотношение массы адсорбента к массе разделяемого образца составляло не менее 50 : 1. Стартовый элюент – гексан. Отбор элюата проводили по 10 мл через 10 мин. Контроль за элюирующими АрУВ осуществляли по показателю преломления и УФ-спектрам. После выхода насыщенных углеводородов ($n_D^{20} \leqslant 1{,}49$) выделение ароматических УВ продолжали в градиентном режиме смесью гексан – бензол с увеличивающейся концентрацией последнего. Элюаты, в УФ-спектрах которых имелись полосы поглощения разных групп АрУВ, объединяли в промежуточные фракции. Фракцию биаренов составили элюаты со сходными УФ-спектрами (220–229 нм).

Концентрат биароматических УВ, а также промежуточные фракции подвергали дальнейшему разделению в тонком слое на силикагеле на пластинках Силуфол. Подвижная фаза – гексан : хлороформ (95 : 5 по объему). Хроматографические зоны биароматических углеводородов индицировали сравнением с величинами R_F индивидуальных алкилнафталинов. Объединенная фракция биароматических углеводородов после очистки концентрата и промежуточных фракций являлась объектом исследования.

Разделение концентрата биаренов на узкие аналитические фракции проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на колонке с обращенной фазой Сепарон-C_{18} в изократном режиме. В качестве подвижной фазы

использовали смесь метанол : вода (80 : 20), скорость элюирования 1 мл/мин. Длина колонки 15 см, диаметр 3,3 мм.

Ультрафиолетовые спектры снимали на спектрофотометре Specord-UV-VIS в растворе гексана, ГЖ-хроматограммы получали на приборе «Биохром-1», снабженном стеклянной капиллярной колонкой (25 м×0,22 мм) с OV-101, в режиме линейного программирования температуры от 45 до 275° С со скоростью 2 К/мин, газ-носитель — водород. Масс-спектры получали на приборе МХ-1310 с прямым вводом образца в ионизационную камеру. Оптимальная температура испарения образца — 200—220° С; энергия ионизирующих электронов — 70 и 18 эВ.

Масс-спектры отдельных компонентов ВЭЖХ-фракций получали на хромато-масс-спектрометре R10-10 фирмы NERMAG, снабженном системой сбора и обработки данных — Spectral-500. Хроматографирование осуществляли на кварцевой капиллярной колонке (26 м×0,22 мм) с фазой CPSIL-5, толщиной пленки 0,13 мм. Газ-носитель — гелий. Режим хроматографирования: начальная температура 120° С, конечная 250° С, скорость нагрева 2 К/мин, температура испарителя 240° С. Масс-спектры получали при энергии ионизирующих электронов 70 эВ, температуре ионизационной камеры и интерфейса 210° С. Время развертки спектра 0,5 с.

Обсуждение результатов

В зависимости от поставленных задач для выделения АрУВ из нефтей и широких (200—500° С) нефтяных фракций традиционно применяют элюентно-адсорбционную хроматографию на силикагеле и оксиде алюминия в колонке [1, 2] или тонком слое [3]. Однако в первом случае значительная продолжительность эксперимента делает способ малопригодным для изучения большого количества образцов. Во втором — достигается высокая экспрессность и эффективность выделения отдельных групп АрУВ, но малая навеска разделяемого образца требует наработки достаточного количества анализируемой фракции, что приводит к накоплению абсолютной и относительной погрешности анализа.

В основу выделения концентрата биароматических УВ нами положен метод двухступенчатой жидкостной хроматографии на оксиде алюминия и силикагеле в колонке и тонком слое. Последовательное использование этих двух методов позволяет избавиться от указанных недостатков, повысить эффективность разделения и экспрессность метода по сравнению с первым и увеличить количество разделяемого образца по сравнению со вторым способом. Причем вследствие разной адсорбционной активности оксида алюминия к АрУВ различной степени конденсации колец уже на первом этапе разделения в колонке достигается высокая степень концентрирования ароматических УВ в хроматографических фракциях. Дополнительное хроматографирование полученного концентрата в тонком слое позволяет удалить примеси моно- и триароматических УВ, сернистых соединений. Применяемые пластинки марки «Силуфол» обладают высокой эффективностью разделения (до 600—800 т. т. на 20 см пробега для *н*-гексилбензола) и хорошей селективностью по отношению к ароматическим углеводородам (1,5—1,8 для смеси *н*-гексилбензол — 1-метилнафталин).

В результате применения двухступенчатой схемы достигается две цели: практически полное выделение биароматических УВ из сырой нефти и получение образца с минимальным количеством примесей. По данным масс-спектрометрии концентрат содержит основных компонентов не менее 95—97% и состоит из: алкилнафталинов (C_nH_{2n-12}) — 27,8%, бифенилов и нафтенонафталинов (C_nH_{2n-14}) — 46,5%, динафтенонафталинов (C_nH_{2n-16}) — 22,4%, тиофенов ($C_nH_{2n-4}S$) — 2,0%, фенантренов и тринафтенонафталинов (C_nH_{2n-18}) — 1,3%. Количество примесей в виде тиофеновых и триароматических углеводородов находится в пределах 3%.

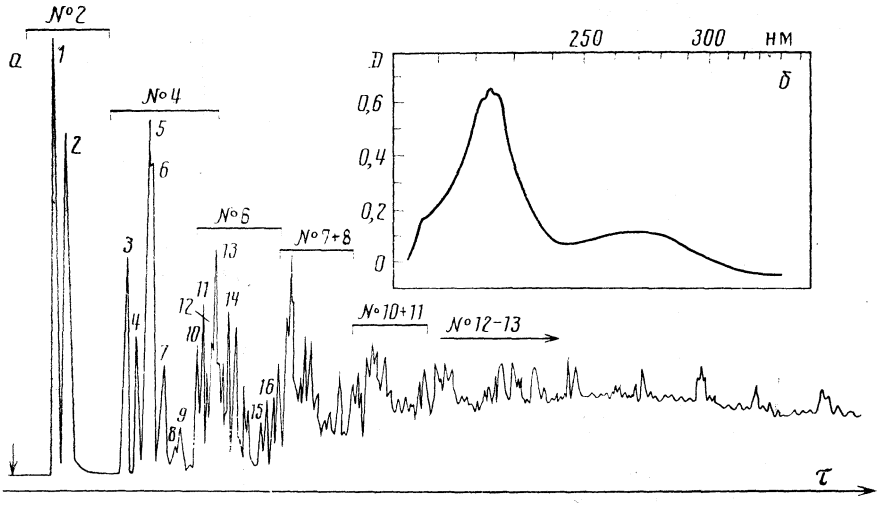


Рис. 1. Газовая хроматограмма (*а*) и УФ-спектр (*б*) концентрата биаренов нефти Оленьего месторождения: *1* и *2* – β- и α-метилнафталины, *3* – β- +α-этилнафталины, *4* – 2,6- +1,7-диметилнафталины, *5* и *6* – 1,3- и 1,6-диметил-, *7* – 1,4- +1,5-диметилнафталины, *8* и *9* – 1,2- и 1,8-диметилнафталины, *10* и *11* – β- и α-пропилнафталины, *12* – 1,3,7-триметил-, *13* – 1,3,6-триметил-, *14* – 1,2,5-триметилнафталины, *15* и *16* – β- и α-бутилнафталины

Полученный концентрат биаренов был непосредственно исследован методом газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) для определения в нефтях состава алкилнафталинов и других хроматографически разделяющихся компонентов. Так, в нефти Оленьего месторождения Западной Сибири методом ГЖХ при совместном введении индивидуальных соединений установлено наличие и порядок элюирования β- и α-метил- и этилнафталинов, всех десяти изомеров диметилнафталинов, некоторых триметилнафталинов (рис. 1). В то же время известно [3], что в нефтях присутствуют и другие соединения биароматической природы, исследование которых затруднено вследствие их совместного элюирования с алкилнафталинами. Бифенилы — соединения, содержащие в молекуле ароматические и нафтеновые кольца, зачастую составляют более 50% от суммы всех биаренов, однако их структурные особенности до сих пор не выяснены. До сегодняшнего дня не были обнаружены в нефтях бифенилалканы.

Для концентрирования этих компонентов нами применен метод высокоэффективной обращенно-фазовой жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), позволивший получить фракции, содержащие бифенилы и бифенилалканы в достаточных для дальнейших исследований концентрациях. Наряду с этим при ВЭЖХ было достигнуто более тонкое фракционирование исходного концентрата биаренов на алкилпроизводные и соединения гибридного строения. На рис. 2 приведена жидкостная хроматограмма концентрата биароматических УВ, получено 13 фракций. Величины удерживания отдельных ВЭЖХ-фракций были оценены по коэффициенту емкости (таблица), который рассчитывается по уравнению [4]

$$k=(t_R-t_0)/t_0,$$

где t_R — время удерживания хроматографического пика, t_0 — время удерживания несорбируемого компонента, рассчитываемое по уравнению

$$t_0=LR^2\pi 0{,}75/F$$

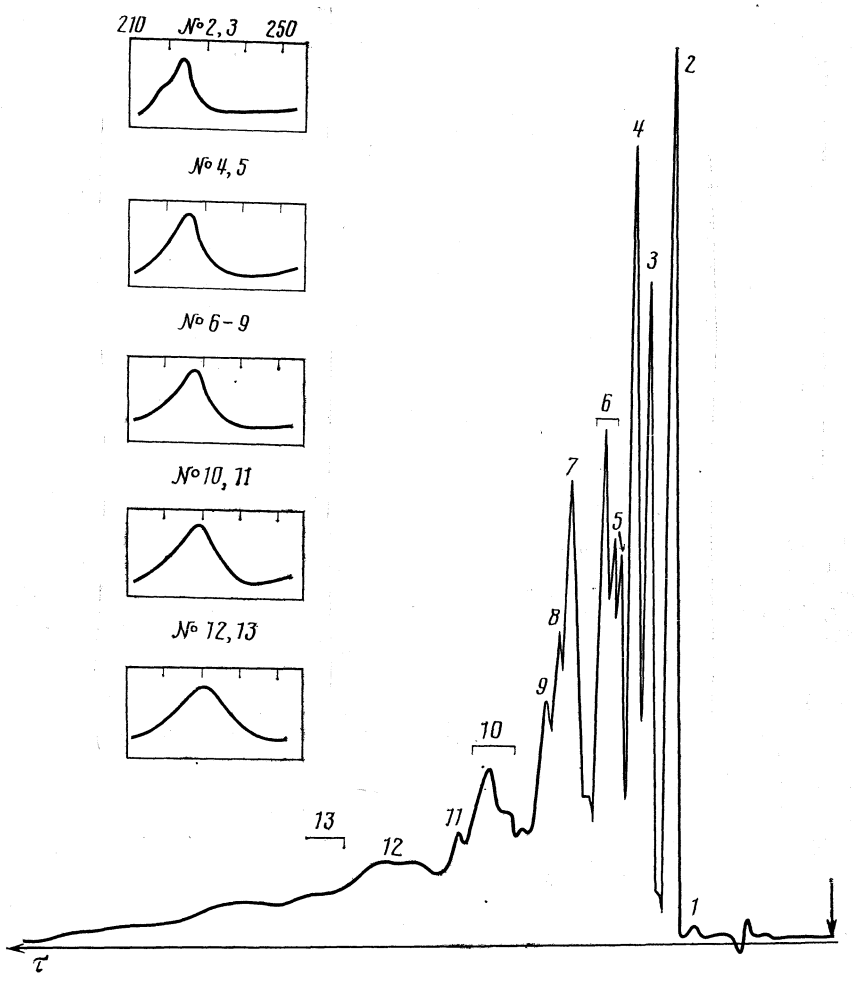


Рис. 2. Жидкостная хроматограмма концентрата и УФ-спектры хроматографических фракций биаренов

где L — длина колонки, см; R — радиус колонки, см; F — скорость потока, см^3/с; 0,75 — пористость колонки. Пять ВЭЖХ-фракций (3, 5, 9, 12 и 13) проанализированы методом масс-спектрометрии, остальные — хромато-масс-спектрометрии. На рис. 1 показаны области удерживания ВЭЖХ-фракций на газо-жидкостной хроматограмме, основной состав которых приведен в таблице (k — коэффициент емкости, ν — характеристические полосы поглощения в УФ-спектре).

По составу ВЭЖХ-фракций установлено, что время удерживания алкилбиароматических углеводородов на обращенной фазе увеличивается с ростом молекулярной массы, числом заместителей в молекуле, это согласуется с установленной ранее закономерностью разделения на неполярном сорбенте ряда органических соединений [4]. Батохромный сдвиг основных полос поглощения в УФ-спектрах, соответствующий повышению замещенности ароматического ядра, наблюдается с ростом времени удерживания фракции (рис. 2). Порядок удерживания различных изомеров одной молекулярной массы подчиняется более сложной закономерности. По-види-

Фракция	k	ν, нм	Состав
2	4,41	224, 218,5 (плечо)	1- и 2-метилнафталины (C_{11}), диметилнафталины (C_{12})
3	5,24	224, 218,5 (плечо)	бензонафтотиофены (C_{14-20}), гексациклонафталины (C_{17-22})
4	5,55	225,8–226	1-этилнафталин (C_{12}), изобутил-, бутил-, тетраметилнафталины (C_{14}), 2-метилбифенил, бифенилметан (C_{13})
5	6,07	225,8–226	пентациклонафталины (C_{15-22})
6	6,69	228	триметилнафталины (C_{13}), тетраметилнафталины (C_{14}), алкилбифенилы (C_{14-15})
7 + 8	7,63 8,05	228	пропилметилнафталины (C_{14}), алкилбифенилы (C_{15-16}), бифенилалканы (C_{15-16})
9	8,46	228, 210–213 (плечо)	алкилнафталины (C_{12-19}), алкилбифенилы (C_{13-19})
10 + 11	10,23 11,27	228,8–228,9	алкилнафталины (C_{15}), бифенилы, бифенилалканы (C_{16})
12	не опр.	230	алкилнафталины (C_{14-15}), алкилбифенилы (C_{14-17})
13	не опр.	230	

мому, важную роль здесь играют не только количество, но и строение заместителей в ароматическом ядре, изменяющие пространственную геометрию молекулы.

Все тиофеновые соединения элюируются одновременно во фракции 3. Из нафтенонафталинов меньшим временем удерживания характеризуются соединения с циклогексановым кольцом в молекуле (элюируются во фракции 3 совместно с тиофенами). Нафтенопроизводные с пентациклическим кольцом концентрируются во фракции 5.

В результате метод ВЭЖХ позволил получить фракции, обогащенные соединениями ряда бифенила, состав которых представлен гомологами C_{13}—C_{16}, среди которых, по данным хромато-масс-спектрометрии, превалируют диметил-, триметил- и метилэтилбифенилы. Причем соэлюирующиеся при газо-жидкостной хроматографии компоненты разделяются при ВЭЖХ и попадают в разные фракции, дальнейший анализ которых может быть проведен без затруднений. Важным достижением применения ВЭЖХ является обнаружение ранее неизвестных в нефтях соединений группы бифенилалканов, концентрирующихся во фракциях 7—11: 1,1-бифенилалкан, бифенилбутан, дитолилэтан и др. Правильность их идентификации подтверждена идентичностью масс-спектров, полученных с помощью хромато-масс-спектрометрии с имеющимися в каталоге [5] синтетических аналогов.

Таким образом, предлагаемая комплексная схема выделения и разделения нефтяных биароматических компонентов, включающая колоночное элюентно-адсорбционное разделение сырой нефти на оксиде алюминия, очистку фракций биароматических УВ в тонком слое на силикагеле и высокоэффективное разделение полученного концентрата на обращенно-фазовом сорбенте, позволяет получить достаточно простые по составу фракции, что облегчает дальнейшее исследование их состава.

Список литературы

1. *Остроухов С. Б., Арефьев О. А., Забродина М. Н.* // Методы исследования состава ароматических соединений нефти и битумоидов. М.: Наука, 1985. С. 33.
2. *Степина Л. Ф., Анкудинова В. П., Галишев М. А. и др.* // Методы изучения нефтей, природных газов, органического вещества пород и вод. Л.: Наука, 1980. С. 120.
3. *Cumbers K. M., Alexander R., Kadi R. J.* // J. Chromatogr. 1986. V. 361. P. 385.
4. *Энгельгардт Х.* Жидкостная хроматография при высоких давлениях. М.: Мир, 1980. С. 241.
5. *Петров Ал. А., Головкина Л. С., Русинова Г. В.* Масс-спектры нефтяных углеводородов. М.: Недра, 1986. С. 308.

Академия наук СССР
Сибирское отделение
Институт химии нефти
Томск

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 643.544 : 547.677

© 1991 г.

Иванов В. И., Мозжелина Т. К., Головко А. К.

ЖИДКОСТНО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ НЕФТЯНЫХ ТРИАРЕНОВ НА РАЗЛИЧНЫХ СОРБЕНТАХ

На примере модельных смесей и нефтяных триароматических углеводородов подобраны оптимальные условия проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии на различных сорбентах. Показана возможность отделения триароматических углеводородов от тиофеновых, три- и тетрациклических соединений на силикагеле с привитой NH_2-группой. Показана эффективность применения фазы ODS-CH для разделения гомологов алкилфенантренов.

Современные достижения в развитии жидкостной хроматографии продемонстрировали эффективное ее применение для разделения и анализа сложных многокомпонентных смесей. Особый интерес представляет использование высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в анализе нефтяных ароматических соединений, которые до сих пор остаются наименее изученными среди углеводородов (УВ) нефти. Молекулярный состав ароматических УВ во многом отражает геологическую историю формирования и преобразования нефтей [1—3], сведения о них также необходимы для совершенствования процессов нефтепереработки и нефтехимии.

В данной работе приведены результаты применения жидкостной хроматографии в изучении нефтяных триароматических УВ. Применяемые в практике изучения триаренов методы их выделения не позволяют получить образец без таких примесей как S- и N-содержащие соединения (дибензтиофены, нафтобензтиофены, карбазолы), трициклические (флуорены, аценафтены, дигидрофенантрены) и тетрациклические (пирены, флуорантены, бензфлуорены) компоненты, что затрудняет, а в отдельных случаях делает невозможным, идентификацию индивидуального состава исследуемого образца.

Экспериментальная часть

Триароматические УВ выделяли из сырых нефтей на оксиде алюминия (γ-форма, активность II по Брокману) градиентным элюированием системой гексан – бензол в стеклянной колонке длиной 70 см, с внутренним диаметром 10 мм. Соотношение нефть : адсорбент составляло не менее 1 : 50 (по массе). Фракции отбирали по 15 мл через 8—10 мин. Контроль за ходом разделения осуществляли по электронным спектрам поглощения. Элюаты, имеющие характерные для триароматических УВ полосы поглощения в УФ-спектрах (252—258, 294—300 нм), объединяли.

ВЭЖХ концентратов триаренов и модельных смесей на Separon CN, -NH_2, -C_{18} проводили на приборе GPS (ЧСФР) с использованием УФ-детектора с переменной длиной волны. В качестве подвижной фазы испытывали *н*-гексан, *н*-гептан, ацетонитрил (АЦН) : вода (65 : 35), метанол (МеОН) : вода (80 : 20), тетрагидрофуран (ТГФ) : вода (40 : 60), АЦН : ТГФ : вода (57,2 : 4,8 : 38 по объему). ВЭЖХ на обращенно-фазовых сорбентах ODS-T, ODS-CH (производства фирмы «Янако») проводи-

ли на жидкостном хроматографе L-4000W с применением УФ-детектора при λ= =254 нм. Подвижная фаза МеОН : вода (80 : 20), скорость элюирования 1 мл/мин. ГЖХ-анализ осуществляли на хроматографе «Биохром-1» на капиллярной кварцевой колонке длиной 20 м, с внутренним диаметром 0,2 мм с SE-52 в режиме линейного программирования температуры от 100 до 260° С со скоростью 2 К/мин. Газ-носитель – гелий.

Масс-спектры получали на приборе МХ-1310 с прямым вводом пробы при энергиях ионизации 70 и 18 эВ. УФ-спектры сняты на приборе Specord-UV-VIS в растворе гексана.

Обсуждение результатов

Анализ используемых исследователями различных вариантов выделения и разделения нефтяных триаренов, таких как жидкостная хроматография на стандартных и модифицированных сорбентах, экстракция, гель-проникающая хроматография, а также специально проведенное нами сравнение этих методов, показало преимущества применения жидкостной хроматографии на оксиде алюминия.

В составе выделенных этим способом концентратов триаренов по данным масс-спектрометрии и ГЖХ-анализа (рис. 1) присутствуют в качестве примесей сернистоароматические, три- и тетрациклические соединения, количество которых находится в разных образцах в пределах 15–30%.

Во многих работах [4–6] описано применение ВЭЖХ для разделения смесей полиароматических УВ преимущественно модельных соединений или несложных по составу смесей. Нами опробованы различные варианты ВЭЖХ для сложной смеси, какой является концентрат нефтяных триаренов, с целью отделения присутствующих соединений, не содержащих в молекуле три сконденсированных ароматических кольца и препятствующих анализу ароматических УВ.

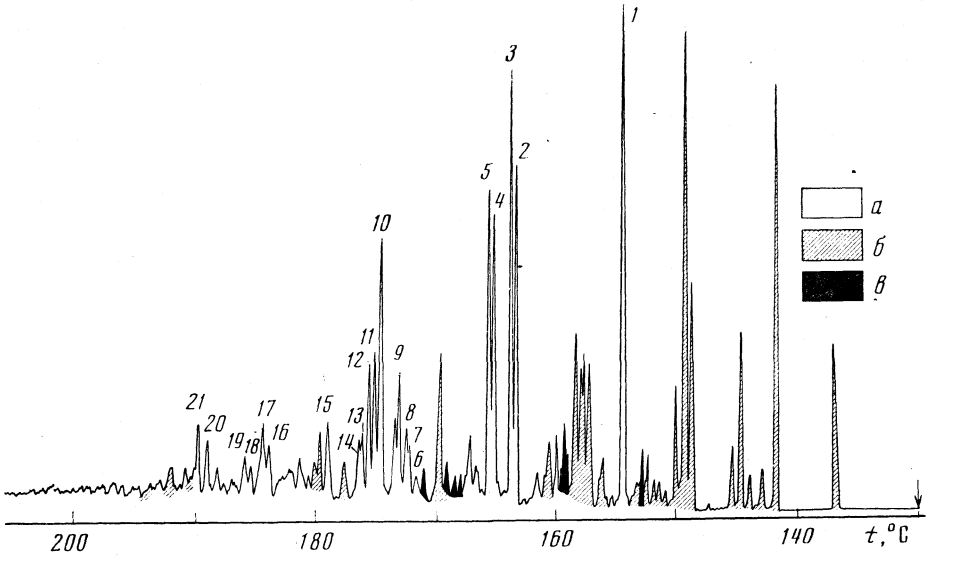
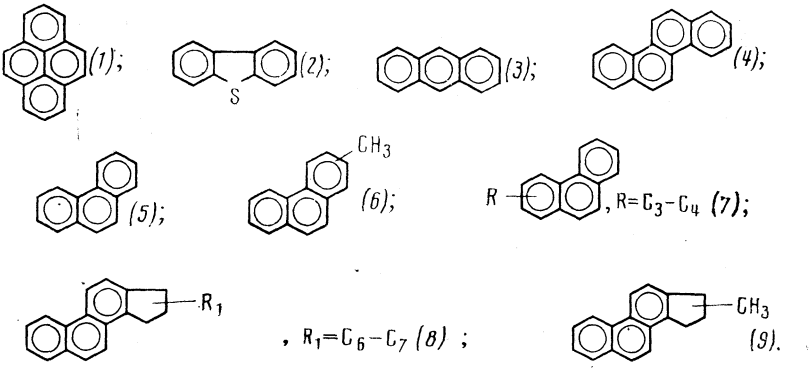


Рис. 1. Хроматограмма нефтяных триароматических углеводородов (SE-52, l=20 м, внутренний диаметр 0,2 мм, программирование температуры от 100 до 260° С со скоростью 2 К/мин, газ-носитель – гелий): *а* – триароматические УВ, *б* – три- и тетрациклические УВ, *в* – сернистоароматические соединения; *1* – фенантрен; *2–5* – метилфенантрены; *9–15* – этил-, диметилфенантрены; *6–20* – пропил-, триметилфенантрены; *21* – ретен

В качестве объекта исследования взята нефть месторождения Монги на о. Сахалин, а также три модельных смеси: 1 — дибензтиофен, антрацен, 3-метилдибензтиофен, 1,3-диметилантрацен, пирен; 2 — метилциклопентафенантрен, изомеры состава C_{25}—C_{27} триароматического стерана, C_3-фенантрены (продукты дегидрирования холестерина селеном); 3 — фенантрен, 1-метилфенантрен, 3-этилфенантрен, ретен, хризен.

На примере модельных и нефтяных смесей подбирали оптимальные режимы деления для вариантов адсорбционной нормально-фазовой и обращенно-фазовой ВЭЖХ, детектирования при различных длинах волн (λ = =254, 290, 313, 365 нм), а также скоростей и природы подвижной фазы. На основании проведенных экспериментов выбран режим деления смеси: λ=254 нм, подвижная фаза — *н*-гексан, скорость элюента — 1 мл/мин. Сравнение типа привитой фазы к силикагелю для нормально-фазовой хроматографии показало, что лучшую эффективность проявляет Separon-NH_2. На рис. 2 приведены жидкостные хроматограммы модельных смесей и нефтяных триаренов на этом сорбенте, пики соответствуют следующим соединениям:



На примере модельной смеси видно, что происходит дифференцирование антраценовых, дибензтиофеновых и пиреновых соединений. В нефтяной смеси первые две группы компонентов элюируются одним пиком с фенантреновыми УВ, наблюдается лишь отделение пиренов. Анализ ВЭЖХ-фракций смеси 3 методом ГЖХ и УФ-спектроскопии позволяет установить следующий порядок элюирования компонентов: метилциклопентафенантрены, триароматические стераны с длинными заместителями (C_6—C_7), алкилфенантрены.

С целью разделения концентрата триаренов на структурно-подобные группы нами опробован метод обращенно-фазовой разделительной ВЭЖХ, эффективность которой продемонстрирована в работах [6, 7]. Эффективность таких фаз в значительной мере зависит от типа силикагелей, применяемых силанизирующих агентов, плотности привитых фаз. Вследствие этого было проведено сравнение обращенно-фазовых сорбентов Separon-C_{18} (ЧСФР), ODS-T, ODS-CH и режимов хроматографирования.

Лучшие результаты для разделения триароматических УВ были получены при использовании ODS-CH, скорости элюирования 1 мл/мин, подвижной фазы MeOH : вода (80 : 20), выбранной нами из ряда: АЦН : вода (65 : 35); ТГФ : вода (40 : 60); АЦН : ТГФ : вода (57,2 : 4,8 : 38).

Жидкостная хроматограмма нефтяного концентрата приведена на рис. 3. По данным ВЭЖХ-фракций методами УФ-спектроскопии и масс-

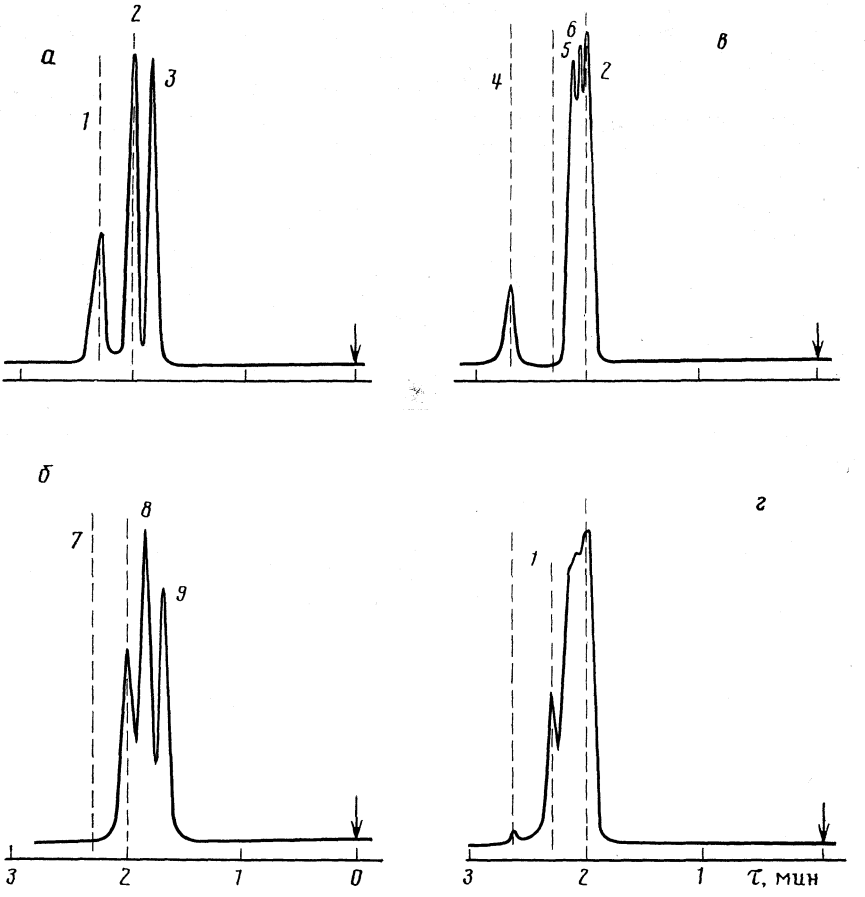


Рис. 2. Жидкостные хроматограммы модельных смесей *1*, *2*, *3* (*а*, *б*, *в*) и нефтяных триароматических УВ (*г*) на Separon NH_2 (подвижная фаза – АЦН : H_2O (65 : 35), λ=254 нм, скорость элюента=1 мл/мин)

спектрометрии определен состав каждой отдельной фракции, который приведен в таблице. Данные таблицы показывают, что выбранный сорбент проявляет высокую селективность при разделении алкилзамещенных фенантренов, которые концентрируются в отдельных фракциях ВЭЖХ по структурным признакам (количество и длина алкильных заместителей, положение заместителей в алкильном ядре). Четыре возможных изомера метилфенантренов концентрируются на данном сорбенте в четырех разных фракциях (5, 6, 7, 9). Для C_2-фенантренов наблюдается пять пиков на жидкостной хроматограмме (8, 11, 12, 13, 15). Фенантрены с тремя атомами углерода в алкильной части молекулы образуют всего два пика (14, 16), что связано с их меньшей концентрацией в нефтях.

Из данных таблицы и жидкостной хроматограммы (рис. 3) видно, что дигидрофенантрен (пик 1) и флуорен (пик 2) хорошо отделяются от ароматических углеводородов, в то время как их алкилзамещенные производные (пики 4 и 5) элюируются совместно с алкилфенантренами. Одинаковые с алкилфенантренами времена удерживания имеют и дибензтиофеновые соединения (пики 8 и 10).

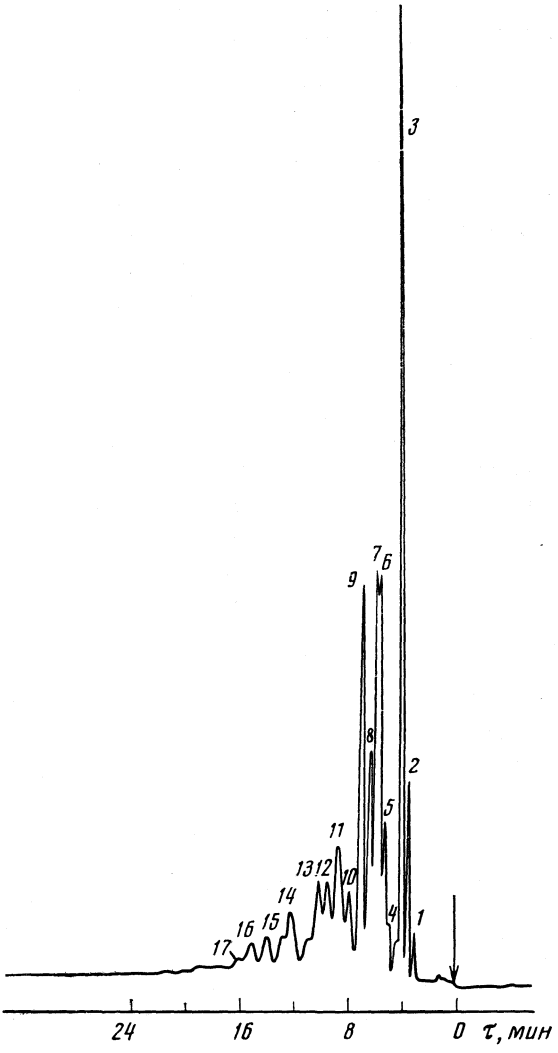


Рис. 3. Жидкостная хроматограмма концентрата нефтяных триароматических УВ на ODS-CH (подвижная фаза – MeOH : вода (80 : 20), λ=254 нм, скорость элюента=1 мл/мин): *1–17* – см. таблицу

Таким образом, данные деления концентрата на сорбенте ODS-CH показывают, что не удается достаточно четко отделить триароматические УВ от сопутствующих примесей. Поэтому делению на обращенно-фазовом сорбенте должны предшествовать обязательные этапы, позволяющие удалить компоненты, не содержащие в молекуле три сконденсированных ароматических ядра. Следует отметить, что эффективность разделения изомеров метилфенантренов и C_2-фенантренов позволяет использовать ВЭЖХ в геохимических исследованиях [1, 2].

В результате проведенных исследований предложена схема выделения и разделения нефтяных триароматических УВ, включающая последова-

Состав фракций ВЭЖХ нефтяных триаренов по данным УФ- и масс-спектроскопии (I – характеристические полосы в УФ-области, нм; II – характеристические ионы в масс-спектре)

Фракция	Компоненты	I	II
1	дигидрофенантрен	213, 218, 260, 297	—
2	флуорен	210, 221, 262, 300	166, 165, 83
3	фенантрен	212, 252, 294	178, 176, 152, 88
4	C_1-дигидрофенантрен	214, 222, 252, 299	–
5	C_1-фенантрен +	213, 254, 296	192, 189, 165, 96
	+ C_1-флуорены	219, 267, 300	180, 178, 165, 76
6	C_1-фенантрен	214, 254, 296	192, 189, 165, 96
7	C_1-фенантрен	214, 254, 296	192, 189, 165, 96
8	C_2-фенантрен +	225, 255, 300	–
	+ C_2-флуорены +	213, 300	
	+ дибензтиофен	232, 278, 288	
9	C_1-фенантрен	214, 254, 296	192, 189, 165, 96
10	C_1-дибензтифены	213, 235, 280, 288	–
11	C_2-фенантрен	213, 255, 302	206, 191, 189
12	C_2-фенантрен	213, 255, 302	–
13	C_2-фенантрен	213, 255, 301	–
14	C_3-фенантрен	213, 259, 302	–
15	C_2-фенантрен	213, 255, 302	–
16	C_3-фенантрен	213, 259, 302	–

тельное применение жидкостной хроматографии на оксиде алюминия для выделения триаренов из сырых нефтей, отделения тетраароматических УВ на силикагеле с привитой группой NH_2 и дифференцирования по степени алкилирования на силикагеле типа ODS-CH. Подобраны оптимальные условия хроматографирования. На модельных смесях установлен порядок элюирования производных триаренов, дибензтиофенов, пирена и хризена на силикагеле с NH_2-группой. Установлен порядок элюирования C_1-, C_2-, C_3-алкилфенантренов на силикагеле ODS-CH.

Список литературы

1. *Radke M.* // Petrol. Geochem. 1987. V. 2. P. 141.
2. *Radke M.* // Geochim. Cosmochim. Acta. 1982. V. 46. P. 1831.
3. *Riolo J., Hussler G., Albrecht P.* // Adv. Org. Geochem. 1985. Org. Geochem. 1986. V. 10. P. 981.
4. *Wise S. A., Chesler S. N., Hertz H. S.* // Anal. Chem. 1977. V. 49. P. 2306.
5. *Chmielowiec J., George A. E.* // Ibid. 1980. V. 52. P. 1154.
6. *Garriques P., Parlanti E., Willson H.* // J. Chromatogr. 1987. V. 395. P. 217.
7. *Garriques P., Saptorahardjo A., Gonzales G.* // Adv. Org. Geochem. 1985. Org. Geochem. 1986. V. 10. P. 959.

Академия наук СССР
Сибирское отделение
Институт химии нефти
Томск

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 665.662.3+543.544

© 1991 г.

Мин Р. С., Бейко О. А.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА ЭКСТРАКЦИИ СЕРНИСТЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ НЕФТИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии исследованы особенности экстракции сернистых и ароматических соединений из нефтяного сырья.

В последние годы наблюдается интенсивный рост исследований в области химии гетероатомных — сера-, азот-, кислород- и металлсодержащих органических соединений нефти. Несмотря на некоторые успехи в области химии неуглеводородных компонентов нефти, решение этой задачи требует дальнейшего глубокого изучения. Причины отставания этих исследований, в первую очередь, обусловлены сложностью природы самих гетероорганических компонентов, а также недостатками существующих методов их выделения, разделения и анализа.

Наиболее часто используются схемы, включающие комплекс различных методов: жидкостно-адсорбционная хроматография, комплексообразование, экстракция, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и сочетание этих методов в одной схеме. Большое внимание уделяется методу ВЭЖХ, что объясняется его информативностью, экспрессностью, относительно простой техникой выполнения и обработки результатов, а также его быстрым развитием. ВЭЖХ является перспективной при групповой дифференциации высококипящих нефтяных дистиллятов [1].

Возможность изучения группового химического состава экстрактов с использованием ВЭЖХ легла в основу данной работы.

Экспериментальная часть

Для ВЭЖХ-анализа использовали жидкостной хроматограф фирмы Янако, модель L-4000 W, с УФ-детектором при 254 нм. Анализ проводили с использованием колонки 250×2,6 мм с нормальной фазой, представляющей собой крупнопористый силикагель с химически привитыми группами NH/CN (размер частиц 10 мкм) с гептаном в качестве подвижной фазы в режиме постоянного давления (17 атм). Регистрацию хроматограмм осуществляли с помощью двухперьевого самописца, скорость диаграммной ленты – 2,5 мм/мин. В качестве эталонных соединений использовали ароматические углеводороды с числом колец от одного до четырех, сернистые соединения, а также нефтяные сульфиды, выделенные сернокислотной экстракцией (86% кислота) из дистиллята (200–300° С) нефти Кокайты (Южный Узбекистан) с последующей очисткой хроматографией на оксиде алюминия. Пробы для анализа готовили путем смешения 1 мкл образца с 1 мл растворителя (*н*-гептан). В колонку вводили 5 мкл раствора, приготовленного из 0,1—0,2 мкл раствора образ-

Таблица 1

Данные по удерживанию ароматических и сернистых соединений, полученные с использованием ВЭЖХ

Номер	Соединение	t_R, мин	$t_R - t_0$, мин	k'
1	α-Додецилтиофан	3,40	−1,36	−0,29
2	Бензол	4,56	−0,20	−0,04
3	Толуол	4,76	0,00	0,00
4	Тиофен	5,04	0,28	0,06
5	Нефтяные сульфиды	4,4–5,2	−0,36–0,44	−0,08–0,09
6	2-Пропил-3-метилбензотиофен	6,60	1,84	0,39
7	Нафталин	7,08	2,32	0,49
8	Дифенил	8,04	3,28	0,69
9	Флуорен	10,44	5,68	1,19
10	Дибензтиофен	11,16	6,40	1,34
11	Антрацен	13,52	8,76	1,84
12	Фенантрен	14,20	9,44	1,98
13	Пирен	18,32	13,56	2,85
14	Хризен	33,64	28,88	6,07

ца и 4,0–4,8 мкл растворителя. Данные по удерживанию эталонных соединений приведены в табл. 1.

Удерживание вещества определяли с помощью емкостного фактора, рассчитываемого по уравнению

$$k' = (t_R - t_0)/t_R,$$

где t_R – время удерживания вещества от момента ввода пробы до максимума хроматографического пика; t_0 – время удерживания слабосорбирующегося вещества (толуол); k' – удерживание вещества. Параметры удерживания рассчитывали в виде среднего значения не менее чем из пяти измерений. Содержание каждой группы соединений на хроматограмме рассчитывали в виде относительной величины путем суммирования высот всех пиков, Σh_i, и отношение высоты одного или суммы нескольких пиков, относящихся к одной группе соединений, к общей сумме всех пиков $h_i/\Sigma h_i$.

Исследуемые экстракты получали обработкой нефтяной фракции (s_0= =2,8 масс.%) диметилформамидом и его смесями с хлоридами лития или цинка с различной мольной долей их в растворе. Экстракцию проводили в две ступени при комнатной температуре при перемешивании в течение 10–15 мин, объемное отношение экстрагент : сырье составляло 2 : 1 [2].

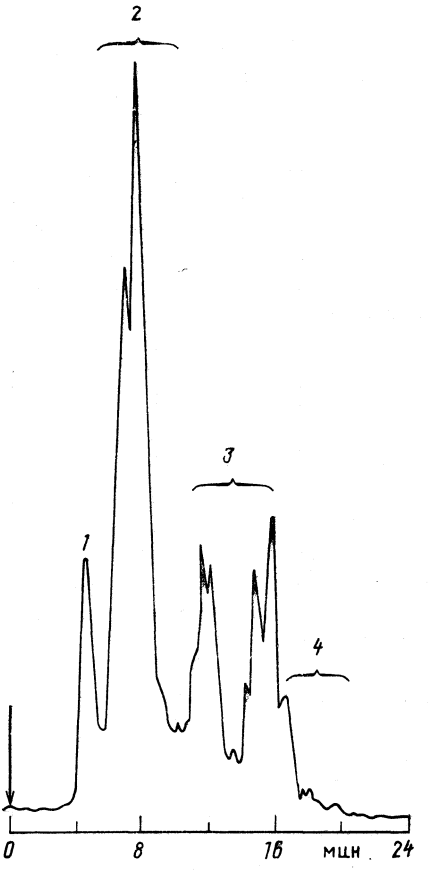
Полученные экстракты анализировали на жидкостном хроматографе. На рисунке представлена хроматограмма экстракта первой ступени обработки диметилформамидом (ДМФ) исходного дистиллята.

Обсуждение результатов

Ввиду сложности компонентного состава экстрактов (рисунок) анализ с помощью ВЭЖХ может быть проведен на уровне группового состава. С этой целью был определен порядок элюирования индивидуальных ароматических углеводородов и некоторых сернистых соединений как ароматического (тиофеновые производные), так и насыщенного характера (индивидуальный циклический сульфид и смесь нефтяных сульфидов), ожидаемых в продуктах экстракции. Как следует из данных табл. 1, время удерживания нефтяных сульфидов находится в диапазоне 4,4–5,2 мин, что соответствует области элюирования моноароматических углеводородов, алкилтиофена и алкилтиофана.

Удерживание ароматических углеводородов в условиях нормальнофазовой системы на сорбенте с привитыми полярными группами NH/CN

изменяется в соответствии с числом ароматических колец в молекуле. Эта же последовательность выхода наблюдается для производных тиофена: возрастание удерживания с увеличением числа ароматических конденсированных колец. Бензо- и дибензотиофены удерживаются несколько слабее, чем соответствующие им ароматические углеводороды, хотя, по-видимому, в смесях с последними вряд ли будут разрешаться. Важное значение в целях изучения распределения сернистых и ароматических соединений в продуктах экстракции имеет определение примерных границ элюирования отдельных групп соединений. К сожалению, отсутствие соответствующего набора индивидуальных соединений, различающихся как алкильным, так и нафтеновым замещением, не позволяет строго оценить эти границы. Поэтому условно приняты границы для групп, соответствующие средним величинам удерживания каждого класса соединений: сульфиды, $k'<0{,}09$; моноароматические, $0{,}09<k'<0{,}22$; биароматические, $0{,}22<k'<1{,}23$; триароматические, $1{,}23<k'<2{,}42$ и тетрааароматические соединения, $k'>2{,}42$. (Такое допущение возможно, так как в условиях нормально-фазовой ВЭЖХ разделение происходит по числу ароматических ядер в молекуле, независимо от типа алкильного обрамления. Нафтеновое замещение незначительно увеличивает удерживание сернистых и ароматических соединений [3].)



Хроматограмма ДМФ-экстракта, выделенного из нефтяной фракции (200–350° С): *1* – сульфиды, *2* – биароматические, *3* – триароматические, *4* – тетраароматические соединения (стрелкой отмечен ввод пробы)

В табл. 2 приведены результаты обработки хроматограммы экстракта первой ступени обработки ДМФ исходного дистиллята с указанием групп ароматических соединений (I – сульфиды, II – биароматические, III – триароматические, IV – тетраароматические соединения), диапазона изменения k' для каждой группы и относительного содержания c. Как следует из этих данных, экстракт состоит из сульфидов, би-, три- и тетрааароматических соединений с преобладанием би- и триароматических соединений (~90%). Так как обнаружение соединений, содержащихся в анализируемых экстрактах, проводили в УФ-области при длине волны 254 нм, то очевидно, что чувствительность различных компонентов, имеющих свои характеристичные области поглощения, значительно различающиеся, не будет пропорциональна содержанию их в пробе. Поэтому в данном случае можно говорить об относительном содержании исследуемых групп соединений. Кроме того

Таблица 2

Результаты ВЭЖХ-анализа ДМФ-экстракта, выделенного из нефтяной фракции

Соединение	k'	c, отн.%	Соединение	k'	c, отн.%
I	0,09	6 0	III	1,43–2,31	33,0
II	0,38–1,13	57,0	IV	2,48–3,08	4

Таблица 3

ВЭЖХ-анализ (c, отн. %) экстрактов, выделенных из нефтяного дистиллята бинарной системой $ZnCl_2$ (0,15; 0,5; 1,0 М) – ДМФ на 1-ой и 2-ой ступенях экстракции

Соединение	0,15 М		0,5 М		1,0 М	
	1	2	1	2	1	2
I	6,9	16,2	5,2	10,5	4,1	9,2
II	67,8	57,9	67,9	62,5	66,4	68,9
III	24,8	25,9	26,8	27,0	29,0	21,9
IV	0,5	–	0,1	–	0,5	–

следует отметить, что извлекаемые из нефтяного дистиллята сульфиды в данной области УФ-спектра имеют низкую чувствительность по сравнению с ароматическими углеводородами и поэтому далеко не отвечают их содержанию в продуктах реакции.

В табл. 3 представлены результаты ВЭЖХ-анализа экстрактов, выделенных с использованием бинарной системы хлорид цинка – диметилформамид. Как видно из этих данных, в зависимости как от концентрации соли в ДМФ, так и от ступени экстракции, изменяется распределение сульфидов и групп ароматических соединений. Содержание сульфидов в продуктах экстракции с увеличением концентрации хлорида цинка в диметилформамиде снижается на обеих ступенях обработки дистиллята, в то же время во вторую ступень экстракции среди сернистых соединений возрастает доля извлекаемых сульфидов по сравнению с первой ступенью.

На первой ступени экстракции содержание группы биароматических соединений (здесь и далее речь идет о сумме ароматических углеводородов и бензопроизводных тиофена) практически не изменяется с увеличением концентрации соли, на второй же ступени экстракции в области изменения концентраций хлористого цинка 0,15–0,5 М доля этой группы соединений несколько снижается по сравнению с первой ступенью обработки, но имеет тенденцию к незначительному увеличению при переходе от 0,5 к 1,0 М раствору. При концентрации хлористого цинка в ДМФ, равной 1,0 М, относительная доля биароматических соединений практически не изменяется и является максимальной по сравнению с более низкой концентрацией соли в растворителе.

Извлечение триароматических соединений в концентраты практически не зависит от ступени обработки, хотя для бинарных систем с 1,0 М раствором хлорида цинка наблюдается тенденция к снижению доли этой группы соединений. Для триароматической группы соединений наблюдается незначительное повышение степени извлечения с увеличением содержа-

Таблица 4

ВЭЖХ-анализ (*c*, отн. %) экстрактов, выделенных бинарной системой LiCl (0,15; 0,5; 1,0; 3,0 М) – ДМФ на 1-ой ступени экстракции

Соединение	0,15 М	0,5 М	1,0 М	3,0 М
I	5,4	4,9	3,1	0,9
II	56,5	62,6	53,3	48,0
III	35,0	30,2	40,0	49,4
IV	3,1	2,3	3,6	1,7

ния соли в ДМФ на обеих стадиях обработки за исключением второй стадии для 1,0 М раствора. В этих экстрактах практически отсутствуют тетраароматические соединения, хотя на первой ступени экстракции зафиксированы следовые количества этих соединений.

В табл. 4 представлены результаты ВЭЖХ-анализа продуктов выделения с использованием бинарной системы, содержащей хлористый литий. Как следует из этих данных, в зависимости от концентрации LiCl в ДМФ изменяется распределение групп в анализируемых экстрактах. Относительное содержание группы сульфидов в концентратах с увеличением концентрации соли в экстрагенте от 0,15 до 3,0 М снижается. В этом же интервале изменения концентрации хлористого лития содержание диароматических соединений максимально при 0,5 М растворе соли в ДМФ, а для триароматических соединений в этом случае наблюдается минимум по их извлечению.

Сопоставление данных ВЭЖХ-анализа продуктов экстракции ДМФ и раствором хлорида лития в нем показывает, что добавление соли способствует подавлению извлечения группы сульфидов и тетраароматических соединений и резкому повышению извлечения триароматической группы соединений, особенно при концентрации соли в интервале 1,0–3,0 М. Кроме того общая степень выделения сернистых и ароматических соединений в продуктах экстракции резко повышается с увеличением содержания соли лития в ДМФ. Этот вывод следует из сопоставления ВЭЖХ-профилей хроматограмм одинаковых по объему проб, вводимых в колонку, ДМФ-экстракта и экстрактов, полученных при использовании бинарных систем.

Резюмируя изложенное выше, можно сделать следующее заключение в отношении селективности экстракции бинарными системами ДМФ – хлорид металла. Выделение сернистых и ароматических соединений бинарной смесью, содержащей хлористый литий, приводит к получению концентратов с меньшим содержанием сульфидов и большим три- и тетраароматических соединений по сравнению с аналогичными концентратами, выделяемыми в присутствии хлористого цинка, в которых преобладают группы сульфидов и биароматических соединений и практически отсутствуют тетраароматические группы соединений.

Список литературы

1. *Dark W. A.* // J. Liquid Chromatogr. 1983. V. 6. № 2. P. 325.
2. *Мин Р. С., Савинова И. А., Плюснин А. Н.* Способ очистки нефтепродуктов от сероорганических соединений: А. с. 1502602 СССР // Б. И. 1989. № 31.
3. *Boduszynski M. M., Hurtubise R. J. et al.* // Anal. Chem. 1983. V. 55. № 2. P. 225.

Академия наук СССР, Сибирское отделение
Институт химии нефти, Томск

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

Серебренникова О. В., Мозжелина Т. К., Шульга А. М.

ПРИМЕНЕНИЕ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И РАЗДЕЛЕНИЯ ГЕОПОРФИРИНОВ

Предложена методика выделения и разделения ванадилпорфиринов из различных нефтей и горючих сланцев на основании сочетания различных приемов жидкостной хроматографии.

Порфирины, присутствующие в нефтях, горючих сланцах, а также рассеянном органическом веществе пород, представляют собой сложную смесь соединений, различающихся характером координирующего металла (наиболее распространены никель и ванадил), наличием или отсутствием дополнительного циклопентанового кольца (так называемые ДФЭП- и Этиотипы соответственно), суммарным числом углеродных атомов в боковых алкильных цепях (обычно от 6 до 20), характером и расположением отдельных алкильных заместителей в порфириновом макроцикле. Исследование особенностей химического строения порфиринов, характерных для органического вещества пород, проливающее свет на источник и условия преобразования органического вещества в недрах, требует выделения из смеси отдельных соединений. Используемый для этой цели метод хромато-масс-спектрометрии летучих производных геопорфиринов [1] требует проведения предварительного деметаллирования природных порфиринов. Это приводит, особенно в случае ванадиловых комплексов, к нежелательному изменению качественного и количественного состава анализируемых продуктов вследствие различной устойчивости отдельных соединений к деметаллированию.

Уже несколько десятилетий для разделения порфириновых комплексов с никелем и ванадилом успешно используется метод колоночной жидкостной хроматографии [2]. Методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) удалось частично разделить смесь нефтяных ванадилпорфиринов [3], а методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) — выделить из нефти месторождения Боскан ряд соединений [4]. В данной работе сочетание различных приемов жидкостной хроматографии было использовано для выделения и разделения ванадилпорфиринов из различных нефтей и горючих сланцев.

Выделение ванадилпорфиринов из нефтей проводили путем экстракции диметилформамидом и последующим отделением соэкстрагированных примесей хроматографированием экстрактов в стеклянных колонках с оксидом алюминия (IV степени активности по Брокману), а затем с силикагелем Л 100/160 мк. Элюирование осуществляли растворителями (гексан, бензол, хлороформ) и их смесями увеличивающейся полярности. За выходом из колонок металлопорфиринов следили спектрофотометрически

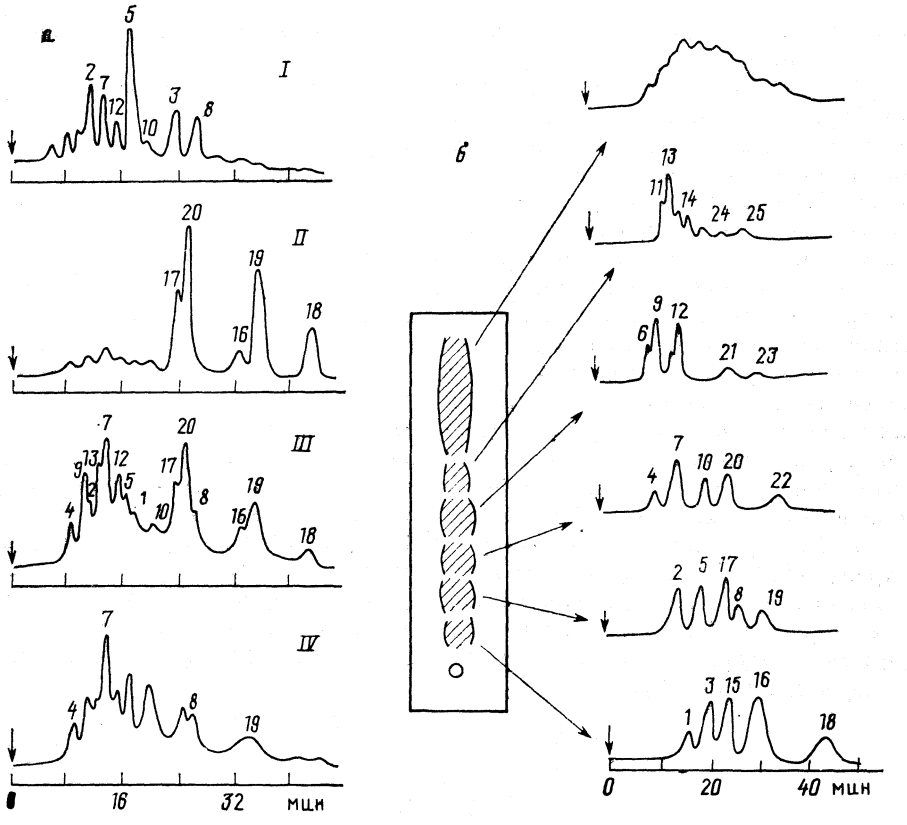


Рис. 1. ВЭЖХ концентратов ванадилпорфиринов (*а*) из горючих сланцев кембрийского (I) и ордовикского (II) возраста, нефтей Западно-Сургутского (III) и Усть-Балыкского (IV) месторождений, ТСХ ванадилпорфиринов из нефти Западно-Сургутского месторождения (*б*) и ВЭЖХ полученных фракций (*в*). Номера пиков соответствуют соединениям, приведенным в табл. 2

по появлению в спектрах элюатов полос поглощения при 550—555 нм (никелевые порфирины) и 570—575 нм (ванадиловые комплексы). Количественное разделение никелевых и ванадиловых порфиринов достигалось на колонке с силикагелем элюированием смесью гексан — бензол (1 : 3) и бензол — хлороформ (1 : 1) соответственно.

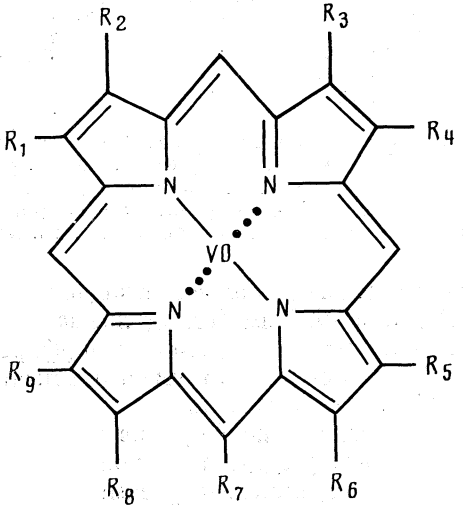
Дальнейшая очистка ванадилпорфиринов в колонках требует многократного повторения хроматографирования концентратов при чередовании колонок с различными неподвижными фазами. Значительно сокращает время, необходимое для получения чистых препаратов ванадилпорфиринов, хроматографирование их после отделения от никелевых комплексов в тонком слое. Тонкослойную хроматографию ванадилпорфиринов проводили на Силуфоле, используя в качестве подвижной фазы хлороформ на первой стадии. Снятые с сорбента ванадилпорфирины вновь наносили на Силуфол и проводили двумерную ТСХ в бензоле, затем в смеси гексан — ацетон (3 : 1). Сочетание этих операций позволило получить чистые препараты ванадилпорфиринов из широкого круга нефтей.

Из горючих сланцев ванадилпорфирины выделяли хроматографированием битумоидов, полученных горячей экстракцией хлороформом и смесью

этанол — бензол (1 : 1), в условиях, аналогичных принятым для экстрактов из нефтей.

Выделенные из различных природных объектов концентраты ванадилпорфиринов различаются сложностью смеси и, как следствие, требуют разных подходов к их разделению. При этом следует, однако, заметить, что набор основных соединений (пиков, проявляющихся на хроматограммах) качественно идентичен для всех исследованных объектов. Основные представители ванадилпорфиринов из битумоидов некоторых горючих сланцев могут быть выделены непосредственным разделением смеси методом ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой (рис. 1). Подобное разделение концентратов ванадилпорфиринов большинства нефтей невозможно вследствие существенного перекрывания хроматографических пиков. Исключает это затруднение введение дополнительной стадии — предварительного разделения смеси методом ТСХ на Силуфоле (элюент — бензол). Большинство получаемых в результате фракций содержит набор соединений, легко разделяемых на колонке с обращенной фазой. Проведение предварительного фракционирования ТСХ целесообразно и для ванадилпорфиринов из горючих сланцев, поскольку снижает их потери при разделении.

ВЭЖХ проводили на колонке ODS-T (4×250 мм, эффективность по пирену 5300 т. т.) жидкостного хроматографа L4000W фирмы Янако, используя в качестве подвижной фазы 5% хлороформа в метаноле с объемной скоростью 1 мл/мин. В аналогичных условиях были получены характеристики удерживания на колонке ODS-T ванадилпорфиринов известного строения (табл. 1):



Величину удерживания порфиринов на ODS-T оценивали по коэффициенту емкости (k'), который рассчитывали по уравнению

$$k' = (t_R - t_0)/t_0,$$

где t_R — время удерживания порфирина, с; t_0 — время удерживания несорбируемого компонента, с. В свою очередь

$$t_0 = L\pi R 0{,}75/F,$$

где L — длина колонки, см; R — радиус колонки, см; F — скорость потока, см^3/с; 0,75 — пористость колонки.

Таблица 1

Характер и положение заместителей в молекулах синтетических ванадилпорфиринов Этио-типа (*M* – молекулярная масса; Ме – метил, Эт – этил, Пр – пропил)

Индекс	*M*	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7	R_8	R_9	*k'*
A_1	431	Ме	Ме	Н	Н	Ме	Ме	Н	Н	Н	2,14
A_2	431	Ме	Н	Н	Ме	Ме	Н	Н	Н	Ме	9,95
A_3	487	Ме	Ме	Ме	Ме	Ме	Ме	Н	Ме	Ме	13,64
A_4	487	Ме	Н	Ме	Н	Ме	Эт	Н	Эт	Ме	4,43
A_5	501	Ме	Эт	Эт	Ме	Ме	Н	Ме	Н	Ме	6,13
A_6	515	Ме	Эт	Ме	Эт	Ме	Ме	Н	Ме	Ме	7,83
A_7	529	Ме	Эт	Эт	Ме	Ме	Ме	Ме	Ме	Ме	8,29
A_8	543	Ме	Эт	Ме	Эт	Ме	Эт	Н	Ме	Эт	4,86
A_9	543	Ме	Эт	Эт	Ме	Ме	Эт	Н	Эт	Ме	4,86
A_{10}	543	Ме	Ме	Ме	Ме	Ме	Пр	Н	Пр	Ме	9,52
A_{11}	555	Ме	Эт	Эт	Ме	Ме	Эт	Ме	Эт	Ме	4,86
A_{12}	599	Эт	Эт	Эт	Эт	Эт	Эт	Н	Эт	Эт	2,73
A_{13}	711	Пр	Пр	Пр	Пр	Пр	Пр	Н	Пр	Пр	6,13

Таблица 2

Величины удерживания геопорфиринов на колонке ODS-T

Номер	Индекс	*M*	Число β-заместителей			*k'*
			—Н	$-CH_3$	$-C_2H_5$	
			Порфирины Этио-типа			
1	C_{26}Э	459	2	6	–	6,13
2	$C_{27}{}^1$Э	473	2	5	1	4,73
3	$C_{27}{}^2$Э	473	1	7	–	9,57
4	$C_{28}{}^1$Э	487	2	4	2	3,63
5	$C_{28}{}^2$Э	487	1	6	1	6,98
6	$C_{29}{}^1$Э	501	Не определено			3,73
7	$C_{29}{}^2$Э	501	1	5	2	5,37
8	$C_{29}{}^3$Э	501	–	7	1	10,20
9	$C_{30}{}^1$Э	515	1	4	3	4,18
10	$C_{30}{}^2$Э	515	–	6	2	7,83
11	$C_{31}{}^1$Э	529	Не определено			4,52
12	$C_{31}{}^2$Э	529	–	5	3	6,04
13	C_{32}Э	543	–	4	4	4,86
14	C_{33}Э	557	Не определено			7,87
			Порфирины ДФЭП-типа			
15	C_{28}Д	485	2	4	1	8,26
16	C_{29}Д	499	1	5	1	12,41
17	$C_{30}{}^1$Д	513	1	4	2	9,19
18	$C_{30}{}^2$Д	513	–	6	1	17,33
19	C_{31}Д	527	–	5	2	12,50
20	C_{32}Д	541	–	4	3	9,53
21	$C_{33}{}^1$Д	555	Не определено			9,86
22	$C_{33}{}^2$Д	555	Не определено			13,43
23	C_{34}Д	569	–	–		11,14
24	C_{35}Д	583	–	–		11,22
25	C_{36}Д	597	–	–		11,48

В результате приведенных операций из нефтей и горючих сланцев выделено более 20 ванадилпорфиринов. Характеристики удерживания этих соединений, а также данные о характере их заместителей приведены в табл. 2.

Исследование разделения синтетических ванадилпорфиринов на колонке ODS-T показало, что наибольшей величиной удерживания среди рассматриваемой серии соединений характеризуется порфирин, все β-пиррольные положения которого замещены метильными группами. Замена метильных заместителей на пропильные приводит к снижению величины удерживания молекулы, еще больший эффект достигается заменой их на этильные (рис. 2). Внутри этих серий величина удерживания порфиринов снижается с увеличением молекулярной массы. Более низкие значения k' наблюдаются также при наличии в молекулах незамещенных β-Н.

Разделение изомеров на колонке ODS-T происходит в случае, когда они различаются набором заместителей. Разделяются также изомеры, различающиеся взаимным расположением заместителей в молекуле и содержащие несколько незамещенных β-Н. В случае соединений, в которых все β-пиррольные положения замещены, разделение таких изомеров не происходит. Влияние на удерживание порфиринов мезо-метильного заместителя зависит от его ближайшего окружения. Введение мезо-метильной группы в порфирин, где соседние β-пиррольные положения замещены этильными не оказывает влияние на величину удерживания молекулы, наличие мезо-метильного заместителя в окружении метильных групп и β-Н приводит к увеличению коэффициента k'.

Исследование ванадилпорфиринов, выделенных из нефтей и горючих сланцев, проведенное методами масс-спектрометрии (70 эВ) и электронной спектроскопии, позволило получить характеристики набора заместителей большинства соединений (табл. 2). Для ряда из них эти сведения подтверждены данными ПМР-спектроскопии (360 МГц) деметаллированных производных.

Основная масса геопорфиринов не имеет заместителей длиннее этильных. Отсутствуют мезо-заместители. Лишь девять соединений, присутствующие во всех исследованных объектах в незначительном количестве, имеют в масс-спектрах фрагментные ионы, характерные для отщепления более длинных цепей. Пропильный заместитель присутствует в молекулах $C_{29}{}^{1}Э$, $C_{31}{}^{1}Э$, $C_{33}{}^{1}Д$, $C_{34}Д$, бутильный — $C_{33}Э$, $C_{33}{}^{2}Д$, и $C_{35}Д$, гексильный — $C_{36}Д$ порфиринов.

Полученные данные о величинах удерживания геопорфиринов укладываются в рамки сделанных заключений о закономерном снижении величин k' порфиринов, характеризующихся одинаковым качественным набором заместителей, при увеличении их молекулярной массы. При этом геопорфирины Этио-серии, не имеющие заместителей длиннее этильных, могут быть подразделены на три группы: 1) соединения, все β-пиррольные положения которых содержат алкильные заместители, 2) соединения, имеющие одно незамещенное β-положение, и 3) соединения с двумя незамещенными β-протонами (рис. 3). Следует также отметить, что порфирины из разных групп, содержащие одинаковое число метильных заместителей в молекулах, характеризуются близкими величинами удерживания, незначительно снижающимися с увеличением числа незамещенных β-Н (рис. 3). Для соединений ДФЭП-серии характерно наличие двух групп полностью β-алкилзамещенных порфиринов и порфиринов с одним незамещенным β-положением. Внутри каждой из этих групп величина k' также снижается с увеличением молекулярной массы порфиринов.

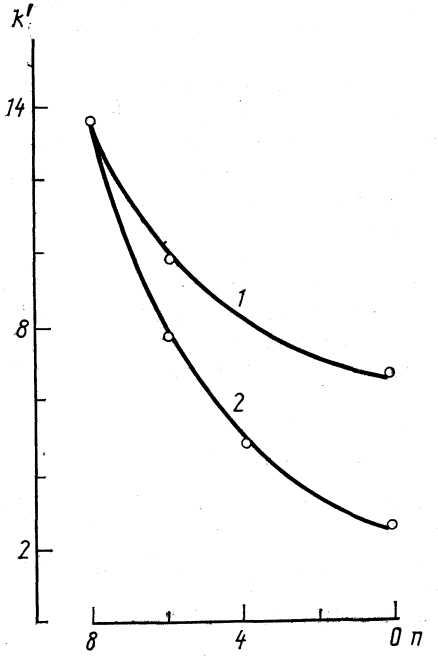


Рис. 2. Изменение k' ванадилпорфиринов при замене β-метильных заместителей (n – их число) на пропильные (*1*) и этильные (*2*)

Рис. 3. Зависимость величины удерживания порфиринов Этио (*а*) и ДФЭП (*б*) типов от числа атомов углерода в молекуле (N): *1–3* – группы порфиринов полностью β-алкилзамещенных (*1*), имеющих одно (*2*) и два (*3*) незамещенных β-Н; *4–7* – имеющих соответствующее число метильных заместителей в молекулах; *8* – синтетические, *9* – геопорфирины

Рис. 2

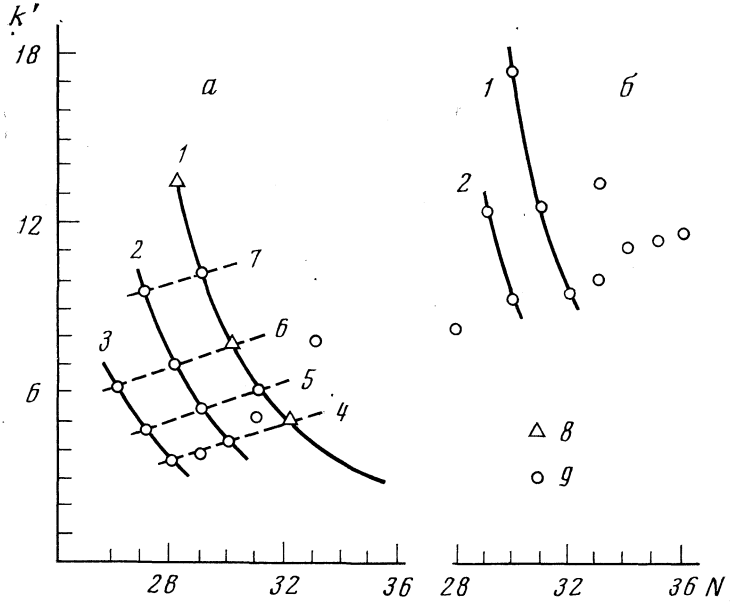


Рис. 3

Полученные данные о разделении синтетических порфиринов Этиотипа с пропильными группами и анализ величин удерживания соответствующих геопорфиринов, для которых не получено достоверных сведений о количественном наборе остальных заместителей, позволяют сделать некоторые предварительные заключения о возможных особенностях их

строения. Изомер $C_{31}{}^{1}$Э с более низким значением k' содержит по данным масс-спектрометрии пропильный заместитель, наличие которого вместо этильного, как следует из результатов хроматографического разделения синтетических порфиринов, приводит к увеличению k', которое может быть компенсировано наличием незамещенных β-Н. Время удерживания этого порфирина близко удерживанию порфиринов с четырьмя метильными заместителями. На основании этого можно предположить для $C_{31}{}^{1}$Э строение монопропилдиэтилтетраметилпорфирина, аналогично для $C_{29}{}^{1}$Э — монопропилмоноэтилтетраметилпорфирина.

Таким образом, проведенное исследование показало возможности использования различных вариантов жидкостной хроматографии для выделения, разделения и получения в ряде случаев дополнительной информации об особенностях строения геопорфиринов, характеристики набора и относительного содержания отдельных порфириновых соединений в различных природных объектах.

Список литературы

1. *Wolf G. A., Chicarelly M. J., Show G. J. et al.* // Tetrahedron. 1984. V. 40. N 19. P. 3747.
2. *Hodgson G. W., Ushijima N., Taguchi K. et al.* // Sci. Rept. Tohoku Univ. 3rd Ser. 1963. V. 8. N 3. P. 483.
3. *Антипенко В. Р., Серебренникова О. В., Титов В. И.* // Нефтехимия. 1979. Т. 19. № 3. С. 323.
4. *Haj Ibrahim S. M.* // J. Liquid Chrom. 1981. V. 4. № 3. P. 749.

Академия наук СССР
Сибирское отделение
Институт химии нефти
Томск

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544.2 : 852.4

© 1991 г.

Круглов Э. А., Ушакова З. И.

РАЗДЕЛЕНИЕ БЕНЗОЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ МЕТОДОМ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Исследовано разделение бензолкарбоновых кислот от бензойной до меллитовой и их метилпроизводных методом жидкостной хроматографии на силикагеле и обращенной фазе. Показано, что в выбранных условиях и в том, и в другом варианте разделяются практически все кислоты; не разделяются только кислоты с близкими константами диссоциации. При анализе конкретных смесей сильных поликарбоновых кислот предложено использовать нормально-фазовую жидкостную хроматографию, а для анализа более слабых моно- и дикарбоновых кислот – обращенно-фазовый вариант.

Ароматические кислоты и их производные широко используются в народном хозяйстве как мономеры для различных типов полимерных материалов, как гербициды, красители, биологически активные препараты в медицине и т. д. В настоящее время существуют многотоннажные производства бензойной фталевой, терефталевой, тримеллитовой, пиромеллитовой и других кислот и их производных. Существующие газохроматографические методы определения ароматических кислот, как правило, длительны и характеризуются достаточно высокими пределами обнаружения [1]. Большие трудности встречаются при анализе многокомпонентных смесей изомеров поликарбоновых кислот и их производных [2]. В большинстве случаев при анализе методом газовой хроматографии ароматические карбоновые кислоты предварительно переводят в метиловые эфиры. Жидкостная хроматография позволяет анализировать ароматические кислоты непосредственно.

До недавнего времени разделение ионных соединений типа кислот и аминов методом жидкостной хроматографии проводилось исключительно на ионообменных колонках [3, 4]. На работу этих колонок отрицательное влияние оказывают свойства полимерной матрицы ионообменника. Скорости массопередачи сравнительно низки, сжимаемость влажного геля не позволяет использовать высокий перепад давления. Следовательно, эти материалы не пригодны для быстрого разделения. В последнее время для разделения ионизируемых кислот все чаще и чаще стали применять обращенно-фазовую хроматографию на силикагеле с химически связанной алкильной цепочкой.

В настоящее время большой популярностью пользуются два вида обращенно-фазовой хроматографии: ионное подавление [5, 6] и ионное спаривание [7, 8]. В обоих видах важную роль играет ионное равновесие, влияющее на характер удерживания. Ионизация растворенного вещества регулируется контролем pH подвижной фазы за счет использования буферных растворов. Сущность метода ионного подавления заключается в

том, что хроматографическое удерживание контролируется через подавление ионизации ионной пробы путем регулирования pH элюента. В ионпарной хроматографии заряженное растворенное вещество и противоион, добавляемый к подвижной фазе, образуют ионную пару, экстрагируемую в органическую фазу.

При анализе ароматических кислот на силикагеле используют либо адсорбционную модификацию силикагеля [9], либо полярные добавки к подвижной фазе [10]. В качестве адсорбционных модификаторов используют воду, растворы солей, кислот и т. д. При модификации подвижной фазы на разделение кислот оказывают влияние вид полярной добавки и ее концентрация в элюенте.

В данной работе исследована возможность разделения сложных смесей ароматических поликарбоновых кислот от бензойной до меллитовой и их метилпроизводных обращенно-фазовой и нормально-фазовой жидкостной хроматографией.

Экспериментальная часть

Исследование проводили на жидкостном аналитическом хроматографе Альтекс, модель 330 с УФ-детектором при длине волны 254 нм. Разделение бензолкарбоновых кислот в обращенно-фазовом варианте осуществляли на колонке 250×4,6 мм с сорбентом зорбакс ОДС (фирма «Дюпон», США) зернением 7,5 мкм. Подвижная фаза – 0,01 М фосфатный буферный раствор с pH=3, содержащий 30 об.% метанола, со скоростью элюирования 1 мл/мин. Разделение кислот в нормально-фазном варианте проводили на колонке 250×4,1 мм с сорбентом зорбакс сил зернением 7,5 мкм. Подвижная фаза: гексан – ледяная уксусная кислота – диизопропиловый эфир в объемном соотношении 50 : 20 : 30 с добавкой 0,04 мМ серной кислоты. Колонки и детектор не термостатировали. Объем пробоотборной петли составлял 20 мкл.

Обсуждение результатов

Трудность решаемой задачи заключается в том, что анализируемые смеси многокомпонентны. К примеру, бензолкарбоновых кислот и их изомеров насчитывается 12, а метил- и диметилпроизводных *о*-фталевой кислоты – 5. Кроме того, в составе анализируемых смесей присутствуют изомеры кислот, близкие по своим физико-химическим свойствам, и кислоты, свойства которых значительно отличаются. Данные табл. 1 [11] показывают, например, что константы диссоциации бензойной и меллитовой кислот отличаются друг от друга на несколько порядков.

Таблица 1

Константа диссоциации K бензолкарбоновых кислот (N – положение карбоксильных групп)

Кислота	N	K
Бензойная	1	$6{,}2\cdot10^{-5}$
Фталевая	1, 2	$1{,}1\cdot10^{-3}$
Изофталевая	1, 3	$2{,}0\cdot10^{-4}$
Терефталевая	1, 4	$2{,}9\cdot10^{-4}$
Гемимеллитовая	1, 2, 3	$1{,}6\cdot10^{-3}$
Тримеллитовая	1, 2, 4	$3{,}0\cdot10^{-3}$
Тримезиновая	1, 3, 5	$7{,}5\cdot10^{-4}$
Пиромеллитовая	1, 2, 4, 5	$1{,}2\cdot10^{-2}$
Меллитовая	1, 2, 3, 4, 5, 6	$4{,}0\cdot10^{-2}$

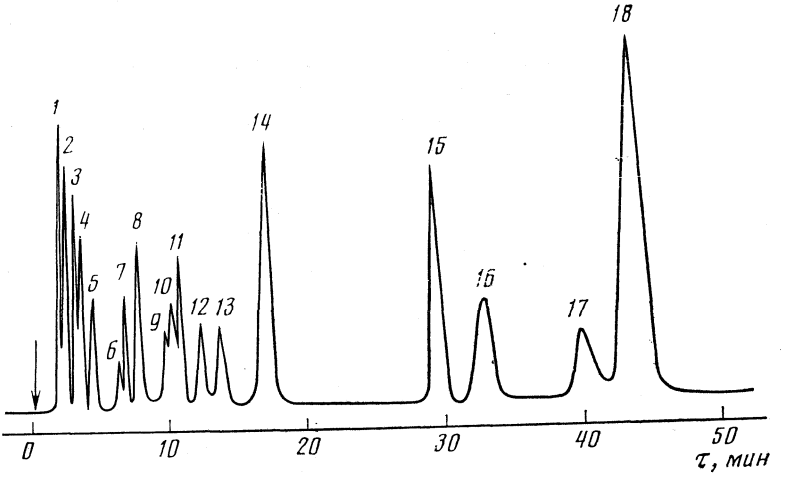


Рис. 1. Разделение бензолкарбоновых кислот и их метилпроизводных на обращенной фазе (стрелкой отмечен ввод пробы): *1* – меллитовая, *2* – пиромеллитовая, *3* – тримеллитовая, *4* – гемимеллитовая, *5* – фталевая, *6* – тримезиновая, *7* – 4-метилфталевая, *8* – терефталевая, *9* – изофталевая, *10* – 3-метилфталевая, *11* – 3,6-диметилфталевая, *12* – 4,5-диметилфталевая, *13* – 2,5-диметилтерефталевая, *14* – бензойная, *15* – триметилфталевая, *16* – *о*-толуиловая, *17* – 4,6-диметилизофталевая+2,4-диметилизофталевая, *18* – *м*-толуиловая+*п*-толуиловая

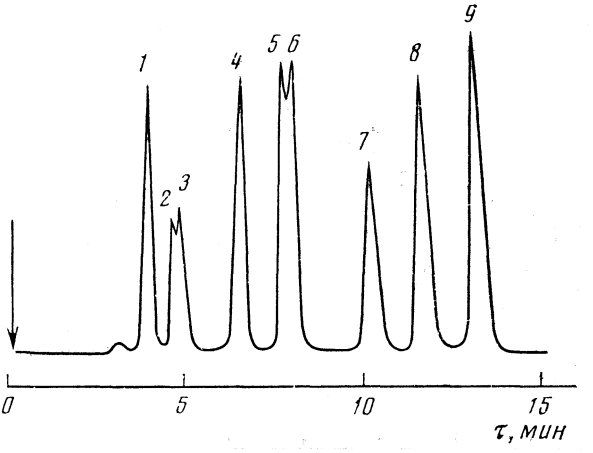


Рис. 2. Разделение бензолкарбоновых кислот на силикагеле: *1* – бензойная, *2* – терефталевая, *3* – изофталевая, *4* – *о*-фталевая, *5* – тримезиновая, *6* – тримеллитовая, *7* – пренитовая, *8* – гемимеллитовая, *9* – пиромеллитовая

При использовании ионной хроматографии для разделения кислот с такими различными константами диссоциации разница во временах удерживания кислот настолько велика, что для анализа таких систем необходимо применять градиентное элюирование, что связано со значительными экспериментальными трудностями.

Метод обращенно-фазовой хроматографии контролирует удерживание через подавление ионизации кислот за счет применения фосфатного буфера в подвижной фазе. В результате кислоты сильнее удерживаются и элюируются в виде четких пиков. Ароматические кислоты выходят из

Таблица 2

Время удерживания t_R бензолкарбоновых кислот (I – зорбакс ОДС, II – зорбакс сил)

Кислота	t_R, мин		Кислота	t_R, мин	
	I	II		I	II
Меллитовая	1,9		3,6-Диметилфталевая	10,3	
Пиромеллитовая	2,1	13,1	4,5-Диметилфталевая	12,8	
Пренитовая		10,2	2,5-Диметилтерефталевая	14,3	
Тримеллитовая	3,5	8,0	Бензойная	16,8	3,9
Гемимеллитовая	3,8	11,1	Триметилфталевая	28,5	
Фталевая	4,6	6,6	*о*-Толуиловая	32,3	
Тримезиновая	5,7	7,7	4,6-Диметилизофталевая	40,2	
4-Метилфталевая	6,2		2,4-Диметилизофталевая	40,7	
Терефталевая	7,4	4,6	*м*-Толуиловая	43,2	
Изофталевая	9,6	4,8	*п*-Толуиловая	43,7	
3-Метилфталевая	9,8				

колонки в порядке уменьшения константы диссоциации их. Методом нормально-фазовой хроматографии сильно удерживаемые силикагелем поликарбоновые кислоты элюируются из колонки подвижной фазой, содержащей в качестве модификатора серную кислоту. Порядок выхода кислот обратный методу обращенно-фазовой хроматографии. На рис. 1, 2 представлены хроматограммы разделения бензолкарбоновых кислот и их метилпроизводных двумя вариантами.

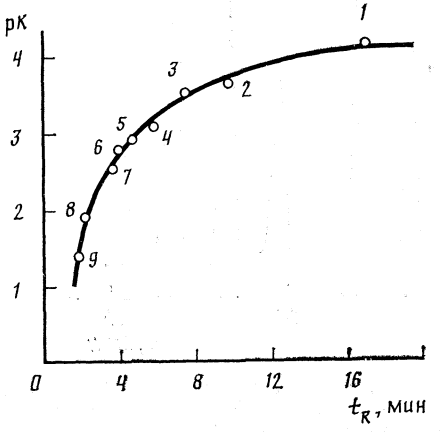


Рис. 3. Зависимость времени удерживания бензолкарбоновых кислот от pK на обращенной фазе: *1* – бензойная, *2* – изофталевая, *3* – терефталевая, *4* – тримезиновая, *5* – фталевая, *6* – гемимеллитовая, *7* – тримеллитовая, *8* – пиромеллитовая, *9* – меллитовая

Показано, что в выбранных условиях и в том, и в другом варианте разделяются практически все кислоты. Не разделяются кислоты с близкими константами диссоциации. Недостаточно хорошо разделяются сильные поликарбоновые кислоты на обращенной фазе. В табл. 2 приведены времена удерживания индивидуальных кислот. Метод контроля ионизации не всегда применим к сильным кислотам, так как для их разделения целесообразно использовать pH в пределах 1—2.

Но при значениях pH<2,5 наблюдается коррозия аппаратуры и разрушение химически связанной неподвижной фазы. Чем более полярен буфер, тем сильнее удерживаются ионизированные вещества модифицированными силанольными группами сорбента. Поэтому оптимальным вы-

бран фосфатный буферный раствор с pH=3. Для элюирования сильных кислот на силикагеле необходимо использовать большую концентрацию полярных добавок в подвижной фазе. На рис. 3 представлена зависимость времени удерживания кислот от pK на обращенной фазе.

Таким образом, исследовано разделение ароматических карбоновых кислот методом жидкостной хроматографии на обращенной фазе C_{18} и силикагеле. Определены времена удерживания 20 бензолкарбоновых кислот и их метилпроизводных. Показано, что при анализе конкретных смесей сильных поликарбоновых кислот желательно использовать нормально-фазовую жидкостную хроматографию, а для анализа более слабых моно- и дикарбоновых кислот лучше применять обращенно-фазовый вариант.

Список литературы

1. *Улинская Н. Н., Клещева М. С.* // Экспресс-информация. Сер. Охрана окружающей среды и очистка от промышленных выбросов. М.: Изд. ЦНИИТЭнефтехим, 1981. № 6. С. 1.
2. *Круглов Э. А., Цыпышева Л. Г., Харлампович Г. Д. и др.* // Журн. аналит. химии. 1980. Т. 35. № 1. С. 122.
3. *Hanai T., Tran K. C., Hubert J.* // J. Chromatogr. 1982. V. 239. P. 385.
4. *Naikwadi K. P., Rokushika S., Hatano H.* // Chromatographia. 1984. V. 18. № 11. P. 633.
5. *Jones P., Wellington A.* // J. Chromatogr. 1981. V. 213. № 3. P. 357.
6. *Bojsova E.* // Petrochemia. 1984. V. 24. № 4. P. 85.
7. *Bidlingmeyer B. A.* // J. Chromatogr. Sci. 1980. V. 18. № 10. P. 525.
8. *Арапскова А. А., Яшин Я. И.* // Тез. докл. 4 Всесоюз. симп. по молекулярной жидкостной хроматографии. Алма-Ата, 16–20 июня, 1987. М.: Изд. ИФХ АН СССР, 1987. С. 55.
9. *Schwarzenbach R.* // J. Chromatogr. 1980. V. 202. № 3. P. 397.
10. *Brugman W. J. Th., Heemstra S., Kraak J. C.* // Ibid. 1981. V. 218. P. 285.
11. *Физер Л., Физер М.* Органическая химия. М.: Изд-во иностр. лит., 1949. С. 595.

Научно-исследовательский институт
нефтехимических производств
Уфа

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544.4.547.58

© 1991 г.

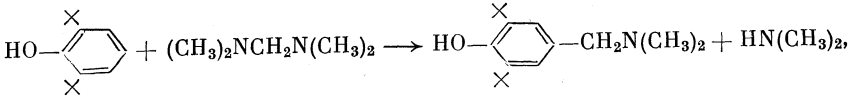
Круглов Э. А., Ушакова З. И.

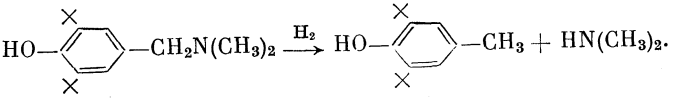
ИССЛЕДОВАНИЕ ЦВЕТООБРАЗУЮЩИХ ПРИМЕСЕЙ В ПРОДУКТАХ ПРОИЗВОДСТВА ИОНОЛА

Методом жидкостной хроматографии исследован состав технологических потоков производства ионола через основание Манниха с целью выявления цветообразующих примесей, влияющих на качество продуктов. Показано, что основными примесями, обусловливающими цветность исследованных промышленных продуктов, являются 3,5,3′,5′-тетра-*трет*-бутил-4,4′-дифенохинон в образцах основания Манниха и 3,5,3′,5′-тетра-*трет*-бутил-стильбен-4,4′-хинон в образцах ионола.

В настоящее время в промышленности ионол нашел широкое применение как стабилизатор различных каучуков, светлых и цветных резин, пластических масс, нефтепродуктов, а также в качестве антиокислительной присадки к смазочным маслам, топливам и химической добавки к полимерам. Одним из важных показателей качества ионола является цветность. По ОСТ 38.01420—87 цветность определяется фотометрически в единицах оптической плотности, но этот метод не дает представления о причинах цветообразования. С практической точки зрения весьма целесообразным является создание методики качественного и количественного определения цветообразующих примесей в продуктах производства ионола, влияющих на качество товарных продуктов.

Промышленный процесс получения ионола через основание Манниха протекает в две стадии — аминометилирование 2,6-ди-*трет*-бутилфенола бисамином и гидрогенолиз основания Манниха





Известно, что цветность фенолов обусловливается наличием хиноидных структур, образуемых при окислении пространственно затрудненных фенолов [1—5]. Газовая хроматография не позволяет анализировать нестабильные хиноидные соединения из-за разложения их в испарителе. Метод спектрофотометрии не дает возможности количественного определения хиноидных соединений в смеси, особенно микропримесей, вследствие взаимного перекрывания полос поглощения. Эту задачу, по нашему мнению, можно успешно решить методом жидкостной хроматографии.

Экспериментальная часть

Исследования проводили на хроматографе «Алтекс» (США) с колонкой из нержавеющей стали 250×4,1 мм, заполненной сорбентом зорбакс-сил зернением 7,5 мкм. Подвижная фаза – раствор гексана с хлороформом в объемном соотношении 95 : 5, скорость элюирования 0,6 мл/мин. Объем петли дозатора – 20 мкл, температура – комнатная. Регистрацию каждого компонента смеси осуществляли двумя последовательно установленными фотометрическими детекторами при разных длинах волн. Один при длине волны 254 нм регистрировал бесцветные соединения, а другой – только окрашенные при длинах волн 376, 400, 420 и 446 нм, соответствующих максимумам поглощения [5–7] индивидуальных хинонов, присутствие которых предполагалось в исследуемых промышленных образцах.

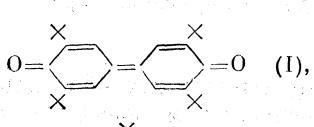
Идентификацию проводили по индивидуальным соединениям методом добавки их в анализируемые пробы и по спектрам поглощения препаративно выделенных цветных компонентов из исследуемых образцов. Индивидуальные хиноидные соединения синтезированы на Стерлитамакском опытно-промышленном нефтехимическом заводе.

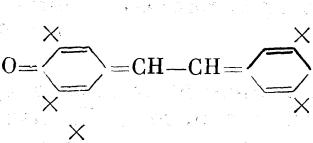
Количественный расчет проводили методом абсолютной калибровки. Дозатор обеспечивал ввод постоянной пробы. Концентрации индивидуальных хинонов в калиброванных растворах были близкими к концентрациям их в растворах исследуемых образцов. При отсутствии индивидуальных хинонов количественный расчет проводили с учетом калибровочных коэффициентов, определенных по коэффициентам поглощения, взятым из литературы [6, 7].

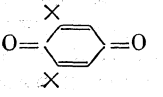
Обсуждение результатов

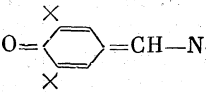
Известно, что источником образования окрашенных соединений являются пространственно-затрудненные фенолы и их производные, которые при нагревании в процессе синтеза и очистки при контакте с воздухом окисляются и превращаются в имеющие интенсивную окраску хиноидные соединения. Соединения хиноидной структуры поглощают свет в видимой области спектра. Чем длиннее цепь сопряженных связей в молекуле, тем интенсивнее окраска, тем больше длина волны поглощаемого света. Это свойство было положено в основу при разработке метода определения цветообразующих примесей в технологических потоках процесса синтеза ионола жидкостной хроматографией с фотометрическим детектором. При детектировании на длинах волн видимой области спектра на хроматограмме проявляются только окрашенные соединения. Высокая чувствительность детектора к ним позволяет регистрировать микропримеси в количествах до $1 \cdot 10^{-6}$ масс.%.

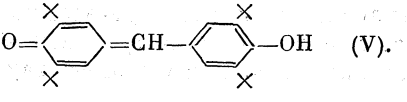
В исследованных промышленных образцах основания Манниха и ионола идентифицированы следующие хиноидные соединения: 3,5,3′,5′-тетра-*трет*-бутил-4,4′-дифенохинон (I), 3,5,3′,5′-тетра-*трет*-бутил-стильбен-4,4′-хинон (II), 2,6-ди-*трет*-бутилбензохинон (III), 2,6-ди-*трет*-бутил-4(*N*, *N*-диметиламинометилен)-2,5-циклогексадиен-1-он (IV); 2,6,3′,5′-тетра-*трет*-бутил-4′-гидроксифенил-4-метилен - 2,5 - циклогексадиен-1-он (V):


(I),


(II),


(III),


(IV),


(V).

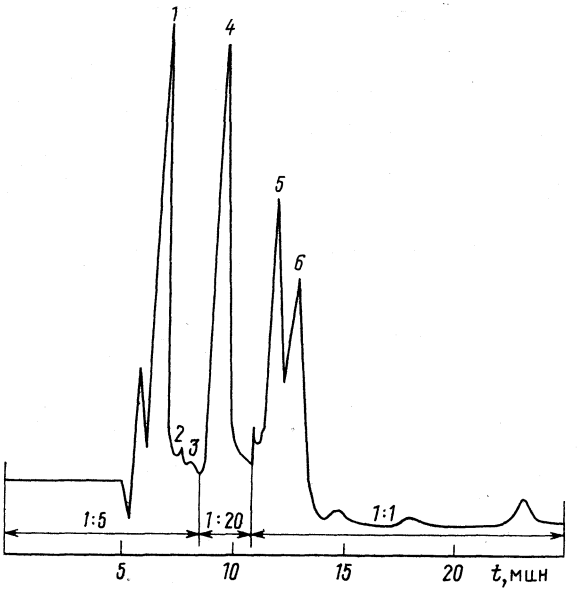


Рис. 1. Хроматограмма образца основания Манниха до дегазации при $\lambda=400$ нм

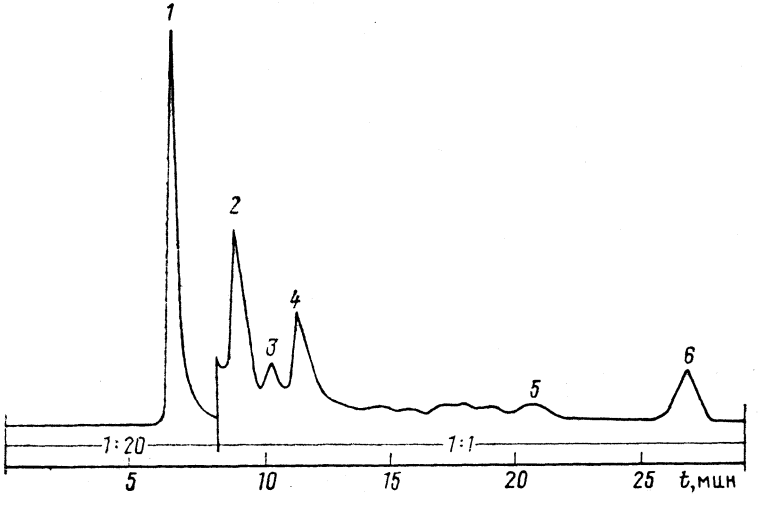


Рис. 2. Хроматограмма образца ионола до ректификации при $\lambda=420$ нм

На рис. 1, 2 приведены хроматограммы промышленных образцов основания Манниха и ионола. Данные по относительным временам удерживания (τ) и количественному содержанию цветообразующих примесей (c) в исследованных образцах представлены в табл. 1, 2. В выбранных условиях не разделяются соединения IV, V. Основной примесью в образцах основания Манниха до и после дегазации и в готовой партии (табл. 1) является соединение I (пик *1*). Пики *4—6* не идентифицированы, так как количество веществ, им соответствующих, настолько мало,

Таблица 1

Содержание окрашенных примесей ($c \cdot 10^2$, масс. %) в образцах основания Манниха до (А) и после (В) дегазации, а также в готовой партии (С)

Пик (рис. 1)	Компоненты	$\lambda_{макс}$, нм	τ	А	В	С
1	I	420	1,00	6,0	11,0	41,0
2	IV, V	376, 400	1 50; 1,54	0,14	1,2	10,0
3	III	307	1,82	0,04	0,6	0,9
4–6	не идентифицированы			не определялось		

Таблица 2

Содержание окрашенных примесей ($c \cdot 10^3$, масс. %) в образцах ионола до (А) и после (В) ректификации, а также в готовой партии (С)

Пик (рис. 2)	Компоненты	$\lambda_{макс}$, нм	τ	А	В	С
1	I	420	1,00	4,4	0,03	–
2, 3	не идентифицированы		1 20; 1,30	–	не определялось	
4	II	446	1,62	30,0	0,8	следы
5–9	не идентифицированы			не определялось	следы	–

что препаративно выделить не удалось. Площади соответствующих не идентифицированных пиков увеличиваются с увеличением длины волны. По-видимому, эти хиноны имеют длинные цепи сопряжения. Как видно из табл. 1, общее содержание окрашенных примесей в процессах дегазации и чешуирования увеличивается.

В образцах ионола до и после ректификации (табл. 2) основной окрашенной примесью, появляющейся при гидрогенолизе основания Манниха, является соединение II (пик *4*), которое практически исчезает при перекристаллизации ионола из метанола. Однако при очистке ионола ректификацией увеличивается содержание неидентифицированных хиноидных соединений (пики *2*, *3*), которые не исчезают при перекристаллизации и присутствуют в товарном ионоле. Площади этих пиков увеличиваются в направлении уменьшения длины волны. Можно предположить, что это структуры с меньшей длиной сопряженных связей.

Таким образом, основными примесями, обусловливающими цветность исследованных промышленных продуктов, являются 3,5,3′,5′-тетра-*трет*-бутил-4,4′-дифенохинон в образцах основания Манниха и 3,5,3′,5′-тетра-*трет*-бутил-стильбен-4,4′-хинон в образцах ионола.

Список литературы

1. *Bann C. R.* // J. Org. Chem. 1957. V. 22. № 4. P. 458.
2. *Becker H.* // Ibid. 1965. V. 30. P. 892.
3. *Orlando C.* // Ibid. 1968. V. 33. P. 2516.
4. *Походенко В. Д.* Феноксильные радикалы. Киев: Наук. думка, 1969.
5. *Вахитова М. Ш., Толстиков Г. А. и др.* // Журн. прикл. химии. 1985. № 4. С. 863.
6. *Kharasch M. S., Goshi B. S.* // J. Org. Chem. 1957. V. 22. № 11. P. 1435.
7. *Ingold K. U.* // Can. J. Chem. 1963. V. 41. № 11. P. 2807.

Научно-исследовательский институт нефтехимических производств
Уфа

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 547.565 : 543.88

© 1991 г.

Демьянов П. И., Хименес М. П., Петросян В. С.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОЛОВ В ВИДЕ ДАБСИЛАТОВ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Показано, что одно- и двухатомные фенолы, а также трехатомный фенол флороглюцин легко реагируют с 4′-(диметиламино)азобензол-4-сульфохлоридом (дабсилхлоридом) с образованием устойчивых, сильно поглощающих свет в видимой области спектра моно-, ди- и тридабсилатов соответственно. Установлено, что дабсилаты фенолов разделяются методами нормально- и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии; пределы обнаружения дабсилатов одноатомных фенолов с помощью жидкостной хроматографии составляют 1–2 нг или несколько пмоль.

Фенолы антропогенного происхождения широко распространены в окружающей среде. Их приходится определять в воде, воздухе, почве. Важной задачей является определение фенолов и биологически активных фенольных соединений в фармацевтических препаратах, растительных и животных тканях, биологических жидкостях.

Наряду с газовой хроматографией при определении фенолов часто применяется высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) [1]. Для увеличения чувствительности и селективности определения методом ВЭЖХ фенолы часто превращают в окрашенные производные (азосоединения [2] или антипирилхинонимины [3, 4]), либо во флуоресцирующие производные (дансилаты [5, 6]). Однако в реакции с солями арилдиазония [7] и с 4-аминоантипирином [3], приводящими соответственно к азосоединениям и антипирилхинониминам, вступают не все фенолы. Существенные недостатки имеет и превращение фенолов в дансилаты, которые могут разлагаться на свету [8, 9]; интенсивность их флуоресценции сильно зависит как от природы фенола, так и от полярности растворителей [6], используемых в качестве подвижных фаз в ВЭЖХ.

Недавно найдено [10], что 4-гидроксибензойная, ванилиновая и сиреневая кислоты за счет фенольных гидроксильных групп взаимодействуют с 4′-(диметиламино)азобензол-4-сульфохлоридом (дабсилхлоридом) с образованием окрашенных производных, которые могут разделяться с помощью ВЭЖХ. В настоящей работе исследованы возможности использования дансилхлорида для количественного определения этим методом одно-, двух- и трехатомных фенолов.

Экспериментальная часть

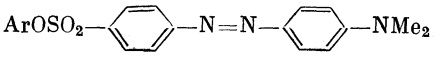
Спектры поглощения дабсилатов фенолов в УФ- и видимой областях регистрировались на спектрофотометре DMS 100S («Вариан», США). Хроматографический анализ этих соединений проводился на жидкостном хроматографе «Виста 5560» с автоматическим спектрофотометрическим детектором UV 200 («Вариан», США) Управление хроматографом, определение времен удерживания, площадей пиков, факторов отклика детектора, численная обработка хроматограмм осуществлялись с помощью хроматографической системы «Виста 402» («Вариан», США).

Дабсилхлорид синтезировался по ранее описанной методике [11]. В течение 8 мин 6 г (18,3 ммоль) метилоранжа растирались в фарфоровой ступке с 9 г (43,9 ммоль) пятихлористого фосфора. Полученная смесь переносилась в стакан с 500 мл воды со льдом. Ярко окрашенный осадок промывался на стеклянном фильтре тремя порциями воды по 200 мл, высушивался в эксикаторе над пятиокисью фосфора и помещался в аппарат Сокслета, где дабсилхлорид экстрагировался ацетоном, после чего перекристаллизовывался; выход 20%.

Для определения выходов дабсилатов в реакциях дабсилхлорида с разбавленными растворами фенолов в трехгорлую колбу, снабженную обратным холодильником, капельной воронкой и механической мешалкой, помещалось 5 мл водного карбонатно-гидрокарбонатного буферного раствора и несколько микролитров стандартного раствора смеси фенолов в ацетонитриле. При перемешивании раствора фенолов к нему добавлялся из капельной воронки раствор требуемого количества дабсилхлорида в 10 мл ацетона. Реакционная смесь определенное время перемешивалась и нагревалась до равномерного кипения ацетона и затем охлаждалась до комнатной температуры. Ацетон удалялся на роторном испарителе, оставшаяся водная фаза экстрагировалась тремя порциями хлористого метилена по 5 мл. Органические экстракты объединялись и с целью удаления из них избытка дабсилхлорида промывались в течение 1 мин 20 мл 1 М раствора гидроксида натрия. К полученному экстракту дабсилатов фенолов добавлялось нужное количество раствора метилдабсилата или дабсилата 2,4,6-трихлорфенола (внутренние стандарты) известной концентрации в хлористом метилене. Экстракты высушивались безводным сульфатом натрия и упаривались на роторном испарителе до ~200 мкл. Определенный объем (как правило 0,5—5 мкл) полученного концентрата анализировался методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в условиях, указанных в подписи к рисунку, *г*.

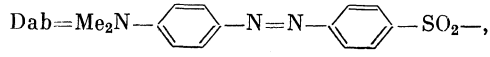
Обсуждение результатов

Исследованные в работе одно- и двухатомные фенолы, а также трехатомный фенол флороглюцин легко реагируют с дабсилхлоридом. Уже при добавлении эквивалентного количества дабсилхлорида на каждую гидроксильную группу фенола образуются полные производные, т. е. соответственно моно-, ди- и тридабсилаты *1—21*:



Ar :C_6H_5 (*1*), 4-MeC_6H_4 (*2*), 4-$MeOC_6H_4$ (*3*), 3,4-$Me_2C_6H_3$ (*4*), 2-ClC_6H_4 (*5*), 4-ClC_6H_4 (*6*), 2,4-$Cl_2C_6H_3$ (*7*), 2,4-$Br_2C_6H_3$ (*8*), 2,4,6-$Cl_3C_6H_2$ (*9*), C_6Cl_5 (*10*), 2-$NO_2C_6H_4$ (*11*), 4-$NO_2C_6H_4$ (*12*), 2,4-$(NO_2)_2C_6H_3$ (*13*), 4-HOC_6H_4 (*14*), 4-$DabOC_6H_4$ (*15*), 3-$DabOC_6H_4$ (*16*), 5-Me-3-$DabOC_6H_3$ (*17*), 3-DabO-6-$MeOCOC_6H_3$ (*18*), 6-$DabOC_{10}H_6$ (*19*), 8-$DabOC_{10}H_6$ (*20*), 3,5-$(DabO)_2C_6H_3$ (*21*),

где



$C_{10}H_6$—нафтдил.

В препаративных экспериментах дабсилаты *1—13* получаются как правило практически с количественными выходами. С меньшими выходами получены в чистом виде дабсилаты *15* (91%), *16* (82%), *17* (83%, смесь моно- и дидабсилатов в соотношении 15 : 85), *18* (82%), *19* (85%), *20* (83%) двухатомных фенолов и тридабсилат *21* (70%) флороглюцина.

Таблица 1

Параметры электронных спектров, относительные мольные факторы *F* отклика спектрофотометрического детектора (450 нм) и пределы обнаружения (ПО) методом ВЭЖХ для дабсилатов некоторых одноатомных фенолов

Дабсилат	Растворитель	$\lambda_{макс}$, нм	lg ε	*F*	ПО, пмоль
1	метанол	449	4,50	0,81	4,4
2	метанол	447	4,65	0,96	3,5
4	метанол	447	4,50	0,80	3,4
6	метанол	451	4,53	0,85	3,1
7	метанол	453	4,56	0,82	3,3
9	ацетонитрил	456	4,51	0,74	2,7
10	ацетонитрил	461	4,54	0,86	2,4
13	–	–	–	0,86	1,3

Примечание. Условия разделения на последовательно соединенных колонках МСН-5-N-CAP и SP-C18-5 указаны в подписи к рисунку, *г*. Приведены значения ПО при объеме вводимой пробы 5 мкл и отношении интенсивности сигнала к шуму базовой линии, равном 3 — 7.

Таблица 2

Влияние продолжительности реакции, pH среды и соотношения мольных количеств дабсилхлорида и фенолов (*R*) на выходы (%) дабсилатов фенолов ($c_Ф$ – концентрация фенола)

Фенол	$c_Ф \cdot 10^6$, М	pH 8,9; *R*=1		pH 9,9; 15 мин			
		15 мин	60 мин	*R*=1	*R*=4	*R*=8	*R*=12
Фенол	276	86	92	98	92	84	88
4-Метилфенол	240	75	84	96	91	88	89
4-Хлорфенол	268	105	100	100	91	89	90
3,4-Диметилфенол	278	56	69	83	82	85	87
2,4-Дихлорфенол	265	60	77	71	77	77	78
2,4,6-Трихлорфенол	252	11	11	18	70	72	76
Пентахлорфенол	97	6	—	11	15	55	73
2,4-Динитрофенол	248	–	—	–	3	9	29

Дабсилаты фенолов представляют собой твердые, ярко окрашенные, устойчивые при обычных условиях вещества. Их строение подтверждено данными элементного анализа, ИК-спектроскопии, спектроскопии ПМР и масс-спектрометрии. Дабсилаты фенолов не растворимы в воде, слабо растворяются в метаноле и особенно в диэтиловом эфире, лучше растворяются в ацетонитриле и в хлористом метилене. Дабсилаты одноатомных фенолов легко растворяются в бензоле.

В электронных спектрах растворов дабсилатов фенолов имеются два максимума поглощения, положение которых мало зависит от строения фенольного остатка. Молярные коэффициенты экстинкции для коротковолновых максимумов (269—274 нм) существенно ниже, чем для широких максимумов, расположенных в области 447—462 нм. В этой области величины lg ε для дабсилатов одноатомных фенолов максимальны и мало зависят от строения фенольного остатка (см., например, табл. 1), но снижаются до 4,18—4,21 при переходе к дидабсилатам двухатомных фенолов и до 4,02 при переходе к тридабсилату флороглюцина.

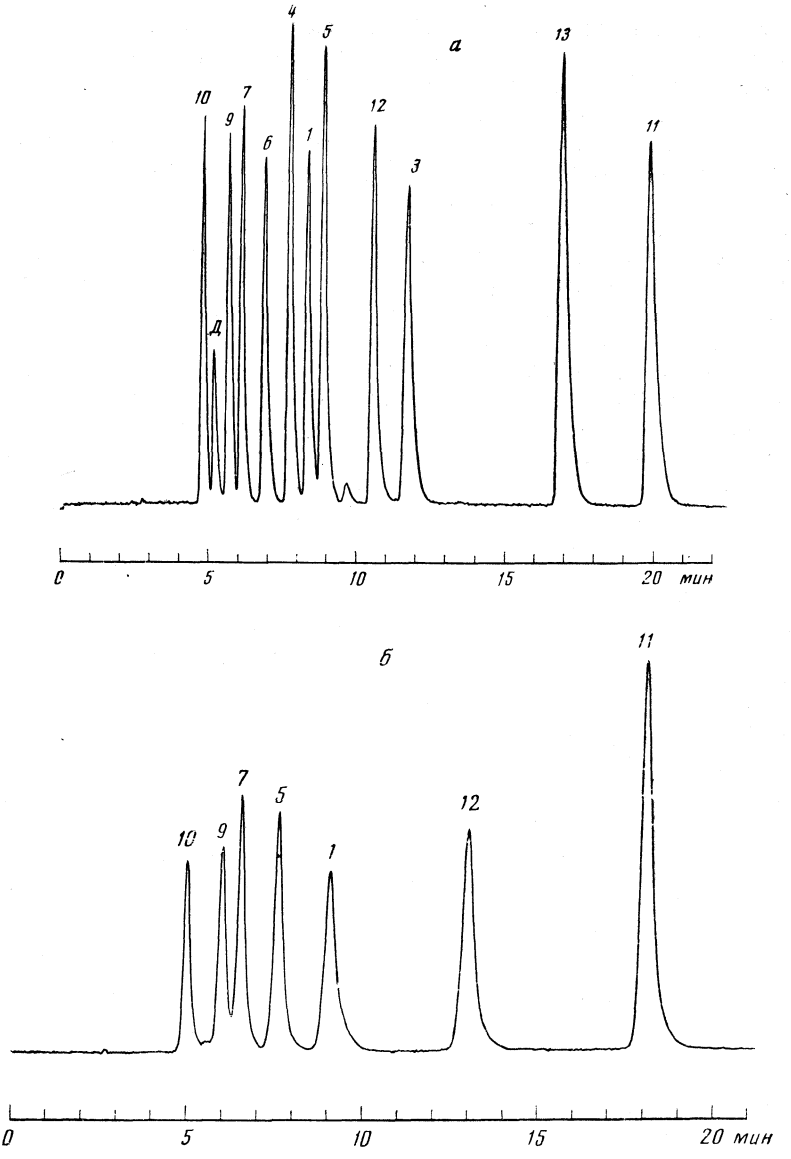
Дабсилаты фенолов разделяются с помощью как нормально-, так и обратнофазной ВЭЖХ (рисунок). Селективность разделения дабсилатов одноатомных фенолов этими двумя типами ВЭЖХ практически противоположна, что позволяет выбирать один из них в зависимости от заместителей в определяемых фенолах и требуемой скорости анализа. Спектрофотометрическое детектирование дабсилатов по их поглощению в видимой области спектра позволяет применять градиентное элюирование даже смесями, содержащими сильно поглощающие в УФ-области растворители, такие как ацетон и хлористый метилен. Использование последних в качестве модификаторов гексана при разделении дабсилатов фенолов методом нормальнофазной ВЭЖХ гораздо удобнее, чем применение для этих целей спиртов. Большая элюирующая способность спиртов требует их малых добавок к гексану, что затрудняет реализацию плавно меняющегося градиента в составе подвижной фазы.

Дабсилаты фенолов являются сильногидрофобными соединениями, и для их анализа методом обратнофазной ВЭЖХ требуется применять водные подвижные фазы, обогащенные органическим растворителем — ~80% ацетонитрила или метанола в начале анализа. Предпочтение следует отдать ацетонитрилу, а не метанолу. Метанол способен взаимодействовать с нерасходовавшимся в реакции дабсилхлоридом с образованием метилдабсилата [10], по сравнению с ацетонитрилом он плох еще и тем, что в водно-спиртовой подвижной фазе дабсилаты фенолов чрезвычайно плохо растворимы, и это может приводить к закупорке хроматографической системы, в частности колонки.

Спектрофотометрическое детектирование разделяемых методом ВЭЖХ дабсилатов фенолов по их поглощению в видимой области позволяет проводить более чувствительное и селективное определение фенолов, чем по поглощению дабсилатов в УФ-области. В работе проводилось детектирование при 450 нм. В табл. 1 приведены величины относительных мольных факторов F отклика спектрофотометрического детектора при этой длине волны для дабсилатов одноатомных фенолов. Малый диапазон изменения F для дабсилатов фенолов различного строения согласуется с близостью их величин $\lg \varepsilon$. С близостью значений $\lg \varepsilon$ связан, конечно, и узкий диапазон пределов обнаружения дабсилатов различных фенолов (табл. 1), а малые величины пределов обнаружения обязаны интенсивному поглощению видимого света этими веществами. Пределы обнаружения дабсилатов фенолов очень близки к пределам обнаружения дабсильных производных аминов [12] и аминокислот (2—5 пмоль) [13].

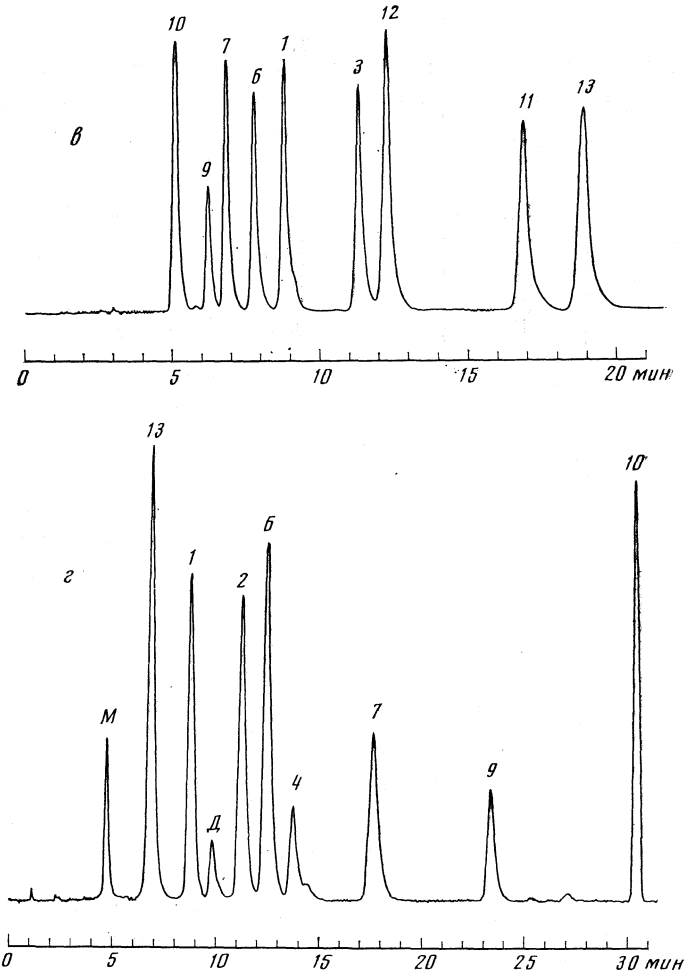
В разбавленных растворах большинство исследованных одноатомных фенолов даже с эквимолярными количествами дабсилхлорида за 15 мин образуют дабсилаты более чем с 60%-ными выходами (табл. 2). Увеличение времени реакции и pH от 8,9 до 9,9 приводит к заметному возрастанию выходов дабсилатов, которые для некоторых фенолов становятся почти количественными (табл. 2).

При pH 9,9 увеличение количества дабсилхлорида приводит к возрастанию выходов дабсилатов малоосновных фенолов, таких как 2,4,6-трихлорфенол, пентахлорфенол и 2,4-динитрофенол, причем выходы дабсилатов других фенолов либо мало изменяются, либо даже несколько снижаются (табл. 2). Как было обнаружено, причина этого заключается в том, что в условиях реакций фенолов с дабсилхлоридом образуется побочный продукт, имеющий практически такое же время удерживания на обратнофазной колонке, как и взятый в качестве внутреннего стандарта метилдабсилат. Выход данного продукта возрастает по мере увеличения



концентрации дабсилхлорида в реакционной смеси, приводя к фиктивному увеличению количества внутреннего стандарта и тем самым к кажущемуся снижению выходов дабсилатов фенолов. В случае же малоосновных фенолов, медленно реагирующих с дабсилхлоридом, увеличение его концентрации приводит к гораздо большему реальному возрастанию выходов дабсилатов по сравнению с их кажущимся уменьшением за счет фиктивного роста количества внутреннего стандарта.

Побочно образующийся продукт не идентифицировался. Он может быть ангидридом 4′-(диметиламино)азобензол-4-сульфокислоты. Соль этой кислоты, т. е. метилоранж, образуется, конечно, за счет гидролиза дабсилхлорида и, реагируя с последним, дает ангидрид. Такой процесс отме-



Разделение дабсилатов фенолов методом ВЭЖХ на различных колонках. Спектрофотометрическое детектирование, 450 нм. Номера у пиков соответствуют номерам дабсилатов, Д – дабсилхлорид, М – метилдабсилат (внутренний стандарт); *а* – MicroPak Si-5 (15×0,4 см), секция из двух колонок, подвижная фаза гексан (А) – ацетон (Б), 2 мл·мин$^{-1}$, 96% А (время анализа $\tau=0$) и 87% А ($\tau=25$ мин); *б* – MicroPak NH_2-10 (30×0,4 см), подвижная фаза гексан (А) – хлористый метилен (Б), 2 мл·мин$^{-1}$, 85% А ($\tau=0\div8$ мин) и 76% А ($\tau=15$ мин); *в* – MicroPak CN-10 (30×0,4 см), подвижная фаза гексан (А) – ацетон (Б), 2 мл·мин$^{-1}$, 95% А ($\tau=0$) и 80% А ($\tau=20$ мин); *г* – последовательно соединенные MicroPak MCH-5-N-CAP (15×0,4 см) и MicroPak SP-C-18 (15×0,4 см), подвижная фаза вода (А) – ацетонитрил (Б), 1,2 мл·мин$^{-1}$, 80% Б ($\tau=0$) и 100% Б ($\tau=30$ мин)

чался при взаимодействии стероидов фенольного типа с дансилхлоридом [14]. Возможно, появляющийся в реакциях посторонний продукт представляет собой ацетонилдабсилат, образующийся из дабсилхлорида и енолята ацетона, исключить существование которого при pH 9,9 нельзя.

Использование дабсилата 2,4,6-трихлорфенола в качестве внутреннего стандарта позволяет наблюдать истинные выходы дабсилатов фенолов, и, как показывают данные табл. 3, они выше, чем найденные при использовании метилдабсилата как внутреннего стандарта (см. табл. 2). При по-

Таблица 3

Выходы дабсилатов (β) при различных концентрациях фенолов ($c_ф$)

Фенол	$c_ф \cdot 10^6$, М	β, %	$c_ф \cdot 10^6$, М	β, %	$c_ф \cdot 10^6$, М	β, %
Фенол	389	96	38,9	92	3,89	91
4-Метилфенол	383	95	38,3	98	3,83	97
4-Хлорфенол	369	94	36,9	93	3,69	90
3,4-Диметилфенол	339	93	33,9	89	3,39	89
2,4-Дихлорфенол	298	85	29,8	82	2,98	86
Пентахлорфенол	153	75	15,3	74	1,53	73

Примечание. Время реакции 15 мин, pH 9,9; отношение мольного количества дабсилхлорида к общему мольному содержанию фенолов $R=12$.

нижении концентраций фенолов в 100 раз намечается, однако, тенденция к некоторому уменьшению выходов их дабсилатов (табл. 3). Возможно, это связано с замедлением реакций фенолов с дабсилхлоридом вследствие разбавления, и 15 мин не достаточно для полного превращения фенолов в дабсилаты. Для увеличения скорости дабсилирования, особенно малоактивных фенолов, таких как пентахлорфенол и 2,4-динитрофенол, в их очень разбавленных растворах необходимо, по-видимому, увеличить вводимые в реакции количества дабсилхлорида. Проведение реакций фенолов с дабсилхлоридом в межфазных условиях, возможно, также позволит резко ускорить процесс превращения фенолов в дабсилаты. Такой эффект наблюдался при дансилировании стероидов фенольного типа и некоторых фенолов [14, 15].

В экспериментах при $c_ф \approx 3 \cdot 10^{-6}$ М (табл. 3) в реакции вводилось ~2 мкг каждого фенола, и анализ реакционных смесей осуществлялся при чувствительности спектрофотометрического детектора 0,05 единицы поглощения на всю шкалу регистрирующего устройства. Оценки показывают, что за счет реально возможного повышения чувствительности детектора в 25 раз и увеличения объема анализируемой воды от 5 до 100 мл можно достичь предела метода количественного определения фенолов в виде дабсилатов на уровне 10—20 нг·л$^{-1}$ каждого фенола.

Выше отмечено, что двухатомные фенолы и флороглюцин при взаимодействии даже с эквивалентными количествами дабсилхлорида образуют с высокими выходами соответственно ди- и тридабсилаты. Это позволяет надеяться, что и при малых (типичных для загрязненных вод) концентрациях, но в присутствии значительного избытка дабсилхлорида двух- и трехатомные фенолы, как и фенолы одноатомные, также будут количественно превращаться в соответствующие дабсилаты, высокие коэффициенты экстинкции которых дадут возможность определять двух- и трехатомные фенолы методом ВЭЖХ почти с такой же чувствительностью, как и одноатомные фенолы.

Список литературы

1. *Tesařová E., Pacáková V.* // Chromatographia. 1983. V. 17. № 5. P. 269.
2. *Whitlock L. R., Siggia S., Smola J. E.* // Anal. Chem. 1972. V. 44. № 3. P. 532.
3. *Emerson E.* // J. Org. Chem. 1943. V. 8. № 5. P. 417.
4. *Blo G., Dondi F., Betti A., Bighi C.* // J. Chromatogr. 1983. V. 257. P. 69.
5. *Lawrence J. F.* // Chemical Derivatization in Analytical Chemistry. N. Y.: Plenum Press, 1982. P. 191—242.
6. *Lawrence J. F.* // J. Chromatogr. Sci. 1979. V. 17. № 3. P. 147.

7. *Вейганд-Хильгетаг.* Методы эксперимента в органической химии. М.: Химия, 1968. С. 400–408.
8. *Frei-Häusler M., Frei R. W., Hutzinger O.* // J. Chromatogr. 1973. V. 84. P. 214.
9. *De Ruiter C., Bohle J. F., De Jong G. J. et al.* // Anal. Chem. 1988. V. 60. № 7. P. 666.
10. *Wolski T., Golkiewicz W., Bartuzi G., Lobarzewski J.* // Chromatography'85. Budapest: Acad. Kiado, 1986. P. 659–667. (Proc. 5th Budapest Chromatography Conference. June 11–14, 1985).
11. *Lin J.-K., Chang J.-Y.* // Anal. Chem. 1975. V. 47. № 9. P. 1634.
12. *Lin J.-K., Lai C.-C.* // Ibid. 1980. V. 52. № 4. P. 630.
13. *Chang J.-Y., Knecht R., Braun D. G.* // Biochem. J. 1981. V. 199. P. 547.
14. *De Ruiter C., Otten R. R., Brinkman U. A. T., Frei R. W.* // J. Chromatogr. 1988. V. 436. P. 429.
15. *De Ruiter C., Tai Tin Tsoi J. N. L., Brinkman U. A. T., Frei R. W.* // Chromatographia. 1988. V. 26. P. 267.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова
Химический факультет

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

Духовная И. С., Чмиль В. Д.

ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В АНАЛИЗЕ АМИНОСОЕДИНЕНИЙ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В ПРОИЗВОДСТВЕ ПОЛИМЕРОВ

Исследованы закономерности удерживания ароматических аминов и дабсилпроизводных ароматических и алифатических аминов в условиях нормально- и обращенно-фазовой жидкостной хроматографии. Установлено существование корреляционных зависимостей между параметрами удерживания и величинами, характеризующими структуру сорбатов, состав и свойства подвижных фаз. Обсуждены некоторые аспекты механизмов удерживания аминосоединений в режимах нормально- и обращенно-фазовой хроматографии. Полученные результаты использованы для разделения и определения аминов, мигрирующих из полимерных материалов.

Для контроля за применением полимерных материалов необходимо использование методов, позволяющих проводить эффективное разделение смесей токсических веществ, мигрирующих в контактирующие с полимерами среды. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), позволяющая значительно повысить эффективность разделения нелетучих и термолабильных ингредиентов рецептуры полимеров, является одним из таких методов. Не теряет своего значения для анализа подобных соединений и тонкослойная хроматография. В настоящей работе рассмотрены результаты исследования закономерностей удерживания и выбора условий определения с использованием жидкостной хроматографии аминосоединений, применяемых в производстве полимерных материалов, или образующихся в процессах их производства, переработки и эксплуатации.

Нормально-фазовая жидкостния хроматография аминосоединений. Хроматографическое поведение аминов и их производных изучалось на хроматографе «Милихром» на колонке 64×2 мм с Силасорбом 600 (5 мкм) в подвижных фазах гексан — изопропанол и гексан — изопропанол — хлороформ, взятых в различных соотношениях, при УФ-детектировании (250 и 280 нм) и на пластинках для тонкослойной хроматографии «Силуфол» в бинарных подвижных фазах на основе слабополярных органических растворителей, содержащих 5—17% полярных добавок.

Известно, что основным типом взаимодействия ароматических аминов с поверхностью силикагеля является донорно-акцепторное взаимодействие атома азота аминогруппы, обладающего неподеленной парой электронов, и протонированными оксигруппами на поверхности адсорбента [1]. Алифатические амины отличаются значительно более сильной сорбируемостью на силикагеле, позволяющей предполагать существование вклада в адсорбцию кислотно-основного взаимодействия.

Таблица 1

Величины R_f ароматических аминов в тонком слое силикагеля

Амин	I	II	III	Амин	I	II	III
Анилин	0,22	0,55	0,57	*п*-Толуидин	0,20	0,52	0,59
Моноэтиланилин	0,38	0,71	0,98	*м*-Фенилендиамин	0,00	0,08	0,10
Диметиланилин	0,70	—	0,98	*о*-Анизидин	0,43	0,62	0,74
о-Толуидин	0,64	0,61	0,81	*п*-Анизидин	0,17	0,36	0,42

Обозначения подвижных фаз: I — четыреххлористый углерод — эфир (5 : 1), II — бензол — ацетон (9 : 1), III — хлороформ — эфир (9 : 1).

Таблица 2

Величины R_f алифатических аминов в тонком слое силикагеля

Амин	I	II	III
Диметиламин	0,18	0,06	0,10
Диэтиламин	0,30	0,15	0,30
Дибутиламин	0,78	0,62	0,75
Циклогексиламин	0,63	0,76	0,68
Моноэтаноламин	0,24	0,63	0,69

Обозначения подвижных фаз: I — ацетон — вода — ледяная уксусная кислота (60 : 10 : 2,5), II — ацетон — аммиак (9 : 1), III — метанол — ацетон — аммиак (4,5 : 4,5 : 1).

Таблица 3

Коэффициенты емкости (k') аминосоединений (подвижная фаза : гексан – изопропанол 5 : 1 и 1 : 1)

Соединение	5 : 1	1 : 1	Соединение	5 : 1	1 : 1
Анилин	1,60	0,78	*п*-Анизидин	–	1,20
Этиланилин	0,63	–	*о*-Толуидин	0,73	0,43
Диметиланилин	0,20	0,21	*п*-Толуидин	1,65	0,80
Диэтиланилин	0,13	0,15	Фенил-β-нафтиламин	0,27	0,07
Дибутиланилин	0,03	0,00	Дифенил-*п*-фенилендиамин	0,47	0,16
Бензиланилин	0,13	0,21	*о*-Фенилендиамин	–	3,80
Дибензиланилин	0,06	0,07	*м*-Фенилендиамин	–	4,40
о-Аминофенол	1,10	–	*п*-Фенилендиамин	–	6,80
м-Аминофенол	1,80	–	2,4-Толуилендиамин	–	4,30
п-Аминофенол	6,30	1,40	2,6-Толуилендиамин	–	3,00
о-Нитроанилин	–	0,21	Диаминодифенилметан	–	2,30
п-Нитроанилин	–	0,43	2-Аминопиридин	–	2,80

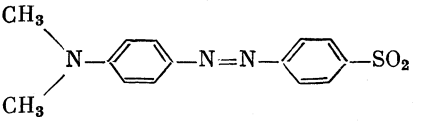
В табл. 1—3 приведены данные по хроматографированию ароматических аминов в условиях ВЭЖХ и ароматических и алифатических аминов в тонком слое сорбента. Как видно из приведенных данных, для определения этих групп аминосоединений необходимо применение подвижных фаз, резко отличающихся по своему составу. Ариламины элюируются смесями неполярных и слабополярных органических растворителей с небольшими добавками полярных модификаторов; для хроматографиче-

ского определения алифатических аминов необходимо использование смесей сильнополярных гидрофильных растворителей с водным аммиаком или уксусной кислотой. Приведенные результаты свидетельствуют, что практически невозможно осуществить разделение и определение арил- и алкиламинов в одних и тех же условиях. Различия в механизмах их сорбции приводят к тому, что при использовании ВЭЖХ ариламины в основном определяют в свободном виде [2], а алкиламины в подавляющем большинстве случаев анализируют в виде различных производных [3–5].

Поскольку при определении веществ, мигрирующих из полимерных материалов, во многих случаях приходится определять содержание как ароматических, так и алифатических аминов в одной пробе, нами были получены их производные с 4-диметиламиноазобензолсульфонил — хлоридом (дабсилхлоридом) — соответствующие дабсиламиды — и проведено исследование некоторых закономерностей удерживания ароматических аминов и дабсилпроизводных алкил- и ариламинов.

Полученные результаты показывают, что хроматографическое поведение дабсилпроизводных в значительной степени отличается от поведения исходных аминов. Наиболее ощутимы эти различия в случае алифатических аминов, удерживание дабсиламидов которых значительно уменьшается по сравнению с исходными аминами, что дает возможность проводить их разделение и определение с использованием нормально-фазовой ВЭЖХ. Дабсиламиды ароматических аминов также сорбируются слабее исходных соединений, но в этом случае различия не столь значимы.

По-видимому, введение в молекулу амина сильного электроноакцептора



приводит к снижению электронной плотности на атоме азота образовавшегося дабсиламида и соответственно ослаблению его взаимодействия с поверхностью адсорбента по сравнению с исходным амином. При этом, вероятно, исключается вклад кислотно-основного взаимодействия между сорбатом и сорбентом, имеющего место при адсорбции свободных алифатических аминов, и механизм адсорбции дабсилпроизводных как алифатических, так и ароматических аминов сводится, в основном, к образованию водородной связи между атомом азота исходного амина и гидроксильными группами на поверхности силикагеля (при постоянном вкладе в адсорбцию функциональных групп дабсильного радикала).

Сравнение хроматографических параметров исследуемых дабсиламидов показывает, что доминирующее влияние на их удерживание оказывают свойства заместителей у атома азота исходного амина. Это подтверждается существованием корреляционных зависимостей между хроматографическими параметрами дабсиламидов (k', R_f) и константами, характеризующими электронные свойства и пространственную структуру заместителей (константы Тафта σ^* и E_s соответственно). Аналогичные зависимости существуют и в ряду свободных ароматических ($k' - E_s$, $k' - \sigma_n$) и алифатических ($R_f - E_s$) аминов. Подобные зависимости, однако, могут рассматриваться только для отдельных групп соединений в связи с необходимостью их определения в резко отличающихся условиях, обусловленных различиями в характере адсорбции свободных аминосоедине-

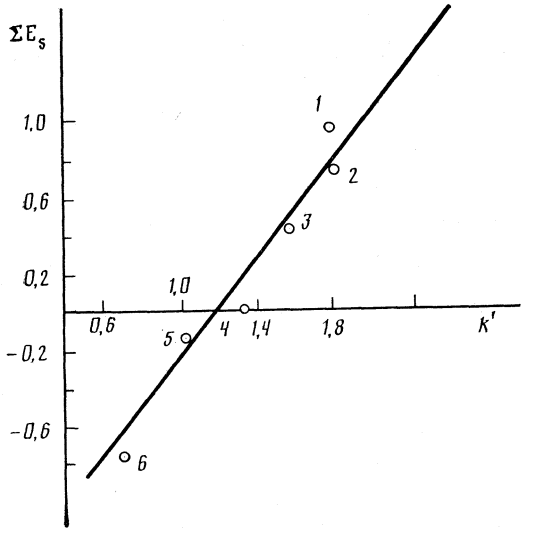


Рис. 1. Зависимость между коэффициентами емкости (k') и суммой стерических констант Тафта (ΣE_s) заместителей у амидного атома азота дабсилпроизводных алкил- и ариламинов; колонка с Силасорбом 600, подвижная фаза гексан – изопропанол – хлороформ (50 : 1 : 10); *1* – анилин, *2* – бензиламин, *3* – циклогексиламин, *4* – диметиламин, *5* – диэтиламин, *6* – дибутиламин

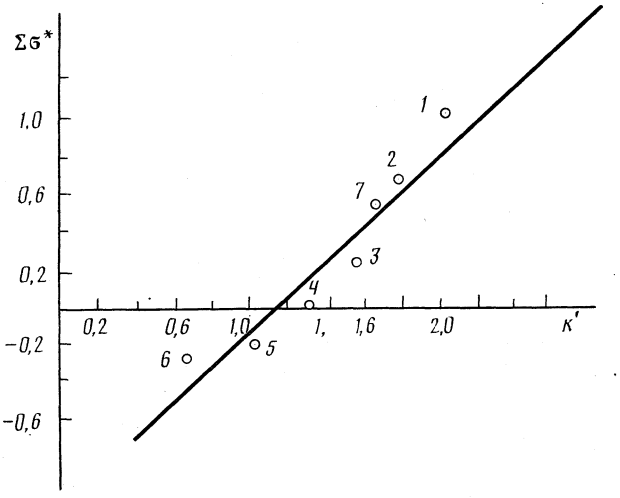


Рис. 2. Зависимость между коэффициентами емкости (k') и суммой индукционных констант Тафта (σ^*) заместителей у амидного атома азота дабсилпроизводных алкил- и ариламинов; колонка с Силасорбом 600, подвижная фаза гексан – изопропанол – хлороформ (50 : 1 : 10); *1–6* – см. рис. 1, *7* – моноэтиланилин

ний. При определении аминов в виде дабсилпроизводных появляется возможность характеризовать удерживание арил- и алкиламинов с помощью единых зависимостей (рис. 1, 2).

При рассмотрении закономерностей удерживания ароматических аминов и дабсиламидов в зависимости от состава подвижных фаз проводилось их хроматографирование на колонках с Силасорбом 600 с ис-

Таблица 4

Коэффициенты емкости аминосоединений и их производных на колонке с Силасорбом 600 (2×64 мм)

Подвижная фаза	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2
	ароматический амин					дабсиламид				
I	1,3	0,17	0,17	0,17	0,25	1,54	0,94	0,49	–	–
II	2,7	0,17	0,17	0,18	0,48	1,78	1,03	0,58	–	–
III	3,0	0,17	0,18	0,18	0,82	2,81	1,54	0,74	–	–
IV	6,6	0,17	0,18	0,19	–	5,55	3,00	1,85	–	–
V	5,6	0,18	0,26	0,53	1,48	1,30	1,03	0,67	1,93	1,67

Обозначения: 1 — анилин, 2 — моноэтиланилин, 3 — неозон Д, 4 — дифенил-*n*-фенилендиамин, 5 — диафен ФП, 6 — диметиламин, 7 — диэтиламин, 8 — дибутиламин; подвижные фазы: гексан — изопропанол 100 : 10 (I), 100 : 5 (II), 100 : 3 (III), 109 : 1 (IV), гексан — изопропанол — хлороформ 50 : 1 : 10 (V).

Таблица 5

Коэффициенты емкости ариламинов и дабсилпроизводных аминов на колонке с Силасорбом C_{18} (120×2 мм)

Подвижная фаза	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ариламин			дабсиламид					
Метанол–вода 90 : 10	0,60	0,42	0,37	0,60	0,80	2,08	0,36	0,88	3,30
Метанол–вода 80 : 20	1,65	1,03	0,90	1,67	2,76	3,80	3,00	3,41	7,50
Метанол–вода 70 : 30	5,90	4,20	3,13	5,78	–	–	–	–	–
Ацетонитрил–вода 90 : 10	1,04	0,90	0,80	–	–	–	–	–	–
Ацетонитрил–вода 80 : 20	1,55	1,18	1,23	1,40	2,10	–	–	2,20	1,40

Обозначения: 1 — неозон Д, 2 — диафен ФФ, 3 — дифен ФП, 4 — диметиламин, 5 — диэтиламин, 6 — дибутиламин, 7 — анилин, 8 — циклогексиламин, 9 — бензиламин.

пользованием подвижных фаз гексан — изопропанол при различных соотношениях растворителей. При этом установлено существование корреляционных зависимостей между коэффициентами емкости изучаемых веществ и мольной долей изопропанола в подвижной фазе (r=0,96).

В табл. 4 приведены результаты хроматографирования ряда ароматических аминов и дабсилпроизводных алифатических и ароматических аминов в условиях нормально-фазовой ВЭЖХ. Представленные данные показывают, что применение этого метода позволяет проводить определение антиоксидантов, относящихся к ряду ароматических аминов, в свободном виде и в виде продуктов превращения ускорителей вулканизации резин — аминов алифатического и ароматического ряда — в виде дабсилпроизводных.

Обращенно-фазовая жидкостная хроматография аминосоединений. В режиме обращенно-фазовой хроматографии также было проведено изучение хроматографического поведения свободных аминов ароматического ряда и дабсилпроизводных алкил- и ариламинов. Хроматографирование проводилось на колонках с Силасорбом C_{18} (120×2 мм, 7,5 мкм) и Силасорбом C_{18}, дополнительно силинизированным трихлорметилсиланом (64×2 мм, 5 мкм), а также на пластинках «Силуфол», импрегнированных вазелиновым маслом.

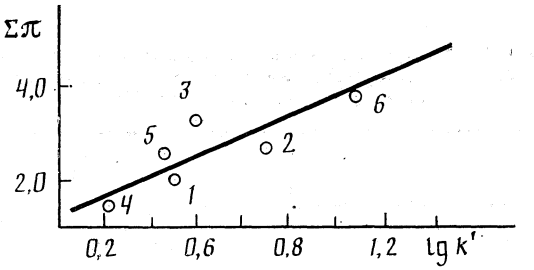


Рис. 3. Зависимость между логарифмами коэффициентов емкости ($\lg k'$) и суммой гидрофобных констант заместителей у амидного атома азота дабсилпроизводных алкил- и ариламинов; колонка с Силасорбом C_{18}, подвижная фаза метанол – вода (80 : 20), *1–6* – см. рис. 1

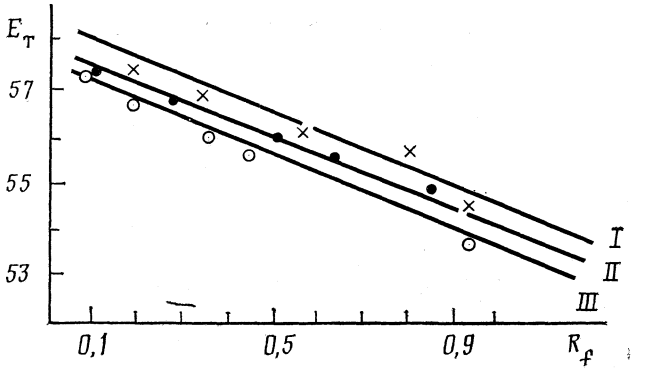


Рис. 4. Зависимости между величинами R_f дабсилпроизводных алкил- и ариламинов и полярностью бинарных подвижных фаз ($E_т$); I – диэтиламин, II – циклогексиламин, III – диметилциклогексиламин; подвижные фазы на основе ацетонитрила

Анализ данных по хроматографированию аминосоединений и их производных (табл. 5, 6) показывает, что, как и в случае нормально-фазовой хроматографии, существенное влияние на удерживание этих соединений оказывают свойства заместителей у атома азота исходного амина, однако в условиях обращенно-фазовой хроматографии доминирующее воздействие оказывает число атомов углерода, характеризующее гидрофобные свойства заместителей. При этом наблюдаются линейные зависимости между параметрами удерживания и числом атомов углерода или гидрофобными константами π заместителей (рис. 3).

Предполагается, что удерживание в обращенно-фазовой хроматографии в первую очередь зависит от состава подвижных фаз и должно быть пропорционально разности в полярности подвижной и неподвижной фаз [6]. Полярность подвижной фазы является основным фактором, влияющим на процесс хроматографирования. Это подтверждается существованием корреляционных зависимостей между хроматографическими параметрами и величинами $E_т$ [7], характеризующими полярность подвижных фаз метанол — вода и ацетонитрил — вода (рис. 4).

Полученные данные свидетельствуют, что с ростом содержания органического растворителя в подвижной фазе уменьшается удерживание изучаемых ариламинов и дабсиламинов. Увеличение количества органической добавки приводит к уменьшению поверхностного натяжения подвижной фазы, что существенно влияет на сорбируемость (табл. 5). Поэтому ука-

Таблица 6

Коэффициенты емкости ароматических аминов на колонке с Силасорбом C_{18}, дополнительно силанизированным трихлорметилсиланом, подвижная фаза метанол – вода (90 : 10)

Амин	k'	Амин	k'
Анилин	0,20	Дибензиланилин	1,80
Моноэтиланилин	0,28	Неозон Д	2,85
Диметиланилин	0,60	Диафен ФФ	1,71
Дибутиланилин	2,90	Диафен ФП	1,00

занный параметр является одним из распространенных, применяемых в теории удерживания в обращенно-фазовой хроматографии для относительной количественной характеристики элюирующей силы бинарных подвижных фаз [6]. Между параметрами удерживания и этими величинами существуют корреляционные зависимости (r=0,98 при ВЭЖХ и 0,96 при ТСХ). Линейные зависимости наблюдаются также между величинами, характеризующими удерживание и молярную долю органической добавки в подвижной фазе (r=0,97).

Выявленные закономерности и полученные корреляционные зависимости дают возможность количественно характеризовать свойства сорбатов и подвижных фаз, прогнозировать хроматографическое поведение ароматических аминов и дабсилпроизводных алифатических и ароматических аминов. Полученные результаты использованы нами для разделения и определения аминосоединений, мигрирующих из полимерных материалов, в условиях высокоэффективной колоночной и плоскостной жидкостной хроматографии.

Список литературы

1. *Rochester C. H., Yong Gen Huo* // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1980. Pt. 1. V. 76. № 5. P. 1158.
2. *Barek J., Pacakova V., Stulik K., Zima J.* // Talanta. 1985. V. 32. № 4. P. 279.
3. *Barreira E. S., Parente P., De Alencar N.* // J. Chromatogr. 1987. V. 379. P. 381.
4. *Hishikawa Y.* // Ibid. 1987. V. 392. P. 349.
5. *Bieganovska M., Soczewinski E., Wolski T.* // Chem. Anal. 1983. V. 28. P. 245.
6. *Dorsey J. G., Johnson B. P.* // J. Liq. Chromatogr. 1987. V. 10. № 12. P. 2695.
7. *Chong W. J., Carr P. W.* // Ibid. 1987. V. 10. № 4. P. 561.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
гигиены и токсикологии пестицидов,
полимеров и пластических масс
Киев

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

Градил И., Орлов В. И., Аратскова А. А., Семений В. Я., Яшин Я. И.

ИОН-ПАРНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ МЕТАЛЛОВ НА МЕТАКРИЛАТНЫХ ПОЛИМЕРАХ

Показана возможность разделения и определения комплексов переходных металлов с пиридилазорезорцином методом ион-парной хроматографии в щелочной среде при использовании колонок с поверхностно-модифицированным фенильными группами полиметакрилатным сорбентом и спектрофотометрического детектирования. Установлено, что при элюировании водными растворами ацетонитрила, содержащими карбонат натрия и ион-парный реагент, комплексы металлов разделяются в основном по ионообменному механизму. Предложен новый ион-парный реагент – октабутилтетраамидофосфоний, обладающий определенными преимуществами перед тетраалкиламмонийными соединениями.

Ион-парная хроматография (ИПХ) – весьма эффективный метод разделения комплексов переходных и тяжелых металлов с фотометрическими реагентами [1–7]. Как показано в [5], селективность разделения может быть существенно повышена при использовании щелочных элюентов. Однако слабая устойчивость в щелочной среде силикагеля – основы большинства используемых в ИПХ сорбентов, существенно ограничивает возможности этого метода. Более перспективным для указанных целей является использование модифицированных полимерных сорбентов, стойких в широком диапазоне изменений pH. В связи с этим цель данной работы состояла в оценке аналитических возможностей ион-парной хроматографии при определении переходных и тяжелых металлов на колонках, заполненных модифицированными полимерными сорбентами, выяснении механизма разделения с использованием различных ион-парных реагентов.

Экспериментальная часть. Эксперименты проводили на жидкостных хроматографах «Цвет-306» и «Цвет-3000» со спектрофотометрическим детектором (рабочая длина волны 510 нм, объем петли дозатора 50 мкл). Колонки 10×0,6 см из нержавеющей стали заполняли пористым, метакрилатным сополимером производства Института макромолекулярной химии АН ЧСФР. В качестве элюента использовали раствор ацетонитрила в воде (10–20 об.%) с добавлением углекислого натрия (0,01–0,04 моль/л) и ион-парных реагентов тетрабутиламмония гидрооксида (I) и октабутилтетраамидофосфония бромида (II). Расход элюента 1,5 см³/мин. Подготовка пробы включает добавление в анализируемую пробу равного объема раствора пиридилазорезорцина (ПАР) концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М.

Обсуждение результатов. Выбор адсорбента. В работе изучены три образца сорбента G-60-Bz на основе пористого метакрилатного сополимера с эпоксигруппами, химически модифицированными бензиловыми группами. Сорбенты отличаются содержанием (m) бензиловых групп. В таблице приведены изученные типы сорбентов.

Образец	Состав, %		Конверсия	m, ммоль/л
	C	H		
124	57,66	7,51	–	0,1
125	64,46	6,48	78,11	0,379
126	64,89	6,33	88,05	1,505

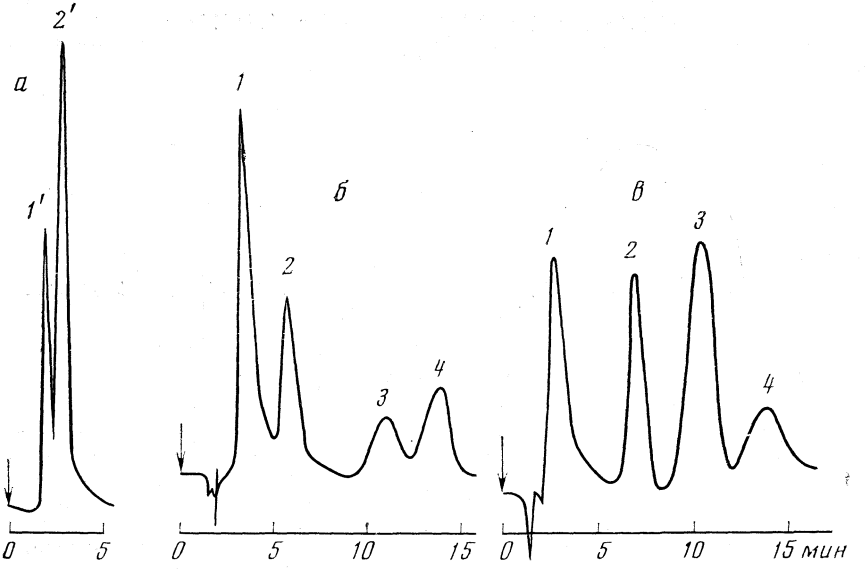


Рис. 1. Хроматограммы смеси комплексов меди (*1*), кобальта (*2*), железа (*3*) и никеля (*4*), *1′* – Cu+Co, *2′* – Fe+Ni на образцах № 124 (*а*), 125 (*б*), 126 (*в*), колонка 6×100 мм, подвижная фаза 20% ацетонитрила, 0,02 М Na_2CO_3, 0,004 М I, расход элюента – 1,5 см³/мин

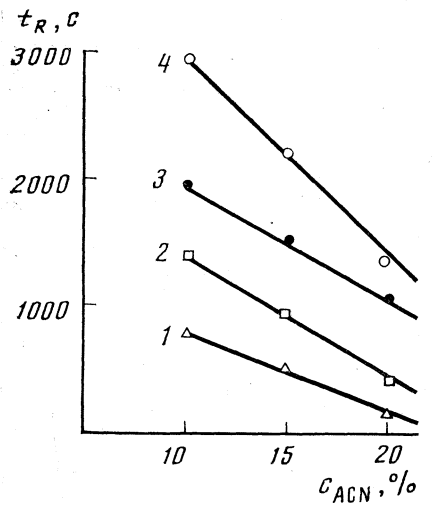


Рис. 2

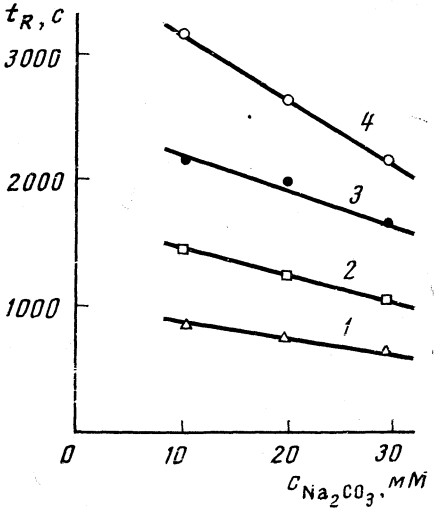


Рис. 3

Рис. 2. Зависимости удерживания Cu (*1*), Co (*2*), Fe (*3*), Ni (*4*) от концентрации ацетонитрила в подвижной фазе

Рис. 3. Зависимости удерживания Cu (*1*), Co (*2*), Fe (*3*), Ni (*4*) от концентрации карбоната натрия в подвижной фазе

На рис. 1 (*а–в*) представлены хроматограммы разделения комплексов меди, кобальта, железа и никеля с ПАР. Образец № 124 (таблица), содержащий весьма малое количество фенильных групп, практически не удерживает комплексы металл – ПАР. Образцы № 125 и 126 удерживают на поверхности и разделяют комплексы металлов с ПАР. Образец 126 вследствие повышенного количества фенильных

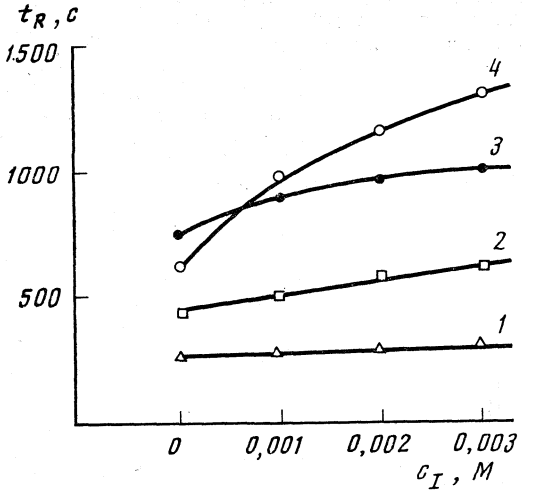


Рис. 4. Зависимости удерживания Cu (*1*), Co (*2*), Fe (*3*), Ni (*4*) от концентрации I в подвижной фазе

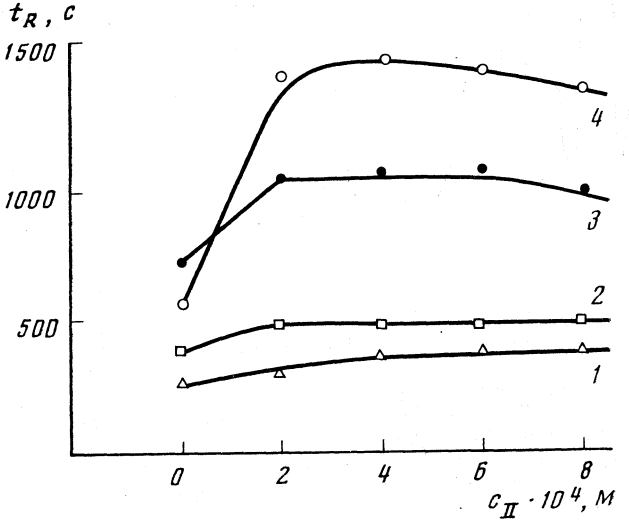


Рис. 5. Зависимости удерживания Cu (*1*), Co (*2*), Fe (*3*), Ni (*4*) от концентрации II в подвижной фазе

групп обладает более высокой селективностью по отношению к комплексам металлов.

Оптимизация условий разделения. Удерживание комплексов металлов с ПАР в ИПХ определяется несколькими параметрами: концентрацией в подвижной фазе органического компонента (ацетонитрила), концентрацией углекислого натрия и концентрацией ион-парного реагента. Была проведена оценка влияния каждого параметра на удерживание и разделение комплексов.

Влияние концентрации ацетонитрила. В ион-парной хроматографии как и в обращенно-фазовой хроматографии увеличение концентрации органического компонента приводит к уменьшению удерживания всех компонентов, но наиболее отчетливо этот эффект сказывается на удерживании сильно удерживаемого комплекса Ni – ПАР (рис. 2). Как показано в [5], порядок выхода комплексов определяется

в случае ионообменного механизма сорбции значением атомной электроотрицательности, которая убывает в ряду Cu(2,1)–Co(2,0)–Ni(1,9)–Fe(1,8). Примерно также выглядит порядок выхода комплексов из колонки. В условиях доминирования адсорбционного механизма последовательность элюирования комплексов должна быть обратной. При элюировании водно-ацетонитрильными подвижными фазами с сорбента с группами C18 последовательность выхода соответствует адсорбционному механизму [5]. Поэтому правдоподобным является предположение о том, что при замене алкильных групп C18 на фенильные группы меняется механизм удерживания с адсорбционного (гидрофобного) на ионообменный.

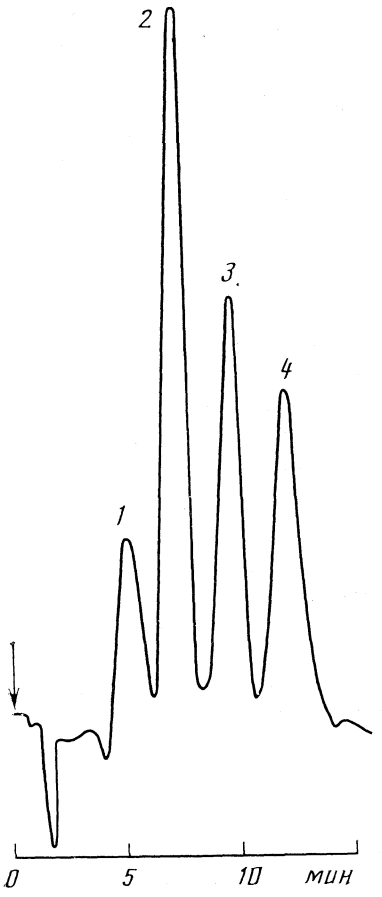


Рис. 6. Хроматограмма смеси комплексов Cu (*1*), Co (*2*), Fe (*3*), Ni (*4*). Колонка 6×100 мм, подвижная фаза 20% ацетонитрила, 0,04 М Na_2CO_3, 0,0004 М II, расход элюента 1,5 см^3/мин

Влияние концентрации углекислого натрия. Добавлением в подвижную фазу углекислого натрия (0,01–0,04 моль/л) создается не только щелочная среда (pH=11, 5÷12,0), но и изменяется элюирующая сила растворителя (рис. 3). Этот эффект подобен эффекту элюирования анионов с помощью углекислого натрия в ионной хроматографии на стационарных ионообменниках, что дополнительно свидетельствует о вкладе ионного взаимодействия в удерживание отрицательных двухзарядных комплексов в щелочной среде. При сорбции по ионообменному механизму ион-парный реагент (BX) адсорбируется на поверхности модифицированного фенильными группами сорбента (S), образуя поверхностный слой, обладающий ионообменными свойствами

$$BX+S \rightleftarrows S(BX). \qquad (1)$$

Сорбция комплексов $M(ПАР)_n^{2-}$ в такой системе подчиняется обычным закономерностям ионного обмена

$$2SB-M(ПАР)_n^{2-}+2X^- \rightleftarrows 2SBX+M(ПАР)_n^{2-}. \qquad (2)$$

При элюировании карбонатом уравнение имеет вид

$$2SB-M(ПАР)_n^{2-}+CO_3^{2-} \rightleftarrows 2SBCO_3+M(ПАР)_n^{2-}. \qquad (3)$$

Если заряд комплекса равен двум, то можно показать, что

$$\lg t_R = A - B \lg[CO_3^{2-}]. \qquad (4)$$

Экспериментальное значение коэффициента B в уравнении (4) равно в среднем для меди, кобальта, железа $B=-0{,}6$, что свидетельствует о частичном удерживании комплексов по гидрофобному механизму (при чисто ионообменном механизме значение коэффициента $B=-1$). Для сильно удерживаемых комплексов никеля значение коэффициента B близко к -1, что свидетельствует о преимущественно ионообменном механизме сорбции.

Влияние концентрации ион-парного реагента. Зависимость удерживания от концентрации I (рис. 4) и II (рис. 5) имеет типичный для ион-парной хроматографии характер – увеличение удерживания с ростом концентрации ион-парного реагента с дальнейшим выпрямлением кривых и даже, в случае II, снижением удерживания. Для создания эффекта ион-парного взаимодействия требуются значительно меньшие концентрации II, чем I. По-видимому, это связано с тем, что II более прочно связан с фенильными группами адсорбента, чем I. Такое же явление наблюдается и при использовании адсорбента, модифицированного углеводородными соединениями типа C8, C16, C18. Кроме того, при использовании II хроматограмма выхо-

дит за более короткое время при сохранении эффективности и селективности разделения, чем при использовании I (рис. 6), что приводит в конечном счете к повышению экспрессности анализа при сохранении погрешности определения концентрации компонентов. Таким образом, октабутилтетраамидофосфоний является весьма перспективным ион-парным реагентом.

Определение ионов металлов. В оптимальных условиях разделения и детектирования металлов градуировочные графики в координатах высота пиков – концентрация линейны в диапазоне двух-трех порядков. Абсолютные пределы обнаружения составляют от 1(Cu) до 12(Fe) нг (объем пробы 50 мкл).

Список литературы

1. *Hoshino H., Yotsuyanogi T., Aomura K.* // Bunseki Kagaku. 1978. V. 27. P. 315.
2. *Wada H., Nesu Sh., Orawa T., Nakagawa C.* // J. Chromatogr. 1984. V. 295. P. 413.
3. *Hoshino H., Yotsuyanogi T.* // Anal. Chem. 1985. V. 57. № 5. P. 625.
4. *Hirowatari K.* // Bunseki Kagaku. 1981. V. 30. № 8. P. 534.
5. *Орлов В. И.* Дис. ... канд. техн. наук. М.: ВЗИПП, 1990. 202 с.
6. *Алимарин И. П., Басова Е. М., Большова Т. А., Иванов В. М.* // Журн. аналит. химии. 1990. Т. 45. № 8. С. 1478.
7. *Sevenich G. J., Fritz J. G.* // Anal. Chem. 1983. V. 55. № 1. P. 12.

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544 : 546.83

© 1991 г.

Сербинович В. В., Мединец В. И., Антонович В. П., Рыбалка В. Б.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ОПТИМИЗАЦИИ ПРОЦЕССОВ РАЗДЕЛЕНИЯ ЦИРКОНИЯ И ГАФНИЯ МЕТОДОМ ЭКСТРАКЦИОННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Для решения задачи высокочувствительного определения примесей гафния в соединениях циркония предложено предварительное экстракционно-хроматографическое разделение этих двух близких по химическим свойствам элементов. Разработана модель выбора оптимальной экстракционной системы для хроматографического разделения микро- и макроколичеств гафния и циркония, основанная на сочетании компьютерного моделирования процесса хроматографирования с экспериментальными данными. С помощью разработанной модели предложена оптимальная экстракционная система, которая позволила осуществить разделение гафния и циркония при соотношении $1 : 10^5$. Разработана методика определения содержания $1 \cdot 10^{-3}$% гафния в материалах на основе циркония.

Метод экстракционной хроматографии успешно решает проблему разделения близких по свойствам элементов [1]. Применение смесей органических реагентов в экстракционной хроматографии дает положительные результаты при разделении элементов. Однако для разделения циркония и гафния смеси органических экстрагентов не использовались. Поэтому представляло интерес изучить возможность экстракционно-хроматографического разделения циркония и гафния с использованием смесей органических реагентов.

В данной работе изучена экстракция циркония и гафния смесями трибутилфосфата (ТБФ) с ацетилацетоном (I), метилизобутилкетоном (II), фурфуролом (III), трибутиларсином (IV), динонилфталатом (V), циклогексаноном (VI), трифенилфосфатом (VII) и трикрезилфосфатом (VIII) при различных объемных соотношениях. Экстракцию проводили, встряхивая 1 г носителя полихрома с нанесенной на него смесью органических реагентов с 5 мл водной фазы, содержащей цирконий и (или) гафний. При изучении экстракции использовали изотопы ^{95}Zr и ^{181}Hf.

Установлено, что среди изученных добавок к ТБФ только ацетилацетон, фурфурол, трибутиларсин и циклогексанон вызывают увеличение фактора разделения циркония и гафния $F = D_{Zr}/D_{Hf}$ в 2,2—2,5 раза (табл. 1). Поэтому для дальнейшего изучения выбраны смеси ТБФ с этими реагентами.

Существует ряд теоретических подходов к описанию процессов, происходящих в хроматографической колонке, основанных на концепциях дистилляционного процесса. В последнее время, благодаря применению ЭВМ, осуществлен переход от эмпирического к фундаментальному подходу по оптимизации рабочих параметров хроматографических систем [2]. Пред-

Таблица 1

Коэффициенты распределения и фактор разделения циркония и гафния при экстракции их смесями органических реагентов

Состав	ТБФ : R	D_{Zr}	D_{Hf}	F
100% ТБФ	–	2,52	0,95	2,65
ТБФ : I	4 : 1	3,11	0,50	6,22
ТБФ : II	3 : 1	4,05	1,01	4,01
ТБФ : III	2 : 1	3,45	0,60	5,75
ТБФ : IV	4 : 1	5,55	0,90	6,17
ТБФ : V	2 : 1	2,54	0,98	2,59
ТБФ : VI	2 : 1	2,91	0,50	5,82
ТБФ : VII	2 : 1	2,52	0,92	2,74
ТБФ : VIII	2 : 1	2,52	0,95	2,65

ложены различные методы компьютерного моделирования, которые основаны на модели теории случайных процессов перемещения [3], теории тарелок Крейга [4, 5], на основе алгоритма Роушона [6, 7], на решении дифференциального уравнения массового баланса [8, 9]. Общим недостатком предложенных компьютерных моделей является их неприменимость для описания процессов разделения микро- и макроколичеств элементов. Только в работах [6, 7] показано практическое использование разработанной модели для разделения веществ при соотношениях 1 : 9 и 9 : 1.

Нами разработана модель выбора оптимальной экстракционной системы для разделения микро- и макроколичеств циркония и гафния. Поиск оптимальной экстракционной системы проводили на основе сочетания результатов компьютерного моделирования и экспериментальных данных. Компьютерное моделирование осуществляли на основе математической модели Маркова В. К. [10].

Хроматографическое экстрагирование можно моделировать посредством непрерывного процесса, состоящего из отдельных актов экстракции и реэкстракции, последовательно протекающих в элементарных слоях колонки. При описании хроматографического процесса колонка разбивается на ряд слоев, при этом переход подвижной фазы от слоя к слою осуществляется скачкообразно прерывными порциями.

Установлены допущения:

1) равновесие в слое устанавливается быстро за время каждого переноса;
2) отсутствует влияние одного компонента на другой;
3) длина слоя равна 1 см;
4) объем водной фазы в слое равен объему одной порции.

В дальнейшем объем загружаемой в колонку пробы и объем подвижной фазы, идущей на элюирование, выражают через количество порций.

На основе этих положений разработана программа для миниЭВМ «Apple-11e». Программа использует следующие параметры: коэффициент распределения (K_d) — один из основных параметров, посредством которого можно учитывать воздействие на систему различных факторов; N_c — количество слоев в колонке (характеристика длины колонки); N_p — количество порций пробы; N_w — количество порций элюента; Q — количество элемента в одной порции загружаемого раствора; $Q_{макс}$ — максимальное количество элемента в органической фазе одной ячейки. Этот параметр определяет максимальную емкость органической фазы по анализируемому элементу.

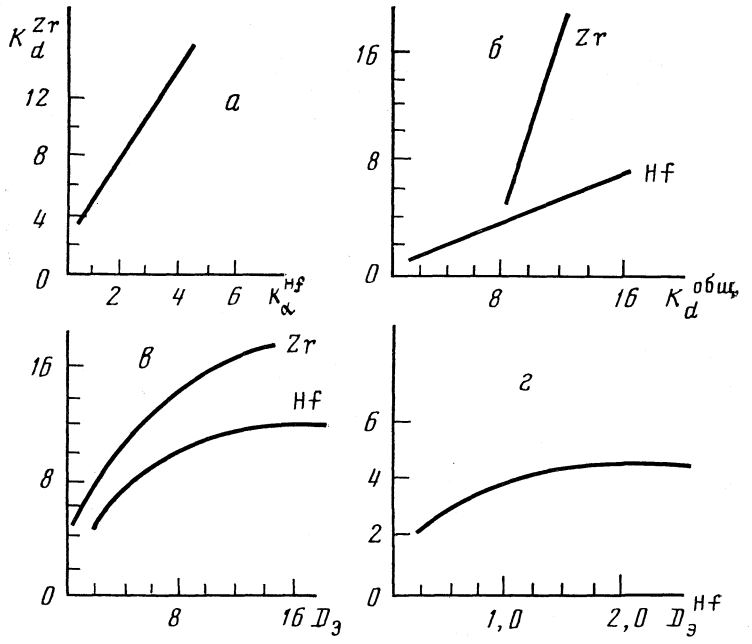


Схема оптимизации условий хроматографического разделения циркония и гафния

Программа выдает на печать содержание компонентов в органической и водной фазе каждого слоя и содержание компонента в каждой порции элюирования. По результатам счета построены выходные хроматографические кривые в координатах: количество вещества (Q_i) — количество порций элюирования (N_w).

Для описания полученных расчетным методом хроматографических кривых определены их основные параметры:

1) число порций элюирования, соответствующее максимуму кривой;
2) число порций элюирования, соответствующее половинам максимума кривой;
3) число порций элюирования, соответствующее точкам пересечения кривой хроматографирования с прямой $Q=1$ (Q_1 и Q_2). Для расчетов принимаем, что количество элемента в пробе $\Sigma Q=1000$. Тогда точка Q_2 является точкой перекрывания двух хроматографических кривых на 0,001, что достаточно для количественного разделения.

Найдена корреляционная зависимость между числом порций элюирования, которые соответствуют основным параметрам хроматографических кривых, и коэффициентами распределения. В зависимости от коэффициентов распределения эти точки образуют серию расходящихся прямых. Анализ этой серии дает возможность построить зависимость коэффициента распределения одного элемента от коэффициента распределения другого (рисунок, *а*). Эта зависимость представляет собой прямую линию, которая ограничивает две области. Точки, попадающие в область выше прямой, обусловливают разделение циркония и гафния на колонке.

В разработанной программе в качестве одного из допущений предполагали отсутствие влияния одного компонента на другой при хроматографическом разделении. Однако в реальных системах таким влиянием прене-

Таблица 2

Результаты определения гафния в диоксиде циркония и циркониевой стали (n=5; P=0,95)

Образец	c'	c''	S_r
ZrO_2	0,06% HfO_2	(0,057±0,002) % HfO_2	0,035
ZrO_2(«ос. ч.»)	$<5\cdot10^{-3}$% HfO_2	$(3,6\pm0,4)\cdot10^{-3}$% HfO_2	0,13
Циркониевая сталь	$4\cdot10^{-4}$% Hf	$(4,21\pm0,44)\cdot10^{-4}$% Hf	0,12

брегать нельзя, особенно при отделении микроколичеств одного элемента от макроколичеств другого. Найдена зависимость между хроматографическими коэффициентами распределения циркония и гафния $K_d^{Zr(Hf)}$, полученными при хроматографировании одного элемента и при их совместном присутствии $K_d^{общ}$ (рисунок, *б*).

Далее найдена связь между коэффициентами распределения $K_d^{общ}$, определенными хроматографическими и экстракционными ($K_э$) методами (рисунок, *в*). Полученные результаты позволяют перейти к последнему шагу схемы оптимизации, т. е. получить зависимость, связывающую экстракционные коэффициенты распределения циркония и гафния (рисунок, *г*). Аналогичные кривые получены для колонок различной длины. Если координаты точки находятся выше кривой на рисунке, *г*, то цирконий и гафний будут количественно разделяться на колонке, в противном случае разделения не будет.

С помощью этой модели в качестве лучшей экстракционной системы для хроматографического разделения циркония и гафния выбрана смесь ТБФ и трибутиларсина (ТБА) с объемным соотношением 4 : 1.

Исследование экстракционно-хроматографического поведения циркония и гафния показало, что они ведут себя в соответствии с их коэффициентами распределения, установленными статической экстракцией: первым элюируется гафний ~30 мл 6,2 М HNO_3, цирконий начинает элюироваться при пропускании 42—45 мл 6,2 М HNO_3. Метод позволяет отделить 0,5 мкг гафния от 50 мг циркония, т. е. разделить их при соотношении Hf : Zr = $=1:10^5$. После отделения гафний определяли с помощью дибромфенилфлуорона (ДБФФ). При элюировании гафний отделяют не только от циркония, но и от Fe, Mg, Ta, Mo, W. Хотя 10—20 мг Cu, Ni, Al, Co, Cr, Mn не сорбируются на колонке, но и не мешают конечному определению гафния.

Правильность полученных результатов проверяли анализом разных навесок проб и методом добавок. Результаты определения гафния в диоксиде циркония и циркониевой стали 141-4 (1 ФМ 16) представлены в табл. 2 (c' — содержание, определенное атомно-эмиссионным методом, c'' — найденное содержание). Разработанный метод позволяет определять $1\cdot10^{-3}$% гафния в материалах на основе циркония.

Список литературы

1. *Браун Т., Герсини Г.* Экстракционная хроматография. М.: Мир, 1978. 627 с.
2. *Quiochon G., Katti A.* // Chromatographia. 1987. V. 24. P. 165.
3. *Chen Yinliang* // J. Radioanal. and Nucl. Chem.: Art. 1988. V. 123. № 2. P. 667.
4. *Eble J. E., Grob R. L., Antle P. T., Snyder L. R.* // J. Chromatogr. 1987. V. 384. № 1. P. 25.

5. *Eble J. E., Grob R. L., Antle P. T., Snyder L. R.* // Ibid. 1987. V. 405. № 1. P. 1.
6. *Guiochon G., Ghodbane S.* // J. Phys. Chem. 1988. V. 92. № 12. P. 3682.
7. *Newburger J., Liebes L., Colin H., Guiochon G.* // Separ. Sci. and Technol. 1987. V. 22. № 8–10. P. 1933.
8. *Plicka J., Svoboda V., Kleinmann I., Uhlirova A.* // J. Chromatogr. 1989. V. 469. № 1. P. 29.
9. *Ghodbane S., Guiochon G.* // Ibid. 1988. V. 440. № 1. P. 9.
10. *Марков В. К.* // Труды Комиссии по аналитической химии. 1963. Т. 14. С. 99.

Академия наук УССР
Физико-химический институт
им. А. В. Богатского
Одесса

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

Горчаков В. Д., Даурова Е. А., Авдюшкина Т. В., Сакодынский К. И.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ПИЩЕВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ ИЗ ПРОДУКТОВ ПЕРЕРАБОТКИ ВИНОГРАДА

Показано, что для препаративного хроматографического выделения антоцианов из экстракта виноградных выжимок наиболее эффективен слабоосновной анионит с группами диметиламина. Установлено, что процесс сорбции антоцианов из кислого водного экстракта происходит в результате формирования водородных связей молекулы красителя и анионогенных групп с одновременным извлечением свободной кислоты; эффективное разрушение образующегося комплекса происходит при использовании в качестве элюента 0,12–0,14 М водного раствора соляной кислоты, содержащего 20–30% этанола.

В настоящее время большое внимание уделяется комплексному использованию пищевого сырья с целью повышения полноты его переработки. В ряду таких задач актуально получение антоцианов – пищевых красителей из ягод, плодов и цветочных лепестков [1]. Разработанная в СССР экстракционная технология выделения этих красителей из виноградных выжимок не обеспечивает необходимую полноту очистки от сахаров, органических кислот, азотсодержащих соединений [2]. Примеси не только ухудшают эксплуатационные характеристики антоцианов, но и вызывают образование нерастворимых осадков, существенно снижающих срок хранения продукта и ведущих к его значительным потерям. Введение стадии препаративного хроматографического выделения красителя на селективном сорбенте позволяет исключить эти нежелательные явления и обеспечить получение высококачественного продукта.

Экспериментальная часть. В качестве рабочего раствора использовали водный экстракт выжимки красных сортов винограда, полученный при гидромодуле 1 : 2 и 50–60° С. Концентрацию красителя в экстракте определяли стандартным методом [3] с использованием спектрофотометра СФ-26.

Для получения изотерм сорбции навески анионитов (0,2 г) помещали в колбы с притертыми пробками, заливали 50 мл рабочего раствора с различной концентрацией красителя и выдерживали при периодическом перемешивании в течение 48 ч. Затем анионит отфильтровывали и в фильтрате определяли равновесную концентрацию красителя.

Для изучения кинетики сорбция 0,5 г анионита помещали в колбы, заливали 50 мл рабочего раствора красителя с постоянной концентрацией красителя (2,5 мМ), помещали во встряхивающую машину и через заданные промежутки времени определяли текущую концентрацию.

Для изучения динамики сорбции 1 г анионита загружали в колонку диаметром 8 мм и с помощью перистальтического насоса подавали на вход рабочий раствор со скоростью 0,2 мл/мин. Аналогично проводили элюирование сорбированного красителя.

Обсуждение результатов. Селективное извлечение антоцианов, представляющих собой растительные гликозиды, содержащие в качестве агликона оксипроизводные флавенола-2, мож быть обеспечено анионитами различных типов [4]. Однако, как показали предварительные эксперименты, наиболее эффективны слабоосновные аниониты (таблица), причем отечественный анионит А-15, полученный по оригинальной технологии, обеспечивающей его монофункциональность [5], значительно превосходит зарубежный аналог Дуолайт А-374.

Равновесная сорбция красителя (c_R, ммоль/г) из кислого водного экстракта выжимок винограда сорта «Каберне» при исходной концентрации красителя $4 \cdot 10^{-3}$ М (D – коэффициент распределения)

Анионит	Функциональные группы	$c_R \cdot 10^2$	D
Дауэкс 1×4	$-\overset{+}{N}(CH_3)_3Cl^-$	0,8	29
Дуолайт А-374	$-N(CH_3)_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3Cl^-$	1,35	59
А-15	$-N(CH_3)_2$	2,7	160

Так как экстракция антоцианов проводится кислыми растворами [2], была изучена зависимость сорбции от исходного значения pH экстрагента. Установлено, что в исследованном интервале имеет место четкая линейная корреляция между равновесной емкостью по красителю (c_R) и pH:

$$c_R = 0{,}018\ pH + 0{,}158.$$

Рассматривая сорбцию антоцианов (ВН) как комплексообразование со свободными аминогруппами анионита (АН) можно записать:

$$АН + ВН \rightleftarrows АН \cdot ВН,$$

$$K = [АН \cdot ВН]/[АН][ВН].$$

Величина [АН·ВН] численно равна сорбированному количеству красителя c_R, а [ВН] – его равновесной концентрации в растворе c_s. Концентрация свободных аминогрупп [АН] в свою очередь равна разности между их исходной концентрации в структуре ионита c_E и емкостью по красителю c_R и кислоте, содержащейся в экстракте $c_к$. Отсюда имеем

$$K = c_R/c_s(c_E - c_R - c_к).$$

Расчет, проведенный для изученных значений pH дал величину $K = 63{,}8 \pm 2{,}6$.

Предложенная схема сорбции антоцианов была применена и для анализа изотермы. Соответствующее значение константы равновесия K составляет $67{,}1 \pm 0{,}8$, что хорошо коррелирует с величиной, определенной исходя из зависимости равновесной сорбции от pH.

Наряду с избирательностью, сорбент для препаративного хроматографического выделения красителя должен обеспечивать высокую скорость диффузии. Обработка результатов, полученных при исследовании кинетики сорбции, проведенная с использованием ряда моделей [6], показала, что наиболее адекватной является внешнедиффузионная модель с коэффициентом массопереноса $\beta = 2{,}6 \cdot 10^{-5}$.

При получении пищевых красителей важное значение имеет выбор эффективного и нетоксичного элюента. Так как в предлагаемой схеме формирование комплекса антоцианов с анионогенными группами обусловлено водородными связями, представляется целесообразным использование в качестве элюента водного раствора соляной кислоты. Как следует из полученных данных, наибольший эффект при этом дают концентрации 0,12–0,14 М (рис. 1). Применение более концентрированных растворов нецелесообразно, так как при этом заметную роль начинают играть процессы кислотного гидролиза красителя.

Степень элюирования антоцианов повышается при введении в кислый элюент этанола, причем в широком интервале концентраций наблюдается обратная зависимость от его мольной доли N (рис. 2).

С целью моделирования и оптимизации сорбционной стадии хроматографического выделения красителя была изучена зависимость времени защитного действия слоя $\tau_{пр}$ от его длины L. В аналитическом виде она с высокой точностью описывается уравнением Шилова:

$$\tau_{пр} = 0{,}88\ L - 4{,}31.$$

На основании полученных данных был проведен расчет реальной масообменной колонны для Голубицкого винсовхоза Краснодарского края. При опытно-промышленных испытаниях на экстракте виноградных выжимок сорта «Каберне» колонна с высотой рабочего слоя 0,96 м отработала до проскока 77 мин, что очень

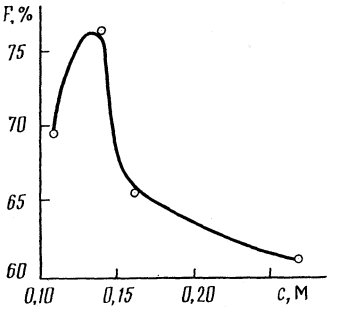


Рис. 1

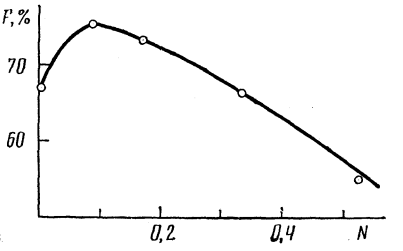


Рис. 2

Рис. 1. Влияние концентрации соляной кислоты на степень элюирования красителя, сорбированного анионитом А-15 при нагрузке 0,01 ммоль/г

Рис. 2. Зависимость степени элюирования красителя, сорбированного анионитом А-15, от содержания этанола в кислом элюенте

хорошо коррелирует с расчетным временем работы 80 мин. Препаративное хроматографическое выделение антоцианов по разработанной методике, включающей сорбцию на анионите А-15 из кислого водного экстракта с последующим элюированием водным 0,14 М раствором соляной кислоты, содержащим 30% этанола обеспечивает получение высококачественного продукта, не содержащего балластных примесей.

Список литературы

1. *Параска П. И., Ножница В. Н., Бондарь Г. Д., Узун Д. Ф.* // Виноделие и виноградарство СССР. 1985. № 1. С. 7.
2. *Параска П. И.* // Новое в виноделии Молдавии. Кишинев: Штиинца, 1979. С. 202.
3. *Харламова О. А., Кафка Б. В.* Натуральные пищевые красители. М.: Пищевая пром-сть, 1979. С. 180–182.
4. Пат. 4452822 США, МКИ³А 231 1/277. Способ получения энокрасителя.
5. *Горчаков В. Д., Авдюшкина Т. В., Лейкин Ю. А., Макарова С. Б.* // Тез. докл. Всесоюз. совещ. по сорбентам для хроматографии. М., 1986. С. 137.
6. *Шатаева Л. К., Кузнецова Н. Н., Елькин Г. Э.* Карбоксильные катиониты в биологии. Л.: Наука, 1979. С. 114–198.

Научно-производственное объединение
ИРЕА

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

УДК 547.96.05:543.544.2

© 1991 г.

Иванов А. Е., Вульфсон А. Н., Якимов С. А., Зубов В. П., Арутюнян А. М.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ШИРОКОПОРИСТЫХ СИЛИКАГЕЛЕЙ С N-БУТИЛПОЛИАКРИЛАМИДНОЙ «СТАЦИОНАРНОЙ ФАЗОЙ» ДЛЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ БЕЛКОВ

Исследовано фракционирование модельных смесей белков методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на композиционных слабогидрофобных сорбентах, полученных путем модифицирования широкопористых силикагелей типа «Армсорб» хемосорбционными слоями N-бутилполиакриламида. Показано, что элюирование белков характеризуется высоким разрешением и емкостью пиков. Описано использование аналитических колонок с полученным сорбентом для определения рекомбинантных проинсулина и инсулина на различных стадиях их синтеза.

Методы синтеза слабогидрофобных полимерных «стационарных фаз» и их применение в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) биополимеров интенсивно развиваются с середины 80-х годов. В качестве таких «фаз» использованы, например, хемосорбированные на силикагелях ацилированные полиэтиленимины [1], N-алкилполиаспартамиды [2], полиэтиленоксид [3], поливиниловый спирт [4]. Преимущества слабогидрофобных «фаз» перед традиционными алкилсилильными «обращенными фазами» заключается в возможности фракционирования высокомолекулярных и лабильных белков без существенной потери их биологической активности и с высокими выходами [5]. Возможными причинами указанной биосовместимости являются, во-первых, экранирование кремнеземного каркаса петлями и хвостами хемосорбированных макромолекул [6] и, во-вторых, меньшая, чем у «обращенных фаз», свободная энергия поверхности сорбента в контакте с водными элюентами [7]. Как следствие, взаимодействие белковых сорбатов со стационарной фазой носит обратимый характер, десорбция происходит в более мягких условиях, не требующих введения в элюент органического модификатора и обычно достигается путем снижения в элюенте концентрации солей.

Ранее нами были исследованы сорбенты, представляющие собой макропористое стекло, покрытое хемосорбированными N-бутил- и N-бензилполиакриламидами [8]. Была показана применимость этих сорбентов для препаративного выделения высокомолекулярных белков – гексонов (300–400 кДа) в режиме хроматографии низкого давления, с высоким сохранением антигенной и иммуногенной активности целевого продукта и высоким выходом.

В данной работе N-бутилполиакриламидная стационарная фаза была синтезирована на мелкодисперсном широкопористом силикагеле и охарактеризована путем фракционирования модельных смесей белков методом ВЭЖХ. Представляло интерес тестировать полученные слабогидрофобные сорбенты в условиях градиентного элюирования ацетонитрилом с 0,1%-ной трифторуксусной кислотой, как принято в обращенно-фазовой хроматографии, и оценить возможность подбора более «мягких» солевых элюентов для десорбции белков.

Экспериментальная часть. В работе использовали силикагель «Армсорб Si 50» со средним диаметром пор 500 Å и средним размером частиц 5 мкм (производства ЕрОНем ИРЕА, г. Ереван). Синтез полимерных стационарных фаз проводили, как

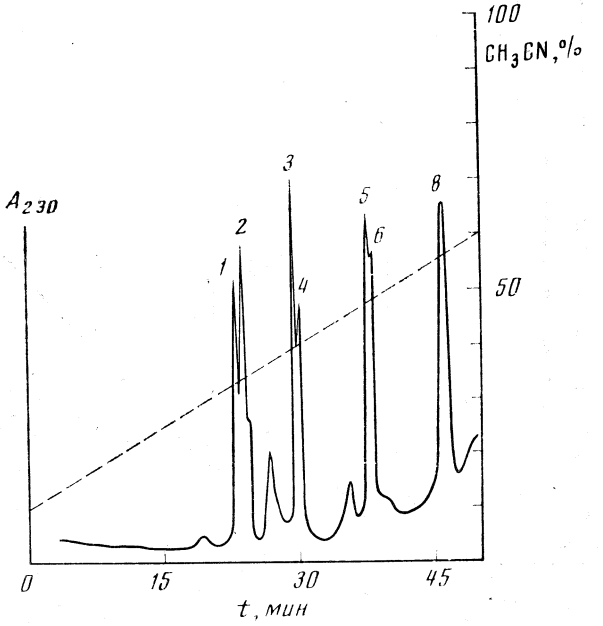


Рис. 1. Высокоэффективная жидкостная хроматография модельной смеси белков на колонке Nucleosil RP Protein 300-7: *1, 2* – инсулин, *3, 4* – лизоцим, *5, 6* – миоглобин, *7* – γ-глобулин, *8* – овальбумин. Нанесение на колонку: 10% ацетонитрил, 0,1% – трифторуксусная кислота. Элюция: градиент концентрации ацетонитрила 1%/мин, скорость элюции 0,8 мл/мин

описано в работе [8]. Методом ртутной порометрии было установлено, что объем и диаметр пор силикагелей после проведения химического модифицирования поверхности существенно не изменились (данные не приводятся). Полученный сорбент (Армсорб-ПА-бутил) хорошо смачивался водой, образовывал в ней плотный осадок. Упаковку сорбентов проводили в стальные аналитические колонки размером 4,6××100 и 4,6×150 мм. В качестве белковых стандартов использовали лизоцим (Boehringer Mannheim, Австрия), миоглобин (Calbiochem, США), γ-глобулин (Calbiochem, США), овальбумин (Reanal, Венгрия). Инсулин и проинсулин человека, рекомбинантные, получены в ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР. Объем пробы составлял 0,5–20 мкл раствора белка с концентрацией 4–15 мг/мл. Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили на хроматографе Du Pont-8800, режимы элюирования см. рис. 1–3. Емкость пиков рассчитывали по формуле $E=t_{гр}/4\sigma$, где $t_{гр}$ – время градиента, σ – дисперсия пика [9].

Обсуждение результатов. На рис. 1 представлена хроматограмма разделения нескольких модельных белков на колонке Nucleosil RP Protein 300-7 (Macherey Nagel, ФРГ), обозначим ее колонка I, а на рис. 2 хроматограмма разделения белков на колонке Армсорб-ПА-бутил (колонка II), проведенного в аналогичных условиях. Как и следовало ожидать, времена удерживания белковых сорбатов (инсулин, миоглобин) на колонке со слабогидрофобной фазой заметно меньше, чем на обращенно-фазовой колонке, а лизоцим не удерживается вовсе. Последнее можно объяснить эксклюзией этого основного белка (pI=11,0 [4]) из пор сорбента, поверхность которого в водных средах несет частичный положительный заряд из-за наличия остатков γ-аминопропилтриэтоксисилана, не связанных с полимерной стационарной фазой [8]. При этом разрешающая способность колонки Армсорб-ПА-бутил несколько выше, поскольку компоненты коммерческих препаратов белков разделяются на ней более полно.

В механизм удерживания белков на сорбенте, по-видимому, вносят вклад как гидрофобное, так, частично, и электростатическое взаимодействие. В пользу этого свидетельствует характер влияния состава элюента на объемы удерживания белков (см. рис. 3). Как следует из рисунка, при хроматографии в солевом буфере (pH=4,5) с использованием метанола в качестве «мягкого» органического модификатора, наблюдается, во-первых, удерживание лизоцима и, во-вторых, возрастание времен

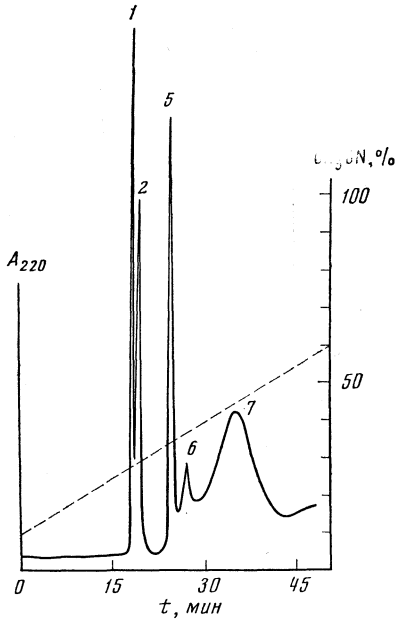


Рис. 2

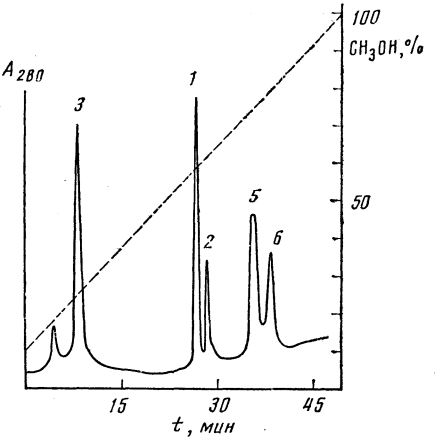


Рис. 3

Рис. 2. Высокоэффективная жидкостная хроматография модельной смеси белков на колонке Армсорб-ПА-бутил. Нанесение на колонку, элюция и обозначение образцов – те же, что и на рис. 1

Рис. 3. Высокоэффективная жидкостная хроматография модельной смеси (обозначения – см. рис. 1) на колонке Армсорб-ПА-бутил. Нанесение на колонку: 10% метанол, 0,2 М ацетат аммония, pH=4,5. Элюция: градиент концентрации метанола 2%/мин, скорость элюции 0,8 мл/мин

элюции инсулина и миоглобина. Одновременно достигается более полное отделение примеси от основного вещества в препарате инсулина. Таким образом, путем изменения полярности и солевого состава элюента можно существенно влиять на параметры хроматографического разделения белков с использованием сорбента Армсорб-ПА-бутил.

Наиболее полная и количественная характеристика свойств колонок Nucleosil RP Protein и Армсорб-ПА-бутил возможна на основе сопоставления емкостей пиков элюции белковых сорбатов (см. таблицу). Из данных таблицы следует, что фракционирование модельных смесей характеризуется весьма высокими значениями емкости пиков на обеих использованных колонках. Для сравнения, хроматографические пики лизоцима, рибонуклеазы и цитохрома С с величинами емкостей 60–70, полученные при их разделении на слабогидрофобной (полиэтиленоксидной) фазе в снижающемся градиенте концентрации сульфата аммония (180 мин), оценены как достаточно емкие [10]. Низкая емкость пика γ-глобулина (белок 7, таблица) объясняется, видимо, гетерогенностью образца, представляющего собой сложную смесь иммуноглобулинов различных подклассов с молекулярной массой ~150 кДа [11]. В то же время высокие емкости пиков инсулина и проинсулина, а также примесных компонентов, содержащихся в их препаратах, создают возможность использования аналитических колонок с сорбентом Армсорб-ПА-бутил для контроля промышленного синтеза рекомбинантного инсулина.

На указанных колонках анализировали следующие промежуточные продукты: ренатурированный проинсулин (с замкнутыми S–S-связями) и собственно инсулин в ферментативном гидролизате проинсулина на нескольких стадиях очистки. На каждой из использованных колонок Армсорб-ПА-бутил было проведено более 50 анализов, что позволило идентифицировать целевые продукты и оценивать степень их чистоты. При этом колебания времени выхода проинсулина и инсулина находились в пределах 1 мин (см. рис. 2 и 3), что свидетельствует о высокой стабильности по-

Емкости хроматографических пиков белков *1*, *2*, *3*, *5*, *7* (см. рис. 1) на колонках I и II

Колонка	*1*	*2*	*3*	*5*	*7*
I, рис. 1	120	140	120	65	–
II, рис. 2	140	210	–	120	4
II, рис. 3	60	60	30	15	4

лимерной стационарной фазы и, следовательно, о хорошей воспроизводимости метода. Обращает на себя внимание высокая проницаемость колонок Армсорб-ПА-бутил. Скорость потока элюента 0,8 мл/мин достигалась через эту колонку при давлении 18–20 атм, а через колонку Nucleosil RP Protein – при давлении 80 атм. Возможной причиной повышенной проницаемости может являться лучшая смачиваемость частиц слабогидрофобного сорбента и, как следствие, более равномерная упаковка.

Таким образом, предложенные композиционные сорбенты являются весьма перспективным материалом для высокоэффективной жидкостной хроматографии белков, сопоставимы по свойствам с лучшими коммерческими аналогами и могут служить составным элементом материальной базы современных процессов биотехнологии.

Список литературы

1. *Fausnaugh J. L., Kennedy L. A., Regnier F. E.* // J. Chromatogr. 1984. V. 317. P. 141.
2. *Alpert A. J.* // Ibid. 1986. V. 359. P. 85.
3. *Chang J. P., El Rassi Z., Horvath C.* // Ibid. 1984. V. 319. P. 396.
4. *El Rassi Z., Horvath C.* // J. Liq. Chromatogr. 1986. V. 9. P. 3245.
5. *Miller N. T., Shieh C. H.* // Ibid. 1986. V. 9. P. 3269.
6. *Иванов А. Е., Жигис Л. С., Турчинский М. Ф. и др.* // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. 1987. № 11. С. 39.
7. Polymers as Biomaterials/Ed. by S. W. Shalaby. N. Y.; L.: Plenum Press, 1984. P. 135.
8. *Иванов А. Е., Верховская Л. Н., Хилько С. Н., Зубов В. П.* // Биоорган. химия. 1990. Т. 15. № 8. С. 1028.
9. *Janzen R., Unger K. K., Giesche H. et al.* // J. Chromatogr. 1987. V. 397. P. 91.
10. *Wu S.-L., Figueroa A., Karger B. L.* // Ibid. 1986. V. 371. P. 3.
11. *Уайт Л., Хендлер Ф., Смит Э. и др.* Основы биохимии. М.: Мир, 1981. С. 1163.

Академия наук СССР
Институт биоорганической химии
им. М. М. Шемякина
Москва

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544.62

© 1991 г.

Клюшниченко В. Е., Вульфсон А. Н., Мальцев К. В., Беляев С. В.

ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНАЯ ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ В АНАЛИЗЕ ПРОДУКТОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА

Изучена эффективность применения эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии для решения задачи постадийного анализа продуктов производства генно-инженерного инсулина человека. На опробированных коммерческих сорбентах найдены оптимальные по разрешению и информативности условия проведения эксклюзионной хроматографии этих веществ. Выдвинута гипотеза, объясняющая специфическую эксклюзию проинсулина-S-сульфоната и подобных ему производных белков. Продолжены разработка и исследования отечественных материалов для эксклюзионной хроматографии белков, пригодных для решения поставленной задачи постадийного контроля продуктов производства генно-инженерного инсулина человека.

Генно-инженерный инсулин человека – гормональный препарат антидиабетического действия, полностью соответствующий инсулину, выделяемому в живом организме, который получают ферментативным расщеплением проинсулина. Проинсулин получают расщеплением рекомбинантного белка, выделяемого из разрушенных клеток продуцента, выращенных в ферментере. В качестве продуцента используют рекомбинантный штамм E. coli с трансформированной плазмидой. Генно-инженерный инсулин человека предназначается для приготовления высококачественных лекарственных форм инсулина.

Эксклюзионная является одним из видов хроматографии, в котором разделение происходит в соответствии с размерами, которые имеют молекулы образца в растворе, причем крупные молекулы элюируются раньше мелких [1].

Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) широко применяется для качественного и количественного анализа белков и пептидов. Существует ряд специальных колонок с различными сорбентами для разделения белков, причем разделение может производиться как в широком диапазоне молекулярных масс (M), так и в узком. Авторы [2] описали разделение смеси белков, состоящей из 22 компонентов (минимальная M у триптофана – 204, максимальная у тироглобулина – $66 \cdot 10^4$). На колонке Bio Rad Bio-Sill TSK 125 удалось провести разделение 27 цистеиннасыщенных белков, имеющих небольшие различия в молекулярной массе с хорошим разрешением [3]. С аналитической точки зрения интересны хроматографии разделения гексокиназы, проведенные на микроколонках (с внутренним диаметром 0,35 мм при длине 81 см) [4]. Нередко белки, имеющие одинаковую аминокислотную последовательность, но разные источники выделения, имеют небольшую разницу во временах удерживания гель-проникающей хроматографии (ГПХ). Различные конформации бычьего сывороточного альбумина по-разному взаимодействуют с сорбентом колонки DuPont GF-250 [5]. При разработке приемлемой хроматографической системы необходимо учитывать многие факторы, связанные как с элюентами, так и с сорбентами [6]. В ряде исследований важно соблюдать такие условия, как, например, недопущение денатурации белков в элюенте или отсутствие в буферах галоидных соединений [7].

Цель данной работы – разработка универсальной методики аналитического контроля технологии получения рекомбинантного инсулина человека, с помощью которой можно было бы проводить качественный и количественный анализ продуктов реакций на каждой технологической стадии.

Технологические стадии основных (А) и промежуточных (В) продуктов технологии получения рекомбинантного инсулина человека (в скобках приведены M, кДа)

Стадия	А	В
I	*3*(17 000)	*2*(34 000), *1*(70 000)
II	*5*(9000)	*3*(17 000), *1*(70 000)
III	*4*(9500)	*5*(9000), *3*(17 000), *9*(17 500)
IV	*6*(9000)	*4*(17 500)
V	*7*(5700)	*10*(5600), *11*(5650), *6*(9000)

Обозначения. *1—7* — см. рис. 1, *9* — гибридный белок-S-сульфонат, *10* — родственные белки, *11* — дезамидоинсулин.

Для контроля технологии получения рекомбинантного инсулина человека необходимо проводить анализы продуктов пяти основных стадий (таблица): выделение и очистка гибридного белка (I), расщепление гибридного белка с помощью BrCN (II), сульфитолиз проинсулина (III), ренатурация проинсулина (IV), синтез инсулина (V).

Так как исследования проводились с использованием хроматографа высокого давления (Varian 8500), необходимо было ограничиться буферами, не содержащими галогенных соединений, из-за которых детали прибора подвергаются коррозии. Также необходимо избегать компонентов буферов, денатурирующих белки. Детектирование проводили при длине волны λ=280 нм.

Разделение продуктов технологических стадий проводили на коммерческих колонках Protein Pac 60 (30 см×7,5 мм) (Waters). TSK G 2000 SW (60 см×7,5 мм), TSK G 3000 SW (60 см×7,5 мм) (Tosoh) при различных значениях pH. В качестве элюентов использовали *трис*-, Na-, и NH_4-ацетат и Na-фосфат с органическими и неорганическими добавками.

В ходе выполнения эксперимента было обнаружено, что проинсулин-S-сульфонат и проинсулин, обладая почти одинаковой молекулярной массой, имеют разное время выхода из хроматографической колонки. Это можно объяснить следующим образом. 1) Проинсулин является глобулярным белком с тремя замкнутыми мостиковыми связями –S–S–, проинсулин-S-сульфонат – линейный белок с открытыми группами SSO_3. Поэтому он больше по размеру, чем проинсулин и в эксклюзионной ВЭЖХ его удерживание меньше, чем удерживание проинсулина.

2) Отрицательно заряженные группы $-SSO_3$ проинсулин-S-сульфоната отталкиваются от одноименно заряженных групп –OH сорбента колонки. Это явление, возможно, обусловливает худшее проникновение проинсулина-S-сульфоната в поры частиц насадки колонки. Вследствие этого происходит совмещение пиков гибридного белка и проинсулин-S-сульфоната, время выхода которого не укладывается на калибровочную кривую (рис. 1).

Было эмпирически установлено, что: 1) помимо увеличения эффективности за счет сужения пиков, добавление Na_2SO_4 к Na-фосфатному буферу приводит к увеличению времени удерживания проинсулин-S-сульфоната на колонке TSK G 2000 SW (Tosoh), при увеличении концентрации Na_2SO_4 ширина пиков уменьшается; 2) добавка ацетонитрила к Na-фосфатному буферу приводит к снижению удерживания проинсулин-S-сульфоната и сужению пиков, благодаря чему возрастает разрешение системы.

Были найдены условия, при которых разделение продуктов реакций технологических стадий (таблица) проходит с максимальной эффективностью на колонке TSK G 2000 SW (60 см×7,5 мм) (Tosoh) в 0,1 M Na-фосфате с добавлением 0,1–0,2 M Na_2SO_4 и 5% ацетонитрила, pH=7,0 (рис. 2).

Проведено исследование сорбционных свойств отечественных эксклюзионных колонок, разработанных совместно с ЕрОНЕМ ИРЕА «Армхром» с различными модификациями поверхности силикагеля. Инсулинсодержащие и другие белки по отдельности элюировались на каждой колонке. При этом выходящие фракции рехроматографировались на колонке TSK G 2000 SW. Найдены условия, при которых все инсулинсодержащие белки не сорбировались на насадке колонок с диольным покрытием.

В результате проведенной работы по разделению белков, образующихся в ходе биотехнологического производства рекомбинантного инсулина человека, разработана методика качественного и количественного постадийного определения промежуточных и конечных продуктов всех технологических стадий. Найдены условия, в ко-

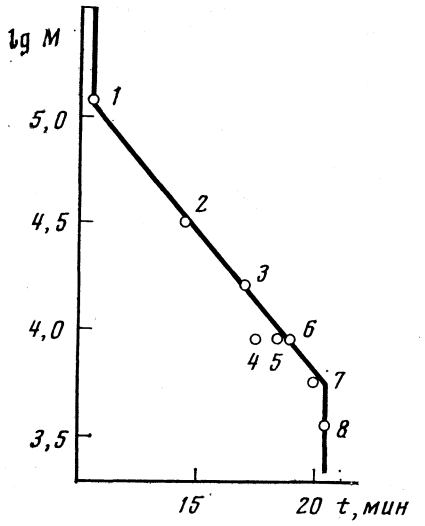


Рис. 1. Калибровочная кривая колонки TSK G 2000 SW (Tosoh), элюент – 1 М Na-фосфат, 0,2 М Na_2SO_4, 5% ацетонитрил (pH=7,0): *1* – высокомолекулярные белки, *2* – димер гибридного белка, *3* – гибридный белок, *4* – проинсулин-S-сульфонат, *5* – проинсулин денатурированный, *6* – проинсулин, *7* – инсулин, *8* – соли

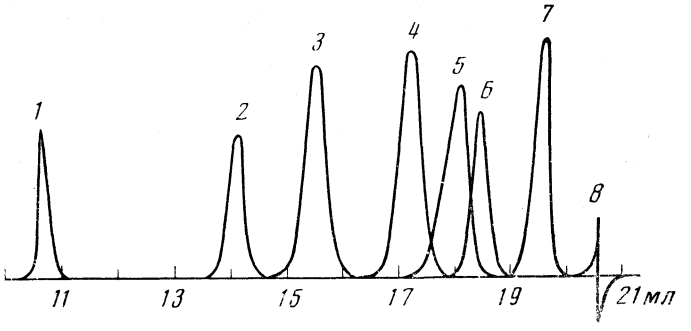


Рис. 2. Совмещенные хроматограммы инсулинсодержащих белков (условия и обозначения продуктов см. рис. 1)

торых времена выхода пиков инсулинсодержащих белков равномерно распределяются на калибровочной кривой. Проведены разделения этих же белков на отечественных хроматографических колонках. Выполненная работа составит основу методики аналитического контроля промышленной технологии получения рекомбинантного инсулина человека.

Список литературы

1. *Yau W. W., Kirkland J. J., Bly D. D.* Modern size-exclusion liquid chromatography. N. Y.: Wiley Interscience Publication, 1979. P. 1–30.
2. *Yan-Bo Yang, Verzele M.* // J. Chromatogr. 1987. V. 391. № 1. P. 383.
3. *Said H. M., Newsom A. E., Tippins B. L., Mahtews K. A.* // Ibid. 1985. V. 324. № 1. P. 65.
4. *Takeuchi T., Saito T., Ishii D.* // Ibid. 1986. V. 351. № 1. P. 295.
5. *Stodola J. D., Walker J. S., Dame P. W., Eaton L. C.* // Ibid. 1986. V. 357. № 1. P. 423.
6. *Brent T. F.* // Ibid. 1987. V. 404. № 1. P. 215.
7. *Madden D. E., Alpenfels W. F., Mahtews R. A., Newsom A. E.* // Ibid. 1982. V. 248. № 1. P. 476.

Академия наук СССР
Институт биоорганической химии
им. М. М. Шемякина
Москва

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544 : 612.118

© 1991 г.

Соловьева Л. Я., Антипова Т. О., Ищенко А. М., Карабанова В. А.

ПРИМЕНЕНИЕ ИОННО-ГИДРОФОБНЫХ СОРБЕНТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ КОМПЛЕМЕНТА С3, С4, С5 ИЗ НОРМАЛЬНОЙ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Изучена возможность применения ионно-гидрофобных сорбентов для выделения С3-, С4-, С5-компонентов комплемента из цельной нормальной сыворотки человека. На основании полученных результатов предложена схема очистки перечисленных компонентов комплемента, которая позволяет в препаративных количествах получать электрофоретические чистые белки С3, С4, С5 с сохранением их функциональной активности.

Система комплемента — одна из защитных систем организма. Она включает 20 белков плазмы крови, которые обеспечивают распознавание и элиминацию генетически чужеродного организму материала. Выделение индивидуальных компонентов комплемента необходимо для изучения молекулярных механизмов активации системы, определения их роли в проявлении воспалительных и иммунорегуляторных реакций, для получения моноспецифических сывороток и создания препаратов для дифференциальной диагностики комплемента. Компоненты комплемента С4 и С3 являются узловыми при формировании ключевых ферментов комплемента, С3 и С5 — конвертаз, а С5-компонент — начальным при сборке мембраноатакующего комплекса.

Известные схемы очистки компонентов комплемента [1, 2] включают как правило обработку сыворотки осаждающими агентами: полиэтиленгликолем (ПЭГ), $(NH_4)_2SO_4$, а также несколько стадий хроматографии, в результате чего выход и удельная активность индивидуальных компонентов комплемента невелики. Цель настоящей работы — создание простой и эффективной схемы выделения компонентов комплемента.

Экспериментальная часть

Для разработки схемы выделения компонентов комплемента С3, С4, С5 использовали ионно-гидрофобные сорбенты: ряд катионитов Солоза КГ [3] с различной гидрофобностью и анионит ДЕАЕ-сферанит [4]. Оценку степени гидрофобности, выраженную в единицах энергии взаимодействия CH_2-группы с сорбентом ($-\varepsilon_0$), проводили по экспериментальным данным хроматографии алифатических спиртов [5]. При выборе оптимального по гидрофобности катионита Солоза КГ для хроматографии С3 использовали высокоочищенный препарат с удельной активностью 3700 ГЕ/мг, полученный с помощью иммунно-аффинного сорбента. Эксперименты на катионите Солоза КГ проводили при комнатной температуре, на колонке 0,9×13 см, объем пробы составлял 2 мл, концентрация белка в пробе 0,15 мг/мл, скорость потока 20 мл/ч. Колонку уравновешивали 0,1 М *трис*-HCl, pH 6,8. Сорбированные белки элюировали градиентом pH до 10.

Варьированием ионной силы раствора подбирали условия, при которых на катионите Солоза КГ одновременно с очисткой С3 от балластных белков происходит его отделение от С5-компонента комплемента. С этой целью проводили ряд хроматографических опытов с цельной нормальной сывороткой человека при комнатной температуре на колонке 0,9×3 см, объем пробы 1 мл, скорость элюции 20 мл/ч. Сорбент уравновешивали *трис*-HCl-буфером (pH 6,8) соответствующей молярности (30, 60, 130 мМ), сорбированные белки элюировали градиентом *трис*-HCl-буфера той же молярности. Буферные растворы содержали 20 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и 50 мМ ε-аминокапроновой кислоты (ε-АКК).

На основании полученных данных для проведения первой стадии препаративного выделения компонентов комплемента из цельной сыворотки человека были выбраны катионит Солоза КГ ($-\varepsilon_0=0{,}6$) и условия сорбции в 30 мМ *трис*-HCl-буфере, pH 6,8 (с добавками ЭДТА и ε-АКК) при десорбции тем же буфером, содержащим 100 мМ NaCl. В опытах, проводимых при комнатной температуре использовали колонку 150 мл, скорость потока 150 мл/ч. В результате препаративной хроматографии на катионите Солоза КГ были получены две фракции: содержащая С3-компонент и включающая С4- и С5-компоненты комплемента. Эти фракции подвергали доочистке.

Для окончательной очистки С3 использовали ионно-гидрофобный анионит ДЕАЕ-сферанит ($-\varepsilon_0=1{,}04$). Колонку объемом 50 мл уравновешивали 100 мМ *трис*-HCl-буфером, pH 6,8, и после нанесения фракции С3 элюировали белок тем же буфером с 500 мМ NaCl.

Полную очистку С4, в том числе отделение его от С5, достигали с помощью хроматографии на ДЕАЕ-Тойо-650(S). При этом использовали колонку объемом 200 мл. Сорбцию проводили в 25 мМ *трис*-HCl-буфере pH 6,8, затем элюировали белки тем же буфером с 200 мМ NaCl.

Доочистку С5 проводили на гидроксилапатите (HA-Ultrogel). Условия хроматографии: сорбция в 25 мМ фосфатном буфере, pH 7,1 с 0,1 М KCl на колонке 50 мл, элюция тем же буфером с 0,5 М KCl.

Опыты по доочистке компонентов комплемента С3, С4, С5 проводили при 5° С, скорость потока при хроматографии составляла 150 мл/ч, в буферных растворах присутствовали добавки ЭДТА и ε-АКК.

В описанных выше экспериментах контроль за выходом белка осуществляли спектрофотометрически по поглощению на 280 нм. Активность С3 и С5 во фракциях определяли гемолитическим методом с использованием сенсибилизированных эритроцитов барана и сыворотки, дефицитной по данному компоненту [6]. Для определения наличия С4-компонента комплемента использовали твердофазный иммуноферментный метод, сорбцию антигена проводили на нитроцеллюлозе, в качестве первых антител использовали поликлональную кроличью сыворотку, в качестве вторых антител – антикроличьи антитела, меченные пероксидазой хрена.

Электрофорез проводили в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) по методу [7].

Обсуждение результатов

Компоненты комплемента С3, С4, С5 имеют близкую молекулярную массу (~ 200 кД) и изоэлектрические точки (pI 6,1–6,3), поэтому их разделение с помощью гель-проникающей и ионообменной хроматографии представляет собой сложную задачу. Известно, что отделение С3 от С5 достигается на гидроксилапатитах [1, 2], имеются также данные об отличии хроматографического поведения С3 и С5 на гидрофобных сорбентах [1, 2]. В связи с этим нами было предложено использовать для разделения С3 и С5 различие их гидрофобных свойств, применяя при этом ионно-гидрофобные катиониты Солоза КГ. Ионно-гидрофобная хроматография имеет ряд преимуществ по сравнению с хроматографией на гидрофобных сорбентах. Так, большая емкость катионита Солоза КГ по белку (~600 мг/г.с.с.) позволила хроматографировать цельную сыворотку человека (СЧ) без общепринятой процедуры фракционирования белков методом осаждения, причем оказалось возможным нанесение на сорбент объема цельной СЧ, равного объему колонки. Варьирование ионных сорбционных свойств изменением концентрации и pH буферных растворов дало возможность по-

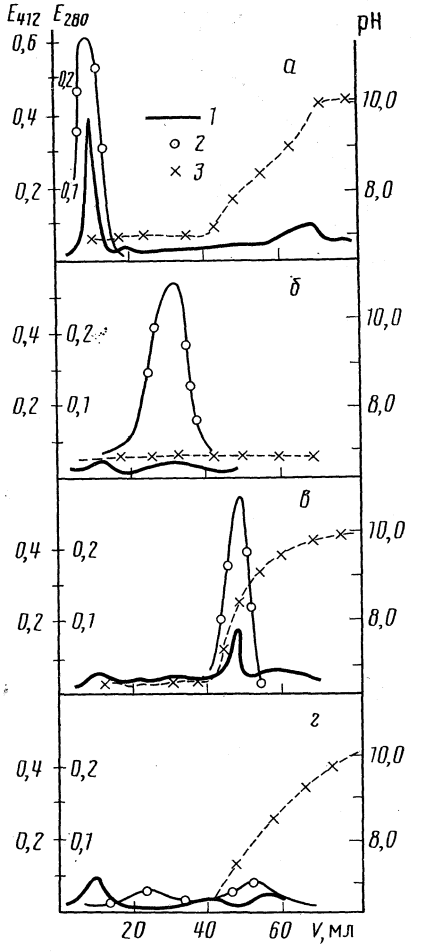


Рис. 1

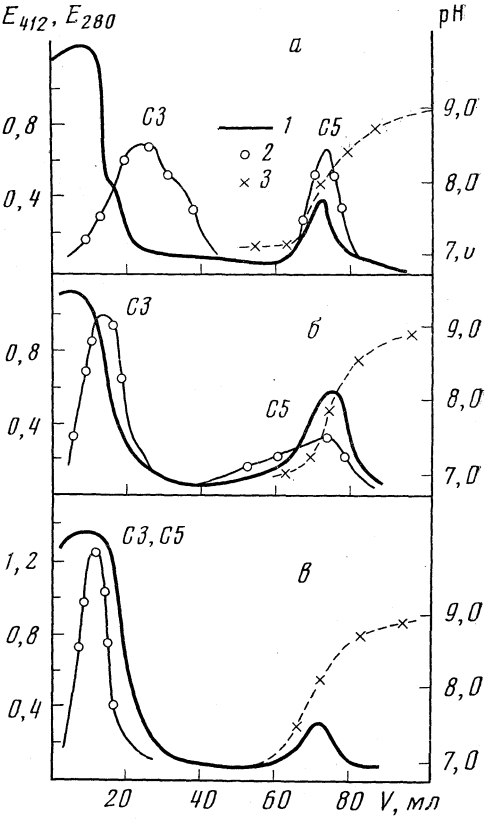


Рис. 2

Рис. 1. Хроматография высокоочищенного С3-компонента комплемента на СМ-сефарозе 6B-CL (*а*) и карбоксильных катионитах Солоза КГ различной гидрофобности (*б–г*); 0,1 М *трис*-HCl-буфер, pH 6,8, $V_к$=8 мл; *1* и *2* – оптическая плотность при 280 и 412 нм соответственно, *3* – pH элюирующего буфера; значения – ε_0: *а* – 0,5; б – 0,6; *в* – 0,8; *г* – 1,1

Рис. 2. Разделение компонентов комплемента С3 и С5 на катионите Солоза КГ 0/24 при различной ионной силе раствора: *а* – 30, *б* – 60, *в* – 130 мМ, *трис*-HCl-буфер, pH 7,0; *1–3* – см. рис. 1

добрать достаточно оптимальный режим процесса сорбции – десорбции трех разделяемых белков и получить существенную очистку от примесей (~10–20 раз) уже на первой стадии.

С целью выбора оптимального по гидрофобности из катионитов Солоза КГ, в ряду которых в зависимости от состава величина $-\varepsilon_0$ меняется от 0,6 до 1,1, были проведены эксперименты по хроматографии чистого С3 в изократических условиях с последующей элюцией сорбированных белков увеличением pH буфера (рис. 1). Из рис. 1 видно, что представленная для сравнения гидрофильная СМ-сефароза ($-\varepsilon_0$=0,5) не удерживает С3, а наиболее гидрофобная Солоза КГ ($-\varepsilon_0$=1,1) необратимо сорбирует С3,

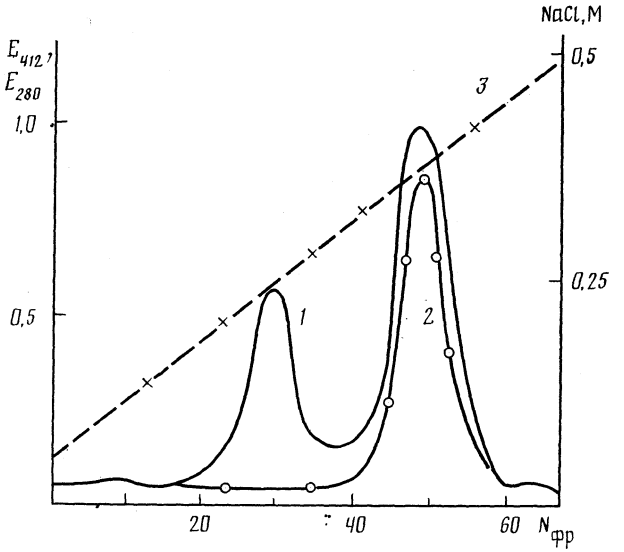


Рис. 3. Очистка С3 на анионите ДЕАЕ-сферанит; *1* и *2* – оптическая плотность при 280 и 412 нм соответственно, *3* – концентрация NaCl

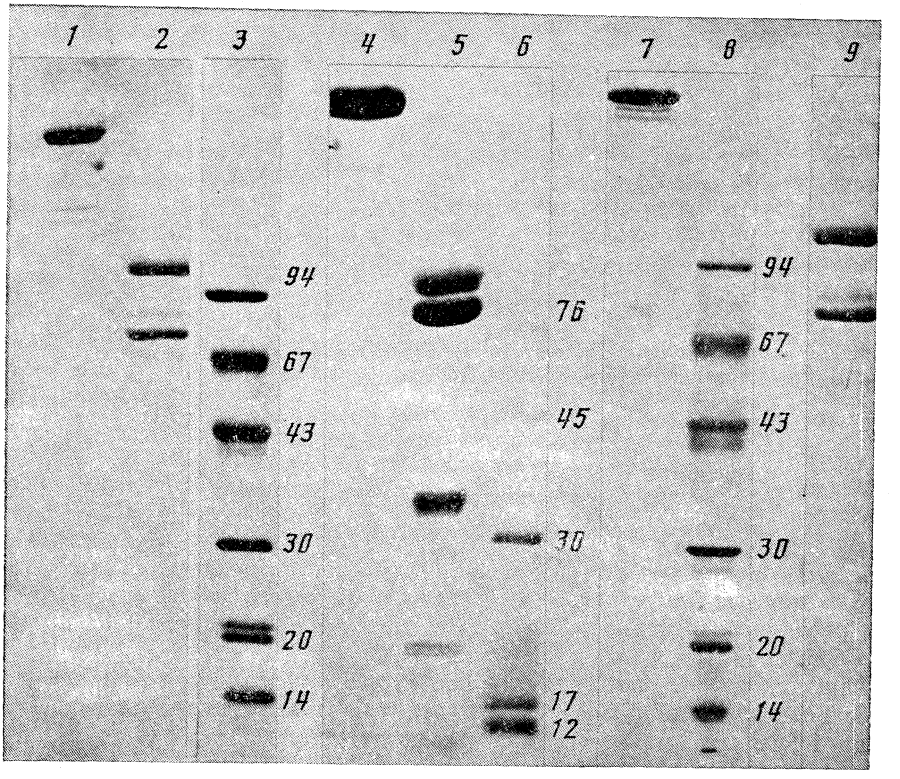


Рис. 4. Электрофореграмма препаратов С3 (*1–3*), С4 (*4–6*), С5 (*7–9*) в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия (ДДС); *1, 4, 7* – компоненты, обработанные ДДС; *2, 5, 9* – обработанные ДДС и β-меркаптоэтанолом; *3, 6, 8* – калибровочные смеси белков

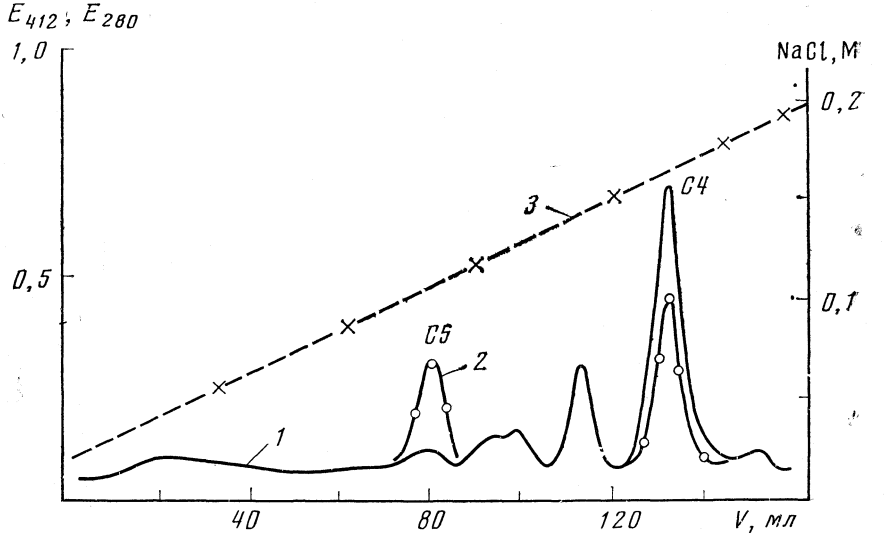


Рис. 5. Разделение С4 и С5 на ДЕАЕ-Тойо-650(S), *1–3* – см. рис. 3

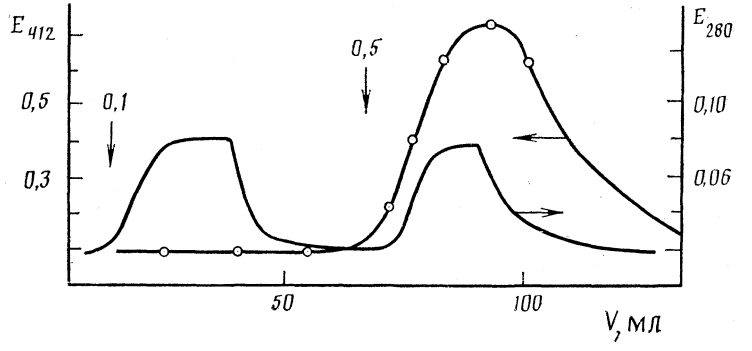


Рис. 6. Очистка С5 на гидроксилапатите HA-Ultragel, стрелками показаны моменты добавления 0,1 и 0,5 М KCl

который элюируется при повышении pH в инактивированном состоянии. Наиболее удачным оказался вариант слабогидрофобного катионита Солоза КГ ($-\varepsilon_0$=0,6), на котором С3 выходит с удерживанием в изократическом режиме на объеме, равном ~3 объемам колонки.

Следующим этапом работы была оптимизация условий проведения хроматографии на катионите Солоза КГ ($-\varepsilon_0$=0,6) по значениям ионной силы и pH буфера; результаты представлены на рис. 2. В соответствии с полученными данными для использования в дальнейшей работе нами был выбран режим хроматографии СЧ (рис. 2, *а*), при котором основная часть сывороточных белков не удерживается сорбентом, С3-компонент слабо удерживается, но выходит без изменения ионной силы и pH буфера, а элюция сорбированных С4 и С5 возможна при увеличении pH до 9,0, или, как показали дополнительно проведенные опыты, при увеличении концентрации буфера на 0,1 М.

Таким образом, на первой стадии хроматографии цельной СЧ на слабо гидрофобном катионите Солоза КГ ($-\varepsilon_0$=0,6) достигается отделение С3

Выделение и очистка С3- и С5-компонентов комплемента из нормальной человеческой сыворотки

Стадия	V, мл	a	E'_{280}	a′	η, %	α
			С3-компонент			
Исходная сыворотка	143	7631	100	69	100	1
1 Солоза КГ	515	1485	1,5	990	70	14
2 ДЕАЕ-сферанит	125	5010	1,0	5000	60	71
			С5-компонент			
Исходная сыворотка	98	5925	100	59	100	1
1 Солоза КГ	490	786	0,5	1572	66	27
2 ДЕАЕ-Тойо	45	6793	0,22	30 877	52	523
3 Гидроксилапатит	9	27 787	0,5	55 574	43	942

Обозначения: a и a′ — значения CH_{50} в 1 мл и 1 мг соответственно. (CH_{50} — единица гемолитической активности компонента комплемента, определенная методом гемолитического титрования), E'_{280} — значение оптической плотности при 280 нм, η — выход по активности, α — степень очистки.

от С4 и С5 с одновременной очисткой от основной массы сывороточных белков в 10—20 раз.

Для второй стадии очистки С3 был использован ДЕАЕ-сферанит ($-\varepsilon_0$= =1,04) с высокой степенью гидрофобности. Хроматография на ДЕАЕ-сфераните С3-содержащей фракции, полученной после очистки на катионите, приведена на рис. 3. Условия, при которых происходит сорбция С3 на анионите, позволяют избавиться от белков сыворотки, не отделившихся на первой стадии, и получить препарат 90—95%-ной чистоты с выходом по активности 60—70%. Результаты выделения С3 и С5 из нормальной человеческой сыворотки приведены в таблице. Данные электрофореза в ПААГе представлены на рис. 4.

Полученная на первой стадии очистки С4, С5-содержащая фракция хроматографировалась на ДЕАЕ-Тойо-650(S) (рис. 5), что позволило получить С4-компонент 90—95%-ной чистоты (рис. 4) и выделить фракцию С5-компонента, для доочистки которой оказалось достаточно хроматографии на HA-Ultrogel (рис. 6). Данные по электрофорезу препарата С5 приведены на рис. 4.

Таким образом, предлагаемая нами схема очистки позволила упростить процедуру выделения белков С3, С4 и С5, благодаря исключению трудоемких стадий дробного осаждения и достигнуть высокого выхода и чистоты получаемых препаратов.

Список литературы

1. *Hammer C. H., Wirtz G. H., Renfer I. L. et al.* // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 8. P. 3995.
2. *Kunkel S. L., Krentzer D. L., Goralnick S., Ward P. A.* // J. Immunolog. Methods. 1980. V. 35. P. 337.
3. *Болдырев А. Г., Пасечник В. А., Федорова Е. А. и др.* Способ получения карбоксильного катионита: А. с. 1623994 СССР // Б. И. 1991. № 4.
4. *Громова О. А., Гаврюченкова Л. П., Хрущева Т. А. и др.* Способ получения полимерного гранульного анионита // Положительное решение по заявке на изобретение № 4301214/05 от 31.08.89.
5. *Pasechnik V. A., Solovyova L. Ya., Gorbunov A. A. et al.* // Chromatographia. 1989. V. 28. № 5/6. P. 258.
6. *Кэбот Е., Нейр М.* Экспериментальная иммунохимия. М.: Медицина, 1968. С. 140—146.
7. *Laemmli V. K.* // Nature. 1970. V. 27. P. 680.

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544 : 612.118

© 1991 г.

Штукина Т. В., Ищенко А. М., Болдырев А. Г., Антипова Т. О., Мартюшин С. В., Трофимов А. В., Синева С. А.

ВЫДЕЛЕНИЕ С1-ИНГИБИТОРА КОМЛЕМЕНТА

Предложены два способа получения очищенного С1-ингибитора из плазмы крови человека: первый включал три стадии очистки (преципитацию ПЭГ и последовательную хроматографию на ДЕАЕ-целлюлозе и ионно-гидрофобном сорбенте), второй способ основан на применении иммуноаффинной хроматографии с иммобилизованными на Сефарозу моноклональными антителами к С1-ингибитору.

С1-ингибитор (С1-ин) наряду с другими, такими как антитрипсин, атромбин III, относится к суперсемейству ингибиторов серинового типа, называемых «серпинами». Он участвует в регуляции нескольких протеолитических систем крови: комплемента, свертывания, растворения, кининовой. Его роль в регуляции системы комплемента сводится к контролю активации первого компонента комплемента С1, представляющего собой комплекс из трех белков $C1q-(C1r-C1s)_2$ [1]. При этом С1-ин вызывает диссоциацию активированного комплекса $\overline{C1}$ за счет его ковалентного связывания с протеазами С1r и С1s, катализирующими каскад реакций комплемента.

С1-ин является одноцепочечным высокогликозилированным белком, содержание углеводной части молекулы составляет 35%. Активный центр его локализован в белковой части молекулы. Молекулярная масса нативного С1-ин составляет 105 кД, хотя известны и другие молекулярные формы функционально активного белка с молекулярной массой 89–96 кД. В сыворотке крови присутствует также функционально неактивный С1-ин, молекулярная масса которого составляет 95 кД [2].

Важность физиологической роли С1-ин наилучшим образом продемонстрирована на четко установленной взаимосвязи между его дефицитом и проявлением симптома ангионевротического отека (АНО). Данная патология обусловлена тем, что при дефиците С1-ин происходит неконтролируемая активация комплемента с образованием вазоактивных пептидов, являющихся продуктами реакций комплемента [3, 4].

В последнее время появились публикации о применении препарата С1-ин для лечения АНО посредством заместительной терапии [5, 6]. Использование С1-ин в качестве лечебного препарата требует разработки методов его выделения, позволяющих получить функционально активный С1-ин высокой степени очистки. В настоящей работе представлены два различных способа получения функционально активного С1-ин 90–98% степени чистоты.

Экспериментальная часть

Исходным сырьем для получения С1-ин служила пулированная цитратная плазма крови (ПК) здоровых доноров, в которую добавляли ингибиторы протеаз – фенилметилсульфонидфторид (I) и *n*-нитрофенил-*n'*-гуанидинобензоат (II) до концентраций 1 мМ и 25 мкМ соответственно.

Первый способ включал в себя три стадии: дробное осаждение ПЭГ-4000 в интервале концентраций 16–45%, хроматографию на ДЕАЕ-целлюлозе и хроматографию на ионно-гидрофобном сорбенте. На всех стадиях использовали буферный раствор, именуемый в дальнейшем основным буфером (ОБ), следующего состава: 1 мМ KH_2PO_4, 2 мМ этилендиаминотетрауксусной кислоты (III), 1 М ε-аминокапроновой кислоты (IV), 1 мМ I и 25 мкМ II, pH 7,4. По мере необходимости варьировали только величину ионной силы ОБ добавлением сухого порошка NaCl. Ионная сила характеризовалась величиной электропроводности ρ (мСм/см), которая проводится для каждого этапа. Все процедуры проводили при 4° С на хроматографическом оборудовании фирмы ЛКБ (Швеция).

К 50 мл ПК добавляли 8 г сухого ПЭГ-4000 при постоянном перемешивании в течение 1 ч, затем центрифугировали 30 мин при 10 000*g*. В супернатант добавляли также при постоянном перемешивании 14,5 г сухого ПЭГ-4000 (до конечной концентрации 45%) и вели осаждение в течение 1 ч. Раствор центрифугировали 30 мин при 10 000*g*. Преципитат растворяли в 30 мл ОБ (ρ=0,6 мСм/см), а затем электропроводность раствора доводили до 3,8 мСм/см добавлением сухого порошка NaCl.

Растворенный преципитат наносили на колонку со 100 мл сорбента ДЕАЕ-сефароцелла, уравновешенного ОБ с ρ=3,8 мСм/см. Сорбент отмывали ОБ с тем же значением электропроводности до нулевого поглощения при длине волны 280 нм и вели элюцию градиентом ионной силы (500 мл ОБ, ρ=3,8 мСм/см+500 мл ОБ, ρ=21 мСм/см). Фракции, содержащие С1-ин, объединяли и концентрировали до объема 5 мл. Проводимость раствора доводили до 3,8 мСм/см.

Полученную фракцию наносили на колонку, содержащую 17 мл сорбента Солоза 0/24, уравновешенного ОБ (ρ=3,8 мСм/см), и отмывали тем же буфером до нулевого поглощения при 280 нм. Элюцию С1-ин проводили ступенчато ОБ (ρ=11,0 мСм/см), а затем 1 М NaCl (ρ=85,0 мСм/см). Фракции, соответствующие каждому пику, объединяли. Функционально активный С1-ин элюировался с Солозы 0/24 ОБ (ρ=11,0 мСм/см). Степень гомогенности препарата составляла 95–98%.

Второй способ выделения С1-ин заключался в проведении иммуноаффинной хроматографии на сефарозе с иммобилизованными асцитными моноклональными анти-С1-ин-антителами Н1Д7 (МАТ Н1Д7). На колонку, содержащую 30 мл иммуноаффинного сорбента, уравновешенного буферным раствором состава: 20 мМ *трис*, 0,15 М NaCl, 1 мМ I, 25 мкМ II, pH 7,4, наносили 30 мл ПК и отмывали уравновешивающим буфером до нулевого поглощения при 280 нм. Элюцию С1-ин вели 30 мл 3 М NaCNS, после чего сорбент отмывали уравновешивающим буферным раствором. Фракции, содержащие С1-ин, объединяли, концентрировали до объема 2 мл и диализовали против буферного раствора, содержащего 20 мМ *трис*, 0,15 М NaCl, pH 7,4.

Первичный скрининг С1-ин во фракциях после хроматографии, определение общего количества С1-ин, а также его активной формы проводили с помощью твердофазных иммуноферментных тест-систем согласно методике [7]. Определение общего количества С1-ин основано на его взаимодействии с моноклональными анти-С1-ин-антителами, специфичными к обеим формам С1-ин, а определение активной формы С1-ин – на связывании его с активированным субкомпонентом комплемента $\overline{C1S}$.

Полученный обоими способами С1-ин хранили в растворе при −70° С или лиофильно высушенным при 4° С.

Обсуждение результатов

При разработке обоих способов выделения С1-ин наряду с получением очищенного функционально активного препарата ставилась задача применения для этих целей отечественных сорбентов и сравнение их с сорбентами импортного производства.

Иммуноаффинный сорбент был получен иммобилизацией на сефарозу асцитных МАТ Н1Д7 методом активированных эфиров [8]. Антитела МАТ Н1Д7, продуцируемые гибридомой LBP Н1Д7, оказались специфич-

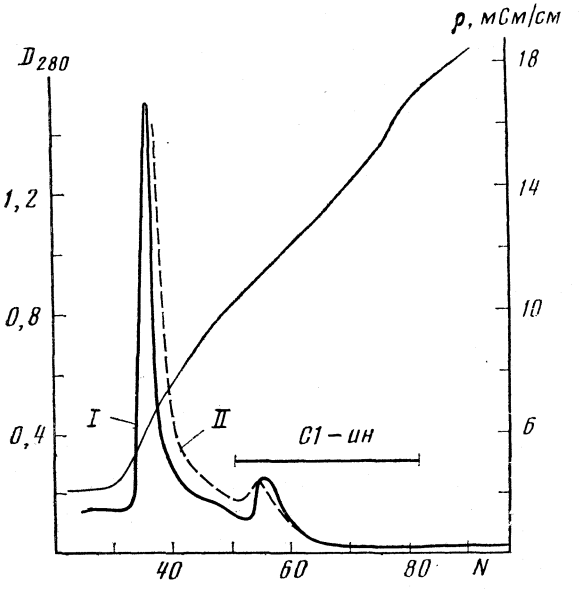


Рис. 1. Хроматограмма элюции С1-ин линейным градиентом ионной силы на ДЕАЕ-сфероцелле(I) и ДЕАЕ-сефацеле(II). Колонка 2,5×35, объем сорбента – 100 мл, скорость элюции – 100 мл/ч, общий объем градиента – 1000 мл, объем фракции – 10 мл, *N* – номер фракции

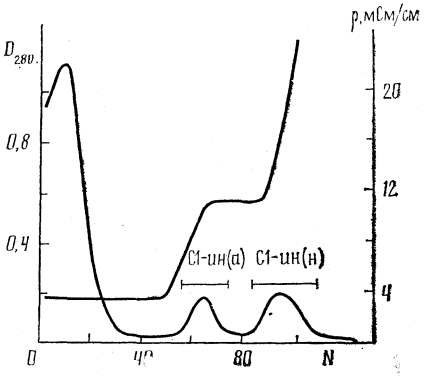


Рис. 2. Хроматограмма элюции С1-ин с Солозы 0/24. Колонка 2,5×35, объем сорбента – 17 мл, скорость элюции – 60 мл/ч, объем фракции – 3 мл; С1-ин (а) и С1-ин (н) – соответственно активная и неактивная формы

ными как к нативной, так и к неактивной формам С1-ин. Они были использованы в тест-системах для определения общего количества С1-ин.

Иммуноаффинный способ позволил получить С1-ин с выходом по активности 55%. Согласно данным электрофореза, степень гомогенности препарата составила 90–93%.

При разработке альтернативного метода выделения С1-ин за основу был взят способ, предложенный в [2]. При этом была изучена возможность использования на стадии ионообменной хроматографии вместо ДЕАЕ-сефацеля синтезированных на основе микрокристаллической целлюлозы анионообменников. Лучшие результаты, практически идентичные полученным для ДЕАЕ-сефацеля, достигнуты на сорбенте ДЕАЕ-сфероцелл. На рис. 1 даны хроматограммы элюции С1-ин градиентом ионной

Характеристика фракций С1-ин на стадиях выделения

Фракция	V, мл	c, мг/мл	β, %	β_a, %
1 способ очистки				
Исходная плазма	50	0,20	100	100
Супернатант 16% ПЭГ-4000	50	0,20	100	100
Преципитат 45% ПЭГ-4000	30	0,33	98	95
Элюат с ДЕАЕ-сфероцелла	4,1	0,56	23	20
Элюат с Солозы 0/24	5,0	0,34	17	17
2 способ очистки				
Исходная плазма	30	0,20	100	100
Элюат с Н1Д7-сефарозы	2	1,70	56	55

Обозначения: V — объем фракции, c — концентрация С1-ин, β — выход С1-ин, β_a — выход функционально активного С1-ин.

силы; характеристики фракций, содержащих С1-ин, после ионообменной хроматографии приведены ниже:

Сорбент	ДЕАЕ-сфероцелл	ДЕАЕ-сефацель
Выход С1-ин, %	22	23
Содержание С1-ин, %	12	10

В работе [2] для последующей очистки С1-ин использовали хроматографию на Zn-хелатном сорбенте. При этом получали препарат С1-ин 70%-ной степени чистоты, требовавший дальнейшей доочистки.

В качестве альтернативы стадии Zn-хелатной хроматографии в настоящей работе было предложено использовать для дальнейшей очистки гидрофобные свойства молекулы С1-ин. Были испытаны несколько синтезированных ионно-гидрофобных сорбентов типа Солоза с различной степенью гидрофобности. Оказалось возможным для сорбента с наименьшим содержанием гидрофобной составляющей (Солоза 0/24) подобрать такие условия проведения хроматографии, при которых С1-ин 95—98%-ной степени гомогенности элюировали ступенчатым повышением ионной силы раствора. При этом происходило также и отделение от неактивной формы С1-ин, находящейся во фракции после ионообменной хроматографии. Неактивная форма более прочно связана с сорбентом и элюировалась раствором большей ионной силы. Хроматограмма очистки С1-ин на Солозе 0/24 представлена на рис. 2.

В таблице приведены характеристики фракций, содержащих С1-ин, на стадиях его очистки как по первому, так и по второму способам.

Таким образом, разработаны два способа очистки С1-ин из плазмы крови человека, позволяющие получать данный гликопротеин в практически гомогенном состоянии. Подобран сорбент (Солоза 0/24) и режимы хроматографии на нем, позволяющие отделять функционально активный С1-ин от его неактивного аналога. Конечный выход С1-ин, выделенного по первому способу, составил 17%, по второму — 55%.

Список литературы

1. *McKay E.-J., Laurell A.-B., Märtensson U., Sjöholm A. G.* // Mol. Immunology. 1980. V. 18. № 5. P. 349.
2. *Prograis L. J., Hammer C. H., Katusha K., Frank M. M.* // J. Immunol. Methods. 1987. V. 99. P. 113.
3. *Cicardi M., Frangi D., Bailliere's* // Clinical Immunology and Allergy. 1988. V. 2. № 2. P. 405.
4. *Lachman P. J., Rosen F. S.* // Acta Pathologia et Micrologica Scandinavica. Sect. C, Suppl. 284. 1984. V. 92. P. 35.
5. *Cullmann W., Opferkuch W.* // Progr. Allergy. 1986. V. 39. P. 311.
6. *Abinun M., Mikuška M.* // 7th Intern. Congress of Immunology. Abstr. July 30 – August 5. 1989. P. 144.
7. *Hach C. E., Hanneman A. J., Eerenberg-Belmer A. I. M. et al.* // J. Immunology. 1981. V. 127. № 4. P. 1450.
8. *Pasechnik V. A.* // J. Chromatogr. 1986. V. 364. P. 359.

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 577.152

© 1991 г.

Котлова Н. Г., Кулиш М. А., Рубцов К. С.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ОЧИСТКИ СУБЪЕДИНИЦЫ II ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

Установлено, что применение эксклюзионной колонки TSK G 3000 SW для очистки гидрофобного высокомолекулярного полипептида II цитохромоксидазы вследствие наличия в подвижной фазе высокой концентрации солей и детергентов требует последующего обессолевания. С целью упрощения метода очистки белка использована обращенно-фазовая хроматография на колонках МПС 300, Aquapore Butyl, SGX PTFE, однако наилучшее разделение было достигнуто с помощью колонки Ultrasphere XL C 18; электрофорез одной из фракций показал наличие индивидуального полипептида.

Цитохромоксидаза (КФ 1.9.3.1) относится к трансмембранным электронпереносящим белкам, локализуется в митохондриях и катализирует восстановление кислорода до воды в цепи окислительного фосфорилирования. Фермент, выделенный из сердечной мышцы быка, состоит из 12–13 различных субъединиц. В качестве простетических групп цитохромоксидаза содержит два гема *a* и два атома меди. Сложный состав и высокая гидрофобность затрудняют процессы очистки как самого фермента, так и отдельных субъединиц.

Цель данной работы – выделение гомогенной субъединицы II фермента. Этот белок (молекулярная масса 26 000 Да) расположен трансмембранно и содержит аминокислоты – лиганды гема *a* и атома меди, а также участок связывания с цитохромом *c*. Изучение третичной структуры этой субъединицы позволит лучше разобраться в вопросах функционирования фермента в целом.

Для выделения субъединицы II активную цитохромоксидазу (40 мг), полученную из сердечной мышцы быка [1], обрабатывали 2-меркаптоэтанолом и додецилсульфатом натрия (ДСН) и полученные полипептиды разделяли на колонке с Ультрагелем ACA 54 (2,6×90 см). Содержание субъединиц в отдельных фракциях определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН. Профиль элюции и результаты электрофореза приведены на рис. 1 и 2.

Фракции *1–3*, содержащие субъединицу II, подвергали дальнейшей очистке. Для этого использовали колонку TSK G-3000 SW (9×600 мм, LKB, Швеция) и жидкостной хроматограф «Knauer», ФРГ [2]. Эта колонка оказалась недостаточно эффективной, вероятно, вследствие увеличения размеров субъединиц за счет взаимодействия с ДСН, присутствующего в подвижной фазе. Вещества выходят быстро, и не происходит полного разделения полипептидов I, II и III. Применение эксклюзионной высокоэффективной хроматографии на колонке TSK G-3000 SW позволяет получать гомогенный препарат второй субъединицы, однако для исследований такой препарат оказался малопригодным, так как содержал значительное количество солей и ДСН, что требовало последующего обессолевания.

С целью упрощения и ускорения процесса было решено подобрать условия очистки на колонках с обращенной фазой. Для этого мы использовали три колонки с различными типами неподвижных фаз, на основе силикагеля – Aquapore Butyl (2,1×220 мм) и Ultrashere XL C 18 (4×500 мм, «Beckman») – и на силикагеле с тефлоновым покрытием SGX PTFE (4,6×250 мм). В качестве подвижной фазы использовали смеси фосфатного буфера с ацетонитрилом, изопропанолом и муравьиной кислотой [3].

Ограниченное количество субъединицы II во фракциях, полученных в результате гель-фильтрации диссоциированной цитохромоксидазы на колонке с ACA 54, не позволило провести нам подробные исследования, однако можно отметить сле-

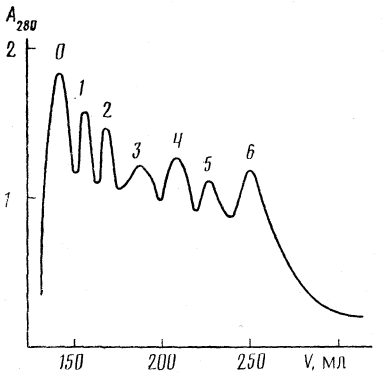


Рис. 1

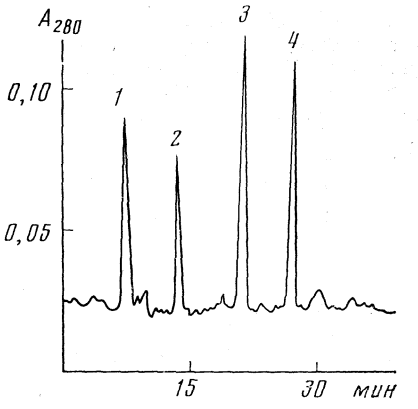


Рис. 3

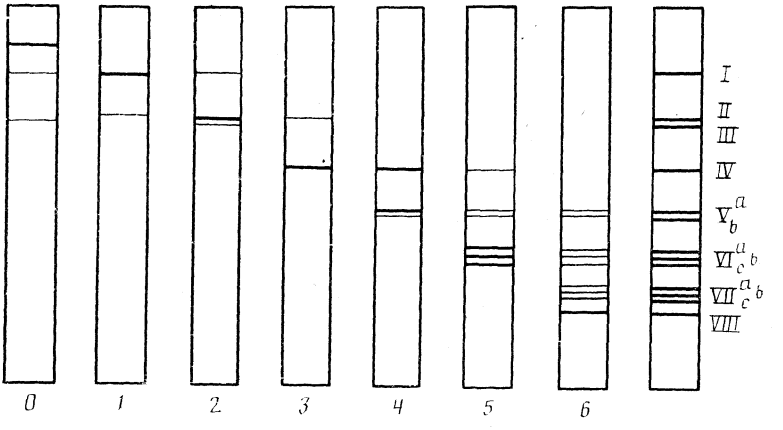


Рис. 2

Рис. 1. Разделение диссоциированной цитохромоксидазы на колонке с Ультрагелем АСА 54 (2,6×90 см), уравновешенной 0,5 М *трис*-H_2SO_4-буфером (pH 8,2), содержащим 3% додецилсульфата натрия, 0,01% азида натрия, 1 мМ ЭДТА. Скорость элюции 6 мл/ч. Препарат предварительно инкубировали в течение 16 ч при 20° С в присутствии додецилсульфата натрия (5 мг/мг белка) и 4% 2-меркаптоэтанола

Рис. 2. Электрофоретический анализ фракций, полученных при гель-фильтрации диссоциированной цитохромоксидазы на колонке с АСА 54. Предварительно образцы инкубировали в 0,05 М *трис*-HCl-буфере (pH 7,0), содержащем 4% додецилсульфата натрия и 8 М мочевины, в течение 14 ч при 20° С. Электрофорез проводили в 18%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Нумерация треков соответствует номерам фракций на рис. 1. Римскими цифрами указаны субъединицы цитохромоксидазы

Рис. 3. ВЭЖХ фракций, содержащих субъединицу I и II цитохромоксидазы

дующее. Колонки МПС 300, SCX PTFE, Aquapore Butyl при небольших нагрузках давали хорошее разрешение пиков при первых анализах, но при последующих вводах пробы разделение быстро ухудшалось. Лучшие результаты были получены на колонке Ultrasphere XL 18, поэтому дальнейшие эксперименты были выполнены именно на этой колонке. Подвижная фаза: буфер А – 1 мМ фосфат натрия (pH 3,0); буфер Б – смесь ацетонитрил – муравьиная кислота (1 : 1, по объему), содержащая 5% хлористого метилена. Градиент линейный: 0–6 мин 100% буфера А, 6–30 мин 100% буфера Б, скорость потока 1 мл/мин. В результате получены индивидуальные пики I и II субъединиц, а также пик додецилсульфата, вероятно, в виде мицелл

(рис. 3). При этом выход белка оказался низким. Часть субъединиц I и II, по данным гель-электрофореза, оказалась включенной в мицеллы ДСН. Улучшить выход субъединицы II позволило добавление к буферу Б 5% хлористого метилена, который, по-видимому, модифицирует поверхность сорбента, что способствует лучшему удерживанию белка на неподвижной фазе и уменьшает захват белка мицеллами ДСН.

Таким образом, нам удалось найти эффективный метод очистки субъединицы II цитохромоксидазы, позволяющий получить полипептид в индивидуальном виде без примеси буферных солей и детергентов.

Список литературы

1. *Филатов И. А., Кулиш М. А., Миронов А. Ф.* // Биоорган. химия. 1985. Т. 11, № 3. С. 192.
2. *Котлова Н. Г., Кулиш М. И., Миронов А. Ф.* // Там же. 1988. Т. 14. № 14. С. 1695.
3. *Остерман Л. А.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука, 1985. С. 210–215.

Московский институт
тонкой химической технологии
им. М. В. Ломоносова

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544:577.11(047)

© 1991 г.

Колосов Ю. В., Колышкин В. М., Смоленский В. И., Трифонов В. Д., Мчедлишвили Б. В.

ПРЕПАРАТИВНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ СУСПЕНЗИИ ВИРУСА ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА

Представлены результаты исследований по хроматографии вируса инфекционного ринотрахеита на макропористых кремнеземах.

Инфекционный ринотрахеит (ИРТ) – широко распространенное вирусное заболевание животных. Наиболее перспективным направлением в борьбе с данной инфекцией является вакцинопрофилактика. Однако технология изготовления инактивированных вакцин не предусматривает предварительной очистки и концентрирования вируса, что сказывается на ее иммуногенности, делает невозможным комплектование поливалентных и ассоциированных препаратов. Кроме того, при диагностике ИРТ все более широкое применение находит иммуноферментный анализ (ИФА), чувствительность которого также во многом обусловлена степенью очистки антигена. Поэтому очистка и концентрирование вируса ИРТ является необходимым условием и при изготовлении диагностикумов на данное заболевание.

Традиционным физическим методом очистки и концентрирования вируса ИРТ в настоящее время является ультрацентрифугирование в градиентах плотности различных веществ. Но этот метод, на наш взгляд, обладает рядом существенных недостатков, основные из которых – нетехнологичность и высокая стоимость оборудования, в основном импортного, что затрудняет его использование в производстве вышеуказанных ветеринарных препаратов.

Среди современных физико-химических методов фильтрационно-хроматографические являются одним из наиболее простых, надежных и эффективных способов очистки вирусных суспензий. В данной работе представлены результаты исследований по хроматографии вируса ИРТ на макропористых кремнеземах [1].

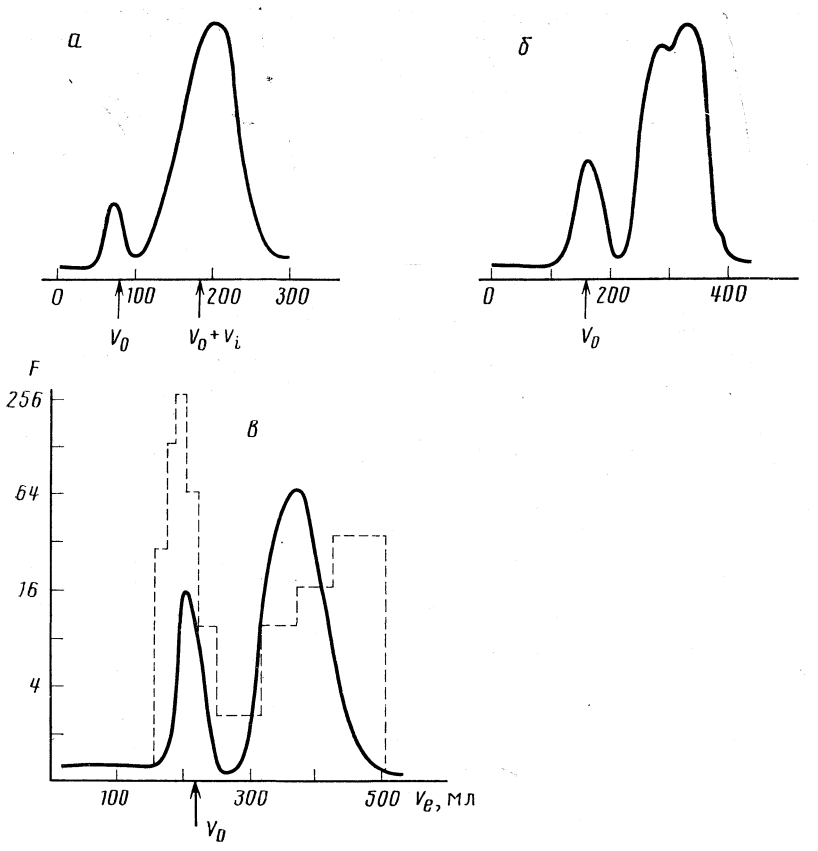
Макропористые кремнеземы были выбраны по следующим причинам. Интервал размеров пор в этих носителях (0,02–2,0 мкм) лежит в области размеров, характерных для вирусных частиц, т. е. может быть просто осуществлен подбор оптимального размера пор; разброс размеров пор стекол крайне узок (до 10% от среднего номинала пор). Кроме того, макропористые стекла прочны и не являются питательной средой для бактерий. Хроматография на пористых стеклах используется в ряде технологий очистки сложных вирусных суспензий (см., например, [2]).

В работе использовали культуральную суспензию вируса ИРТ, штамм «4016», осветленную центрифугированием (30 мин, 3000 об/мин, на роторе GSA центрифуги RC5B фирмы «Sorvall», США), после ее трехкратного замораживания и оттаивания.

Хроматографии подвергали вирусную суспензию, предварительно сконцентрированную в 10–20 раз микрофильтрацией (например, на ядерных фильтрах с диаметром пор 0,08–0,10 мкм или с помощью тех мембран «Миллипор», которые задерживают полимеры с молекулярной массой свыше 100 000 Дальтон). Удельная производительность процесса составляла 0,14–0,17 мл/(мин·см^2·атм).

В хроматографии использовали макропористое стекло марки МПС-1150 ГХ, которое для предотвращения адсорбции вируса модифицировали поли-N-винилпирролидоном по методу, описанному в [1, с. 26].

Очистку концентрированного материала проводили методом гель-фильтрации на колонке высотой 95 см и внутренним диаметром 2,6 см. Колонку уравновешивали 0,05 М *трис*-HCl-буфером, содержащим 0,15 М NaCl, pH=7,6. Объем наносимого на колонку материала 20 мл, скорость элюирования 0,7 мл/мин. Поглощение элюатов в УФ-области контролировали с помощью проточного спектрофотометра «Uvicord 11» (ЛКБ, Швеция) при длине волны 280 нм. Элюат собирали фракциями по 7–17,5 мл в области вирусного пика и по 35–70 мл в области выхода загрязняющих белков.



Препаративная гель-хроматография вируса ИРТ на колонках с пористым стеклом диаметром 2,6 см и высотой 35 (*а*), 65 (*б*), 95 см (*в*). Сплошная линия – оптическая плотность фракций, пунктир – антигенная активность (в иммуноферментном анализе). По оси ординат отложена величина *F*, равная логарифму титра антигенной активности

В исходном вируссодержащем материале, концентрате, очищенном концентрате, фильтрате, а также во всех хроматографических фракциях определяли содержание белка и антигенную активность в иммуноферментном анализе. Уровень белка в пробах материалов определяли по Лоури. Антигенную активность контролировали в прямом твердофазном ИФА при двукратных разведениях используемых материалов.

В таблице приведены результаты концентрирования вируса ИРТ мембранной фильтрацией на мембранной установке «Минитан» (площадь фильтрации мембран 240 см^2, рабочая разность давлений 1,4–1,6 атм); I – исходная вирусная суспензия; II – осветленная вирусная суспензия, III – фильтрат, IV – концентрат вируса.

Как видно из таблицы, в процессе концентрирования исходный материал не только 20-кратно уменьшился в объеме, но и освободился от 70% общего белка.

Результаты измерения инфекционной активности полученных проб показали также, что концентрат вируса содержит примерно 30% от инфекционной активности исходного материала. Это, по-видимому, может быть связано с механическим разрушением вирусных частиц в процессе микрофильтрации, а также с их адсорбцией на поверхности мембран. Минимальный инфекционный титр в фильтрате (всего 0,01%) свидетельствует прежде всего о том, что мембрана имеет высокую селективность по вирусу.

На рисунке представлены результаты препаративной гель-хроматографической очистки концентрата вируса ИРТ на трех колонках с пористым стеклом, различающихся по высоте. При сопоставлении концентраций белка и антигенных активностей собранных в процессе элюции проб видно, что вирусные частицы и коллоидные частицы примесей элюируются с колонки в основном в первом пике – с объемом

Материал	V, мл	Содержание белка, мг			Инфекционность ТЦД50		
		мл	V	%	мл	V	%
I	1000	1,2	1200	100	6,5	9,5	100
II	1000	1,2	1198	100	6,5	9,5	100
III	950	0,9	853	70	2,0	5,0	0,01
IV	50	7,1	359	30	7,25	8,9	30

элюирования V_e, равном свободному объему колонки V_0 (эта величина в среднем составляет 0,43 от величины полного объема колонки V_t).

Белковые же примеси выходят вторым пиком с объемом элюирования, большим V_0 на величину объема пор в колонке $V_i = gП$, где $П$ – пористость (объем пор стекла), а g – масса этого носителя в колонке. И так как коэффициент распределения частиц в первом пике (K_d=0) и белковых примесей (K_d=1) резко различаются, то разделение зон этих веществ – хорошее. В результате хроматографии среднее содержание белковых примесей уменьшается не менее чем в 100 раз (с 7,1 мг/мл в вирусном концентрате, подаваемом на колонку, до 0,05 мг/мл в первом пике после хроматографии).

При этом разделение наиболее полно, если высота колонки составляет ~100 см. Поэтому для данной колонки объем наносимой пробы может быть увеличен с 20 до примерно 40 мл, т. е. с 3–4% от V_t до 8–10% от V_t, тогда как для двух других колонок объем наносимой пробы свыше 3–4% от V_t увеличен быть не может.

На рисунке, *в* приведены также данные по антигенной активности хроматографических фракций. Видно, что примерно $^2/_3$ вирусной (антигенной) активности выходит в свободном объеме колонки. Это соответствует тем вирусным частицам из общего их пула, которые, не адсорбируясь на матрице носителя, полностью выходят из колонки. Но, наряду с такими частицами, в вирусном материале присутствует довольно много растворимого антигена (примерно $^1/_3$), который выходит в зоне белковых примесей. Это может быть обусловлено наличием в вирусном препарате компонентов белковой оболочки вирусных частиц из-за разрушения в результате операций замораживания – оттаивания, микрофильтрационного концентрирования, либо это те вирусные белки, которые остались не использованными при образовании вирусных частиц.

Список литературы

1. *Коликов В. М., Мчедлишвили Б. В.* // Хроматография биополимеров на макропористых кремнеземах. Л.: Наука, 1986.
2. *Клюшник С. Ю., Березин В. Э., Новицкий В. А. и др.* // Вопр. вирусологии. 1988. № 1. С. 48–51.

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 54.062+543.8+165.3:633.88

© 1991 г.

Волков С. Е., Гродницкая Е. И.

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ВИНБЛАСТИНА В CATHARANTHUS ROSEUS

Разработан модифицированный метод количественного определения винбластина в растении Catharanthus roseus с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Винбластин – бисиндольный алкалоид, выделяемый из растения Catharanthus roseus G. Don, обладает цитостатическим действием и широко применяется при комплексной химиотерапии опухолевых заболеваний. При производстве препаратов винбластина из C. roseus важно знать содержание винбластина в сырье, так как от этого зависят не только экономические показатели производства, но и качество конечного продукта.

Одним из главных недостатков ныне действующего метода анализа C. roseus [1], не говоря уже о продолжительности анализа, является субъективность оценки границ пятна винбластина на стадии тонкослойной хроматографии и возможность того, что под пятном винбластина или очень близко к нему могут оказаться вещества, не обнаруживаемые реактивом Драгендорфа, но образующие окрашенный комплекс с тропеолином, это может привести к завышению результата анализа.

В основу предлагаемого метода положен фармакопейный метод количественного определения винбластина в сырье C. roseus [1], последние стадии которого (тонкослойная хроматография фракции димерных алкалоидов, элюция с пластинки зоны винбластина, образование окрашенного комплекса винбластина с тропеолином и спектрофотометрия) заменены высокоэффективной жидкостной хроматографией с внутренним стандартом.

Около 6,0 г (точная навеска) измельченного сырья, просеянного через сито с отверстиями диаметром 1 мм, смачивали 6 мл 5% раствора уксуснокислого натрия, перемешивали, уплотняли и оставляли на 1 ч при комнатной температуре для набухания сырья. Приливали 150 мл толуола, закрывали пробкой, встряхивали на качалке в течение 1 ч при комнатной температуре и оставляли для настаивания на 4 ч при комнатной температуре. После настаивания колбу снова встряхивали в течение 5 мин. Толуольный экстракт фильтровали через вату, отбрасывая первые 10–15 мл фильтрата, и собирали 100 мл фильтрата. Алкалоиды экстрагировали из фильтрата 2%-ным раствором винной или лимонной кислоты. Кислотный экстракт подщелачивали 5%-ным раствором аммиака до pH=5,8÷6,0 и экстрагировали бензолом. Бензольный экстракт сушили безводным сульфатом натрия и упаривали досуха при температуре 40–45° С. Сухой остаток растворяли в 1,5 мл смеси метанол – хлороформ (7 : 3) и наносили на колонку (16×450 мм) с сефадексом LH-20 в той же смеси растворителей.

Одновременно с началом элюции начинали отбор фракций по объему в соответствии с результатами калибровки колонки. Элюцию вели со скоростью 10–15 мл/ч. Первую фракцию элюата объемом 35–50 мл отбрасывали, собирали следующие две фракции объемом 8–15 и 5–8 мл и промывали колонку еще 50–60 мл той же смеси растворителей, после чего она готова к повторному использованию. Вторую и третью фракции порознь упаривали досуха при температуре 40–45° С. Каждый сухой остаток растворяли в 1 мл смеси метанол – бензол (1 : 1) и по 40 мкл каждого раствора наносили на пластинку с силикагелем (90×120 мм) полосой длиной ~20 мм вдоль широкой стороны пластинки. Рядом наносили в одну точку 20 мкл (20 мкг) 0,1%-ного раствора розевина [2] в смеси метанол – бензол (1 : 1). Пластинку сушили на воздухе (20 мин) и хроматографировали в системе хлороформ – бензол – ацетон – этилацетат – метанол (20 : 20 : 15 : 5 : 3) при температуре 22–24° С. По окончании хрома-

тографии пластинку опрыскивали 1%-ным раствором церийаммонийсульфата. Если в третьей фракции нет зоны винбластина на уровне свидетеля ($R_f \simeq 0{,}25$), то в работу берут только вторую фракцию, если же и в третьей фракции есть зона винбластина, то обе фракции объединяют.

Рабочую фракцию (только вторую или объединенные вторую и третью) упаривали досуха при температуре 40–45° С и растворяли в 1 мл смеси бензол – метанол (1 : 1). К 100 мкл полученного раствора добавляли 50 мкл свежеприготовленного раствора гидрохлорида глауцина (1 мг/мл) и 250 мл метанола, перемешивали и хроматографировали на жидкостном хроматографе LC 822 (ЧСФР).

Условия хроматографии: колонка – 3,3×150 мм с обращенно-фазовым сорбентом Separon SIX C18, 5 мкм; элюент – 35% 5 мМ гидрофосфата аммония (pH=7,3) и 65% метанола; скорость элюции – 0,5 мл/мин; температура – 20–25° С; детектор – ультрафиолетовый LCD 2563 (ЧСФР), длина волны 254 нм; объем пробы – 10 мкл.

Калибровка колонки. Хроматографируют экстракт алкалоидов C. roseus, полученный как описано в методике. Первые 30 мл элюата отбрасывают, а затем собирают 25 фракций по 2 мл. Каждую фракцию упаривают досуха при температуре 40–45° С, растворяют в 100 мкл смеси метанол – бензол (1 : 1) и хроматографируют на пластинках как описано выше, нанося на пластинку все 100 мкл раствора. После хроматографии пластинку высушивают 20 мин на воздухе и опрыскивают раствором церийаммонийсульфата. Ориентируясь по подвижности свидетеля ($R_f \simeq 0{,}2$), нанесенного в точку на каждой пластинке (20 мкл 0,1%-ного раствора розевина), определяют фракции, содержащие винбластин. Суммируя объемы соответствующих фракций, находят общий объем элюата до начала выхода винбластина и объем винбластинсодержащей фракции элюата для данной колонки.

Раствор гидрохлорида глауцина. 25 мг (точная навеска) гидрохлорида глауцина [3] растворяют в 25 мл метанола. Раствор не хранится.

Для определения содержания винбластина поступают следующим образом.

1. Измеряют площади пиков гидрохлорида глауцина (время выхода ~20 мин) и винбластина (время выхода ~30 мин) на хроматограмме с помощью электронного интегратора CI 100 (ЧСФР) или умножая высоту пика на его ширину на половине высоты.

2. По калибровочному графику, построенному для конкретного хроматографа, по отношению площади пика винбластина к площади пика гидрохлорида глауцина определяют массовое отношение винбластина к гидрохлориду глауцина во введенной в хроматограф пробе (N).

3. Рассчитывают содержание винбластина в сырье (x) в процентах по формуле

$$x = \frac{cN(100-W_1)}{12{,}8M(100-W_2)},$$

где c – концентрация гидрохлорида глауцина в растворе, мг/мл; N – массовое отношение винбластина к гидрохлориду глауцина во введенной в хроматограф пробе; W_1 – влажность гидрохлорида глауцина, %; 12,8 – коэффициент, получившийся после перемножения всех заданных в методике численных величин; M – навеска сырья, г; W_2 – влажность сырья, %.

Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяет достаточно эффективно разделить практически все димерные алкалоиды C. roseus. Условия высокоэффективной жидкостной хроматографии выбраны на основе литературных данных по разделению алкалоидов C. roseus [4–12], исходя из требования разделения их в режиме изократической элюции, что обусловлено конструкцией используемого хроматографа. Выбор в качестве внутреннего стандарта глауцина продиктован тем, что пик глауцина на хроматограмме не накладывается на пики алкалоидов C. roseus, глауцин доступен в чистом виде, недорог и стабилен при хранении в сухом состоянии.

Предлагаемый метод позволяет уменьшить количество субъективных факторов, сократить продолжительность анализа с 4 до 2,5 дней и повысить точность определения: относительная ошибка единичного определения 7,7% против 20% по фармакопейному методу.

Список литературы

1. Временная фармакопейная статья «Лист катарантуса розового». ВФС 42-1106-81.
2. Временная фармакопейная статья «Розевин». ВФС 42-1096-81.
3. Фармакопейная статья «Глауцина гидрохлорид». ФС 42-2342-85.
4. *Black J., Buechter D. D., Chinn J. W. et al.* // J. Pharm. Sci. 1988. V. 77. № 7. P. 630.

5. *De Smet M., Van Belle S. J. P., Storme G. A., Massart D. L.* // J. Chromatogr. 1985. V. 345. № 2. P. 309.
6. *Drapeau D., Blanch H. W., Wilke C. R.* // Ibid. 1987. V. 390. № 2. P. 297.
7. *Gorog S., Herenyi B., Javanovics K.* // Ibid. 1977. V. 139. № 1. P. 203.
8. *Keller J. H., Ensminger W. D.* // Amer. J. Hosp. Pharm. 1982. V. 39. № 8. P. 1321.
9. *Naaranlahti T., Nordstrom M., Huhtikangas A., Lounasmaa M.* // J. Chromatogr. 1987. V. 410. № 2. P. 488.
10. *Renaudin J.-P.* // Ibid. 1984. V. 291. P. 165.
11. *Thimmaiah K. N., Sethi V. S.* // Cancer Res. 1985. V. 45. № 11. P. 5382.
12. *Vendrig D. E. M. M., Teeuwsen J., Holthuis J. J. M.* // J. Chromatogr. 1988. V. 424. № 1. P. 83.

Всесоюзный научно-исследовательский институт
лекарственных растений
Москва

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 547.918+543.062

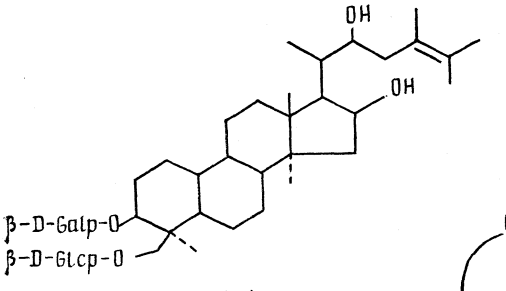
© 1991 г.

Ганенко Т. В., Горшков А. Г., Луцкий В. И., Барам Г. И., Семенов А. А.

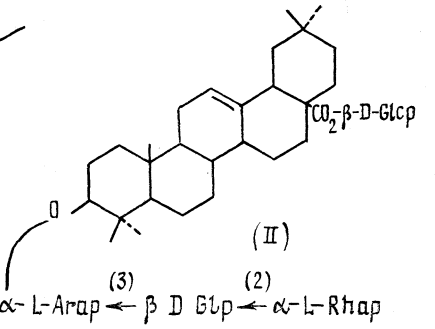
ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ДВУХВОЛНОВОЙ ФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ В РАСТИТЕЛЬНОМ ЭКСТРАКТЕ

Исследована хроматография доминирующих тритерпеновых гликозидов растения Thalictrum minus L. на обращенно-фазовых сорбентах. Показано, что применение двухволновой фотометрической детекции позволяет с высокой степенью достоверности проводить качественное и количественное определение сапонинов в растительном экстракте. Найден оптимальный процесс экстракции сапонинов и определено количественное содержание доминирующего из них (таликозида А) в растительном сырье из разных районов произрастания.

Экстракты надземной части Thalictrum minus L. (семейства Ranunculaceae) содержат два доминирующих тритерпеновых сапонина — таликозиды А и В:



(I)



(II)

Таликозид А (I) относится к тритерпеноидам ланостанового ряда, а таликозид В (II) является гликозидом олеанового ряда. Данные сапонины обладают высокой биологической активностью [1, 2] и могут стать основой для создания лечебных препаратов.

Для выбора оптимальных путей выделения сапонинов I, II, оценки и стандартизации растительного сырья необходим надежный метод их количественного определения.

Одним из лучших методов анализа смесей природных соединений является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Обращенно-фазовая (ОФ) ВЭЖХ позволяет разделить и провести количественное определение тритерпеновых сапонинов (гинзенозидов) в природ-

ных и синтетических смесях с рефрактометрическим детектированием [3] или с детектированием в коротковолновой области УФ-спектра [4, 5], сайкосапонинов после предколоночной дериватизации с обнаружением при 254 нм [6].

В структуре исследуемых соединений имеются следующие хромофорные группы: одна двойная связь (таликозид А), изолированные двойная связь и карбонильная группа (таликозид В). Надежных и простых способов дериватизации для данных соединений не найдено.

С учетом достаточно сложного механизма удерживания таликозидов А и В на ОФ-сорбенте [7] в настоящей работе проведен поиск: 1) оптимальных хроматографических условий позволяющих проводить количественное определение таликозидов I, II в растительных экстрактах с прямым фотометрическим детектированием в области 200—210 нм; 2) способов контроля гомогенности аналитических пиков.

Экспериментальная часть

Хроматографические разделения проводили на жидкостном хроматографе «Милихром-1» на колонках (2×64 мм) с эффективностью 3000—4500 т. т. (по пику нафталина). В качестве неподвижной фазы использовали модифицированные силикагели «Сепарон-5, С18» («ТЕСЕК», ЧСФР), «Силасорб SPH С8» (5 мкм) и «Силасорб SPH С18» (5 мкм) («ЛАХЕМА», ЧСФР), «Нуклеосил-5, С8» и «Нуклеосил-5, С18» («М.-Н.», ФРГ). Для подвижной фазы применяли метанол классификации «х.ч.», ацетонитрил – «для жидкостной хроматографии» без дополнительной очистки. Перед анализом пробы экстрактов центрифугировали с ускорением 5000g. После анализа для регенерации колонки требуется ее промывка 100%-ным метанолом или ацетонитрилом.

Неудерживаемый объем определяли по времени появления сигнала от 4 мкл нитрометана с концентрацией 10 мг/л при элюировании 75%-ным водным метанолом и детектировании при 260 нм.

Периодатное окисление. Пики, отнесенные на хроматограмме таликозидам А и В, определяли препаративно путем 10 разделений экстракта. После отгонки элюента и добавления к остатку 80 мкл раствора $NaIO_4$ с концентрацией 0,01 М смесь хроматографировали через 20, 60, 120 мин.

Подготовка пробы для анализа. Растительное сырье измельчали и просеивали через сито с диаметром отверстий 2 мм. Измельченное сырье (5 г, точная навеска) помещали в колбу объемом 100 мл, прибавляли 50 мл 80%-ного этанола и нагревали при перемешивании с обратным холодильником в течение 0,5 ч, после охлаждения фильтровали через стеклянный фильтр № 4. Экстракцию повторяли 4 раза. Объединенный экстракт упаривали под вакуумом досуха. Остаток переносили в мерную колбу на 25 мл и объем доводили до метки этанолом. Полученный раствор пропускали через колонку (30×30 мм) с оксидом алюминия (10 г), затем промывали колонку 100 мл 50%-ного этанола. Элюат упаривали до объема 10 мл и переносили в мерную колбу на 50 мл, объем доводили до метки этанолом.

Обсуждение результатов

Хроматографические условия для таликозидов А и В подобраны на индивидуальных соединениях, их искусственной смеси и растительных экстрактах на обращенно-фазовых сорбентах указанных выше марок. В качестве элюентов были использованы смеси метанола или ацетонитрила с водными растворами KH_2PO_4 (0,5 мМ, pH 2,2—6,5).

При использовании в составе элюента ацетонитрила полученные хроматограммы имели весьма близкие времена удерживания для анализируемых сапонинов I, II. Величина R_s для пиков соединений I, II, например, не превышала 0,5 при разделении на колонке с сорбентом марки «Нуклеосил-5, С18» или «Нуклеосил-5, С8» и эффективностью 2000—2500 т. т. (по пику таликозида В). Замена ацетонитрила на метанол позволила значительно повысить селективность хроматографической системы (рис. 1).

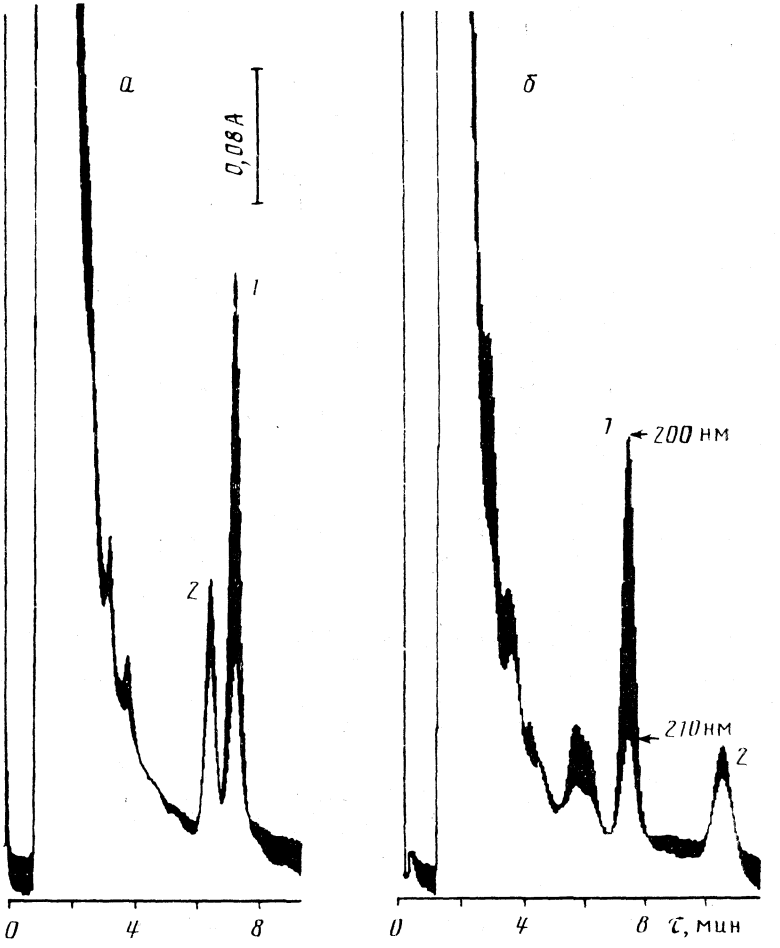


Рис. 1. Хроматограммы экстракта растения Th. minus: *1* – таликозид А, *2* – таликозид В, неподвижная фаза – «Силасорб SPH, C18» (5 мкм), подвижная фаза – ацетонитрил : 0,5 мМ KH_2PO_4=35 : 65 об.%, pH 5,2 (*а*); метанол : 0,5 мМ KH_2PO_4=70 : 30 (об.%), pH 5,2 (*б*). Детектирование при 200, 210 нм

При выборе оптимальных условий разделения была обнаружена очень сильная зависимость времени удерживания таликозидов А и В от содержания органического модификатора в подвижной фазе (рис. 2). Например, увеличение метанола в элюенте от 70 до 80% уменьшает коэффициент емкости k' для таликозида А в 4 раза, а для таликозида В – в 5 раз (неподвижная фаза – «Нуклеосил-5, C18», тогда как для водно-метанольных систем подобное увеличение концентрации метанола уменьшает k' как правило вдвое [8]. Уменьшение длины цепи привитых алкильных групп у используемого сорбента уменьшает абсолютные времена удерживания соединений I, II, но их зависимость от концентрации органического растворителя в элюенте не изменяется. Однако разделение на обращенной фазе C18 позволяет получить лучшее разрешение пиков таликозидов А и В.

Обнаруженные хроматографические свойства таликозидов А и В не позволяют провести плавное изменение селективности хроматографиче-

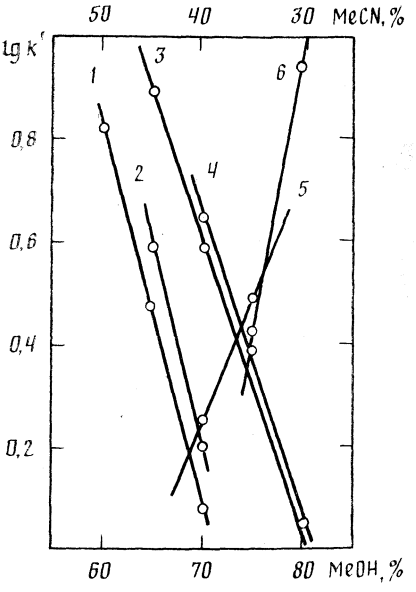


Рис. 2

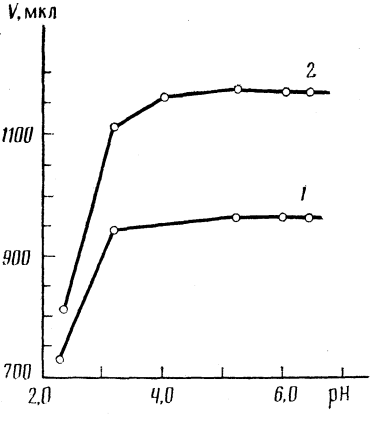


Рис. 3

Рис. 2. Зависимости коэффициента емкости таликозида А от содержания органического растворителя в элюенте. Подвижная фаза – смесь 0,5 мМ раствора KH_2PO_4 (pH 5,2) с метанолом (*1–4*) и ацетонитрилом (*5*, *6*); неподвижная фаза – «Нуклеосил-5, С8» (*1*), «Силасорб SPH C8» (5 мкм) (*2*, *6*), «Силасорб SPH C18» (5 мкм) (*3*, *5*), «Нуклеосил-5, С18» (*4*). Детектирование при 200 нм

Рис. 3. Зависимости объема удерживания *V* таликозидов А (*1*) и В (*2*) от величины pH водной части элюента. Неподвижная фаза – «Сепарон-5, С18», подвижная фаза – ацетонитрил: 0,5 мМ KH_2PO_4=35; 65 (об.%). Детектирование при 200 нм

ской системы традиционным для ОФ ВЭЖХ путем – модификацией элюента органическим растворителем. Изменение величины pH водной части подвижной фазы в пределах 4,0–6,5 практически не влияет на время удерживания изучаемых соединений I, II (рис. 3). При pH<4,0 происходят различные химические превращения таликозидов А и В [9].

Поиск оптимальных хроматографических условий с целью получения гомогенных пиков сапонинов I, II при анализе растительных экстрактов возможен и путем подбора марки, партии сорбента. Так, аналитические разрешенные пики таликозидов А и В были получены на колонках с «Сепароном-5, С18» и «Силасорбом SPH C18» (5 мкм) при использовании в качестве элюентов смесей MeCN : 0,5 мМ KH_2PO_4=35 : 65 (об.%), pH 5,2 и MeOH : 5 мМ KH_2PO_4=70 : 30 (об.%), pH 5,2 соответственно при изократическом режиме хроматографирования.

Обнаруженные хроматографические свойства сапонинов I, II, а также детектирование в универсальной коротковолновой области УФ-спектра приводят к дополнительным требованиям к контролю гомогенности аналитических пиков. Гомогенность пиков тритерпеновых гликозидов I, II на хроматограммах экстрактов была подтверждена тремя способами:

1) методом двухволнового детектирования при 200 и 210 нм с контролем величины спектрального отношения A_{200}/A_{210} для пиков анализируемых соединений, для пиков индивидуальных таликозидов А и В величины A_{200}/A_{210} равны 3,0 и 1,6 соответственно;

2) рехроматографией пиков, отнесенных на хроматограмме экстракта к гликозидам I, II, после препаративного их выделения и проведения реакции периодатного окисления сахарных остатков; после полного прохождения реакции на хроматограмме отсутствуют какие-либо пики с временем удерживания, полученным для пиков сапонинов I, II, а величина A_{200}/A_{210} постоянна в течение всей реакции;

3) параллельным хроматографированием экстракта на сорбентах различных марок с изменением состава элюента при контроле величины спектрального отношения для аналитических пиков (рис. 1).

Необходимо отметить, что при серийном анализе растительных экстрактов первый способ позволяет осуществлять постоянный контроль гомогенности пиков на хроматографе марки «Милихром», а для поддержания их гомогенности необходимо иметь величину pH элюента в пределах 5,0—5,5.

Оптимизация условий хроматографирования позволила разработать методику количественного определения таликозида А с пределом обнаружения 70 мкг/мл при отношении сигнал/шум, равном 10/1. При использовании метода внешней стандартизации воспроизводимость количественных данных характеризовалась величиной S_r=6,4%. Применение метода внутренней стандартизации в исследованном случае затруднено сложностью получения структурного аналога с весьма близкими хроматографическими свойствами, которая объясняется отмеченными ранее особенностями хроматографии таликозидов А и В.

Разработка методики количественного определения гликозида I позволила оптимизировать процесс его экстракции. Установлено, что для исчерпывающего извлечения сапонина I из растительного сырья достаточно пяти циклов экстракции с длительностью 30 мин. Содержание таликозида А (c, % от массы воздушно-сухого образца) в сырье из различных районов произрастания (1 — Тувинская АССР, 2 — Красноярский край, Богучанский район, 3 — Бурятская АССР, Кабанский район, 4 — Бурятская АССР, Тункинский район, 5 — Иркутская область, Чунский район) приведено ниже (по данным сбора 1989 г.):

Район	1	2	3	4	5
c	0,47	0,80	0,76	0,70	0,40

Проведенные исследования позволяют предложить метод качественного и количественного анализа доминирующих сапонинов в экстракте растения Th. minus L.

Список литературы

1. *Мац М. А., Корхов В. В. и др.* // Растительные ресурсы. 1988. Т. 24. № 4. С. 570.
2. *Рахимов К. Д., Верменичев С. М. и др.* // Хим.-фарм. журн. 1987. № 12. С. 1434.
3. *Nagasawa T., Yokozawa T. et al.* // Chem. Pharm. Bull. 1980. V. 27. № 7. P. 2059.
4. *Soldati F., Sticher O.* // J. Medicinal Plant Research. 1980. V. 39. P. 348.
5. *Маханьков В. В., Самошина П. Ф., Малиновская Г. В. и др.* // Химия природн. соединений. 1990. № 1. С. 57.
6. *Kimato H., Hiyama C., Yahara S. et al.* // Chem. Pharm. Bull. 1979. V. 27. № 8. P. 1836.
7. *Ганенко Т. И., Горшков А. Г., Барам Г. И., Семенов А. А.* // Тез. докл. II Сиб. конф. по метрологическому обеспечению аналитических методов в сельском хозяйстве. Новосибирск, 1990. С. 141.
8. *Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии*/Под ред. И. В. Березина. М.: Мир, 1988. С. 49.
9. *Громова А. С., Луцкий В. И., Семенов А. А. и др.* // Химия природн. соединений. 1984. № 2. С. 207.

Академия наук СССР
Сибирское отделение
Иркутский институт органической химии

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 543.544

© 1991 г.

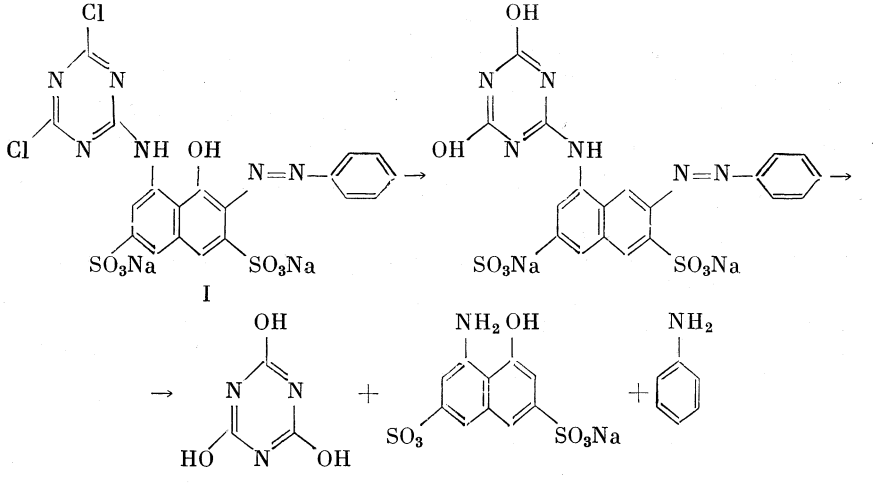
Первухина И. В., Курляндский Б. А., Касаткина Т. А.

ИЗУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРЕВРАЩЕНИЙ АКТИВНЫХ ХЛОРТРИАЗИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ В ОРГАНИЗМЕ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) использована для изучения метаболических превращений активных хлортриазиновых красителей: ярко-красного 5СХ, золотисто-желтого 2КХ и красного СШ в организме белых крыс. Выбраны оптимальные условия разделения метаболитов с компонентами мочи. Установлено различие метаболических профилей мочи подопытных и контрольных животных. С помощью ВЭЖХ проведена идентификация метаболитов в моче крыс. Показано, что превращение активных хлортриазиновых красителей протекает по общей схеме с образованием для всех их общего метаболита – циануровой кислоты и нафтилсульфокислоты.

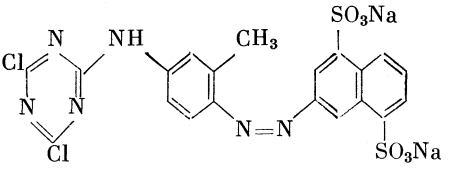
Вопросам охраны труда и окружающей среды в нашей стране уделяется большое внимание. Для решения их значительное место занимают исследования по нормированию вредных веществ в окружающей и производственной среде, поиск новых подходов к их решению. При обосновании предельно допустимых концентраций активных хлортриазиновых красителей в воздухе рабочей зоны нами изучено их поведение в организме животных, которое обусловлено метаболизмом и токсикокинетикой их накопления и выведения. Цель данной работы – изучение метаболизма активных хлортриазиновых красителей в организме животных.

Объектом исследования были выбраны активные дихлортриазиновые красители – ярко-красный 5СХ (I), золотисто-желтый 2КХ (II) и монохлортриазиновый краситель – активный красный СШ (III). Подвижность хлора в триазиновом кольце красителей сохраняется, они легко образуют монооксо- и диоксипроизводные. Было высказано предположение, что наряду с последними возможно образование продуктов ретросинтеза нафтилсульфокислоты и соответствующего ароматического амина, а также продукта гидролитического расщепления – циануровой кислоты. Это показано на примере активного ярко-красного 5СХ



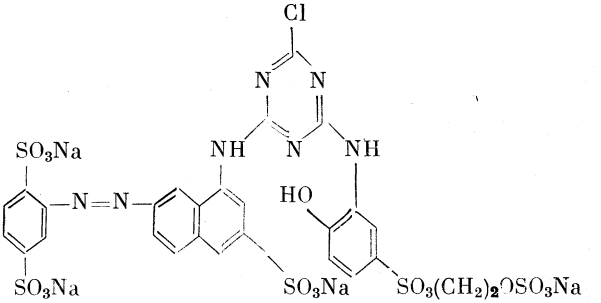
I

Таким же образом может метаболизироваться активный золотисто-желтый 2КХ



II

и активный красный СШ



III

Экспериментальная часть. Экспериментальные исследования проводили на белых беспородных крысах, самцах и самках, массой 200±20 г, которым перорально и внутрибрюшинно вводили 1 мл водного раствора красителя с концентрацией от одного до 20%. Для сбора суточной мочи крыс помещали в обменные клетки.

Очистку красителя проводили на колонке с силикагелем. Для определения красителя и его оксипроизводных в моче использовали спектрофотометрический метод анализа. Метаболиты из определенного объема мочи после подкисления экстрагировали этилацетатом. Экстракты упаривали при комнатной температуре досуха, растворяли в элюенте и 25 мкл пробы вводили в хроматограф. Работу проводили на хроматографе фирмы «Дюпон», модель 8800, с контролером, позволяющим задавать определенный режим работы и ЭВМ для обработки хроматограмм. Детектирование проводили УФ-детектором при длинах волн 240 и 254 нм. Результаты регистрировали на самописце «Спектрофизик» со скоростью бумажной ленты 0,5 мм/мин, хроматографическое разделение проводили в изократическом режиме, при комнатной температуре.

Для анализа метаболитов использовали обращенно-фазовый вариант жидкостной хроматографии. Разделение проводили на колонке Зорбакс ODS, зернением 5 мк, размером 25 см×4,6 мм. В качестве элюентов использовали смеси ацетонитрила с этанолом и водой в различных соотношениях, с добавками ацетата натрия и ортофосфорной кислоты. Скорость элюирования варьировали от 0,5 до 1 мл/мин. На колонке Alltech CN, размером 25 см×4,6 мм зернением 5 мк, в качестве элюента использовали смесь ацетонитрила и этанола с водой в различных соотношениях. Скорость элюирования изменяли от 0,8 до 1 мл/мин. Для количественного определения использовали метод абсолютной калибровки, данные которой вводили в память ЭВМ. Для идентификации метаболитов времена удерживания эталонных соединений вводили в память ЭВМ.

Обсуждение результатов. Проведенные исследования показали, что при различных путях поступления активные хлортриазиновые красители и их оксипроизводные в кровь и мочу не попадают. Поэтому важно было установить, что происходит с красителями в организме животных. Для этого были выбраны оптимальные условия разделения метаболитов с компонентами мочи. Для предполагаемых метаболитов активного ярко-красного 5СХ – циануровой кислоты, АШ-кислоты и анилина оптимальными на колонке Зорбакс ODS были: скорость элюирования – 0,8 мл/мин, элюент – ацетонитрил : этанол : вода в соотношении 40 : 20 : 40 с добавкой 0,25% ортофосфорной кислоты, а на колонке Alltech CN: скорость элюирования 1 мл/мин, элюент – ацетонитрил : этанол : вода в соотношении 30 : 40 : 30.

Для предполагаемых метаболитов золотисто-желтого 2КХ – циануровой кислоты, амино-Ц-кислоты, *м*-толуидина и для предполагаемых метаболитов красного

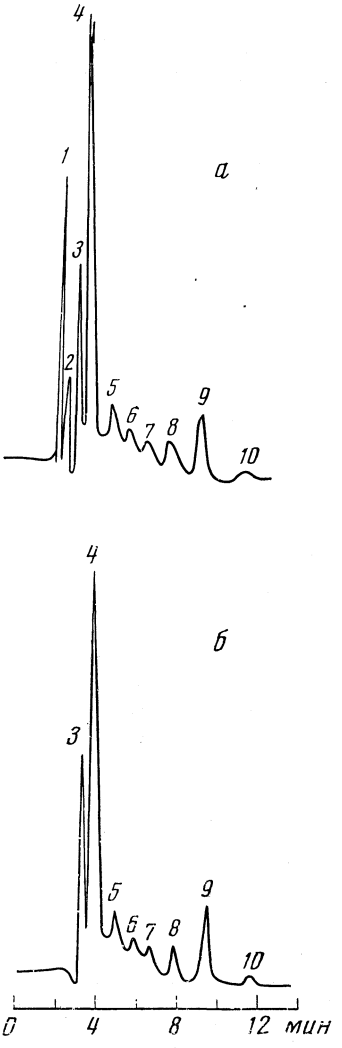


Рис. 1

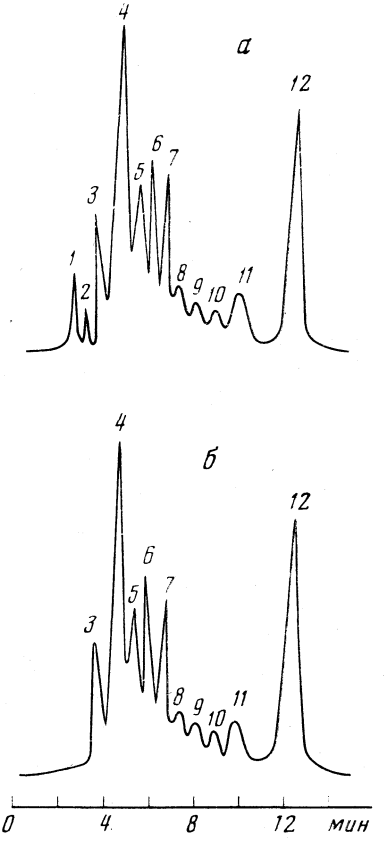


Рис. 2

Рис. 1. Хроматограмма мочи подопытной (*а*) и контрольной (*б*) крыс на колонке Зорбакс ОДS после внутрибрюшинного введения ярко-красного 5СХ

Рис. 2. Хроматограмма мочи подопытной (*а*) и контрольной (*б*) крыс на колонке Зорбакс ОДS после внутрибрюшинного введения золотисто-желтого 2КХ

СШ: циануровой кислоты, К-кислоты и анилин-2,5-дисульфокислоты оптимальные условия разделения были аналогичными.

На втором этапе исследований было проведено сравнение метаболических жидкостно-хроматографических профилей мочи подопытных и контрольных крыс. Использование колонки Зорбакс ODS позволило установить разницу метаболических профилей мочи подопытных и контрольных крыс при внутрибрюшинном введении активного ярко-красного 5СХ. Как видно из хроматограмм (рис. 1), в контрольных пробах отсутствуют вещества с временами удерживания 2,4 и 2,78 мин. Для идентификации этих пиков использовался метод сравнений их хроматографических характеристик, введенных в память ЭВМ, с хроматографическими характеристиками эталонных соединений. Было установлено, что пики *1* и *2* идентичны соответственно АШ-кислоте и циануровой кислоте. Использовался также метод добавки эталона к

анализируемой моче, что приводило к увеличению пиков *1* и *2*, в то время как их хроматографические характеристики не менялись. Анилин в моче крыс не обнаружен. Для достоверности идентификации компонентов была использована колонка Alltech CN, в которой подтверждено наличие циануровой и АШ-кислоты в моче подопытных животных. При пероральном введении красителя также были идентифицированы в моче эти метаболиты.

При внутрибрюшинном и пероральном введении золотисто-желтого 2КХ, установлено, что краситель и его оксипроизводные с мочой не выводятся. Для изучения возможного превращения красителя в организме было проведено сравнение метаболических жидкостно-хроматографических профилей мочи контрольных и подопытных крыс. Использование колонки с Зорбакс ODS позволило установить их различие. Как видно из хроматограмм, приведенных на рис. 2, в контрольных пробах отсутствуют вещества с временем удерживания 2,5 и 2,9 мин. Для их идентификации использовался метод сравнения их хроматографических характеристик, введенных в память ЭВМ, с хроматографическими характеристиками предполагаемых метаболитов, в качестве которых использовались *м*-толуидин, амино-Ц-кислота и циануровая кислота. Установлено, что пики *1* и *2* идентичны амино-Ц-кислоте и циануровой кислоте соответственно. Для достоверности идентификации была использована колонка с Alltech CN и метод добавок эталонов к анализируемой моче.

При внутрибрюшинном и пероральном введении крысам красного СШ установлено, что краситель и его оксипроизводные с мочой не выводятся. Для изучения метаболизма красителя в организме проведено сравнение метаболических жидкостно-хроматографических профилей мочи контрольных и подопытных крыс. Как видно из хроматограмм, приведенных на рис. 3, в контрольных пробах отсутствуют пики *1* и *2*. Для идентификации этих пиков использовался метод сравнения их хроматографических характеристик, полученных на колонке с Зорбакс ODS с хроматографическими характеристиками эталонов, введенных в память ЭВМ. В качестве эталонов использовались циануровая кислота, К-кислота и анилин-2,5-дисульфокислота. Установлено, что пики *1* и *2* идентичны К-кислоте и циануровой кислоте соответственно. Для достоверности результатов использовался также метод добавок и разделение компонентов мочи на колонке с Alltech CN.

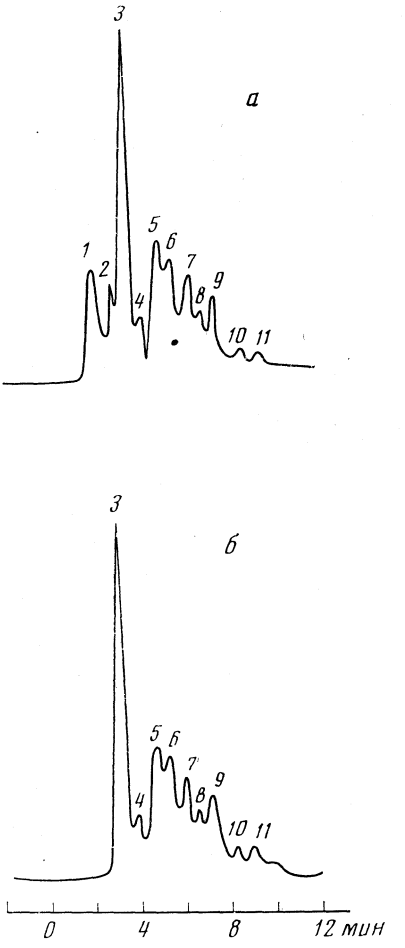


Рис. 3. Хроматограмма мочи подопытной (*а*) и контрольной (*б*) крыс на колонке Зорбакс ОДС после внутрибрюшинного введения красного СШ

Таким образом, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии были идентифицированы метаболиты активных хлортриазиновых красителей. Показано, что метаболизм их протекает по общей схеме с образованием общего для всех метаболита – циануровой кислоты и соответствующей нафтилсульфокислоты. Это явилось одним из обоснований при установлении групповой предельно допустимой концентрации в воздухе рабочей зоны производственных помещений.

ЖУРНАЛ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Т. 65 1991 № 10

УДК 616.24–07

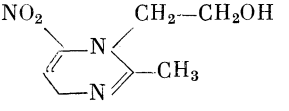
© 1991 г.

Маякова Т. И., Кузнецова Э. Э.

КОНТРОЛЬ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ТЕРАПИИ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ХИРУРГИЧЕСКОЙ ИНФЕКЦИИ

Изучены фармакокинетические параметры синтезированного лекарственного препарата пролонгированного действия, представляющего собой комплекс метронидазола и поливинилпирролидона. С применением метода высокоэффективной жидкостной хроматографии установлено, что лекарственный комплекс циркулирует в организме 48 ч и накапливается в паренхиматозных органах и крови животных. Показано, что задержка исследуемого препарата в организме зависит от молекулярной массы иммобилизующей полимерной матрицы. С применением метода жидкостной хроматографии проведен контроль концентрации метронидазола при лечении больных хирургической инфекцией.

На современном этапе развития хирургии лечение гнойной инфекции — одна из актуальных проблем. Широкое распространение гнойно-септических заболеваний вызывает среди подобного контингента больных до 70% инвалидизации и летальности. Чаще всего возбудителями хирургической инфекции являются аэробные и неклостридиальные анаэробные микроорганизмы или их ассоциации. Наряду с хирургическими методами лечения этой категории тяжелых больных используется антимикробная терапия направленного действия. В Советском Союзе для подавления неклостридиальной анаэробной флоры в клинической практике наибольшее распространение получил препарат из группы имидазолов — метронидазол, оказывающий бактерицидное действие на большинство анаэробов, не вызывая развития бактериальной резистентности [1]:



Анаэробные микроорганизмы превращают метронидазол в его промежуточный продукт с восстановленной нитрогруппой, который оказывает быстрое ингибирующее действие на репликацию ДНК бактерий. В печени макроорганизма препарат окисляется с образованием гидрокси- и кислотного метаболитов, которые по биологической активности уступают метронидазолу, т. е. концентрация препарата в организме уменьшается как в результате клиренса, так и при утрате активности при метаболических превращениях [2].

Минимальная ингибирующая концентрация метронидазола — 3,1 мкг/мл, бактерицидная — 6—10 мкг/мл. Период полувыведения после однократного применения метронидазола составляет 6—8 ч, что требует трех-

четырехкратного введения препарата в сутки для поддержания его концентрации на терапевтическом уровне.

Для повышения эффективности лечения целесообразно использовать лекарственное средство с пролонгированным действием, что возможно путем иммобилизации препарата на полимерной основе. В Иркутском институте органической химии СО АН СССР получен метронидазол пролонгированного действия (пролонгированный метронидазол), представляющий комплекс метронидазола и поливинилпирролидона в качестве иммобилизующей полимерной матрицы. В дальнейшем испытывался комплекс в виде 10%-ного водного раствора поливинилпирролидона с 1% нанесенного на него метронидазола. Полученный комплекс хорошо растворим в воде (в 2,3 раза лучше, чем метронидазол) и кроме того поливинилпирролидон, выполняя роль полимерной матрицы, создает депо лекарства непосредственно в очаге поражения и, освободившись от иммобилизованного препарата, выполняет роль сорбента, поглощающего из раневого отделяемого микроорганизмы и их кислые токсичные метаболиты.

Нами проведена серия экспериментов по изучению некоторых фармакокинетических параметров синтезированного препарата. Нас интересовало время циркуляции пролонгированного препарата в организме и распределение исследуемого комплекса в органах животных при его парентеральном введении.

Экспериментальная часть

Эксперименты выполняли на беспородных белых крысах обоего пола массой 180–200 г. Подопытным животным вводили иммобилизованный препарат внутрибрюшинно однократно в дозе 150 мг/кг, экспериментально установленной при определении антимикробного действия пролонгированного метронидазола методом последовательных серийных разведений в жидкой питательной среде. Контрольная группа крыс получала обычный метронидазол в такой же дозировке. Выполнено две серии экспериментов: в первой – животных забивали через 1, 2, 3 и 4 сут, во второй – через 24, 30, 40 и 48 ч. Для каждого срока забоя было использовано по шесть особей, как в контрольной, так и в подопытной группах. После декапитации для исследования забирали кровь, почки, печень и легкие. Паренхиматозные органы гомогенизировали и определяли в них количественное содержание метронидазола методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на жидкостном хроматографе «Милихром».

В основу методики легли данные [3–7] по исследованию метронидазола после адаптирования для указанного прибора. При снятии УФ-спектра водного раствора исследуемого комплекса установлено, что его оптические характеристики не изменились по сравнению с таковыми обычного метронидазола и максимум поглощения раствора наблюдался при 318 нм.

Биологическую пробу депротеинизировали ацетонитрилом (1 : 1), центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. Супернатант подщелачивали раствором гидроксида натрия до pH 8 и из него дважды по 1 мл экстрагировали препарат хлороформом. После упаривания растворителя досуха в токе азота остаток растворяли в 50 мкл элюента (смесь метанол – вода (8 : 2)). На колонку наносили от 5 до 30 мкл пробы. Для анализа использовали колонку с обращенной фазой нуклеосил C_{18}. Элюирование проводили в градиентном режиме системой растворителей метанол – вода с изменением содержания метанола от 20 до 80%. Скорость элюирования – 1000 мкл/мин, детектирование – спектрофотометрическое при длине волны 318 нм. Количественное содержание препарата в пробе рассчитывали с учетом коэффициентов экстракции вещества хлороформом, разбавления пробы и осаждения вещества с белками при депротеинизации. Суммарный коэффициент равен 8. Количество комплекса поливинилпирролидона с метронидазолом и метронидазола определяли по калибровочной кривой. Предел обнаружения препарата – 0,01 мкг/мл.

Обсуждение результатов

Результаты первой серии опытов, в которой содержание препарата в крови и тканях анализировали на 1, 2, 3 и 4 сутки, показали, что пролонгированный метронидазол удерживается в организме в течение 2 суток, а обычный метронидазол — менее суток. Во второй серии опытов концентрации метронидазола у животных определяли через 24, 30, 40 и 48 ч. Данные приведены в таблице. Полученные значения содержания препарата свидетельствуют о том, что пролонгированный метронидазол хорошо проникает в ткани, его высокая концентрация создается в крови через 24 ч и через 48 ч он еще циркулирует в организме.

В проводимых опытах молекулярная масса поливинилпирролидона, иммобилизующего метронидазол, составляла $(8—10)\cdot10^3$ усл. ед. При замене полимерной матрицы на более высокомолекулярную ($(24—30)\cdot10^3$ усл. ед.) наблюдалось более длительное удерживание пролонгированного препарата в организме животных (рис. 1).

После экспериментального определения антимикробного действия комплекса поливинилпирролидон — метронидазол и его токсичности с учетом того, что обе составляющие исследуемого комплекса являются фармакопейными препаратами, проведено лечение пролонгированным метронидазолом больных с анаэробной неклостридиальной хирургической инфекцией. Одиннадцати больным с единичными и множественными абсцессами легких были внесены коррективы в схему лечения при введении им пролонгированного препарата в полость абсцесса через дренажную трубку. Хроматографический метод позволил контролировать количественный уровень метронидазола в гнойном очаге и в крови больного в течение всего курса антибактериальной терапии, повышая эффективность ее проведения. У ряда больных дозировки метронидазола, предусмотренные фармакопеей, были недостаточными для создания в гнойном очаге минимальной бактерицидной концентрации. В этих случаях было необходимо увеличить пациентам дозу препарата (рис. 2), либо уменьшить временные интервалы между введениями (рис. 3), руководствуясь индивидуальными особенностями организма. На рисунках показана кривая изменения концентрации метронидазола в гнойном очаге (полость абсцесса). Заштрихованная область отражает интервал минимальной бактерицидной концентрации препарата.

Таким образом, нами было проведено детальное изучение «судьбы» пролонгированного метронидазола в организме экспериментальных животных и пациентов с хирургической инфекцией в связи с тем, что этот препарат наиболее широко применяется в практическом здравоохранении.

Содержание пролонгированного метронидазола (мкг/мл) в органах крыс (I — кровь, II — печень, III — почки, IV — легкие) после однократного введения в дозе 150 мг/кг

τ, ч	I	II	III	IV
24	3,64	—	2,59	1,42
30	1,4	1,25	0,44	0,29
40	0,55	0,02	0,14	0,08
48	0,07	0,06	0,04	0,01

Примечания. Содержание метронидазола через 24 ч в пробе из легких составляло 0,8 мкг/мл, в остальных случаях он не был обнаружен; τ — время забора пробы.

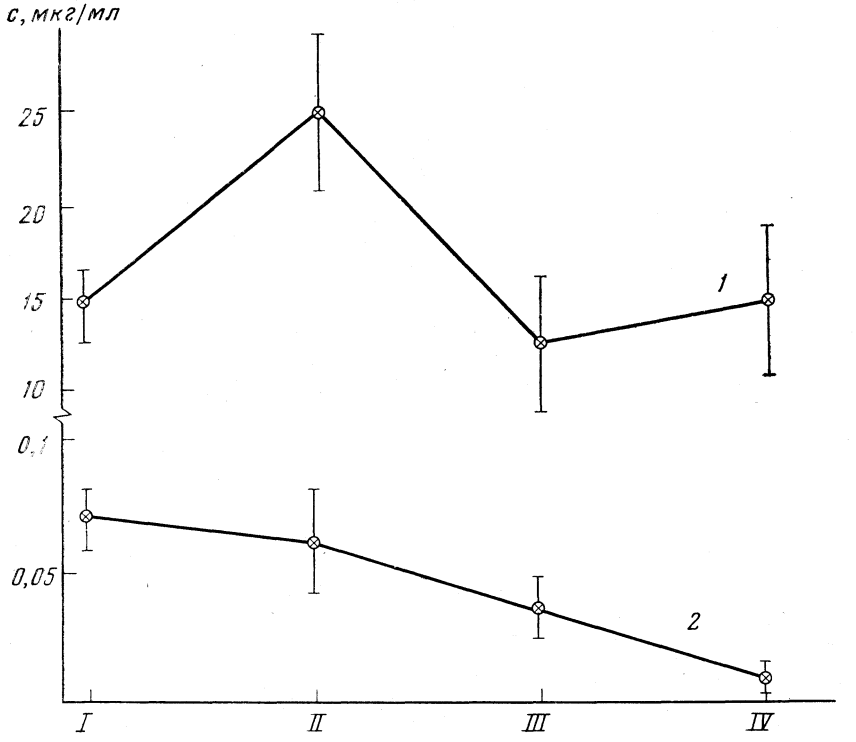


Рис. 1. Распределение метронидазола, иммобилизованного на поливинилпирролидоне, в органах животных (I – кровь, II – печень, III – почки, IV – легкие) при различных молекулярных массах иммобилизующей матрицы: *1* – $(24 \div 30) \cdot 10^3$, *2* – $(8 \div 10) \cdot 10^3$ усл. ед.

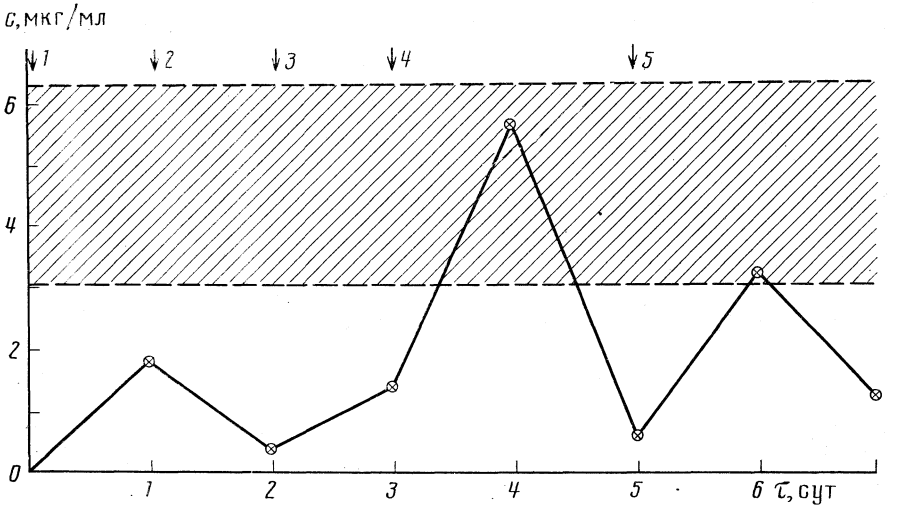


Рис. 2. Динамика изменения концентрации метронидазола пролонгированного действия в содержимом плевральной полости больного с диагнозом: абсцесс нижней доли правого легкого; стрелкой показан момент введения препарата

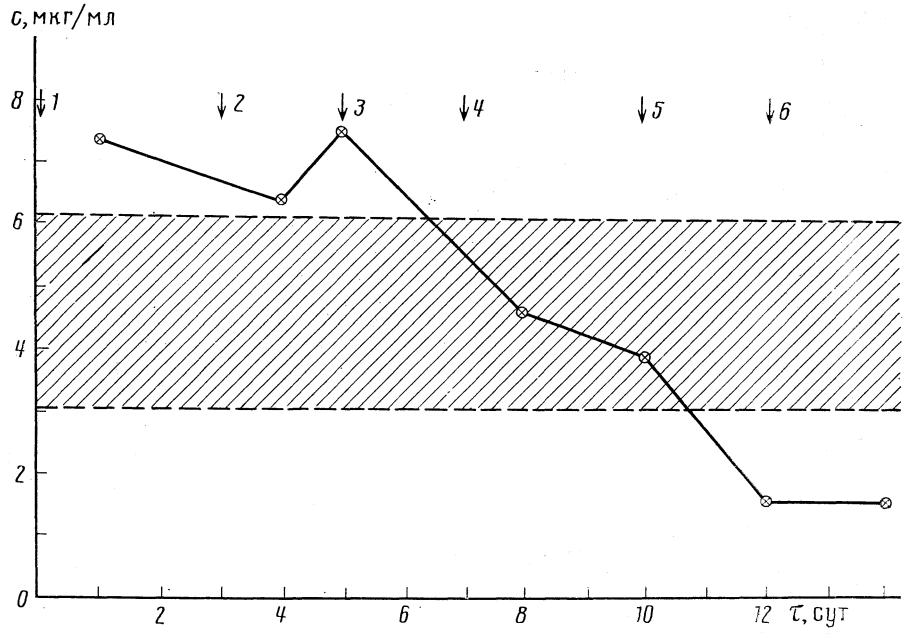


Рис. 3. Динамика изменения концентрации метронидазола пролонгированного действия в содержимом полости больного с диагнозом: абсцесс нижней доли правого легкого, эмпиема плевры; стрелкой показан момент введения препарата

Разработанный нами метод ВЭЖХ был введен в практику центра хирургической инфекции на базе Иркутской областной клинической больницы. Этот метод позволил также проводить количественное определение и других лекарственных противоанаэробных препаратов группы имидазолов (тинидазол-(1-(2-этилсульфонилэтил)-2-метил-5-нитроимидазол) и группы тиазолов (нитазол-2-ацетиламино-5-нитротиазол) с целью индивидуализации проводимой антибактериальной терапии.

Список литературы

1. *Кузин М. И., Вандяев Г. К., Блатун Л. А.* // Хирургия. 1983. № 6. С. 106.
2. *Vyhnanek F., Absolonova V., Prochazka M. et al.* // Ces. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 1988. V. 37. № 3. P. 167.
3. *Mattila I., Mannisto P. T., Mantyla R. et al.* // Antibacter. Chemother. 1983. V. 23. № 5. P. 721.
4. *Mattie H., Dijkmans A. B. C., Van Gulpen C.* // J. Antimicrob. Chemother. 1982. V. 10. Suppl. A. P. 59.
5. *Mattila I., Nerdrum K., Rounhianen H. et al.* // Chemother. 1983. V. 29. P. 188.
6. *Viitanen I., Auvinen O., Tunturi T.* // Ibid. 1983. V. 29. P. 13.
7. *Holter O., Bergan T., Florens T. et al.* // J. Antimicrob. Chemother. 1983. V. 11. P. 357.

Академия медицинских наук СССР
Сибирское отделение
Восточно-Сибирский филиал
Научно-исследовательский институт хирургии
Иркутск

СОДЕРЖАНИЕ

МАТЕРИАЛЫ V ВСЕСОЮЗНОГО СИМПОЗИУМА ПО МОЛЕКУЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Общие вопросы и теория жидкостной хроматографии

Яшин Я. И. Новейшие достижения и перспективы высокоэффективной жидкостной хроматографии 2593

Калиничев А. И. Динамика размывания хроматографического пика в случае произвольных нелинейных изотерм сорбции 2602

Лебедев Ю. Я. Экстремальные зависимости характеристик зоны вещества от параметров хроматографической системы 2607

Андреев В. П., Хидекель М. И. Математическая модель капиллярной хроматографии на открытых колонках 2614

Андреев В. П., Хидекель М. И. О влиянии стенок канала при проточном фракционировании макромолекул на время разделения 2620

Андреев В. П., Казакова Л. Б. Ступенчатое программирование поперечной скорости при гидродинамическом проточном фракционировании высокомолекулярных соединений 2627

Агеев А. Н., Яшин Я. И. Закономерности удерживания эфиров *о*-фталевой кислоты в жидкостной хроматографии 2631

Муляшов С. А., Сировский Ф. С., Гречишкина О. С. Связь хроматографических характеристик ароматических карбоновых кислот и некоторых их производных со строением молекул 2635

Сердан А. А., Богословский С. Ю., Нестеренко П. Н. Зависимость удерживания некоторых лекарственных препаратов на дифильном сорбенте от pH и ионной силы элюента 2638

Бэ Ен Ил, Ланин С. Н., Никитин Ю. С. Удерживание ароматических углеводородов в нормально-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии в присутствии полярных модификаторов подвижной фазы 2644

Рыбин В. К., Григорова Л. В., Макаров П. В. Оптимизация условий обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии белков 2649

Аборнев С. И., Сидельников В. Н. Оптимизация экспериментальных условий при проведении сверхкритической флюидной хроматографии на микронасадочной колонке с пламенно-ионизационным детектором 2655

Агеев А. Н., Мигунов И. М., Орлов В. И., Радченко А. Ю., Яшин Я. И. Новые жидкостные хроматографы ДОКБА 2660

Сорбенты и колонки для жидкостной хроматографии

Трушин С. А., Мальцев В. Г., Кевер Е. Е., Виноградова Л. В., Беленький Б. Г. Хроматографические свойства сорбентов для обращенно-фазовой хроматографии белков 2663

Нестеренко П. Н., Кротов В. В., Староверов С. М. Хроматографические свойства силикагеля с привитым хинином 2671

Шарыгин Л. М., Галкин В. М., Моисеев В. Е., Пономарев В. Г., Даванков В. А., Курганов А. А., Пономарева Т. М. Сорбент на основе диоксида циркония для жидкостной хроматографии 2677

Новиков А. Г., Богомолова Н. Г., Николаев С. В., Постнов В. Н., Крашенюк А. И. Хроматографические и сорбционные свойства кремнезема, модифицированного β-фенилэтилтрихлорсиланом 2683

Уткелов Б. А., Лесене И., Абдрахманова И. К., Марушка А., Ткаченко Р. Р., Кильдибеков Н. А. Хелатные сорбенты на основе 8-оксихинолина для лигандообменной хроматографии 2687

Сабуров В. В., Муйдинов М. Р., Гурьянов С. А., Катаев А. Д., Туркин С. И., Зубов В. П. Перфторполимерсодержащие кремнеземные сорбенты и их применение в обращенно-фазовой хроматографии биологически-активных веществ 2692

Королева С. К., Борисова В. Н., Ахназарова С. Л. Оптимизация получения сорбентов на основе кремнеземов, модифицированных поливинилпирролидоном 2699

Хохлова Т. Д., Никитин Ю. С., Детистова А. Л., Гаркавенко Л. Г. Исследование химии поверхности модифицированных кремнеземов с помощью адсорбции красителей 2705
Градил И., Швец Ф., Белякова Л. Д., Аратскова А. А., Орлов В. И., Яшин Я. И. Пористые метакрилатные полимеры с аминогруппами как анионообменники в ионной хроматографии 2709
Нахапетян Л. А., Мотина Л. И., Швец Ф., Градил И., Коробков И. В., Хусаинов М. Р., Кузнецов В. П. Иммуносорбенты на основе целлюлозы для выделения и очистки биополимеров 2713
Нестеров В. В., Мальцев В. Г., Красиков В. Д., Беленький Б. Г. Новые хроматографические колонки для высокоэффективной жидкостной хроматографии синтетических полимеров и биополимеров 2717

Применения жидкостной хроматографии

Исследование полимеров

Клинских А. Ф., Кузаев А. И., Соколов М. И. Самосогласованная процедура для калибровки гель-хроматографа при определении молекулярных характеристик полимеров 2724
Подосенова Н. Г., Лебедев Ю. Я. О корректности применения ситовой хроматографии к анализу молекулярно-массового распределения полимеров 2729
Петракова Е. А., Окунева А. Г., Балкова Е. В. Определение монофункциональных примесей в линейных алифатических поликарбонатах методом тонкослойной хроматографии в критических условиях 2736
Федоров Е. К. Применение градиентной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии и эксклюзионной хроматографии для исследования распределения по составу статистических сополимеров 4-винилпиридина и N-винилпирролидона 2739
Михальский А. И., Тетенок Н. А., Мирошникова И. И., Курапова Т. Ю. Анализ трехфункционального метилфенилсилоксанового олигомера в режимах эксклюзионной и адсорбционной высокоэффективной жидкостной хроматографии 2745
Михальский А. И., Новиков Д. Д., Тетенок Н. А., Мирошникова И. И. Исследование однородности фракционного состава олигоорганосилоксанов путем синхронного селективного детектирования в режиме эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии 2750
Федосеевский В. В., Тихонов В. С., Ларионов О. Г. Гель-проникающая и высокоэффективная жидкостная хроматография реакционноспособных олигофенил(диметил)силоксанов 2754
Тихонова Т. З., Петракова Е. А. Три режима тонкослойной хроматографии для простых и сложных олигоэфиров 2759
Пискарева Е. П., Карташева Г. Г. Сочетание гель-проникающей хроматографии и светорассеяния как метод оценки разветвленности полимеров 2763
Конкина Л. Н., Таганов Н. Г., Ермакова В. Д., Морозов В. А. Применение хроматографии с комбинированным детектированием для исследования распределения азота в нитратах целлюлозы 2768

Химия и нефтехимия

Стахина Л. Д., Томсон Г. А., Прозорова И. В., Манакова Р. А., Савиных Ю. В. Жидкостная хроматография в исследовании нефти 2771
Коржов Ю. В., Головко А. К. Применение жидкостной хроматографии в исследовании состава нефтяных биаренов 2775
Иванов В. И., Мозжелина Т. К., Головко А. К. Жидкостно-хроматографическое разделение нефтяных триаренов на различных сорбентах 2781
Мин Р. С., Бейко О. А. Изучение процесса экстракции сернистых и ароматических компонентов нефти с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии 2787
Серебренникова О. В., Мозжелина Т. К., Шульга А. М. Применение жидкостной хроматографии для выделения и разделения геопорфиринов 2792
Круглов Э. А., Ушакова З. И. Разделение бензолкарбоновых кислот методом жидкостной хроматографии 2799
Круглов Э. А., Ушакова З. И. Исследование цветообразующих примесей в продуктах производства ионола 2804

Демьянов П. И., Хименес М. П., Петросян В. С. Определение фенолов в виде дабсилатов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии 2808
Духовная И. С., Чмиль В. Д. Жидкостная хроматография в анализе аминосоединений, применяемых в производстве полимеров 2816
Градил И., Орлов В. И., Аратскова А. А., Семений В. Я., Яшин Я. И. Ион-парная хроматография металлов на метакрилатных полимерах 2823
Сербинович В. В., Мединец В. И., Антонович В. П., Рыбалка В. Б. Моделирование оптимизации процессов разделения циркония и гафния методом экстракционной хроматографии 2828
Горчаков В. Д., Даурова Е. А., Авдюшкина Т. В., Сакодынский К. И. Хроматографическое выделение пищевых красителей из продуктов переработки винограда 2833

Биология и медицина

Иванов А. Е., Вульфсон А. Н., Якимов С. А., Зубов В. П., Арутюнян А. М. Использование широкопористых силикагелей с N-бутилполиакриламидной «стационарной фазой» для высокоэффективной жидкостной хроматографии белков 2836
Клюшниченко В. Е., Вульфсон А. Н., Мальцев К. В., Беляев С. В. Эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография в анализе продуктов биотехнологического производства рекомбинантного инсулина человека 2840
Соловьева Л. Я., Антипова Т. О., Ищенко А. М., Карабанова В. А. Применение ионно-гидрофобных сорбентов для выделения компонентов комплемента С3, С4, С5 из нормальной сыворотки крови человека 2843
Штукина Т. В., Ищенко А. М., Болдырев А. Г., Антипова Т. О., Мартюшин С. В., Трофимов А. В., Синева С. А. Выделение С1-ингибитора комплемента 2849
Котлова Н. Г., Кулиш М. А., Рубцов К. С. Использование высокоэффективной жидкостной хроматографии для очистки субъединицы II цитохромоксидазы 2854
Колосов Ю. В., Колышкин В. М., Смоленский В. И., Трифонов В. Д., Мчедлишвили Б. В. Препаративная хроматография инфекционного ринотрахеита суспензии вируса 2857
Волков С. К., Гродницкая Е. И. Количественный анализ винбластина в Catharanthus voseus 2860
Ганенко Т. В., Горшков А. Г., Луцкий В. И., Барам Г. И., Семенов А. А. Применение метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с двухволновой фотометрической детекцией для анализа тритерпеновых гликозидов в растительном экстракте 2863
Первухина И. В., Курляндский Б. А., Касаткина Т. А. Изучение метаболических превращений активных хлортриазиновых красителей в организме методом высокоэффективной жидкостной хроматографии 2868
Маякова Т. И., Кузнецова Э. Э. Контроль эффективности лекарственной терапии методом высокоэффективной жидкостной хроматографии при лечении хирургической инфекции 2872

Редакционная коллегия:

В. В. ГРОМОВ, В. М. ГРЯЗНОВ, Л. В. ГУРВИЧ, В. А. ДАВАНКОВ, В. М. ЖУЛИН, О. Г. ЛАРИОНОВ, Я. С. ЛЕБЕДЕВ, А. А. ЛОПАТКИН, В. В. ЛУНИН, И. А. МЯСНИКОВ, Ю. А. ПЕНТИН, О. М. ПОЛТОРАК, А. Я. РОЗОВСКИЙ, Л. Н. СИДОРОВ, А. П. СИМОНОВ, Н. Ф. СТЕПАНОВ, С. Ф. ТИМАШЕВ, В. П. ЧИЖКОВ, Н. А. ЧУМАЕВСКИЙ, В. И. ШИМУЛИС

Главный редактор **В. М. ГРЯЗНОВ**

Заместители главного редактора

И. А. МЯСНИКОВ, Ю. А. ПЕНТИН

Ответственный секретарь **В. В. ГРОМОВ**

Телефон 227-00-14, доб. 29-28

Зав. редакцией Н. М. Беленкина

Технический редактор *В. П. Наботова*

Сдано в набор 24.07.91 Подписано к печати 03.09.91 Формат бумаги 70×100¹/₁₆
Высокая печать Усл. печ. л. 23,4 Усл. кр.-отт. 36,1 тыс. Уч.-изд. л. 26,9 Бум. л. 9,0
Тираж 1526 экз. Зак. 1748 Цена 4 р. 00 к.

Адрес редакции: 103064, Москва, ул. Обуха, 10, НИФХИ им. Л. Я. Карпова
Тел.: 227-00-14, доб. 29-28
2-я типография издательства «Наука», 121099, Москва, Г-99, Шубинский пер., 6