

## ОСНОВНІ ПУБЛІКАЦІЇ

УДК 543.544

*АНДРОНИКАШВИЛИ Т.Г., АМИРХАНАШВИЛИ К.Д.,  
НАДИРАДЗЕ Н.А., ГАМКРЕЛИДЗЕ К.М.*

### ***К ВЛИЯНИЮ ПРИРОДЫ ГАЗА-НОСИТЕЛЯ НА РАЗРЕШАЮЩУЮ СПОСОБНОСТЬ КАПИЛЛЯРНЫХ КОЛОНОК***

*Досліджено вплив природи газу-носія на хроматографічні властивості капілярної колонки з нерухомою фазою OV-1 на прикладі розділення метилових естерів та ацильних похідних деяких амінокислот. Показано, що використання CO<sub>2</sub> як газу-носія поліпшує розділення компонентів суміші досліджуваних амінокислот, збільшує симетричність хроматографічних зон, підвищує розділювальну здатність та ефективність капілярної колонки, скорочує тривалість аналізу.*

*Исследовано влияние природы газа-носителя на хроматографические свойства капиллярной колонки с неподвижной фазой OV-1 на примере разделения метиловых эфиров и ацильных производных некоторых аминокислот. Показано, что применение CO<sub>2</sub> в качестве газа-носителя улучшает разделение компонентов смеси изучаемых аминокислот, увеличивает симметричность хроматографических зон, повышает разделительную способность и эффективность капиллярной колонки, сокращает продолжительность анализа.*

*The influence of the nature of carrier-gas on the chromatographic properties of capillary column with OV-1 stationary phase for separation methyl esters and acylated forms of some amino acids was studied. It has been shown that the use of CO<sub>2</sub> as a carrier-gas improves the separation of studied amino acids, increases the column efficiency, decreases the analysis time and asymmetry of chromatographic zones.*

Метод капілярної хроматографії широко використовується для аналізу складних органічних сумішей, на чіткість розділення яких впливають такі фактори як: робоча температура і геометричні характеристики колонки, природа подвижної і неподвижної фаз, тиск на вході і виході колонки [1-3]. Найкраще розділення досягається лише при оптимізації робочих умов, що передбачає ретельне вивчення всіх факторів, що впливають на розділення аналізованих сумішей.

Одним из важнейших факторов, влияющих на хроматографическое разделение смесей органических веществ, является природа подвижной фазы. Вязкость и коэффициент диффузии, чувствительность и принцип действия детектора, инертность по отношению к неподвижной фазе и анализируемым веществам, чистота, доступность и низкая стоимость являются теми факторами, которые определяют выбор газа-носителя. На основании теоретических соображений Эттре и другие [4-6] предпочитают применять в качестве газа-носителя более легкие газы с низким коэффициентом диффузии ( $H_2$  и He), некоторые предпочитают азот, вместо дорогого гелия и опасного водорода [7]. В ряде случаев используется  $CO_2$ , применение которого способствует перемещению компонента вдоль колонки в виде компактной пробы, что приводит к повышению симметрии пика и разделительной способности колонки [7,8]. Влияние природы газа-носителя  $CO_2$  на удерживание и процесс разделения углеводов, формирование хроматографической зоны было изучено авторами настоящей работы [9-10]. Показано, что "активная" роль подвижной фазы приводит к блокированию активных центров цеолитных адсорбентов типа Y, что дает возможность существенно повысить эффективность колонки, уменьшить продолжительность разделения, снизить температуру нагрева колонки и улучшить симметричность хроматографических зон.

Природа газа-носителя играет активную роль не только в адсорбционной, но и в газо-жидкостной хроматографии. Так, на примере хроматографирования длинноцепных жирных кислот и их метиловых эфиров с использованием метода газо-жидкостной хроматографии показано, что замена газа-носителя Ar на  $CO_2$  приводит к уменьшению времени удерживания элюируемых соединений и к получению более симметричных пиков на хроматограмме [11].

Установлено также, что природа газа-носителя играет значительную роль и в капиллярной хроматографии [12,13]. В работе [12] показано, что в капиллярной колонке, содержащей сквалан в качестве неподвижной фазы, происходит уменьшение удерживаемых объемов углеводов в указанном порядке:  $He > H_2 > N_2 > Ar > CO_2$ , в зависимости от природы движущего агента.

Таким образом, природа газа-носителя оказывает значительное влияние на хроматографические свойства как адсорбентов, так и жидких фаз. Поэтому изучение влияния природы газа-носителя на разделительные свойства капиллярных колонок представляется нам актуальной задачей.

### ***Материалы и методы***

Исходя из вышеизложенного, нами было изучено влияние природы газа-носителя на разделительные свойства кварцевой капиллярной колонки с неподвижной жидкой фазой (НЖФ) OV-1 (30м x 0.25мм).

5% смесь неподвижной жидкой фазы OV-1 в хлороформе наносилась на стенки капилляра динамическим методом. Газами-носителями служили гелий, азот и диоксид углерода. Расход газов-носителей (в  $см^3/мин$ ) был следующий: для He – 17,7;  $N_2$  – 15,5;  $CO_2$  – 12,5. Давление у входа колонки – 0,15 кПа. Опыты проводились на хроматографе "Цвет-500" с пламенно-ионизационным детектором. Эксперимент проводился в изотермическом режиме при нагревании хроматографической колонки до температур 135, 145, 155, 165, 175 °С.

Существует сравнительно мало работ по разделению и определению производных аминокислот методом газо-жидкостной хроматографии, несмотря на быстроту этого метода, доступность автоматизации процесса и возможность разделения близких по свойствам компонентов. Это вызвано малой летучестью разделяемых

соединений. Поэтому большинство работ в данном аспекте выполнено с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии [14]. С целью повышения упругости паров аминокислоты переводят в этиловые эфиры [7,15]. Однако эти методы не позволяют проанализировать все аминокислоты, и поэтому применяются только в том случае, если частичный анализ аминокислот отвечает требованиям данной конкретной задачи.

Для повышения летучести использовались два варианта: превращение аминокислот в сложные эфиры (метанольный метод) или в летучие ацильные производные. В первом случае к аминокислоте или смеси аминокислот добавляли метанол, насыщенный концентрированной серной кислотой ( $H_2SO_4$ ). Полученную смесь кипятили в течение 5 часов при 68-70 °С. Продукты нейтрализовали раствором 2 н. КОН, фильтровали, перегоняли на водяной бане при 40-50 °С и порцию остатка вводили в хроматограф [15]. Во втором случае превращение аминокислот в летучие производные осуществлялось не только этерификацией, но и ацилированием. При этом к 5 г смеси аминокислот добавляли 10 мл метанола, через смесь пропускали сухой хлористый водород. Избыток кислоты и спирта отгоняли в вакууме при 60-80 °С, затем добавляли 5 мл уксусного ангидрида и размешивали в течение 20 минут, а потом концентрировали в вакууме при 60 °С.

С целью оценки хроматографических свойств изучаемых капиллярных колонок использовали разные газы-носители для определения следующих показателей: исправленного времени и объема удерживания, коэффициентов асимметрии и разделения, эффективности колонки (числа и высоты теоретических тарелок), критерия равномерности [16,17].

Исправленный объем удерживания рассчитывался по формуле:

$$V_{R'} = (t_R - t_m) \cdot F_m,$$

где  $t_R$  – время удерживания компонента R,  $t_m$  – мертвое время колонки (время, прошедшее с момента ввода пробы до момента выхода инертного несорбируемого компонента),  $F_m$  -объемная скорость газа-носителя.

Коэффициенты асимметрии рассчитывались по формуле:

$$K_{as} = \tau_\phi / \tau_m,$$

где  $\tau_\phi$  – ширина фронтального участка пика на уровне 0,1 его высоты,  $\tau_m$  – ширина тылового участка пика на уровне 0,1 его высоты.

Коэффициент разделения

$$K = \Delta l / a_{0,5} (1) + a_{0,5} (2),$$

где  $\Delta l$  – расстояние между максимумами двух пиков;  $a_{0,5} (1)$ ,  $a_{0,5} (2)$  – ширина первого и второго пиков на половине их высоты.

Эффективность колонки (число теоретических тарелок) определяется формулой:

$$N = 5,545 (l_n / \tau_{0,5})^2,$$

где  $l_n$  – расстояние от точки ввода пробы до максимума пика хроматографической зоны,  $\tau_{0,5}$  – ширина пика, измеренная на половине высоты (см или мм);

$$H = L / N,$$

где  $H$  – высота, эквивалентная теоретической тарелке,  $L$  – длина колонки.  
Критерий равномерности рассчитывался по формуле:

$$\Delta = n_k \tau_{и} K_{эф} / t,$$

где  $n_k$  – число пиков на хроматограмме;  $\tau_{и}$  – основание наиболее узкого пика;  $K_{эф}$  – относится к наихудшим образом разделяемой паре;  $t$  – продолжительность анализа.

### *Результаты и их обсуждение*

В настоящей работе тестовыми объектами служили этерифицированные и ацилированные производные следующих аминокислот: аланина, валина, лейцина, изолейцина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты и триптофана.

Из данных, приведенных в таблице 1, следует, что на характер элюирования вышеуказанных соединений значительное влияние оказывают два фактора: природа газа-носителя и температура нагрева хроматографической колонки.

**Таблица 1**

#### **Исправленные удерживаемые объемы метиловых эфиров аминокислот**

Темп. колонки °С	Газ-носитель	Эфиры аминокислот:						
		аланина	валина	лейцина	изо-лейцина	аспарагиновой к-ты	глутаминовой к-ты	триптофана
135	He	95	320	1500	1650	-	-	-
	N <sub>2</sub>	85	295	1450	1625	-	-	-
	CO <sub>2</sub>	55	250	1250	1400	3600	7900	-
145	He	80	300	1400	1600	4050	8500	-
	N <sub>2</sub>	80	285	1290	1500	4000	8200	-
	CO <sub>2</sub>	50	200	1200	1300	3550	6300	-
155	He	65	250	1200	1350	3260	6900	-
	N <sub>2</sub>	60	210	1150	1200	3100	6500	-
	CO <sub>2</sub>	45	150	1000	950	2815	5860	7800
165	He	55	190	1100	1250	2650	4090	7000
	N <sub>2</sub>	50	180	980	1100	2450	3950	6800
	CO <sub>2</sub>	35	100	659	550	1700	3800	4500
175	He	50	190	950	750	1900	3800	6500
	N <sub>2</sub>	45	160	900	730	1850	3200	6000
	CO <sub>2</sub>	35	100	600	450	1400	2100	3250

Так, при температуре нагрева хроматографической колонки 135°С и использовании газов-носителей гелия и азота вымываются только метиловые эфиры аланина, валина, лейцина, изолейцина в указанной последовательности элюирования, т.е. в порядке возрастания их температур кипения. Остальные соединения прочно удерживаются в хроматографической колонке, что, по-видимому, объясняется их недостаточной летучестью в указанных условиях эксперимента. Использование более

"активного" газа-носителя – диоксида углерода делает возможным элюирование из колонки аспарагиновой и глутаминовой кислот. При температуре нагрева колонки 145-155°C под воздействием более легких газов-носителей гелия и азота элюируются все шесть компонентов аминокислот, а при использовании диоксида углерода при температуре нагрева колонки 155°C дополнительно элюируется триптофан. Кроме того, в этом случае имеет место инверсия последовательности вымывания лейцина-изолейцина. По-видимому, это связано с конфигурацией, компактностью молекул изолейцина, так как диоксид углерода одновременно выполняет роль элюента и вытеснителя [9,10]. Подобная картина элюирования всех исследуемых аминокислот наблюдается при нагреве колонки до 165°C. При нагреве хроматографической колонки до 175°C проявляется в большей степени воздействие температурного фактора, а именно, под влиянием всех трех газов-носителей имеет место идентичная последовательность элюирования всех семи метиловых эфиров: аланин-валин -изолейцин -лейцин – аспарагиновая кислота – глутаминовая кислота – триптофан.

В целом, при всех температурах нагрева колонки применение в качестве газа-носителя диоксида углерода позволяет в значительной мере уменьшать времена удерживания всех исследованных соединений, по сравнению с воздействием таких газов-носителей как азот или гелий. Следовательно, диоксид углерода в качестве газа-носителя значительно превосходит гелий и азот по активности воздействия на такой параметр хроматографического процесса как удерживание:  $He < N_2 < CO_2$

Коэффициенты асимметричности (таблица 2) всех исследованных соединений, как и следовало ожидать, зависят как от природы газа-носителя, так и от температуры нагрева колонки.

**Таблица 2**

**Коэффициенты асимметричности  $K_{as}$  метиловых эфиров аминокислот**

Темп. колонки °С	Газ-носитель	Эфиры аминокислот:						
		аланина	валина	лейцина	изо-лейцина	аспарагиновой к-ты	глутаминовой к-ты	триптофана
135	He	0.55	0.51	0.50	0.45	-	-	-
	N <sub>2</sub>	0.48	0.48	0.50	0.50	-	-	-
	CO <sub>2</sub>	0.68	0.65	0.55	0.60	0.45	0.45	-
145	He	0.60	0.55	0.53	0.50	0.48	0.48	-
	N <sub>2</sub>	0.55	0.50	0.50	0.48	0.45	0.40	-
	CO <sub>2</sub>	0.75	0.67	0.65	0.67	0.50	0.50	-
155	He	0.75	0.73	0.68	0.70	0.60	0.55	-
	N <sub>2</sub>	0.68	0.70	0.60	0.70	0.55	0.50	-
	CO <sub>2</sub>	0.86	0.78	0.77	0.80	0.68	0.70	0.65
165	He	0.85	0.80	0.75	0.75	0.72	0.72	0.70
	N <sub>2</sub>	0.80	0.78	0.75	0.72	0.73	0.68	0.71
	CO <sub>2</sub>	0.92	0.90	0.92	0.90	0.85	0.80	0.77
175	He	0.90	0.85	0.95	0.95	0.80	0.75	0.72
	N <sub>2</sub>	0.85	0.85	0.80	0.79	0.75	0.75	0.75
	CO <sub>2</sub>	1.00	0.97	0.95	0.95	0.90	0.87	0.87

Так, при температуре нагрева хроматографической колонки 175°C и диоксида углерода как газа-носителя с высокой молекулярной массой образуются "идеально" симметричные пики на хроматограммах для большинства исследованных соединений. Так, например, симметричность пика метилового эфира аланина на хроматограмме при возрастании температуры нагрева колонки от 135 до 175 °С увеличивается в два раза даже при использовании такого "неактивного" газа-носителя как гелий.

Важным параметром, определяющим хроматографический процесс, является эффективность хроматографической колонки. Эта величина характеризует размывание хроматографических зон. Качественно эффективность колонки тем выше, чем уже, острее зоны хроматографируемых соединений. Ее количественной характеристикой служит число теоретических тарелок (N) или высота, эквивалентная теоретической тарелке (H, ВЭТТ). Иными словами, для повышения эффективности хроматографической колонки желательно путем надлежащего подбора параметров колонки довести до максимума величину N и до минимума величину H. Данные, приведенные в таблице 3, свидетельствуют о том, что эффективность хроматографической колонки наиболее высокая в тех случаях, когда в качестве газа-носителя применяется диоксид углерода и температура нагрева хроматографической колонки повышается до 175°C.

**Таблица 3**

**Эффективность капиллярной колонки (число теоритических тарелок N и высоты эквивалентные теоретической тарелке H в мм) заполненной неподвижной фазой OV-1 (30 м x 0.25 мм)**

№	Метилвые эфиры аминокислот	N (H мм)								
		155°C			165°C			175°C		
		He	N <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	He	N <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>	He	N <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub>
1	аланина	8300(3.8)	8600(3.6)	9600(3.1)	9500(3.2)	9450(3.2)	10600(2.8)	9650(3.2)	9900(3.0)	10600(2.8)
2	валина	8100(3.7)	8200(3.6)	9500(3.2)	8500(3.5)	8560(3.4)	9760(3.1)	9455(3.2)	9650(3.1)	9900(3.0)
3	лейцина	8200(3.7)	8900(3.4)	9480(3.1)	8300(3.6)	9150(3.3)	9600 (3.1)	8800(3.4)	9790(3.1)	10700(2.8)
4	изо лейцина	8500(3.5)	8600(3.4)	9000(3.3)	8700(3.4)	8900(3.3)	10000(3.0)	9000(3.3)	9500(3.2)	10000(3.0)
5	аспарагиновой кислоты	7500(4.0)	7800(3.9)	8600(3.5)	8000(3.8)	8500(3.5)	9200 (3.2)	8600(3.4)	8900(3.3)	9800(3.0)
6	глутаминовой кислоты	6900(4.5)	7100(4.3)	8100(3.7)	7800(3.8)	8450(3.5)	9000 (3.3)	8200(3.7)	8800(3.4)	9500(3.1)
7	триптофана	-	-	5800(5.2)	6000(5.0)	6200(4.8)	6900 (4.3)	7000(4.3)	7900(3.8)	8900 (3.3)

Примечание: в скобках приведены высоты эквивалентные теоретической тарелке H в мм.

Это свойственно не только для столь "активного" газа-носителя как диоксид углерода, но и для гелия и азота. По всей вероятности, это вызвано ростом симметричности пиков на хроматограммах для исследованных соединений и образованием более узких, компактных хроматографических зон.

Основным назначением хроматографии является разделение анализируемых смесей на отдельные компоненты. Поэтому наиболее важным параметром, определяющим целесообразность использования этого метода, является его разрешающая

способность -количественная характеристика разделения. Обычно для этих целей используют коэффициент разделения бинарных смесей  $K$  [16] и критерии равномерности  $\Delta$  [17]. Степень разделения является функцией эффективности хроматографической колонки, что определяется температурой нагрева хроматографической колонки и природой газа-носителя. В таблице 4 сведены результаты разделения бинарных смесей метиловых эфиров аминокислот и ацилированных производных этих же соединений.

**Таблица 4**

**Коэффициенты разделения –  $K$  этерифицированных и ацилированных производных аминокислот**

№	Бинарные смеси производных аминокислот:	165°C					
		He		N <sub>2</sub>		CO <sub>2</sub>	
		этер.	ацил	этер.	ацил	этер.	ацил
1	аланина- валина	1.67	1.80	1.80	1.90	1.95	2.00
2	лейцина -валина	1.60	1.75	1.65	1.70	1.80	1.85
3	лейцин-изо-лейцина	1.30	1.51	1.45	1.65	1.60	1.80
4	изо-лейцина-аспарагиновой кислоты	2.40	2.50	2.40	2.85	3.35	3.50
5	аспарагиновой-глутаминовой кислоты	2.00	3.20	2.90	3.00	3.85	4.15
6	глутаминовой кислоты-триптофана	2.50	3.00	2.85	3.50	4.20	4.50

В качестве газа-носителя был использован диоксид углерода, который способствовал росту эффективности колонки и образованию наиболее симметричных кривых разделения во всех вариантах эксперимента. Наилучшее разделение происходит для бинарных смесей ацилированных производных аминокислот, по сравнению с разделением метиловых эфиров. По-видимому, это вызвано большей летучестью ацилированных производных аминокислот в температурных условиях эксперимента.

Идентичные результаты наблюдались и при разделении многокомпонентных смесей этих соединений. Так, критерии равномерности  $\Delta$  (таблица 5) семикомпонентных смесей этерифицированных и ацилированных производных аминокислот свидетельствуют о наиболее равномерном распределении хроматографических зон.

**Критерий равномерности  $\Delta$  смесей этерифицированных и ацилированных производных аминокислот при разделении на капиллярной колонке с нжф OV-1 (30 м x 0.25 мм)**

№	Семикомпонентная смесь производных аминокислот	температура колонки 165 °С					
		He		N <sub>2</sub>		CO <sub>2</sub>	
		этер.	ацил.	этер.	ацил.	этер.	ацил.
1	Критерий равномерности, $\Delta$	0.254	0.350	0.280	0.320	0.315	0.420

Смеси ацилированных производных четко разделяются при использовании диоксида углерода в качестве газа-носителя, который выполняет одновременно роль элюента и вытеснителя. Данные, приведенные в таблицах 4 и 5, полностью соответствуют друг другу.

Таким образом, еще раз подтверждена значительная роль подвижной фазы не только в высокоэффективной жидкостной хроматографии, но и в капиллярном варианте газовой хроматографии.

### **Выводы**

Показано, что:

- 1) при анализе многокомпонентных смесей аминокислот после превращения их в летучие производные достигается лучший разделительный эффект при их ацилировании, чем после этерификации;
- 2) на чёткость разделения смесей аминокислот оказывает влияние природа газа-носителя. Разрешающая способность капиллярных колонок в значительной мере возрастает в последовательности: гелий < азот < диоксид углерода.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. *Ногаре С.Д., Джувет Р.С.* Газо-жидкостная хроматография.— Л.: Недра, 1966.— 470 с.
2. *Лейбниц Э., Штруппе Х.Г.* Руководство по газовой хроматографии.— М.: Мир, 1988.— Т.2.— 508 с.
3. *Тесаржик К., Комарек К.* Капиллярные колонки в газовой хроматографии.— М.: Мир, 1987.— 222 с.
4. *Philips T., Owens D.* The gas chromatographic analysis of inorganic halogen compounds on capillary columns. In: Gas Chromatography.— London: Butterworth, 1960.— 350 p.
5. *Hinshaw John V.* Strategies for improving the analysis of volatile organic compounds // J. of LCGC.— 2000.— Vol.18, № 2.— P. 128-133.
6. *Hinshaw John V.* Basic GC Measurements and calculations // J. of LC-GC.— 2000.— Vol. 18, № 4.— P. 384-390.
7. *Бенчфилд Г., Сторрс Э.* Газовая хроматография в биохимии.— М.: Мир, 1964.— 620 с.

8. *Амирханашвили К.Д., Далбашвили Н.И., Надирадзе Н.А.* Изучение адсорбционных свойств короткой капиллярной колонки с неподвижной фазой SE-30 при использовании разных газов-носителей // Georgian Engineering News.— 2002.— № 1.— P. 102-106.
9. *Andronikashvili T.G., Berezkin V.G., Laperashvili L.Ya., Nadiradze N.A.* Chromatographic separation of hydrocarbon gases on zeolites with use of carbon dioxide as a carrier gas // J. of Chromatography.—1984.— Vol. 288.— P. 95-103.
10. *Andronikashvili T.G., Berezkin V.G., Laperashvili L.Ya., Nadiradze N.A.* On the possibility of increasing the effectiveness of chromatographic columns filled with zeolites // J. of Chromatography.—1985.— Vol. 331.— P. 402-405.
11. Karmen A., McCaffrey J., Bouman R.L. Use of carbon dioxide as carrier-gas in gas chromatography // Nature.— 1962.— Vol.193, № 4815.— P. 575-576.
12. *Desty D.H., Goldup A., Luckhurst G.R., Swanton W.T.* The effect of carrier-gas and column pressure on solute retention.— Gas Chromatography.—London: Butterworths, 1962.— P. 47.
13. *Березкин В.Г., Кязимов Э.А., Агаева М.Н.* О применении паров летучих соединений в качестве подвижной фазы в газовой хроматографии // Азерб. хим. журнал.— 1973.— № 1.— С. 69-73.
14. *Хениен А., Хуне К.П., Лотипайх Ф., Вельтер В.* Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии.— М.: Мир, 1988.— 678 с.
15. *Сунозова Е.Н., Трубников В.И., Сакодынский К.И.* Газовая хроматография аминокислот.— М.: Наука, 1976.— 80 с.
16. *Пецев Н., Коцев Н.* Справочник по газовой хроматографии.— М.: Мир, 1987.— 260 с.
17. *Гольберт К.А., Вигдергауз М.С.* Введение в газовую хроматографию.— М.: Химия, 1990.— 352 с.

*Институт физической и органической химии им. П.Г. Меликишвили,  
Тбилиси, ул. Джикия 5*

*Поступило в редакцию 28.02.2009*