

УДК 543.544:543.25

## ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПОДВИЖНЫХ ФАЗ НА ПРОФИЛЬ НАЧАЛЬНОГО УЧАСТКА ГРАДИЕНТА pH В ХРОМАТОФОКУСИРОВАНИИ

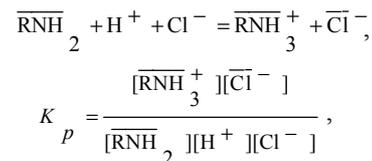
А. В. Иванов, А. Б. Тессман, М. С. Вакштейн

(кафедра аналитической химии)

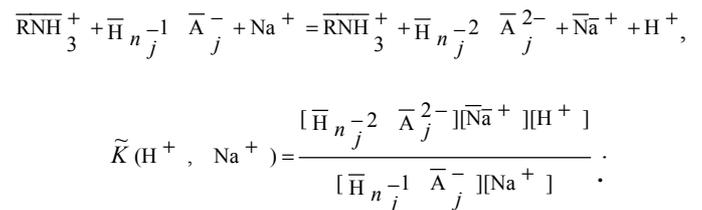
Изучено влияние состава стартового раствора и элюента на профиль начального участка внутреннего градиента pH в хроматофокусировании. «Аномальное» увеличение pH на начальном участке градиента наблюдается в двух случаях: при наличии слабого основания в элюенте и при различии в ионной силе стартового раствора и элюента. При совместном присутствии электролита и слабого основания в элюенте наблюдали два участка с увеличивающимся pH. На профиль начального участка градиента pH влияет также природа сильного электролита.

Хроматофокусирование – метод ионообменной хроматографии, использующий внутренний градиент pH (т.е. формируемый в слое сорбента в хроматографической колонке) как инструмент разделения. Метод обладает такими преимуществами, как высокая разрешающая способность, возможность работы как в препаративном, так и в микроколоночном варианте, простая аппаратура. В настоящее время хроматофокусирование широко применяют для разделения и очистки аминокислот, белков, ферментов и других макромолекул цвиттер-ионного строения [1, 2]. В сочетании с комплексообразовательной хроматографией хроматофокусирование применяют для разделения переходных металлов [3, 4].

Для формирования внутреннего градиента pH ионообменную колонку уравнивают стартовым буферным раствором при значении pH, соответствующем начальной точке градиента, а затем пропускают буферный элюент с отличающимся значением pH. При этом в колонке происходит титрование ионообменных групп сорбента (например, первичных и вторичных аминогрупп) буферным элюентом и, соответственно, плавно изменяется pH в слое сорбента по мере продвижения фронта элюента [1, 5]. В качестве буферных элюентов применяют либо специально синтезированные полиамфолиты, либо многокомпонентные смеси слабых кислот, оснований и амфолитов [6, 7], однако компоненты для таких смесей выбирают чаще всего эмпирически. Для облегчения поиска компонентов буферного элюента нами разработана физико-химическая и математическая модель внутреннего градиента pH в хроматофокусировании, учитывающая в явном виде гомогенные и гетерогенные равновесия в ионообменной динамической системе через выражения условных констант соответствующих равновесий [8–10]. В модели рассмотрен слабоосновный анионообменник, содержащий аминогруппы, и элюент с заданным значением pH, включающий смесь слабых (в общем случае – многоосновных) протолитов и ионы сильного электролита (Na<sup>+</sup> и Cl<sup>-</sup>). В модельной системе устанавливаются такие равновесия, как, например, протонирование аминогрупп сорбента с одновременным связыванием противоиона



монодентатное связывание противоиона и возможный катионный обмен H<sup>+</sup> на Na<sup>+</sup> для ионов в фазе сорбента:



Ионообменная динамическая модель описывает основные особенности профиля внутреннего градиента pH, известные из литературных и экспериментальных данных. Так, например, нередко наблюдаемое «аномальное» увеличение pH (выше pH стартового раствора) на начальном участке градиента pH [4, 6, 7, 11–13] объясняется в рамках предложенной модели либо наличием в элюенте слабого основания, либо достаточно высокой ионной силой элюента по сравнению со стартовым раствором [14]. При pH стартового раствора 6,0–7,5 и ионной силе 10<sup>-3</sup> аминогруппы сорбента протонированы примерно на 50–60% [15]. Поэтому при промывании колонки кислым элюентом (pH ~3,5) происходит сорбция анионов слабых кислот, а также дополнительное протонирование аминогрупп сорбента со связыванием противоиона Cl<sup>-</sup>. Первые порции эфлюента в этом случае содержат либо слабое основание, либо OH<sup>-</sup> в концентрации 10<sup>-6</sup>–10<sup>-7</sup> М, что приводит к увеличению pH. Интересно было бы определить диапазон значений ионной силы обеих подвижных фаз (стартового раствора и элюента), в котором наблюдается увеличение pH на начальном участке градиента. Кроме того, оставалось неясным, возможен ли совместный эффект, обусловленный присутствием слабого основания и сильного электролита в элюенте.

В данной статье рассмотрено образование «аномальных» участков на профиле градиента pH при достаточно высокой ионной силе обеих подвижных фаз, а также при совместном присутствии сильного электролита и слабого основания в элюенте.

### Экспериментальная часть

**Аппаратура.** Работу выполняли в системе ВЭЖХ, состоящей из насоса высокого давления (ОКБА, г. Дзержинск) в составе ионного хроматографа «Eppendorf Biotronik IC-2000» (Германия) или «Altex-110A» (США) и пластмассовой (50×4,6 мм) или стальной (250×4,6 мм) хроматографической колонки для ВЭЖХ, заполненной сорбентом Tetren-SiO<sub>2</sub> на основе Силасорба Si-600 (7,5 мкм) с привитыми группами тетраэтиленпентамина. К выходу колонки присоединяли проточную ячейку для измерения pH [16] (рабочий объем 2 мл), соединенную с перистальтическим насосом низкого давления «Varioperpex-2120» (LKB-Bromma, Швеция) для удаления избытка эфлюента. Для измерения pH эфлюента использовали цифровой pH-метр «TOA Electronics» (Япония) с универсальным электродом GST-5211C со встроенным температурным компенсатором, выходной сигнал регистрировали на самописце «LKB-Bromma» (Швеция).

**Реагенты.** Растворы Трис и шавелевой кислоты готовили по точной навеске сухих препаратов фирмы «Merck» (Германия) квалификации «ч.д.а.» Элюент полибуфер-74 готовили разбавлением 1:16 препарата фирмы Pharmacia (Швеция).

**Методика эксперимента.** Хроматографическую колонку уравнивали стартовым буферным раствором до значения pH, соответствующего начальной точке градиента; затем пропускали буферный элюент, контролируя в потоке pH эфлюента и регистрируя сигнал цифрового pH-метра с помощью самописца. Кислотность стартового раствора подвели добавлением конц. HCl или рассчитанного по программе «Acid-Base Calculator» [17] объема

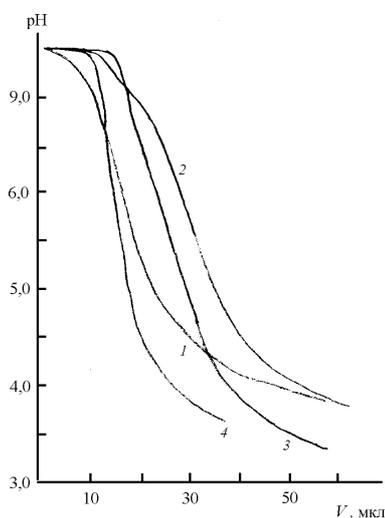


Рис. 1. Градиенты pH, полученные при ионной силе стартового раствора: 1 – 0,02; 2 – 0,5; 3 – 1,0; 4 – 0,1 и ионной силе элюента: 1, 2, 3 – 0; 4 – 0,1 (колонка – Tetren-SiO<sub>2</sub>, 50×4,6 мм; стартовый раствор – 0,0125 М Трис-HCl (pH 7,5); элюент – 1:16 Полибуфер-74 (pH 3,5), 1 мл/мин)

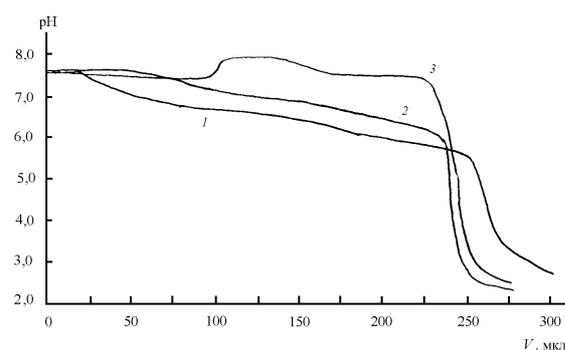


Рис. 2. Влияние ионной силы подвижных фаз на начальный участок градиента pH при ионной силе стартового раствора: 1 – 0,01; 2 – 1,0; 3 – 0,02 и ионной силе элюента: 1, 2 – 0; 3 – 0,5 (колонка – Tetren-SiO<sub>2</sub>, 250×4,6 мм; стартовый раствор – 0,025 М Трис-HCl (pH 7,5); 0,002 М H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (pH 2,9), 1 мл/мин)

20 mM раствора H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, кислотность элюента (в случае H<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) – добавлением рассчитанного объема 20–25 mM раствора Трис. Ионную силу подвижных фаз создавали добавлением 4 М раствора NaCl, в отдельном случае – добавлением KI.

### Результаты и обсуждение

**Сорбент для формирования внутреннего градиента pH.** Анионообменный сорбент Tetren-SiO<sub>2</sub> с привитыми группами тетраэтиленпентамина обладает постоянной буферной емкостью в интервале pH от 4 до 8–9. Молекулы тетраэтиленпентамина могут закрепляться на поверхности кремнезема различными способами (например, за одну или за две концевые аминогруппы), что приводит к варьированности констант протонирования первичных, вторичных и, возможно, третичных аминогрупп и расширяет интервал постоянной буферной емкости [15, 18]. Кислотно-основные взаимодействия привитых аминогрупп с остаточными силанольными группами тоже способствуют более плавному изменению pH в слое сорбента. Кроме того, привитые группы проявляют свойства полиэлектролита. Таким образом, Tetren-SiO<sub>2</sub> наиболее подходит для формирования внутренних градиентов в выбранном интервале pH [9, 10, 18].

**Различие в ионной силе подвижных фаз.** На первом этапе исследовали влияние ионной силы стартового раствора на формирование внутреннего градиента pH. Особое внимание уделяли возникновению «аномальных» начальных участков на профиле градиента pH. В качестве стартового раствора использовали 12,5 М раствор Трис-HCl (pH 7,5–7,6), в качестве буферного элюента – раствор Полибуфера-74 (1:16, pH 3,5), представляющего собой высокомолекулярное полиамфолитное соединение с набором карбоксильных групп, а также первичных и вторичных аминогрупп. Поскольку Полибуфер-74 является достаточно редким и дорогостоящим реагентом, то с целью уменьшения его расхода использовали колонку с малым рабочим объемом (50×4,6 мм). Чтобы получить чистый эффект ионной силы, исключили влияние слабого основания в элюенте.

При ионной силе элюента, равной нулю, и варьировании ионной силы стартового раствора (рис. 1, кривые

Таблица 1

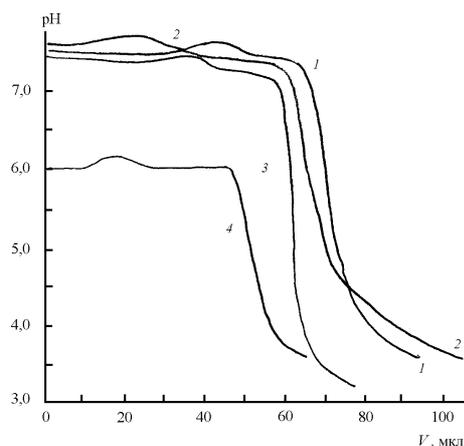


Рис. 3. Влияние слабого основания в элюенте на начальный участок градиента pH при ионной силе стартового раствора: 1 – 0,1; 2 – 1,0; 3, 4 – 0; при pH: 1, 2, 3 – (7,4–7,6); 4 – 6,1. Стартовый раствор – 0,025 М Трис-Н<sub>2</sub>С<sub>2</sub>О<sub>4</sub>; элюент – 0,020 М Н<sub>2</sub>С<sub>2</sub>О<sub>4</sub> – 0,0205 М Трис (pH 3,6, ионная сила ~ 0,02). Остальные условия см. в подписи к рис. 2

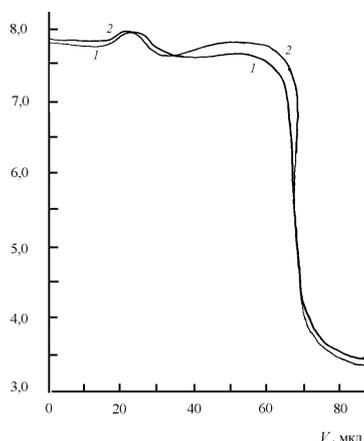


Рис. 4. Одновременное влияние слабого основания и сильного электролита в элюенте при ионной силе: 1 – 0,12, 2 – 0,52 (0,025 М Трис-Н<sub>2</sub>С<sub>2</sub>О<sub>4</sub> (pH 7,7), ионная сила 0,001; элюент: 0,020 М Н<sub>2</sub>С<sub>2</sub>О<sub>4</sub>. Стартовый раствор – 0,025 М Трис (pH 3,5). Остальные условия см. в подписи к рис. 2

1–3) увеличения pH выше значения стартового раствора не наблюдали. Это вполне согласуется с теорией, предложенной нами ранее [14], так как ионная сила элюента ~0. Вместе с тем при высокой ионной силе стартового раствора (0,5–1,0) на начальном участке градиента наблюдали плато; pH в слое сорбента снижался более плавно (рис. 1, кривые 2–3), чем при низкой ионной силе стартового раствора, что связано с изменением констант протонирования аминокрупп сорбента.

При ионной силе 0,1 и различных значениях ионной силы стартового раствора «аномального» повышения pH не наблюдали, затем pH в слое сорбента снижался более резко (рис. 1, кривая 4). Это согласуется с результатами, полученными для Полибуфера-74 при высокой ионной силе [4]. Вероятно, из представленных на рис. 1 градиентов pH для разделения наиболее подходят линейные гра-

Влияние ионной силы подвижных фаз на «аномальное» увеличение pH

Стартовый раствор	Элюент		ΔpH	
Состав	Ионная сила	Состав	Ионная сила	
25 мМ Трис-Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub>	1,0	0,002 М Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub>	0,002	0,0
25 мМ Трис-Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub>	0,1	0,002 М Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub>	0,002	0,0
25 мМ Трис-Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub>	0,1	0,002 М Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub>	0,5	0,10
25 мМ Трис-Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub>	0,02	0,002 М Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub>	0,5	0,35

диенты, сформированные при высокой ионной силе стартового раствора (кривые 2, 3).

В дальнейшем работали с колонкой для ВЭЖХ большего объема (250×4,6), также заполненной сорбентом Tetren-SiO<sub>2</sub>. В качестве стартового раствора использовали Трис-Н<sub>2</sub>С<sub>2</sub>О<sub>4</sub> (25 мМ, pH ~7,5–7,7), кислотность создавали добавлением раствора щавелевой кислоты, чтобы исключить влияние посторонних электролитов (HCl). На данном этапе работы мы перешли от полиамфолитного элюента к раствору слабого протолита (Н<sub>2</sub>С<sub>2</sub>О<sub>4</sub>, 0,002М, pH ~2,9) и исследовали те же эффекты, что и при использовании Полибуфера-74. При ионной силе элюента ~0 и варьировании ионной силы стартового раствора увеличения pH на начальном участке градиента не наблюдали, что хорошо согласуется с теорией (рис. 2, кривые 1, 2). При более высокой ионной силе стартового раствора (1,0) получили более пологий участок градиента до pH 5,9–6,1, однако затем pH в слое сорбента снижался более резко (кривая 2), чем при использовании стартового раствора с ионной силой 0,01. При пропускании через колонку элюента с ионной силой 0,5 получили заметное увеличение pH – до 0,3–0,4 ед. – на начальном участке градиента, а затем наблюдали резкое снижение pH от 7,4 до 3,0 (рис.2, кривая 3). Чем больше разница в ионной силе элюента и стартового раствора, тем значительнее градиент «уходит» в щелочную область pH, что, по всей видимости, обусловлено изменением степени протонирования аминок групп сорбента (табл. 1). Вероятно, для разделения компонентов, элюируемых при pH 7,5–6,0, наиболее подходит градиент, представленный на кривой 2 рис. 2, так как он является наиболее плавным в данном диапазоне.

*Влияние слабого основания.* Выше упоминалось о влиянии слабого основания в элюенте на появление «аномального» подъема на начальном участке градиента pH. При составе элюента 20 мМ Н<sub>2</sub>С<sub>2</sub>О<sub>4</sub> – 20,5 мМ Трис (pH ~3,6) и том же составе стартового раствора было изучено влияние слабого основания на профиль градиента pH (рис. 3, кривые 1, 2). При высокой ионной силе стартового раствора «аномальный» участок на профиле градиента наблюдается несколько раньше (кривая 2). При незначи-

Т а б л и ц а 2

**Влияние слабого основания в элюенте на «аномальное» увеличение pH**

Стартовый раствор		Элюент		ΔрН
Состав	Ионная сила	Состав	Ионная сила	
25 мМ Трис-Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub>	0,1	20 мМ Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub> 20,5 мМ Трис	0,02	0,08
25 мМ Трис- Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub>	1	20 мМ Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub> 20,5 мМ Трис	0,02	0,05
25 мМ Трис- Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub> рН 7,5	~0	20 мМ Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub> 20,5 мМ Трис	0,02	0,08
25 мМ Трис- Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub> рН 6	~0	20 мМ Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub> 20,5 мМ Трис	0,02	0,05
20 мМ гексамин- Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub> рН 6,1	~0	20 мМ Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub> 24мМ гексамин	0,02	0,20

Т а б л и ц а 3

**Одновременное влияние ионной силы и слабого основания в подвижных фазах на увеличение pH**

Стартовый раствор		Элюент		ΔрН
Состав	Ионная сила	Состав	Ионная сила	
25 мМ Трис- Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub>	0,001	20 мМ Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub> 25,5 мМ Трис	0,12	0,16; 0,02
25 мМ Трис- Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub>	0,001	20 мМ Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub> 25,5 мМ Трис	0,52	0,30; 0,20
25 мМ Трис- Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub>	0,01	20 мМ Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub> 25,5 мМ Трис	0,52	0,25; 0,20
25 мМ Трис- Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub>	0,01	20 мМ Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub> 25,5 мМ Трис	0,03	0,02
25 мМ Трис- Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub>	~0	20 мМ Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub> 25,5 мМ Трис	0,03	0,05; 0,08
25 мМ Трис- Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub>	0,01 (NaCl)	20 мМ Н <sub>2</sub> С <sub>2</sub> О <sub>4</sub> 25,5 мМ Трис	0,52 (KI)	0,22; 0,08

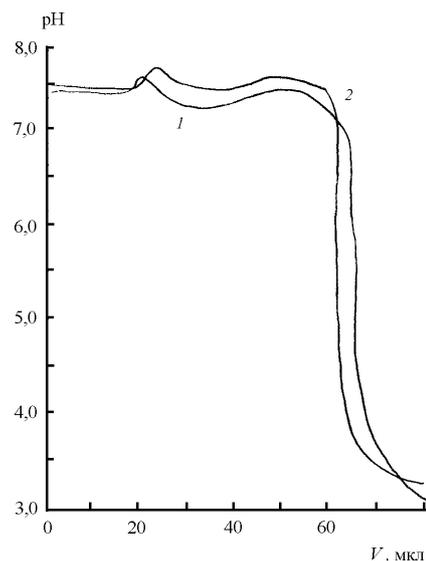


Рис. 5. Образование «аномальных» начальных участков градиента при различной природе электролита в подвижных фазах. СР: 0,025 М Трис-Н<sub>2</sub>С<sub>2</sub>О<sub>4</sub> (рН 7,5), ионная сила 0,01 (NaCl); Э: 0,020 М Н<sub>2</sub>С<sub>2</sub>О<sub>4</sub> – 0,025 М Трис (рН 3,5), ионная сила 0,52; 1 – NaCl; 2 – KI. Остальные условия – см. рис.2

тельной ионной силе стартового раствора и элюента и варьировании pH стартового раствора (рис. 3, кривые 3, 4, табл. 2) наблюдается подъем на начальном участке градиента pH, обусловленный присутствием слабого основания в элюенте (Трис), причем при более высоком значении pH стартового раствора (кривая 3) подъем значительно больше. Это связано с различной степенью протонирования аминогрупп сорбента в зависимости от pH стартового раствора.

Ранее при использовании гексамина (гексаметилентетрамина) в качестве слабого основания, добавленного в элюент, мы наблюдали более выраженное увеличение pH на начальном участке градиента (табл.2, [14]). Вероятно, профиль начального участка градиента pH зависит не только от значения  $pK_a$  слабого основания, но и от строения, а также, возможно, и от сродства к сорбенту.

*Совместное влияние ионной силы и слабого основания.* В следующей серии экспериментов создавали значительную ионную силу (0,12 – 0,52) в элюенте, содержащем слабое основание (20 мМ Н<sub>2</sub>С<sub>2</sub>О<sub>4</sub>–25,5 мМ Трис, рН~3,5), и на несколько порядков меньшую ионную силу (0,001–0,01) в стартовом растворе (табл. 3). Интересно отметить, что увеличение pH, обусловленное высокой ионной силой элюента, и увеличение pH, вызванное наличием в элюенте слабого основания, находятся на разных участках градиента: при значительном различии ионной силы элюента и стартового раствора ( $I_3/I_{cp} \sim 10^2$ ) (рис. 4) помимо «аномального» подъема, обусловленного высокой ионной силой элюента, наблюдается еще один пик, практически одинаковый по форме на обеих кривых. По-видимому, это происходит за счет присутствия в элюенте слабого основания (Трис). Заметим, что при значительном различии в ионной силе элюента и стартового раствора между двумя «аномальными» участками градиента

та наблюдается не плато (кривая 1), а ярко выраженный минимум (кривая 2), т.е. «совместный» эффект электролита и слабого основания усиливается (табл. 3). При сравнимых значениях ионной силы стартового раствора и элюента «аномальный участок» градиента, обусловленный влиянием основания (Трис), тоже заметно сглаживается. Из табл. 3 хорошо видна зависимость величины «аномального» скачка от разницы в ионных силах стартового раствора и элюента.

*Влияние природы электролита в подвижных фазах.* Проверили влияние ионной силы элюента, создаваемой другим электролитом (рис. 5, табл. 3), на «аномальное» повышение рН. Для этого в стартовый раствор для создания ионной силы (0,01) добавляли NaCl, а в элюент – в одном случае NaCl, во втором – KI в одинаковых концентрациях (0,05 М). В обоих случаях на профиле градиента рН наблюдали практически одинаковые участки, обуслов-

ленные влиянием слабого основания в элюенте, и отличные по форме участки, связанные с высокой ионной силой элюента. В случае добавления NaCl в элюент второй «аномальный» участок выражен сильнее (увеличение рН на 0,20 ед.), а ему предшествует явно выраженный минимум (рис. 5, кривая 1). При использовании KI рН эффлюента увеличивается только на 0,08–0,10 ед. (кривая 2). Вероятно, на форму «аномального» участка влияет также подвижность ионов электролита (существенно меньшая в случае Г) и различная сорбируемость аниона на аминогруппах сорбента.

Таким образом, на профиль внутреннего градиента рН можно влиять, добавляя в элюент слабые основания различной природы, а также варьируя ионную силу подвижных фаз и природу электролитов в подвижных фазах.

Авторы выражают глубокую признательность П. Н. Нестеренко за помощь в эксперименте.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хроматофокусирование Полибуфером на ПБИ (*russian translation*). Stockholm-Uppsala, 1981.
2. *Shuyterman L.A.A.E., Kooistra C.* // J. Chromatogr. 1989. **470**. P. 317.
3. *Nesterenko P.N., Ivanov A.V.* // Mendeleev Commun. 1994. № 5. P. 174.
4. *Иванов А.В., Курочкина Е.В., Нестеренко П.Н.* // ЖФХ. 1998. **72**. №6. С. 1129.
5. *Righetti P.G.* Isoelectric focusing: theory, methodology and application. Amsterdam–N.Y.–Oxford, 1983.
6. *Hutchens T.W., Li C.M., Besch P.K.* // J. Chromatogr. 1986. **359**. P. 169.
7. *Murel A., Vilde S., Pank M. et al.* // J.Chromatogr. 1985. **347**. P. 325.
8. *Гармаш А.В., Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н.* // ЖФХ. 1997. **71**. №9. С. 1683.
9. *Гармаш А.В., Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н.* // ЖФХ. 1997. **71**. №10. С. 1872.
10. *Гармаш А.В., Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н.* // ЖФХ. 1997. **71**. №11. С. 2054.
11. *Hutchens T.W., Gibbons W.E., Besch P.K.* // J.Chromatogr. 1984. **297**. P. 283.
12. *Bates R.C., Frey D.D.* //J. Chromatogr.A. 1998. **814**. P. 43.
13. *Narahari C.R., Strong J., Frey D.D.* // J. Chromatogr.A. 1998. **825**. P. 115.
14. *Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н., Гармаш А.В.* // Теория и практика сорбционных процессов. Т. 24. Воронеж, 1999. С. 20.
15. *Кудрявцев Г.В., Лисичкин Г.В.* // Адсорбция и адсорбенты. 1984. №12. С. 33.
16. *Иванов А.В., Тессман А.Б.* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1999. **40**. №4 С. 241.
17. *Тессман А.Б.* / Тез. Межд. конференции «Ломоносов-98». М., 1998. С. 6.
18. *Нестеренко П.Н., Иванов А.В., Галева Н.А., Сеневирагне Дж.Б.Ч.* // ЖАХ. 1997. **52**. №8. С. 814.

Поступила в редакцию 22.06.99