

УДК 543.544

## ФОРМИРОВАНИЕ НИСХОДЯЩИХ ГРАДИЕНТОВ pH ВНУТРИ КАТИОНООБМЕННЫХ КАРБОКСИЛЬНЫХ КОЛОНОК

А.В. Иванов, М.С. Вакштейн, П.Н. Нестеренко

(кафедра аналитической химии)

**Показана возможность формирования нисходящих градиентов pH с использованием техники хроматофокусирования в колонках, заполненных карбоксильными катионообменниками. В качестве элюента, формирующего градиент pH, использован 1:20 раствор Полибуфера-96. Линейность профиля градиента pH в катионообменной системе достигается за счет варьирования ионной силы стартового раствора и элюента.**

Хроматофокусирование – метод ионообменной хроматографии, использующий в качестве инструмента разделения градиент pH, формируемый в слое сорбента внутри колонки. Метод успешно применяют для разделения цвиттер-ионных биологических макромолекул [1–3]. Предложен вариант хроматофокусирования переходных металлов, сочетающий принципы комплексообразовательной хроматографии с формированием нисходящего градиента pH внутри колонки, заполненной сорбентом с привитыми олигоэтиленаминами. В основе этого варианта лежит образование аминных комплексов ионов металлов (например,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ) при начальном значении pH 7,0–7,5 и их последующая диссоциация при линейном снижении pH до 3. Возможности метода продемонстрированы на примере концентрирования и разделения 4–5 ионов металлов из изученного ряда в вариантах хроматографии низкого давления и ВЭЖХ [4, 5]. Однако комплексообразование ионов металлов с олигоэтиленаминами является многоступенчатым процессом с медленной кинетикой [5], в связи с чем целесообразен переход к катионообменным карбоксильным сорбентам. В этом случае, вероятно, удастся расширить круг ионов металлов, разделяемых в условиях формирования нисходящего градиента pH, включив в него щелочноземельные металлы. Отметим, что ранее в хроматофокусировании нисходящие градиенты pH внутри катионообменных колонок не получали.

### Экспериментальная часть

**Реагенты.** В качестве стартового буферного раствора использовали 0,010 М Трис [трис(гидроксиметил)аминометан], приготовленный из сухого препарата квалификации «ч.д.а» фирмы «Serva» (Германия); в качестве элюента – 1:20 Полибуфер-96 (*Polybuffer-96*), приготовленный разбавлением препарата фирмы «Pharmacia» (Швеция). Кислотность растворов создавали добавлением конц. HCl, ионную силу – добавлением рассчитанного количества 2 М раствора NaCl.

**Сорбент.** Использовали катионообменник CM-52 на основе микрогранулированной целлюлозы с карбоксиметильными группами (*Whatman*, Великобритания), рабочий интервал pH 3–10, ионообменная емкость 0,90–1,15 ммоль/г сухого сорбента, плотность упаковки – 0,18 г/мл.

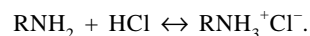
**Аппаратура.** Работу проводили в хроматографической системе низкого давления, состоящей из насоса ХПЖ-1 (г. Дзержинск, Россия), стеклянной хроматографической ко-

лонки K9/30 (300×9 мм), заполненной катионообменным сорбентом CM-52, проточной ячейки для измерения pH [6], цифрового pH-метра «HM20S» фирмы «TOA-Electronics» (Япония) с комбинированным электродом GS-5211C и перистальтического насоса «Multiperplex 2115» («LKB-Bromma», Швеция) для удаления эффлюента из ячейки. Сигнал pH-метра контролировали с помощью самописца LKB (Швеция). Кислотность растворов контролировали на цифровом pH-метре «HM20S».

**Методика эксперимента.** Хроматографическую колонку уравнивали стартовым буферным раствором до pH 7,5, что соответствует начальной точке градиента, затем пропускали буферный элюент при pH 3,0, непрерывно контролируя pH эффлюента. Объемная скорость подвижных фаз составила 0,85 мл/мин.

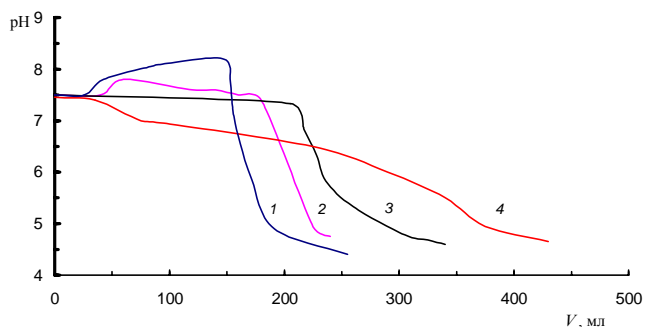
### Обсуждение результатов

**Выбор подвижных фаз** основан на имеющихся у нас данных по нисходящим градиентам pH для анионообменных сорбентов. При формировании нисходящих градиентов в области pH 7,5–3,0 внутри анионообменных колонок в качестве стартовых обычно используют растворы Трис или гистидина. Отметим, что для разделения переходных металлов предпочтительнее уравнивать колонку раствором Трис, поскольку гистидин более склонен к связыванию ионов металлов в комплексы, что осложняет механизм разделения. Поскольку 10 mM раствор Трис имеет pH ~10, то требуется подкислить его конц. HCl до pH 7,5. При этом часть молекул Трис (обозначенного как  $\text{RNH}_2$ ) протонируется, одновременно связывая противоион  $\text{Cl}^-$



В качестве буферного элюента, обеспечивающего плавное снижение pH в анионообменной колонке, в хроматофокусировании традиционно применяют специально синтезированные Полибуфер-74 или Полибуфер -96, представляющие высокомолекулярные соединения с набором первичных и вторичных аминогрупп и карбоксильных групп [2].

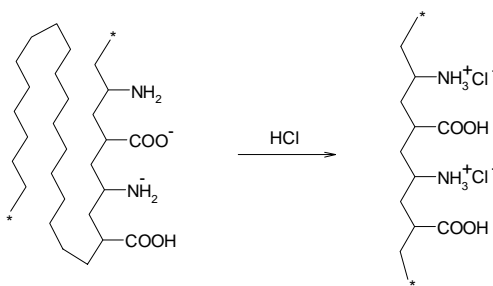
Раствор Полибуфера-96 (1:20) имеет pH 8,0, поэтому для создания оптимальной кислотности элюента необходимо добавление конц. HCl до pH 3. Вероятно, исходно макромолекулы полиамфолитного Полибуфера находятся в свернутом состоянии, а при подкислении конц. HCl приобретают суммарный положительный заряд и в результате разворачиваются в линейную конформацию из-за



Влияние ионной силы стартового раствора и элюента на профиль нисходящего градиента pH в катионообменной системе. Колонка: 300×9мм, CM-52; стартовый раствор: 10 мМ Трис-НСl, pH 7,5,  $I = 0,1$  (1, 4), 0,01 (2), 0,025 (3); элюент: 1:20 Полибуфер-96, pH 3,0,  $I = 0$  (1, 2), 0,025 (3), 0,1 (4), скорость расхода элюента 0,85 мл/мин

С х е м а 1

Процессы, происходящие с макромолекулой



взаимного отталкивания одноименно заряженных звеньев (схема 1). Поскольку ранее было показано, что присутствие сильного электролита (NaCl) в подвижных фазах существенно влияет на профиль градиента pH, формируемого внутри анионообменной колонки, заполненной сорбентом с привитыми олигоэтиленаминами [7, 8], то в настоящей работе исследовали аналогичное влияние сильного электролита в катионообменной системе.

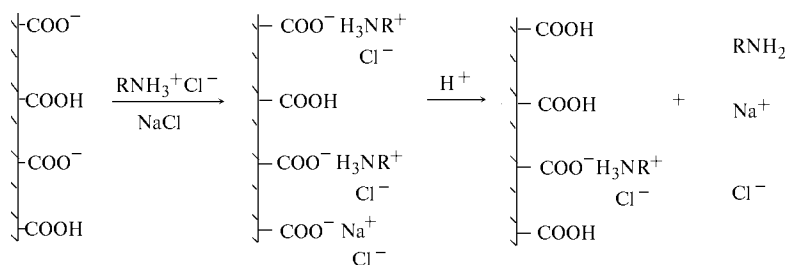
Увеличение концентрации сильного электролита в элюенте приводит к подавлению дополнительного разворачивания макромолекул Полибуфера при pH, сильно отличающемся от изоэлектрической точки (ИЭТ) Полибуфера, вследствие экранирования электростатических взаимодействий и, напротив, к увеличению их разворачивания при значениях pH, близких к ИЭТ [9].

**Формирование градиентов pH. Влияние различия в ионной силе подвижных фаз на профиль градиента pH.** При уравнивании катионообменной карбоксильной колонки 10 мМ раствором Трис-НСl (pH 7,5,  $I = 0,1$ ) возможна частичная сорбция протонированной формы Трис на депротонированных карбоксильных группах катионообменника (схема 2). После уравнивания колонки до pH 7,5 меняли стартовый раствор на элюент – 1:20 Полибуфер-96 (pH 3,0,  $I \sim 0$ ). На профиле градиента (рисунок, кривая 1) сначала наблюдали небольшое плато в области pH 7,5, а затем заметный подъем pH до 8,1–8,2, появление которого можно объяснить тем, что при уменьшении ионной силы раствора условные константы диссоциации карбоксильных групп сорбента уменьшаются, вследствие чего часть групп депротонируется. При этом происходит десорбция нейтральных молекул Трис, приводящая к значительному (до 0,7 ед.) повышению pH эфлюента (схема 2). Затем возможна сорбция положительно заряженных макромолекул Полибуфера-96, сопровождающаяся вытеснением Трис в подвижную фазу, что также способствует повышению pH на выходе из колонки; содержание макромолекул Полибуфера в подвижной фазе при прохождении через колонку снижается до тех пор, пока сорбент не будет насыщен ими. После насыщения карбоксильного катионообменника полиамфолитными макромолекулами pH эфлюента резко снижается от 8,2 до 4,5–4,7. Для разделения методом хроматофокусирования полученный градиент не подходит из-за протяженного начального участка и последующего резкого снижения pH. В хроматофокусировании предпочтительнее получать линейные плавные градиенты pH, поэтому требуется сократить начальный участок, избежать подъема на нем, а участок снижения pH сделать более пологим, протяженным в единицах объема эфлюента.

Уменьшение ионной силы стартового раствора от 0,1 до 0,01 при сохранении остальных условий эксперимента привело к уменьшению подъема pH (до 7,8 по сравнению с 8,2) на начальном участке градиента (рисунок, кривая 2), однако основные особенности профиля сохранились, что также делает этот градиент непригодным для использования в анализе. На следующем этапе эксперимента исследовали влияние ионной силы элюента на профиль градиента pH. При ионной силе стартового раствора и элюента, равной 0,025, подъема на начальном участке градиента pH не наблюдали (рисунок, кривая 3). Это связано, по-видимому, с тем, что условные константы протонирования карбок-

С х е м а 2

Процессы на поверхности сорбента, приводящие к начальному увеличению pH эфлюента



сильных групп сорбента не изменяются и, соответственно, не происходит их допротонирования с вытеснением Трис. Снижение рН (от 7,3 до 4,6) на профиле градиента происходит более плавно, чем при отсутствии сильного электролита в элюенте, однако остается довольно протяженный начальный участок медленного снижения рН от 7,5 до 7,3. Этот градиент также не удовлетворяет требованиям успешного разделения методом хроматофокусирования, но, несомненно, приближается к ним.

Необходимого эффекта удалось добиться при повышении ионной силы подвижных фаз до 0,1 (рисунок, кривая 4). Протяженный начальный участок практически исчез, а участок градиента со снижением рН от 7,5 до 4,5 стал гораздо более плавным, протяженным в единицах объема эфлюента.

При высокой ионной силе элюента большая концентрация ионов  $\text{Na}^+$  приводит к уменьшению сорбции Полибуфера за счет конкуренции в ионном обмене, кроме

того, в присутствии сильного электролита макромолекулы Полибуфера приобретают свернутую конформацию, что также снижает их способность сорбироваться на карбоксильных группах сорбента. В результате Полибуфер-96 при прохождении через колонку практически полностью остается в подвижной фазе. Протонирование катионообменника протекает медленно, что хорошо согласуется с полученным градиентом.

Таким образом, впервые получены нисходящие градиенты рН внутри катионообменных карбоксильных колонок при использовании Полибуфера в качестве элюента. Наиболее плавный линейный градиент в такой катионообменной системе может быть получен при достаточной высокой (~0,1) концентрации электролита, одинаковой в стартовом растворе и элюенте. В дальнейшем планируется исследовать возможность использования растворов слабых органических кислот в качестве элюентов в катионообменных системах.

Работа выполнена при финансовой поддержке ИНТАС, грант № 00-00782.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shuyterman L.A. A.E., Elgersma O.* // J.Chromatogr. 1978. **150**. P. 17.
2. Хроматофокусирование Полибуфером на ПБИ (russian translation). Stockholm-Uppsala, 1981.
3. *Shuyterman L.A.A.E., Kooistra C.* // J.Chromatogr. 1989. **470**. P. 317.
4. *Nesterenko P.N., Ivanov A.V.* // Mendeleev Commun. 1994. №5. P. 174.
5. *Иванов А.В.* Хроматофокусирование переходных металлов. Дис ... канд. хим. наук. М., 1997.
6. *Иванов А.В., Тессман А.Б.* // Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия. 1999. **40**. №4. С. 241.
7. *Тессман А.Б., Иванов А.В., Вакиштейн М.С., Нестеренко П.Н.* // ЖФХ. 2001. **75**. №2. С. 342.
8. *Иванов А.В., Тессман А.Б., Нестеренко П.Н. и др.* // Вестн. Моск. ун-та. Серия 2. Химия. 2001. **42**. №2. С. 109.
9. *Tanford C.* Physical chemistry of macromolecules. N.Y., 1961.

Поступила в редакцию 31.01.02