

УДК 543.544

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КАРБОНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ НИСХОДЯЩИХ ГРАДИЕНТОВ pH ВНУТРИ КОЛОНКИ, ЗАПОЛНЕННОЙ СВЕРХСШИТЫМ ПОЛИСТИРОЛОМ С КАРБОКСИЛЬНЫМИ ГРУППАМИ

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

(кафедра аналитической химии; e-mail: sandro@analyt.chem.msu.ru)

Для формирования нисходящих градиентов pH внутри катионообменной колонки, заполненной сверхсшитым полистиролом с привитыми карбоксильными группами, применили технику хроматофокусирования. Колонку предварительно уравнивали стартовым буферным раствором (10 мМ Трис-HCl). Показана возможность формирования градиентов pH с использованием однокомпонентных элюентов на основе карбоновых кислот. Добавление NaCl в стартовый раствор и элюент позволяет получить квази-линейные градиенты pH в интервале 7,5–3,5.

Большинство работ в области хроматофокусирования посвящено формированию нисходящих градиентов внутри аминофункциональных анионообменных колонок, что связано с практическим применением хроматофокусирования для разделения белков и других биполярных соединений по анионообменному механизму [1–3]. В одном из современных вариантов концентрирования и разделения – хроматофокусировании переходных металлов – используют образование комплексов с аминогруппами сорбента и последующее разрушение в условиях нисходящего градиента pH [4, 5]. В литературе имеются отрывочные сведения о формировании восходящих градиентов pH внутри катионообменных карбоксильных колонок, но эти работы носят преимущественно теоретический характер [1, 6, 7]. С точки зрения применения техники хроматофокусирования для разделения ионов металлов, карбоксильные колонки представляют несомненный интерес, поскольку в этом случае комплексы на поверхности сорбента образуются в одну стадию (в отличие от образования комплексов с аминогруппами). Кроме того, карбоксильные сорбенты позволяют концентрировать и разделять не только ионы переходных металлов по механизму комплексообразования, но и ионы щелочноземельных металлов за счет катионного обмена. В предыдущей статье [8] мы показали возможность формирования нисходящих градиентов pH в системе низкого давления внутри препаративной колонки, заполненной карбоксильным катионообменником CM-52 на основе микрогранулированной целлюлозы. В качестве элюента, формирующего градиент pH, использовали макромолекулярный Полибуфер-96, выпускаемый специ-

ально для хроматофокусирования [9]. Применение Полибуфера ограничено его высокой стоимостью и способностью к разложению под действием бактерий, а в хроматофокусировании металлов – и неоднозначностью комплексообразования с ионами металлов [5], в связи с чем целесообразно заменить Полибуфер более простыми, однокомпонентными элюентами на основе карбоновых кислот. Применение растворов карбоновых кислот в качестве элюентов для формирования нисходящих градиентов pH внутри анионообменных колонок описано в статьях [10–12].

Данная работа посвящена формированию нисходящих градиентов pH внутри катионообменной карбоксильной колонки при использовании однокомпонентных элюентов.

Экспериментальная часть

Реагенты. В качестве стартового буферного раствора использовали 10 мМ Трис [трис(гидроксиметил)аминометан], приготовленный из сухого препарата квалификации “ч.д.а.” (“Serva”, Германия); в качестве элюента применяли 0,05–5 мМ растворы уксусной, щавелевой, винной, лимонной и глутаминовой кислот, приготовленные из препаратов квалификации “ч.д.а.” (“Reaxim”, Россия; “Merck”, Германия). Кислотность стартового раствора регулировали добавлением конц. HCl, ионную силу – добавлением рассчитанного количества 2 М раствора NaCl. В связи с высокой гидрофобностью поверхности сорбента в подвижные фазы добавляли CH₃CN (5 об.%).

Сорбент. Катионообменник на основе сверхсшитого полистирола MN с карбоксильными группами (Purolite, Великобритания), диаметр частиц 5 мкм,

pH-интервал гидролитической стабильности 1–14, ионообменная емкость по H^+ 0,90–1,15 ммоль/г сухого сорбента, плотность упаковки 0,18 г/мл.

Аппаратура. Хроматографическая система включала насос высокого давления “Beckman-114 M” (США), пластмассовую хроматографическую колонку (50×4,6 мм), заполненную катионообменным сорбентом, проточную ячейку для измерения pH, цифровой pH-метр HM20S (TOA-Electronics, Япония) с комбинированным электродом GS-5211C и перистальтический насос “Multi-perplex 2115” (LKB-Bromma, Швеция) для удаления эффлюента из ячейки. Сигнал pH-метра контролировали с помощью самописца “LKB” (Швеция).

Методика эксперимента. Хроматографическую колонку уравнивали стартовым буферным раствором до pH 7,5, что соответствует начальной точке градиента, затем пропускали буферный элюент, непрерывно контролируя pH эффлюента. Объемная скорость расхода подвижных фаз составила 0,9 мл/мин.

Обсуждение результатов

Сорбент. Принципиальная возможность создания нисходящего градиента pH в препаративной катионообменной карбоксильной колонке была продемонстрирована в хроматографической системе низкого давления [8]. Используемый на этом этапе работы сорбент CM-52 на основе микрогранулированной целлюлозы неприменим в хроматографических системах с высоким давлением вследствие низкой механической устойчивости частиц и значительной набухаемости в растворителях. В связи с переходом к системе высокого давления мы решили использовать сорбент MN на основе сверхсшитого полистирола (ССПС) с привитыми карбоксильными группами. Сорбенты на основе ССПС, благодаря жесткости матрицы, обладают повышенной механической устойчивостью, что позволяет проводить разделение при более высоком давлении. За счет высокой регулярности частиц такие сорбенты сохраняют геометрические параметры структуры в водных и органических подвижных фазах, так как чем в меньшей степени сорбент набухает в процессе разделения, тем большей эффективности разделения можно достигнуть. Сорбенты на основе ССПС обладают стабильными свойствами в интервале pH от 1 до 14, что обуславливает их расширяющееся применение в адсорбционной и ионной хроматографии [13]. Тем не менее литературные данные по использованию таких сорбентов для градиентного pH элюирования отсутствуют, ранее ионообменные сорбенты на основе ССПС использовали в хроматографии только в изократическом режиме элюирования [14]. К недостаткам

сорбента можно отнести частичную гидрофобность поверхности, для преодоления которой требуется добавление органического модификатора (например, ацетонитрила) в стартовый раствор и элюент.

Выбор компонентов элюента. В качестве элюентов, формирующих градиент pH внутри колонки, были выбраны растворы карбоновых кислот с увеличивающимся числом карбоксильных групп – уксусной (pK_a 4,76), щавелевой (pK_a 1,25 и 4,27), винной (pK_a 2,98 и 4,34) и лимонной (pK_a 3,10, 4,76 и 6,40). Концентрации кислот варьировали в интервале от 0,2 (в отдельных случаях от 0,05) до 5 мМ. Для всех изученных кислот профиль нисходящего градиента pH можно разделить на несколько характерных участков: начальный участок с постоянным значением pH (соответствующим pH стартового раствора), участок с увеличением pH выше pH стартового раствора и участок с практически линейным снижением pH до значения элюента (рис. 1, а).

При уменьшении концентрации уксусной кислоты от 5 до 0,2 мМ наблюдается увеличение подъема на начальном участке градиента на 0,75 ед. pH (таблица), при этом протяженность этого участка увеличивается более, чем в 10 раз. Стоит отметить, что отрезок градиента до появления подъема pH имеет одинаковую протяженность во всех случаях (рис. 1, а–в), что объясняется первоначальным вытеснением Трис из колонки элюентом. Затем в эффлюенте появляются ацетат-ионы, что и приводит к появлению подъема на профиле градиента. Сорбент, являясь более сильным основанием, чем элюент, забирает протоны у уксусной кислоты, причем чем ниже концентрация кислоты, тем меньшей буферной емкостью обладает раствор элюента, а следовательно, проще депротонируется. Отсюда становится понятным увеличение подъема pH при переходе к более разбавленным кислотам в элюенте. Увеличение же протяженности участка градиента с подъемом pH связано с тем, что на дополнительное протонирование сорбента требуется все большее количество элюента при более сильном разбавлении. Кроме того, при уменьшении концентрации кислоты, например винной, от 5 до 0,2 наблюдали (рис. 1, б; таблица) увеличение протяженности, следовательно, пологости всего градиента pH. На общую протяженность и наклон градиента влияют два фактора: уменьшение концентрации кислоты в элюенте и снижение ионной силы элюента при его разбавлении. Ионную силу элюента рассчитывали с помощью программы “Acid-Base Calculator” [15].

Рассмотрим возможный механизм этого процесса. При уравнивании колонки стартовым буферным раствором на поверхности сорбента удерживается

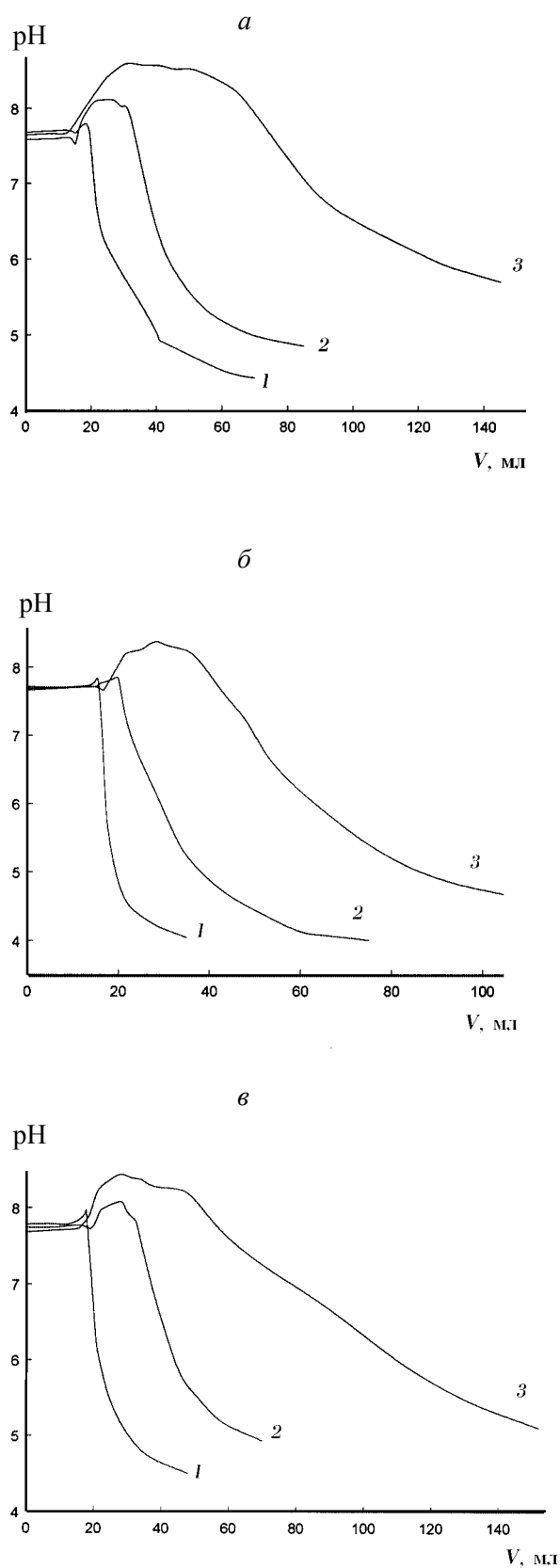


Рис. 1. Влияние концентрации: *a* – уксусной, *б* – винной, *в* – глутаминовой кислоты в составе элюента на профиль внутреннего нисходящего градиента pH в катионообменной системе (колонка 50×4,6 мм, ССПС с привитыми карбоксильными группами; СР 10 мМ Трис – HCl, pH 7,5; элюент, мМ: 5 (1), 1 (2), 0,2 (3))

протонированный Трис. При пропускании элюента с меньшей ионной силой, чем в стартовом растворе, сначала происходит дополнительное протонирование карбоксильных групп сорбента, в результате из колонки выходит анион кислоты (в данном случае тартрат-ион), который, видимо, и приводит к повышению pH эфлюента. Чем больше разница в ионной силе, тем выше степень дополнительного протонирования сорбента, следовательно, из колонки выходит большее количество анионов кислоты. Этот процесс протекает тем дольше, чем ниже концентрация кислоты в эфлюенте, что объясняет увеличение протяженности начального участка на приведенных кривых (рис. 1, *a–в*).

Далее начинается постепенное вытеснение кислотой протонированного Трис. Продолжительность этого процесса напрямую связана с концентрацией кислоты. В случае разбавленных растворов (рис. 1, кривые 2, 3) градиенты получаются наиболее пологие, но зато увеличивается время достижения конечной точки градиента. Аналогичную зависимость наблюдали для щавелевой и лимонной кислот, причем наиболее сильно рассмотренные эффекты проявились при переходе к 0,05 мМ растворам (таблица).

Другим возможным способом получения линейных градиентов является использование растворов аминокислот в качестве буферных элюентов. Так, например, глутаминовая кислота имеет константы ионизации (pK_{a1} 2,19, pK_{a2} 4,25, $pK_a(NH_2)$ 9,67), равномерно распределенные в интервале формирования градиента pH [16]. Для глутаминовой кислоты наблюдали те же закономерности, что и для карбоновых кислот. Градиенты pH получились более пологие за счет того, что глутаминовая кислота слабее щавелевой, а также за счет присутствия первичной аминогруппы в ее молекуле (рис. 1, *в*). Как видно из рисунка, уже при концентрации кислоты 0,2 мМ получается достаточно плавный градиент pH. Характерно, что для более слабой кислоты подъем на начальном участке градиента выражен сильнее.

Влияние природы кислоты при одинаковой концентрации. Если сравнивать градиенты, полученные с разными кислотами при их одинаковой концентрации (рис. 2), то следует обратить внимание на некоторые особенности профиля градиента: а) протяженность начального участка градиента pH, б) величину подъема pH на начальном участке, в) наклон градиента pH.

Протяженность начального участка до появления подъема pH выше этого показателя для стартового раствора у всех кислот одинакова. Это связано с тем,

Влияние состава элюента на характерные участки градиента рН

Элюент (кислота, концентрация)	рН элюента	Ионная сила элюента	Подъем, ед. рН	Протяженность начального участка, мл
Уксусная, 5 мМ	3,55	<0,001	0,10	4
Уксусная, 1 мМ	3,92	~0	0,50	17
Уксусная, 0,2 мМ	4,30	~0	0,85	60
Щавелевая, 5 мМ	2,35	0,005	0,15	2
Щавелевая, 1 мМ	3,00	0,001	0,30	10
Щавелевая, 0,2 мМ	3,63	<0,001	0,40	27
Щавелевая, 0,05 мМ	4,15	~0	0,75	57
Винная, 5 мМ	2,73	0,002	0,10	4
Винная, 1 мМ	3,18	<0,001	0,20	7
Винная, 0,2 мМ	3,70	~0	0,70	25
Лимонная, 5 мМ	2,80	0,002	0,10	2
Лимонная, 1 мМ	3,23	<0,001	0,30	9
Лимонная, 0,2 мМ	3,75	~0	0,80	38
Лимонная, 0,2 мМ	3,92	0,01 (NaCl) (а)	0,05	13
Лимонная, 0,2 мМ	3,97	0,1 (NaCl) (б)	0,02	7
Лимонная, 0,05 мМ	4,25	~0	1,00	65
Глутаминовая, 5 мМ	3,42	0,005	0,10	5
Глутаминовая, 1 мМ	3,70	0,001	0,35	13
Глутаминовая, 0,2 мМ	4,10	<0,001	0,70	43

Примечание. Ионная сила стартового раствора: а – 0,01 (NaCl), б – 0,1 (NaCl).

что сначала происходит вымывание стартового раствора из пор сорбента. Затем в эфлюенте появляются анионы кислоты, которые и приводят к увеличению рН. Величина и протяженность подъема на начальном участке градиента рН довольно хорошо коррели-

рует с силой кислот, используемых в качестве элюентов. Так, в ряду от щавелевой до уксусной кислот происходит постепенное увеличение подъема (в единицах рН), а также протяженности этого участка (рис. 2). Вероятно, это можно объяснить как увели-

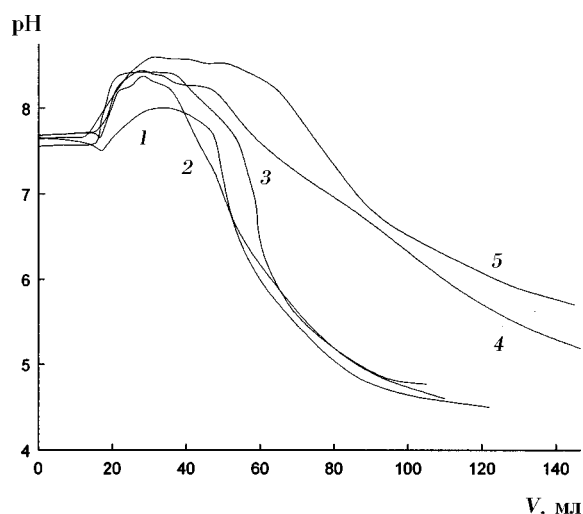


Рис. 2. Нисходящие градиенты pH при использовании 1 мМ растворов кислот: 1 – щавелевой, 2 – винной, 3 – лимонной, 4 – глутаминовой, 5 – уксусной в качестве элюентов (остальные условия представлены в подписи к рис. 1)

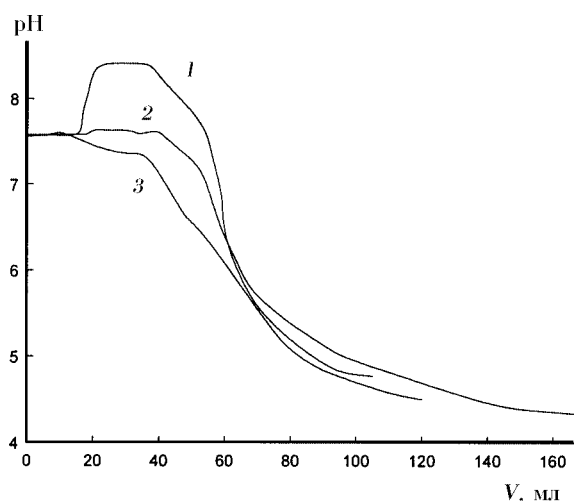


Рис. 3. Влияние ионной силы подвижных фаз на профиль градиента: 1 – 0, 2 – 0,01, 3 – 0,1; элюент 0,2 мМ раствор лимонной кислоты (остальные условия представлены в подписи к рис. 1)

чением в этом ряду силы сопряженного основания, так и уменьшением собственного значения pH кислот при их одинаковой концентрации. Стоит отметить, что ионная сила кислот в этом ряду уменьшается, т.е. для уксусной кислоты разница в ионной силе по сравнению со стартовым раствором максимальна. Таким образом, в случае с уксусной кислотой происходит наибольшее дополнительное протонирование сорбента. Если учесть самое низкое собственное значение pH раствора для этой кислоты,

то можно предсказать, что подъем pH на профиле градиента будет самым продолжительным. Эти предположения хорошо согласуются с экспериментальными данными (рис. 2).

Осталась нерассмотренной последняя из особенностей градиента pH – его наклон. Наклон будет определяться несколькими факторами. Известно, что чем сильнее кислота, тем более резкое падение pH наблюдается при титровании, причем это сохраняется и для гетерогенных систем, например сорбентов. На рис. 2 показано, что присутствие более сильных кислот в элюенте приводит к более резкому снижению pH на профиле градиента. На наклон квази-линейного участка градиента pH оказывает влияние также буферная емкость элюента. Если сравнить градиенты, полученные для глутаминовой и уксусной кислот (рис. 2, кривые 4, 5), видно, что, хотя уксусная кислота слабее, для нее градиент не такой пологий, как для глутаминовой. Аминокислота обладает большей буферной емкостью, чем уксусная.

Влияние ионной силы элюента на профиль градиента pH. Когда стартовый раствор обладает более высокой ионной силой, чем элюент, то на начальном участке градиента pH значение подъема выше, чем значение pH стартового раствора. Этого эффекта можно избежать, повышая ионную силу элюента. Так, при относительно высокой ионной силе элюента и стартового раствора (рис. 3, кривая 3, таблица) удастся получить достаточно плавный градиент pH без подъема на начальном участке, зато с более протяженным квази-линейным участком. Вероятно, при увеличении ионной силы в подвижных фазах карбоксильные группы катионообменника частично депротонируются, в результате чего не происходит повышения pH в первых порциях эфлюента. Вероятно, увеличивается также буферная емкость сорбента за счет улучшения соотношения незаряженных групп к заряженным. Как мы уже отмечали ранее [11, 12], с помощью изменения ионной силы подвижной фазы можно влиять на профиль градиента pH.

Таким образом, впервые были получены нисходящие градиенты pH на катионообменном сорбенте на основе ССПС с привитыми карбоксильными группами. Выделены общие закономерности формирования градиента pH при использовании слабых карбоновых кислот в качестве элюентов. В дальнейшем предполагается более подробно исследовать влияние ионной силы элюента на профиль нисходящего градиента pH в катионообменной системе и промоделировать это влияние.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sluyterman L.A.A., Wijdenes J.* // J.Chromatogr. 1978. **150**. P. 31.
2. *Hutchens T.W., Li C.M., Besch P.K.* // J.Chromatogr. 1986. **359**. P. 169.
3. *Sluyterman L.A.A., Kooistra C.* // J.Chromatogr. 1989. **470**. P. 317.
4. *Нестеренко П.Н., Иванов А.В.* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1993. **32**. С. 574.
5. *Nesterenko P.N., Ivanov A.V.* // J. Chromatogr. 1994. **671**. P. 95.
6. *Hearn M.T., Lyttle D.J.* // J. Chromatogr. 1981. **218**. P. 483.
7. *Salamoun J., Slais K.* // J. Chromatogr. 1990. **522**. P. 205.
8. *Иванов А.В., Вакиштейн М.С., Нестеренко П.Н.* // ЖФХ. 2003. **77**. №1. С. 137.
9. Хроматофокусирование Полибуфером на ПБИ (russian transl.). Stockholm-Uppsala: Pharmacia, 1981.
10. *Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н., Гармаш А.В.* // ЖФХ. 1999. **73**. №8. С. 1476.
11. *Тессман А.Б., Иванов А.В., Вакиштейн М.С., Нестеренко П.Н.* // ЖФХ. 2001. **75**. №2. С. 342.
12. *Иванов А.В., Тессман А.Б., Нестеренко П.Н. и др.* // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2001. **42**. С. 109.
13. *Пеннер Н.А.* Дис. ... канд. хим. наук. М., 2000.
14. *Нестеренко П.Н., Кебец П.А., Волгин Ю.В.* // ЖАХ. 2001. **56**. №8. С. 801.
15. *Тессман А.Б., Иванов А.В.* // ЖАХ. 2002. **57**. №1. С. 6.
16. *Snow J.T.* Peptides. Derivatized amino acids. N.Y., 1988.

Поступила в редакцию 28.03.03

APPLICATION OF CARBONIC ACIDS FOR THE DESCENDING pH GRADIENT FORMATION IN THE COLUMN FILLED WITH HYPER CROSS-LINKED POLYSTERENE WITH ATTACHED CARBOXYLIC GROUPS

M.S. Vakstein, A.V. Ivanov, P.N. Nesterenko, E.M. Khasanova

(Division of Analytical Chemistry; e-mail: sandro@analyt.chem.msu.ru)

For descending pH gradient formation in the cation-exchange column, filled with hyper cross-linked polysterene with attached carboxylic groups, the chromatofocusing technique has been applied. The column was presaturated by start buffer solution (10 mM Tris-HCl). The possibility of pH gradients formation by using of single-component eluents, based on carbonic acids, has been shown. The addition of NaCl to the start buffer and in the eluent allows to form quasi-linear pH gradient in range 7,5–3,5.