

УДК 543.544

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОФИЛЯ ГРАДИЕНТА pH ВНУТРИ КАРБОКСИЛЬНЫХ КОЛОНОК ЗА СЧЕТ ИОННОЙ СИЛЫ ПОДВИЖНЫХ ФАЗ

А.В. Иванов, М.С. Вакштейн, Е.М. Хасанова

(кафедра аналитической химии)

Ионная сила стартового раствора и элюента существенно влияет на профиль нисходящего градиента pH внутри карбоксильных колонок. С помощью правильного выбора ионной силы подвижных фаз можно оптимизировать градиент pH заданной формы. Показано применение однокомпонентных элюентов в сочетании с высокой ионной силой подвижных фаз для формирования линейных градиентов pH в катионообменных системах.

С момента создания хроматофокусирования – метода концентрирования и разделения биполярных соединений по их изоэлектрическим точкам (pI) – прошло около 25 лет. В настоящее время это хорошо разработанный вариант ионообменной хроматографии с внутриколоночным линейным градиентом pH, часто используемый в биохимическом анализе, при препаративном фракционировании ферментов или белков, при контроле качества ферментативных лекарственных препаратов [1–3]. Градиент pH формируется внутри хроматографической колонки за счет кислотно-основных и ионообменных взаимодействий функциональных групп сорбента, уравновешенного при одном значении pH, и буферного элюента при отличающемся значении pH [1, 2]. В слабоосновных анионообменных колонках получают нисходящий, а в слабокислотных катионообменных колонках, как правило, восходящий градиент pH [2, 4]. Недавно была показана возможность формирования нисходящего градиента pH внутри колонки, заполненной карбоксильным катионообменником [5]. Наилучшее разделение биполярных соединений с близкими значениями pI, отличающимися на 0,05–0,1 ед. pH, достигается при плавном линейном градиенте в широком диапазоне pH (при максимально протяженном в интервале pH и единицах объема эфлюента), для чего в качестве элюентов используют либо специально синтезированные полиамфолиты [2], либо буферные смеси, составленные из слабых органических протолитов (до 20–30 компонентов) [6]. В последнее время стремятся использовать более простые (трех-пятикомпонентные) элюенты для получения линейных внутренних градиентов pH, выбирая компоненты элюента и их концентрации как эмпирически, так и на основе модельных представлений [3, 7–9]. Однако и при мо-

делировании, и при эмпирическом подходе большинство исследователей не уделяют внимания составу и свойствам стартового раствора, а следовательно, и не рассматривают его параметры при оптимизации профиля градиента pH. В предыдущих работах [10, 11] мы показали, что в анионообменной системе ионная сила стартового раствора существенно влияет на профиль градиента pH. Так, удается получить градиент, линейный от 7,5 до 5 ед. pH, при использовании однокомпонентного элюента (2 мМ раствор $H_2C_2O_4$) в сочетании с высокой ионной силой (~0,1) стартового раствора. Полученный подход применяли для разделения модельных смесей белков с близкими значениями pI [11].

Данная статья посвящена оптимизации профиля нисходящего градиента pH, формируемого внутри катионообменных карбоксильных колонок.

Экспериментальная часть

Аппаратура. Использовали хроматографические системы, состоящие из изократического насоса высокого давления ХПЖ-1 (Россия, Дзержинск) или “Beckman-114M” (США), стеклянной хроматографической колонки K9/30, заполненной сорбентом CM-52 (табл. 1) или пластмассовой колонки (50×4,6 мм), заполненной сорбентами MN или MacroPrep 50 CM, проточной ячейки для измерения pH, цифрового pH-метра “TOA Electronics-HM-20S” (Япония) с комбинированным электродом GST-5211C, и перистальтического насоса низкого давления “Varioperpex-2120” (“LKB-Bromma”, Швеция) для удаления эфлюента из ячейки. Хроматографическую колонку уравновешивали стартовым раствором до pH 7,5 (начальная точка градиента), затем пропускали элюент при pH 3,0–3,6 (конечная точка градиента). Кислотность

Т а б л и ц а 1

Свойства используемых карбоксильных сорбентов

Сорбент*	СМ-52 (300×9)	MN (50×4,6)	Macro-Prep 50 CM
Производитель	Whatman (GBR)	Purolite (GBR)	Biorad (USA)
Матрица	микрогранулированная целлюлоза	ССПС	ПММА
Функциональные группы	-CH ₂ COOH	-COOH	-CH ₂ COOH
Размер частиц, мкм	100–200	5	50
pH-Диапазон гидролитической стабильности	3–10	1–14	3–13
Ионообменная емкость	0,95–1,15 ммоль/г сухого сорбента	нет данных	0,21±0,04 ммоль/мл геля

* В скобках указан размер колонки (мм).

эффлюента контролировали в проточной ячейке и регистрировали сигнал цифрового pH-метра с помощью самописца “LKB-Bromma” (Швеция), в отдельных случаях – через АЦП с помощью компьютера Pentium-75 с установленной DOS-программой “Экохром”.

Реагенты. В качестве стартовых растворов использовали 10 мМ раствор Трис-НСl или 10 мМ фосфатный буферный раствор (pH ~7,5); в качестве элюентов – раствор Полибуфера-96 (1:20) (“Pharmacia”, Швеция) или 0,2–1 мМ растворы лимонной кислоты. Ионную силу стартового раствора и элюента создавали добавлением рассчитанного количества 2 М раствора NaCl, кислотность стартового раствора и Полибуфера – добавлением конц. HCl. Все растворы готовили из препаратов фирмы “Merck” (Германия) или “Реахим” (Россия) квалификации “ч.д.а.”. Использовали сорбенты СМ-52 на основе микрогранулированной карбоксиметилцеллюлозы, MN на основе сверхсшитого полистирола с закрепленными карбоксильными группами и MacroPrep 50 CM на основе полиметилметакрилата с карбоксиметильными группами (табл. 1). Сорбент MN был любезно предоставлен К.О. Сочилиной, сорбент MacroPrep 50 CM – докт. хим. наук П.Н. Нестеренко.

Обсуждение результатов

Влияние ионной силы при формировании градиента pH полиамфолитным элюентом. В качестве буферного элюента, обеспечивающего плавное снижение pH в слабоосновных анионообменных колонках, в хроматофокусировании традиционно применяют специально синтезированные Полибуферы, представляющие высокомолекулярные соединения с набором первичных и вторичных аминогрупп, а также карбоксильных групп [2]. Для предварительных экспериментов на колонке, заполненной сорбентом СМ-52, мы также выбрали Полибуфер-96 (табл. 2). Раствор Полибуфера-96 (1:20) имеет pH 8,0, поэтому для создания требуемой кислотности элюента (pH 3) необходимо добавление конц. HCl, что способствует разворачиванию макромолекул в составе элюента в линейную конформацию из-за взаимного отталкивания одноименно заряженных звеньев и приобретения суммарного положительного заряда [5]. При уравнивании катионообменной колонки 10 мМ стартовым раствором Трис-НСl (pH 7,5; $I = 0,1$) возможна частичная сорбция протонированной формы Трис на диссоциированных карбоксильных группах катионообменника. В случае формирования градиента pH раствором Полибуфера-96 при ионной силе ~0 на

профиле градиента сначала наблюдали небольшое плато в области pH 7,5, а затем заметный подъем pH до 8,1–8,2 (рис. 1, кривая 1; табл. 2). Снижение ионной силы подвижной фазы вызывает уменьшение условных констант диссоциации карбоксильных групп сорбента, вследствие чего часть групп диссоциирует. В результате десорбируются нейтральные молекулы Трис, что приводит к значительному (до 0,7 ед.) повышению pH эффлюента. В то же время возможна сорбция положительно заряженных макромолекул Полибуфера-96, сопровождающаяся вытеснением Трис из фазы сорбента, что также способствует повышению pH на выходе из колонки. Содержание макромолекул Полибуфера в элюенте при прохождении через колонку снижается до тех пор, пока сорбент не будет насыщен ими. При $I \approx 0$ насыщение достигается быстро, поскольку макромолекулы находятся в развернутой конформации. Тогда карбоксиль-

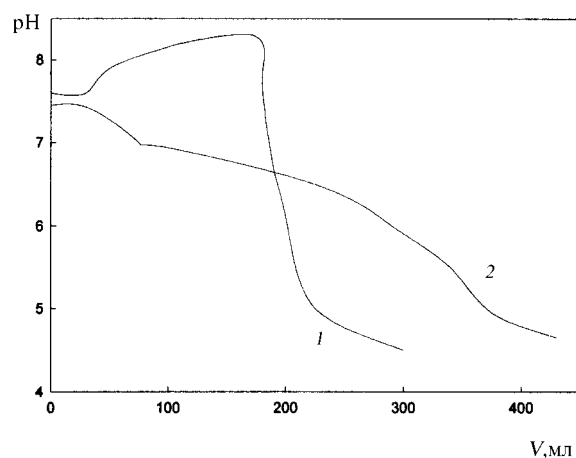


Рис. 1. Влияние ионной силы стартового раствора при формировании градиента pH полиамфолитным элюентом (колонка: 300×9 мм, CM-52; стартовый раствор: 10 мМ Трис-НСl или 10 мМ фосфатный буферный раствор, pH 7,50, $I = 0,1$; элюент: 1:20 Полибуфер-96, pH 3,00, $I = 0$ (1), 0,1 (2); 0,85 мл/мин

Т а б л и ц а 2

Влияние ионной силы элюента на характерные участки градиента pH

Сорбент, колонка	Стартовый раствор (pH, I)	Элюент	Подъем, ед. pH	Протяженность участка с подъемом, мл
CM-52, 300×9 мм	10 мМ Трис-НСl (pH 7,50, $I = 0,1$)	1:20 Полибуфер (pH 3,00, $I \sim 0$)	0,70	~150
	тот же	тот же ($I \sim 0,1$)	0	–
	10 мМ фосфатный буферный раствор (pH 7,50, $I = 0,1$)	1:20 Полибуфер (pH 3,00, $I \sim 0$)	0,70	~150
	тот же	тот же ($I \sim 0,1$)	0	–
MN, 50×4,6 мм	10 мМ Трис-НСl (pH 7,50, $I \sim 0$)	0,2 мМ лимонная кислота (pH 3,75, $I \sim 0$)	0,80	38
	тот же ($I = 0,01$)	0,2 мМ лимонная кислота (pH 3,92, $I = 0,01$)	0,05	13
	тот же ($I = 0,1$)	0,2 мМ лимонная кислота (pH 3,97, $I = 0,1$)	0,02	7
MacroPrep 50 CM, 50×4,6 мм	тот же ($I = 0,01$)	1 мМ лимонная кислота (pH 3,25, $I = 0,01$)	0,03	10
	тот же ($I = 0,1$)	0,5 мМ лимонная кислота (pH 3,47, $I = 0,1$)	0	–

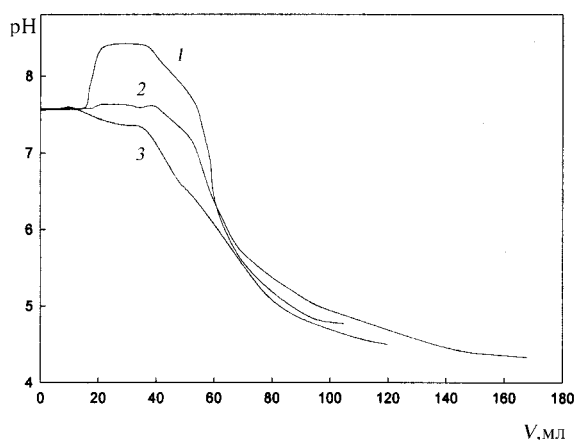


Рис. 2. Влияние ионной силы стартового раствора при формировании градиента pH однокомпонентным элюентом. Колонка: 50×4,6 мм, MN; стартовый раствор: 10 мМ Трис-НСl, pH 7,50; элюент: 0,2 мМ лимонная кислота, 0,90 мл/мин. Ионная сила подвижных фаз: ~0 (1), 0,01 (2), 0,1 (3)

ные группы сорбента экранируются сорбированными макромолекулами и почти не проявляют буферных свойств, при этом pH эфлюента достаточно резко снижается от 8,2 до 4,5–4,7, что делает данный градиент непригодным для применения в хроматофокусировании.

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. При высокой ионной силе (0,1) стартового раствора и элюента (рис. 1, кривая 2; табл. 2) протяженный начальный участок практически исчезает, а участок градиента со снижением pH от 7,5 до 4,5 становится гораздо более плавным и пологим. Условные константы диссоциации карбоксильных групп сорбента при равенстве ионной силы в стартовом растворе и элюенте не изменяются и соответственно не происходит дополнительного протонирования карбоксильных групп с вытеснением Трис. Высокая концентрация ионов Na^+ в подвижных фазах приводит к уменьшению сорбции Полибуфера за счет конкуренции в ионном обмене; кроме того, в присутствии сильного электролита полиамфолитные макромолекулы приобретают свернутую конформацию, что также снижает их способность к сорбции на карбоксильных группах катионообменника. В результате функциональные группы сорбента практически не экранированы и сохраняют свои буферные свойства, что хорошо согласуется с формой градиента.

Природа стартового раствора. Интересно отметить, что замена одного стартового раствора на стартовый раствор иной природы практически не влияет на профиль градиента pH, а влияние ионной силы при этом сохраняется. Так, при использовании 10 мМ фосфатного буферного раствора в качестве стартового, сохранив остальные условия эксперимента (pH и значение ионной силы подвижных фаз, концентрацию элюента), удалось получить градиенты, полностью идентичные представленным на рис. 1. Высокая ионная сила, одинаковая в фосфатном стартовом растворе и в полиамфолитном элюенте, также способствовала формированию пологого линейного градиента pH.

Однокомпонентные элюенты для формирования линейного градиента pH. Ранее была показана возможность формирования нисходящих градиентов pH в карбоксильных колонках с помощью элюентов на основе 0,2–1 мМ растворов карбоновых или аминокислот [12]. Наиболее линейные плавные градиенты pH были получены при использовании растворов лимонной кислоты, константы диссоциации которой pK_a , равные 3,10; 4,76 и 6,40, равномерно распределены в интервале создания градиента pH. Точно так же, как и для полиамфолитных элюентов, в случае простых однокомпонентных элюентов профиль нисходящего градиента 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. 2, кривая 1). Участок градиента до появления подъема pH имеет одинаковую протяженность независимо от природы и концентрации кислоты, что объясняется первоначальным вытеснением стартового раствора Трис из колонки элюентом [12]. Затем в эфлюенте появляются анионы кислоты, что и приводит к появлению подъема на профиле градиента. Сорбент, как более сильное основание, забирает протоны у кислоты в составе элюента, причем чем ниже концентрация кислоты, тем меньшей буферной емкостью обладает раствор элюента, а следовательно, проще депротонируется. Очевидно, что при переходе к более разбавленным растворам кислоты подъем pH на профиле градиента будет все более заметным. Увеличение протяженности участка градиента с подъемом pH можно объяснить тем, что на дополнительное протонирование сорбента требуется все большее количество элюента

при более сильном разбавлении. Кроме того, при уменьшении концентрации кислоты в элюенте наблюдается увеличение протяженности, а следовательно, и пологости всего градиента рН. На общую протяженность и наклон градиента влияют два фактора: уменьшение концентрации кислоты в элюенте и снижение собственной ионной силы элюента при его разбавлении. Собственную ионную силу элюента рассчитывали с помощью Windows-приложения "Acid-Base Calculator" [13].

Рассмотрим влияние ионной силы элюента подробнее. Как уже отмечалось выше, при уравнивании колонки стартовым раствором на поверхности сорбента удерживается протонированный Трис. При пропускании элюента с меньшей ионной силой, чем в стартовом растворе, карбоксильные группы сорбента допротонируются, в результате из колонки выходит анион кислоты, приводящий к повышению рН эффлюента (рис. 2, кривая 1). Чем больше разница в ионной силе, тем больше дополнительное протонирование групп сорбента, следовательно, из колонки выходит большее количество анионов кислоты. Очевидно, что от такого нежелательного участка на профиле градиента можно избавиться повышением ионной силы элюента. Так, при относительно высокой ионной силе (0,01) в элюенте и стартовом растворе (рис. 2, кривая 2; табл. 2) удается заметно снизить высоту и протяженность участка с подъемом рН на профиле градиента. Дальнейшее повышение ионной силы подвижных фаз (до 0,1) позволяет получить достаточно плавный градиент без подъема рН на на-

чальном участке, зато с более протяженным линейным участком (рис. 2, кривая 3; табл. 2). Очевидно, при увеличении ионной силы в подвижных фазах карбоксильные группы катионообменника частично депротонируются, в результате чего не происходит повышения рН в первых порциях эффлюента. При этом, вероятно, также заметно повышается буферная емкость сорбента за счет улучшения соотношения незаряженных и заряженных групп. Таким образом, с помощью изменения ионной силы подвижных фаз можно влиять на профиль градиента рН в хроматофокусировании.

Проверка влияния ионной силы подвижных фаз на профиль градиента. Для дальнейшей экспериментальной проверки были получены градиенты рН внутри колонки, заполненной сорбентом MacroPrep 50 CM, имеющим достаточно высокую ионообменную емкость (табл. 1). В качестве элюентов для формирования градиента рН были выбраны растворы лимонной кислоты. При этом потребовалось перейти к более концентрированным элюентам (0,05 и 1 мМ), а концентрация стартового раствора осталась прежней. В стартовом растворе и в элюенте создавали одинаковую ионную силу с помощью NaCl (табл. 2). В обоих случаях получили достаточно линейное снижение рН, более плавное для 0,5 мМ раствора кислоты при ионной силе 0,1 (рис. 3). Начальная точка градиента соответствует рН 7,40–7,50, конечная – рН 3,40 (на рисунке сигнал рН-метра, регистрируемый с помощью компьютера, представлен в мВ). На профиле градиента, полученного при использовании 1 мМ лимонной кислоты ($I = 0,01$), наблюдали незначительный (на 0,03 ед.) подъем рН (рис. 3, кривая 1; табл. 2). Тем не менее такой градиент тоже подходит для разделения веществ методом хроматофокусирования. При сохранении концентрации лимонной кислоты в элюенте (1 мМ) профиль градиента можно оптимизировать, увеличив ионную силу в обеих подвижных фазах – в стартовом растворе и в элюенте.

Таким образом, плавные нисходящие градиенты рН в карбоксильных катионообменных колонках можно получать с помощью простых однокомпонентных элюентов при условии достаточно высокой ионной силы, равной в обеих подвижных фазах.

Дальнейшая работа будет направлена на физико-химическое и компьютерное моделирование влияния ионной силы подвижных фаз в катионообменных системах.

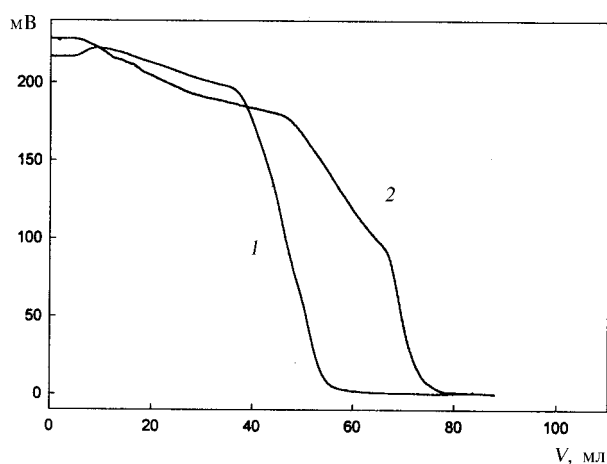


Рис. 3. Формирование градиентов рН однокомпонентными элюентами при равенстве ионной силы в подвижных фазах. Колонка: 50×4,6 мм, MacroPrep 50 CM; стартовый раствор: 10 мМ Трис-HCl, рН 7,50; элюент: 1 мМ (1) и 0,5 мМ (2) лимонная кислота, 0,85 мл/мин; ионная сила: 0,01 (1), 0,1 (2)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sluyterman L.A.A.E., Elgersma O.* // J.Chromatogr. 1978. **150**. P.17.
2. Pharmacia LKB Biotechnology Catalogue 90-91. Pharmacia LKB. Sweden, 1990.
3. *Kang X., Bates R.C., Frey D.D.* // J.Chromatogr. 2000. **890**. P. 37.
4. *Sluyterman L.A.A.E., Wijdenes J.* // J.Chromatogr. 1981. **206**. P. 429.
5. *Иванов А.В., Вакутейн М.С., Нестеренко П.Н.* // ЖФХ. 2003. **77**. С. 137.
6. *Hutchens T.W., Li C.M., Besch P.K.* // J. Chromatogr. 1986. **359**. P. 169.
7. *Bates R.C., Frey D.D.* // J. Chromatogr. 1998. **814**. P. 43.
8. *Narahari C.R., Strong J.C., Frey D.D.* // J. Chromatogr. 1998. **825**. P. 115.
9. *Kang X., Frey D.D.* // Anal. Chem. 2002. **74**. P. 1038.
10. *Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н., Вакутейн М.С.* // ЖФХ. 2001. **75**. С. 342.
11. *Иванов А.В., Тессман А.Б., Нестеренко П.Н. и др.* // Вестн. Моск. ун-та. Химия. 2001. **42**. С. 109.
12. *Вакутейн М.С., Иванов А.В., Нестеренко П.Н., Хасанова Е.М.* // Вестн. Моск. ун-та. Химия. 2003. **44**. С. 258.
13. *Тессман А.Б., Иванов А.В.* // ЖАХ. 2002. **57**. С. 6.

Поступила в редакцию 16.06.03

OPTIMIZATION OF THE PH GRADIENT PROFILE WITHIN CARBOXYLIC COLUMNS BY IONIC STRENGTH OF MOBILE PHASES

A.V. Ivanov, M.S. Vakshtein, E.M. Khasanova

(Division of Analytical Chemistry)

The ionic strength of a start solution and an eluent significantly influences on the profile of decreasing pH gradient within carboxylic columns. The required profile of pH gradient can be optimized by right choice of mobile phases ionic strength. The application of the single-component eluents with the combination of high ionic strength of the mobile phases for formation of linear pH gradients in cation-exchange systems has been shown in the first time.