

УДК 541.544

## ПОЛИЭТИЛЕНИМИН КАК КОМПОНЕНТ СВОБОДНОЙ НЕПОДВИЖНОЙ ФАЗЫ В КАПИЛЛЯРНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ГРАДИЕНТОМ pH

А.В. Иванов, С.С. Кубышев, П.Н. Нестеренко, А.Б. Тессман

*(кафедра аналитической химии)*

**Предложено использовать водные растворы полиэтиленимина (1:3 – 1:2) как свободную неподвижную фазу для индуцирования нисходящих градиентов pH внутри капилляров. В качестве компонентов элюента применяли уксусную и 6-аминогексановую кислоты, а также Трис. Градиенты pH, полученные при скорости расхода элюента 0,4–0,6 мл/мин, характеризуются линейностью в интервале более 5 ед. pH.**

Элюирование с градиентом pH давно привлекает внимание исследователей, поскольку позволяет увеличить нагрузочную емкость хроматографических колонок, работать с веществами, разделение которых невозможно при изократическом элюировании, избежать размывания хроматографических зон [1–3]. В зависимости от задачи можно получать ступенчатые или линейные (непрерывные) градиенты в разных диапазонах pH. Однако формирование градиентов pH до колонки за счет смешивания двух или более подвижных фаз требует использования градиентного насоса или смесителя с электронным управлением для задания градиента pH требуемой формы [2–4]. Именно поэтому все больший интерес вызывают внутриколоночные градиенты pH, создаваемые за счет протолитических и ионообменных взаимодействий между буферным элюентом и функциональными группами сорбента. Наряду с перечисленными выше внутриколоночные градиенты pH обладают следующими преимуществами: достигается высокое разрешение пиков благодаря фокусирующему эффекту [2, 4], для их формирования не требуется градиентный насос или смеситель. Иногда возможно сочетать предварительное концентрирование анализируемых компонентов с последующим разделением на той же самой колонке [2, 4]. Внутриколоночные градиенты pH применяют в ионообменной хроматографии белков и ферментов [3–5], в комплексообразовательной хроматографии металлов [6, 7], для разделения лекарственных форм [4, 8] и т.п. Существует два основных способа формирования линейных внутриколоночных градиентов pH: техника хроматофокусирования [4] и техника индуцирования [8, 9]. В технике хроматофокусирования через колонку предварительно пропускают буферный стартовый раствор, уравнивая ее

до определенного значения pH, а затем пропускают буферный элюент при резко отличающейся кислотности, что приводит к линейному изменению pH в слое сорбента. При использовании техники индуцирования через колонку постоянно пропускают разбавленный буферный элюент, в определенные моменты вводя в поток элюента ограниченный объем концентрированного индуцирующего раствора. Это приводит к резкому изменению кислотности эфлюента до значения pH индуцирующего раствора, а затем идет плавное изменение до значения pH элюента. В ряде случаев удается заметно снизить время формирования градиента (до 2–3 раз) по сравнению с техникой хроматофокусирования [7, 9]. Индуцированные градиенты также линейны в широком диапазоне pH (до 4–5 ед.)

Следует отметить новую область применения техники индуцирования линейных градиентов pH – жидкостная хроматография со свободной неподвижной фазой (ЖХСНФ) [10, 11]. В последние годы в ЖХСНФ применяли только элюирование со ступенчатым доколоночным градиентом pH [12, 13], однако при этом на хроматограммах возникал ряд ложных пиков, вызванных сменой подвижных фаз. Использование техники индуцирования позволило бы сочетать преимущества ЖХСНФ и pH-градиентного элюирования. Согласно разработанному подходу [10, 14] индуцирующий раствор, вызывающий формирование градиента pH в капилляре, одновременно служит и свободной неподвижной фазой. Очевидно, что реагент для индуцирования должен обладать достаточной вязкостью. Так, для индуцирования восходящих и нисходящих градиентов pH показано применение вязких гидрофобных кислот [10] и растворов аминов в полиэтиленгликоле [11] соответственно.

В данной статье описано применение растворов полиэтиленimina в качестве свободной неподвижной фазы, индуцирующей нисходящий градиент рН.

### Экспериментальная часть

**Реагенты.** В качестве индуцирующих использовали водные растворы полиэтиленimina (ПЭИ) при переменной концентрации, приготовленные из препарата (*Aldrich*, США). Водные растворы уксусной, 6-аминогексановой кислот и Трис, приготовленные из препаратов фирмы *Merck* (Германия), использовали в качестве компонентов элюента. Концентрацию компонентов элюента варьировали в диапазоне 0,5–2,0 мМ. Все реагенты имели квалификацию “ч.д.а.”.

**Аппаратура.** Использовали хроматографическую систему высокого давления, состоящую из насоса высокого давления “*Beckman-114 M*” (США) или “*Milton Roy A 802*” (Франция), инжектора “*Rheodyne-7125*” (США) с объемом петли 50 мкл или 1 мл для ввода индуцирующего раствора, тefлонового капилляра с внутренним объемом 1 мл (внутренний радиус 0,4 мм, длина ~200 см), цифрового рН-метра НМ-20S (*TOA Electronics*, Япония) с комбинированным стеклянным электродом GST-5211С и проточной ячейкой для непрерывного контроля рН эффуэнта. Сигнал рН-метра регистрировали через АЦП на компьютере *Pentium-I* с тактовой частотой 100 МГц с помощью DOS-приложения “*Экохром*” (ИОХ РАН, Россия) или самописца “*LKB-2210*” (*LKB-Bromma*, Швеция).

**Методика.** Через капилляр в течение 10–15 мин пропускали буферный элюент с нижним значением интервала рН, вводили в инжектор 50 мкл (в отдельных экспериментах 0,2–1,0 мл) водного раствора полиэтиленimina с верхним значением интервала рН и непрерывно регистрировали рН эффуэнта.

### Результаты и их обсуждение

**Механизм формирования нисходящего градиента рН в капилляре. Выбор неподвижной фазы.** Неподвижные фазы в методе ЖХСНФ называются “свободными”, поскольку в отличие от традиционных сорбентов они не постоянно находятся внутри капилляра (колонки), а постепенно вымываются из капилляра. Процесс вымывания фазы идет с гораздо меньшей скоростью, чем прохождение элюента через капилляр, и этого времени обычно достаточно для разделения анализируемых веществ [13]. Таким образом, при необратимой сорбции или необратимом распределении анализируемых веществ капилляр можно легко освободить от отработанных неподвижных фаз

и заполнить новой порцией неподвижной фазы. В качестве свободной неподвижной фазы используют жидкости, не смешивающиеся с водным элюентом и обладающие плотностью, отличной от плотности воды, и достаточно высокой вязкостью [12]. Модель индуцирования восходящего градиента рН при использовании вязкой гидрофобной кислоты (октановой или гептановой) в качестве неподвижной фазы предложена в [10, 14]. Рассмотрим этапы формирования нисходящего градиента рН внутри капилляра при использовании аминов в качестве неподвижной фазы. После ввода порции амина  $\text{RNH}_2$  внутренние стенки капилляра модифицируются неподвижной фазой, а не сорбируемая на стенках порция амина выходит из капилляра, и тогда рН эффуэнта резко повышается до 9–10 (рис. 1). Поскольку изученные нами амины (пропиламин, 2-бутиламин, диизопропилэтиламин, ундециламин [11]) не обладают достаточной вязкостью и плохо удерживаются на стенках капилляра, то для лучшего удерживания использовали их растворы в вязком полиэтиленгликоле. Толщина слоя амина по длине капилляра может быть неравномерной. Элюент, в состав которого входят слабые органические кислоты НА (уксусная и 6-аминогексановая) постепенно титрует амин, и на модифицированных стенках капилляра образуются участки с аммониевым основанием:



Соль аммониевого основания  $\text{RNH}_3\text{A}$  также удерживается некоторое время на внутренних стенках капилляра. Титрование амина продолжается, и из капилляра выходят смесь кислот, первоначально содержащихся в элюенте, и смываемая со стенок соль  $\text{RNH}_3\text{A}$ . Таким образом, рН эффуэнта плавно снижается до значения рН элюента на входе в капилляр. Внутренние стенки капилляра снова становятся немодифицированными, и можно вводить в систему новую порцию индуцирующего реагента  $\text{RNH}_2$ . Профиль градиента зависит от кислотно-основных свойств фаз и от вязкости неподвижной фазы, а рабочий интервал градиента рН определяется соотношением кислотности элюента и основности неподвижной фазы. Добавление полиэтиленгликоля в состав свободной неподвижной фазы способствует более плавному снижению рН эффуэнта, но вместе с тем сокращает рабочий интервал градиента рН от 7 до 4,5–5,0.

С этих позиций представляется перспективным использовать полиамины (например, полиэтилен-

имин) в качестве компонентов свободной неподвижной фазы, индуцирующей градиент рН. С другой стороны, по кислотно-основным свойствам в сочетании с высокой (до нескольких сотен пуаз) вязкостью [15] несомненный интерес представляют ионные жидкости.

**Свободная неподвижная фаза на основе полиэтиленimina.** Различают полиэтиленимин (ПЭИ) низкой и высокой молекулярной массы [16]. ПЭИ низкой молекулярной массы (600–10000) представляет собой вязкую жидкость (вязкость  $1 \cdot 10^3$ – $2 \cdot 10^4$  пуаз), плотность которой сравнима с плотностью воды ( $1,05 \text{ г/см}^3$ ); температура стеклования  $-45^\circ\text{C}$ . ПЭИ высокой молекулярной массы (30000–100000) является эластомером с очень высокой вязкостью – от  $4 \cdot 10^4$  до  $10^5$  пуаз (4000–10000 Па·с) и температурой стеклования  $-(20-30)^\circ\text{C}$  [16]. Полиэтиленимин хорошо смешивается с водой, давая истинные растворы в широком интервале концентраций. Значения  $\lg K_p$  для аминогрупп в составе ПЭИ равномерно распределены в широком интервале от 4,2 до 10,5, что делает перспективным использование ПЭИ в качестве индуцирующего реагента. Если неподвижные фазы на основе пропиламина или бутиламина в ЖХСНФ можно сравнить с монофункциональными анионообменниками, то ПЭИ в этом случае – аналог анионообменников РВЕ-94, РВЕ-118 или Tetren-SiO<sub>2</sub> – полифункциональных полиэлектролитных сорбентов для хроматофокусирования [2, 4, 7]. Дополнительным преимуществом является хорошее удерживание полиэтиленимина на стенках капилляра, обусловливаемое гидрофобными контактами макромолекул тефлона и полиэтиленимина. Однако чрезвычайно высокая вязкость, характерная даже для ПЭИ низкой молекулярной массы, не позволяет использовать чистый полимер как свободную неподвижную фазу. Решением проблемы является применение водных растворов ПЭИ, поскольку в этом случае вязкость заметно снижается. Так, для 33%-го раствора она составляет 150–250 пуаз (15–25 Па·с). Такие растворы пригодны в качестве неподвижной фазы для ЖХСНФ.

Варьирование содержания ПЭИ в растворе позволяет добиться такой вязкости раствора, при которой профиль градиента будет линейным при сохранении широкого рабочего интервала рН (не менее 5 ед. рН), а время выхода не превысит 50–60 мин. Хроматографические условия, выбранные оптимальными на основе предыдущего исследования [12] (элюент – 1 мМ уксусная кислота, по 0,5 мМ аминоксаноной кислоты и Трис при скорости 0,4 мл/мин), сохранили на

первом этапе эксперимента. С увеличением доли полиэтиленимина в водном растворе от 1:5 до 1:2 (по объему) профиль градиента становится более линейным, рабочий интервал градиента увеличивается. Так, время выхода градиента рН для растворов ПЭИ 1:5, 1:3 и 1:2 составляет 44–45, 70–75 и более 160 мин соответственно (рис.1, таблица). Начальная точка градиента при этом смещается в область более высоких значений рН. Хотя в последнем случае профиль градиента наиболее плавный и практически линейный во всем рабочем интервале рН (от 10,2 до 5,0), слишком длительное время формирования не позволяет выбрать такие условия в качестве оптимальных. Таким образом, градиент, индуцированный при использовании раствора ПЭИ (1:3), благодаря меньшему времени формирования более интересен для практических задач. Однако данную серию экспериментов проводили при низкой скорости расхода элюента.

**Скорость расхода элюента** в ЖХСНФ также существенно влияет на профиль градиента рН. Для проверки влияния скорости элюента выбрали растворы ПЭИ 1:2 и 1:3, состав элюента оставили прежним. При скорости 0,8 мл/мин время выхода градиента рН заметно сокращается (35–37 мин) в отличие от скорости 0,4 мл/мин (таблица, рис. 2); расширяется рабочий интервал рН, но на профиле градиента отчетливо проявляются 2 линейных участка с перегибом или даже небольшим повышением рН (в области 7,2–7,5), причем первый участок более пологий

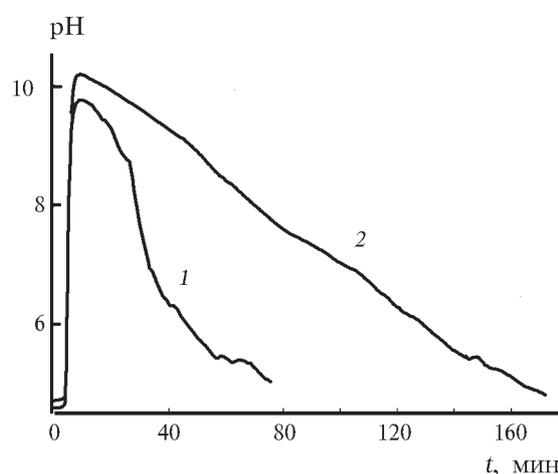


Рис. 1. Влияние содержания ПЭИ в составе свободной неподвижной фазы на профиль градиента рН. Элюент: 1 мМ уксусная кислота, 0,5 мМ аминоксаноной кислоты, 0,5 мМ Трис (0,4 мл/мин); неподвижная фаза – водный раствор ПЭИ: 1 – 1:3, 2 – 1:2

## Условия формирования и характеристики индуцированных градиентов рН

Свободная неподвижная фаза: соотношение ПЭИ : вода; объем	Состав элюента	Скорость расхода элюента, мл/мин	Интервал градиента рН	Время выхода градиента, мин *
1:5; 50 мкл	1 мМ уксусная кислота, 0,5 мМ аминоксановая кислота, 0,5 мМ Трис	0,4	9,77–4,70	43–45
1:4; 50 мкл	тот же	0,4	9,83–4,70	55–58
1:3; 50 мкл	тот же	0,4	9,87–4,68	70–75
1:2; 50 мкл	тот же	0,4	10,20–4,68	более 160
Та же	тот же	0,6	10,30–4,68	92–95
–//–	тот же	0,8	11,20–4,65	40–43
1:3; 50 мкл	1 мМ уксусная кислота, 1 мМ аминоксановая кислота, 0,5 мМ Трис	0,4	9,88–4,60	27–28
Та же	тот же	0,6	9,82–4,60	23–25
1:2; 0,2 мл	тот же	0,6	10,90–4,70	115–120
1:2; 0,8 мл	тот же	0,6	11,55–4,70	более 180
Та же	10 мМ уксусная кислота, 5 мМ аминоксановая кислота, 1 мМ Трис	0,6	10,08–4,50	42–45
1:2; 1,0 мл	тот же	0,6	11,03–4,55	49–53

\* Время снижения рН от максимального до значения рН элюента.

(рис. 2, кривая 1). Такая форма градиента хорошо воспроизводится при многократном повторении эксперимента. Вероятно, при более высокой скорости элюента вымывание свободной неподвижной фазы или аммониевого основания из капилляра происходит не совсем равномерно, и на этом участке градиента частично выходит порция еще неоттитрованного амина. Более высокая скорость подвижной фазы может

препятствовать равномерному распределению ПЭИ по стенкам капилляра. В пользу такого предположения говорит и заметный сдвиг начальной точки градиента в щелочную область (до рН 11,2–11,3).

При скорости расхода элюента 0,6 и 0,4 мл/мин начальные точки градиента лежат практически в одной области рН (10,2–10,3). Время выхода градиента сокращается до 90–95 мин (таблица), снижение рН

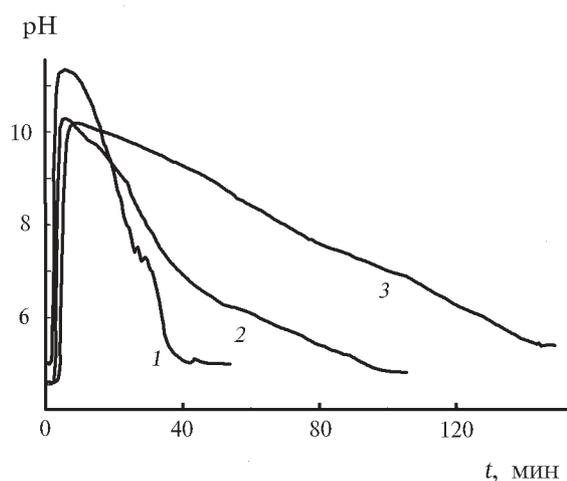


Рис. 2. Влияние скорости элюента на профиль градиента рН при использовании 1:2 раствора ПЭИ в качестве неподвижной фазы. Скорость расхода элюента: 1 – 0,8 мл/мин, 2 – 0,6 мл/мин, 3 – 0,4 мл/мин (условия приведены в подписи к рис. 1)

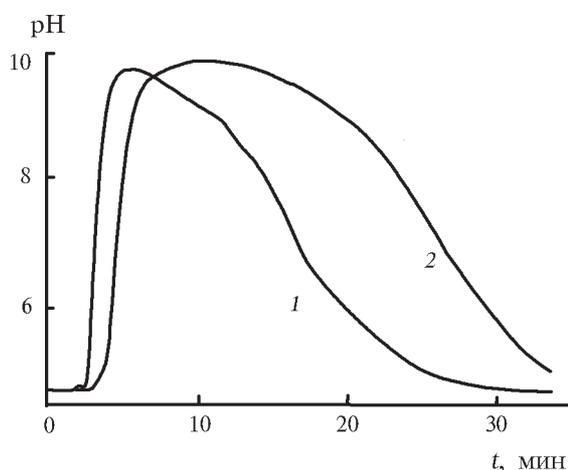


Рис. 3. Градиенты рН, полученные при использовании 1:3 раствора ПЭИ. Элюент: 1 мМ уксусная кислота, 1 мМ аминоксептановая кислота, 0,5 мМ Трис; скорость расхода элюента: 1 – 0,6 мл/мин, 2 – 0,4 мл/мин

идет достаточно плавно. Для сравнения приведен градиент рН, полученный ранее при скорости 0,4 мл/мин (кривая 2 на рис.1 и кривая 3 на рис. 2). Таким образом, скорость расхода элюента 0,6 мл/мин можно считать оптимальной при использовании 1:2 раствора ПЭИ. На рис. 3 представлены градиенты, индуцированные при использовании 1:3 раствора ПЭИ в качестве неподвижной фазы. Помимо скорости варьировали состав элюента – увеличили концентрацию 6-аминоксептановой кислоты до 1 мМ. Время выхода градиента в этом случае не превышало 30–35 мин, оба градиента имеют достаточно плавную, линейную форму в широком диапазоне рН от 9,7–

9,8 до 4,7 (таблица). Таким образом, предложенные условия можно использовать в практических целях.

**Объем свободной неподвижной фазы.** При индуцировании восходящих градиентов рН мы показали на примере октановой кислоты, что вводимый объем неподвижной фазы существенно влияет на линейность градиента. Аналогичным образом варьировали объем свободной неподвижной фазы для растворов ПЭИ 1:2 и 1:3. Можно было сразу предположить, что время выхода градиента при увеличении вводимого объема многократно возрастет. Для того чтобы время не превышало 50–60 мин, увеличили концентрации кислот в элюенте в 5–10 раз (таблица). На основании предыдущих экспериментов выбрали скорость подвижной фазы 0,6 мл/мин. Градиенты, индуцированные при введении 0,8–1,0 мл раствора ПЭИ (1:2), линейны в диапазоне более 5 ед. рН, а их продолжительность в таких условиях не превышает 40 мин (рис.4). Оба градиента представляют практический интерес, но, на наш взгляд, градиент, полученный при введении 1 мл раствора ПЭИ (рис.4, кривая 2), предпочтительнее из-за более плавного снижения рН.

Таким образом, водные растворы ПЭИ перспективны для индуцирования линейных нисходящих градиентов в широком интервале рН внутри капилляров. Наиболее интересными из изученных представляются следующие системы:

- а) неподвижная фаза – 1:3 раствор ПЭИ (50 мкл), элюент – 1 мМ уксусная кислота, 0,5–1 мМ аминоксептановая кислота, 0,5 мМ Трис при скорости 0,4–0,6 мл/мин;

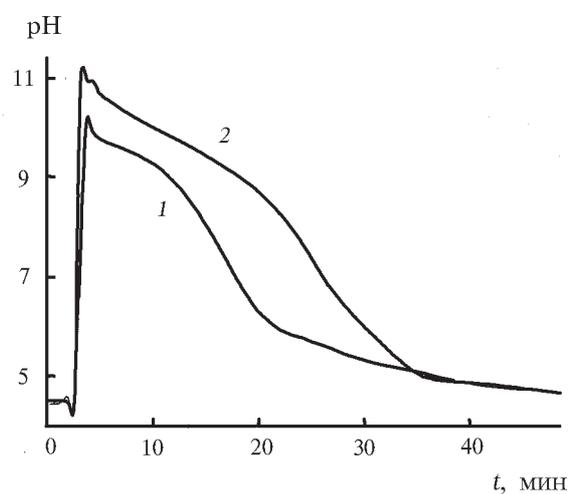


Рис. 4. Индуцирование градиентов рН при варьировании объема свободной неподвижной фазы. Неподвижная фаза: 1:2 раствор ПЭИ. Элюент: 10 мМ уксусная кислота, 5 мМ аминоксептановая кислота, 1 мМ Трис (0,6 мл/мин). Объем раствора ПЭИ, мл: 1 – 0,8, 2 – 1,0

б) неподвижная фаза – 1:2 раствор ПЭИ (50 мкл), элюент – 1 мМ уксусная кислота и по 0,5 мМ аминокснковой кислоты и Трис при скорости 0,6 мл/мин;  
в) неподвижная фаза – 1:2 раствор ПЭИ (0,8–1,0 мл), элюент – 10 мМ уксусная кислота и по 5 мМ

аминокснковой кислоты и Трис при скорости 0,6 мл/мин.

В дальнейшем было бы интересно изучит формирование нисходящих градиентов при использовании ионных жидкостей в качестве неподвижной фазы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jandera P., Churacek J. Gradient elution in column liquid chromatography: theory and practice. Amsterdam; Oxford; N.Y.; Tokio, 1985.
2. Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // ЖАХ. 1999. 54. № 6. С. 566.
3. Liu Y.S., Anderson D.J. // J. Chromatogr. A. 1997. 762. P. 207.
4. Amersham Biosciences BioDirectory (Catalogue). Uppsala, 2003.
5. Kang X., Frey D.D. // Anal.Chem. 2002. 74. P. 1038.
6. Nesterenko P.N., Ivanov A.V. // Mendeleev Comm. 1994. N 5. P. 174.
7. Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // Изв. вузов. Химия и химтехнология. 1999. 42. С. 122.
8. Slais K. // J. Microcol. Sep. 1991. 3. P. 191.
9. Janecsek M., Slais K. // Chromatographia. 1993. 36. P. 246.
10. Иванов А.В., Тессман А.Б., Пирогов А.В. // ЖФХ. 2003. 77. С. 934.
11. Иванов А.В., Кубышев С.С., Нестеренко П.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2004. 45. № 4. С. 240.
12. Counter-Current Chromatography. Editors: J.M.Menet, D.Thiebaut. N.Y.; Basel, 1999.
13. Kitazume E., Higashiyama T., Sato N. et al. // Anal.Chem. 1999. 71. P. 5515.
14. Тессман А.Б., Иванов А.В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2004. 45. № 6. С. 386.
15. Плетнев И.В., Формановский А.А., Смирнова С.В. и др. // ЖАХ. 2003. 58. №7. С. 710.
16. Гембицкий П.А., Жук Д.С., Каргин В.А. Полиэтиленимин. М., 1971.

Поступила в редакцию 28.06.04

## POLYETHYLENEIMINE AS COMPONENT OF FLOWING RETENTIVE PHASE IN PH GRADIENT CAPILLAR LIQUID CHROMATOGRAPHY

A.V. Ivanov, S.S. Kubyshev, P.N.Nesterenko, A.B.Tessman

(Division of Analytical Chemistry)

**The application of polyethyleneimine solutions (1:3 – 1:2) in water as flowing retentive phase to induce the decreasing pH gradients within capillars was suggested. The acetic and 6-amino hexanoic acids and Tris were used as components of eluents. The pH gradients, formed at flow rate 0,4–0,6 ml/min, are linear and smooth within 5 pH-units interval.**