

**ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ
ПРОЦЕССОВ РАЗДЕЛЕНИЯ.
ХРОМАТОГРАФИЯ**

УДК 541.544:681.3

**ПРИМЕНЕНИЕ СЛАБЫХ ОРГАНИЧЕСКИХ ПРОТОЛИТОВ
ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ ГРАДИЕНТА pH
В ХРОМАТОФОКУСИРОВАНИИ**

© 1999 г. А. Б. Тессман, А. В. Иванов, П. Н. Нестеренко, А. В. Гармаш

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет

Поступила в редакцию 01.07.98 г.

Получены внутренние градиенты pH на сорбентах с привитыми олигоэтиленаминами при использовании однокомпонентных элюентов, содержащих слабые протолиты. Объяснены особенности формы экспериментальных градиентов pH. Проведено сравнение экспериментальных градиентов pH и рассчитанных на основе физико-химической модели. Предложен подход для выбора сорбента, стартового раствора и элюента для формирования внутреннего градиента требуемой формы.

Градиент pH эффективно повышает разрешающую способность хроматографической системы и улучшает нагрузочную емкость колонки, заполненной слабоосновным анионообменником или слабокислотным катионообменником. Формирование градиента pH внутри ионообменных колонок (так называемого внутреннего градиента) связано с постепенным оттитровыванием групп сорбента в случае анионообменника кислотными группами компонентов элюента [1–3]. Внутренние градиенты pH широко применяют для разделения цвиттер-ионных органических макромолекул (белков, ферментов и т.п.) в методе хроматофокусирования [1]. Показано, что элюирование с внутренним градиентом pH можно успешно применить для разделения переходных металлов на комплексообразующих сорбентах [4, 5].

Для формирования градиентов pH внутри ионообменных колонок предложено использовать либо промышленно выпускаемые буферные элюенты (например, “Полибуфер-74”), представляющие собой растворы высокомолекулярных полиамфолитных соединений, либо смеси амфолитов и слабых протолитов (до 20–30 компонентов) [2]. Однако применение таких элюентов ограничено высокой стоимостью, низкой антибактериальной устойчивостью и трудоемкостью приготовления. Кроме того, сложно оценить вклад комплексообразующих свойств компонентов элюента в процесс разделения переходных металлов. Поэтому актуален выбор простых буферных элюентов для хроматофокусирования, включающих не более 3–5 компонентов, позволяющих получить градиент требуемой формы в интервале pH, необходимом для разделения [3]. Выбор компонентов элюента можно проводить эмпирически либо на основе компьютерного моделирования физико-химических процессов, протекающих в системе сорбент–элюент [6].

Данная работа посвящена принципам выбора компонентов элюента для создания градиентов pH заданной формы внутри анионообменных колонок, заполненных сорбентами с привитыми олигоэтиленаминами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали хроматографическую систему низкого давления, состоящую из емкости с краном для подвижной фазы (“Pharmacia”, Швеция), четырехходового крана (“Pharmacia”), стеклянной хроматографической колонки K9/30 (“Pharmacia”), заполненной сорбентом Dien-SiO₂ (100–160 мкм) на основе кремнезема с привитыми группами диэтилентриамин; перистальтического насоса “MultiPerpex-2115” (“LKB-Bromma”, Швеция); коллектора фракций “RediRac-2112” (“LKB-Bromma”). Измеряли pH эффлюента на pH-метре “pH-340” со стеклянным электродом. Использовали также хроматографическую систему высокого давления, состоящую из изократического насоса “Beckman-114M” (США), хроматографической колонки из нержавеющей стали длиной 150 мм и внутренним диаметром 4.6 мм, заполненной сорбентом Tetren-SiO₂ (7.5 мкм) с привитыми группами тетраэтиленпентамина, цифрового pH-метра “Orion-501” (США) с комбинированным pH-электродом “Orion-917002” и самописца “LKB-Bromma” (Швеция).

В качестве стартового буферного раствора использовали 0.025 М *трис*-HCl (pH 7.5) или 0.020 М раствор гексаметилентетрамина (гексамина) (pH 5.9–6.1); в качестве буферных элюентов растворы уксусной, молочной, фумаровой, малоновой, щавелевой, малеиновой, янтарной кислот. Для исключения влияния посторонних ионов значение pH стартового раствора гексамина создавали добавлением рассчитанного количества кис-

лоты, входящей в состав элюента; pH буферного элюента подвели до 3.5 добавлением гексамина. Все растворы готовили из препаратов фирмы "Merck" (Германия) квалификации "ч. д. а.". Ионную силу элюента создавали добавлением 3 М раствора NaCl.

Хроматографическую колонку уравнивали стартовым буферным раствором до значения pH, соответствующего начальной точке градиента, затем пропускали буферный элюент с pH 3.5 и либо собирали фракции эфлюента (1–2 мл) и измеряли в них pH, либо регистрировали сигнал цифрового pH-метра в потоке.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Сорбенты с привитыми группами диэтилентриамина и тетраэтиленпентамина обладают постоянной буферной емкостью (70–120 мкмоль/(мл ед. pH)) в интервале pH от 4 до 8–9. Закрепление олигоэтиленаминов на поверхности кремнезема происходит различными способами (например, за одну или две концевые группы), что приводит к варьированию значений pK первичных, вторичных и, возможно, третичных аминогрупп и расширяет интервал постоянной буферной емкости [7]. Кислотно-основные взаимодействия привитых групп с остаточными силанольными группами тоже способствуют плавному изменению pH в слое сорбента. С другой стороны, привитые олигоэтиленамины проявляют свойства полиэлектролита. Таким образом, сорбенты Dien-SiO₂ и Tetren-SiO₂ благодаря своим свойствам подходят для формирования внутреннего градиента в широком интервале pH.

В качестве буферных элюентов, формирующих градиент pH, использовали растворы слабых одно- и двухосновных органических кислот с добавлением гексамина до pH 3.5.

Одноосновные кислоты. Для формирования градиента pH выбрали уксусную и молочную кис-

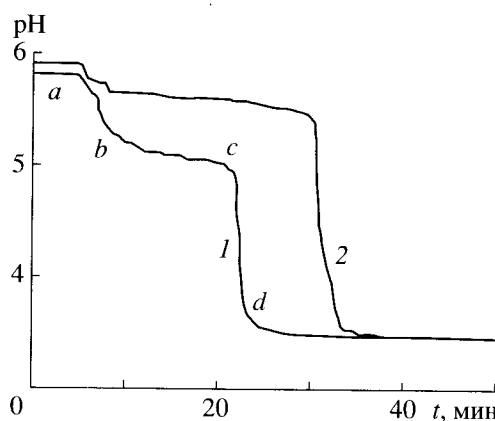


Рис. 1. Градиенты pH, полученные в системе: колонка-Tetren-SiO₂, 150 × 4.6 мм; стартовый раствор – 0.020 М гексамин (pH 6); элюент – 0.020 М уксусная (1) или молочная (2) кислота, 1 мл/мин.

лоты как первых представителей гомологического ряда. Из рис. 1 видно, что строение кислоты (наличие оксигруппы) и состав элюента сильно влияют на форму градиента. При использовании уксусной кислоты получили градиент pH с двумя ярко выраженными ступенями (или характерными участками градиента). Начальный участок градиента a–b (рис. 1, кривая 1) обусловлен сорбцией ацетат-иона из элюента [3]. Степень b–c связана с увеличением степени протонирования сорбента (α), так как при pH стартового раствора (5.9–6.1) величина $\alpha \approx 0.6$ [3]. Участок c–d обусловлен десорбцией ацетат-иона и уравниванием pH сорбента до pH элюента. При элюировании раствором молочной кислоты участки a–b и b–c сглаживаются практически в один (рис. 1, кривая 2), что объясняется существенно большим содержанием гексамина в элюенте, чем в случае уксусной кислоты, а также несколько меньшей сорбируемостью лактат-иона (таблица).

Расчет состава элюента (М) на характерных участках градиента pH

Кислота	pKa	c_a	pH	c_h	pH	c_a	c_h	pH	c_a	c_h	pH
		стартовый раствор		элюент		подъем			ступень		
Уксусная	4.76	0.004	5.85	0.001	3.50	–	–	–	0.001	0.001	5.08
Молочная	3.83	0.003	5.97	0.006	3.51	–	–	–	0.001	0.006	5.70
Малеиновая	1.92, 6.22	0.002	5.90	0.020	3.51	0.015	0.020	6.05	~0.014	0.020	~4.70
Фумаровая	3.03, 4.38	0.001	6.00	0.018	3.55	0.001	0.018	6.10	~0.012	0.018	~4.18
Щавелевая	1.25, 4.27	0.001	6.09	0.024	3.60	0.001	0.024	6.28	~0.011	0.024	~4.60
Малоновая	2.86, 5.70	0.001	6.07	0.019	3.75	0.001	0.019	6.21	~0.018	0.019	~4.0
Янтарная	4.21, 5.63	0.001	6.00	0.003	3.50	–	–	–	–	–	–

Примечание. Концентрация кислоты (c_a) на характерных участках градиента pH рассчитана с использованием программы "Acid-Base Calculator" [8]. Для стартового раствора концентрация гексамина $c_h = 0.020$ М, для элюента $c_a = 0.020$ М.

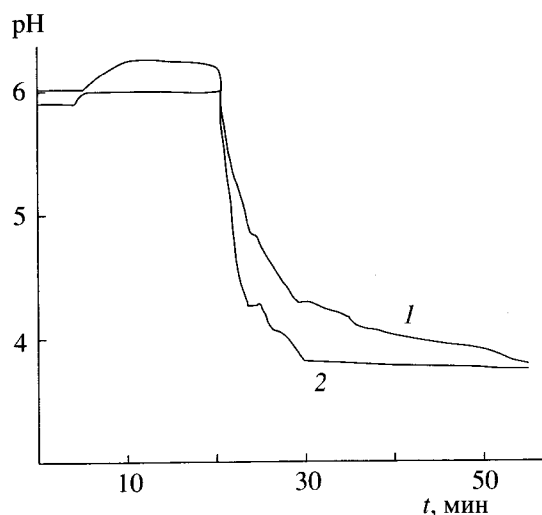


Рис. 2. Градиенты pH, полученные в системе: элюент – 0.020 М малеиновая (1) или фумаровая (2) кислота; остальные условия см. рис. 1.

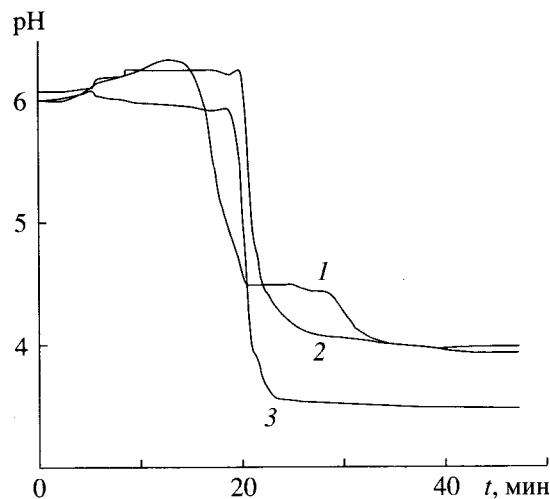


Рис. 3. Градиенты pH, полученные в системе: элюент – 0.020 М щавелевая (1), малоновая (2), янтарная (3) кислоты; остальные условия см. рис. 1.

Двухосновные кислоты. В качестве двухосновных рассматривали два набора кислот: *цис*- и *транс*-изомеры бутеновой кислоты (малеиновую и фумаровую) и гомологический ряд – щавелевую, малоновую и янтарную кислоты. Во всех случаях, кроме янтарной кислоты, на профиле градиента pH наблюдали увеличение pH на начальном участке, ранее считавшееся “аномальным” [9], а также сглаживание участков *b–c* и *c–d* в один (рис. 2, 3). Подъем на профиле градиента pH связан с тем, что в растворы двухосновных кислот требовалось добавлять больше гексамина для подведения pH, чем для более слабых одноосновных кислот. Соответственно резко возрастает отношение концентрации гексамина к концентрации кислоты на участке *a–b* (таблица). Для фумаровой и малеиновой кислоты сорбция практически не зависит от строения изомера (таблица) и протекает преимущественно по одной карбоксильной группе, что согласуется с данными [10].

В гомологическом ряду “щавелевая – малоновая – янтарная кислота” наблюдали уменьшение подъема pH на начальном участке градиента до почти полного его исчезновения в случае янтарной кислоты (рис. 3). Это объясняется уменьшением силы кислоты. В итоге концентрация янтарной кислоты на участке *a–b* оказывается соизмеримой с концентрацией гексамина, так же как и для одноосновных кислот (таблица). Значительный подъем pH (0.2 ед.) для щавелевой кислоты связан не только с более сильными кислотными свойствами, но и с тем, что длина молекулы примерно равна расстоянию между соседними аминогруппами на поверхности сорбента [11], т.е. с увеличением сорбции оксалат-иона из элюента. Вероятно, соизмеримость размеров молекул

щавелевой кислоты с расстоянием между соседними аминогруппами Tetren-SiO₂ обуславливает также появление ступени на профиле градиента при pH 4.6.

Сравнение экспериментальных и модельных градиентов pH. Ранее нами было проведено моделирование градиентов pH в системах “анионообменный сорбент – кислотный буферный элюент” [3, 6]. Расчетные градиенты pH качественно согласуются с известными из литературы [2, 6, 9]. Однако мы не проводили детальное сравнение расчетных градиентов pH и полученных при использовании слабых протолитов в качестве элюента. С этой целью мы изучили реальную систему: анионообменник – Dien-SiO₂, элюент – уксусная кислота, хлорид натрия – для создания ионной силы.

На профиле градиента pH, полученного при пропускании 0.005 М раствора уксусной кислоты через колонку с сорбентом Dien-SiO₂, уравновешенную 0.025 М раствором *трис*-HCl до pH 7.5, наблюдается увеличение pH на 0.1–0.2 ед. (рис. 4, кривая 1). Оно объясняется слабой степенью протонирования аминогрупп сорбента, низкой концентрацией противоиона (хлорид-иона): ионная сила стартового раствора 0.002, а буферного элюента – 0.005. Поэтому при пропускании первых порций элюента через колонку практически полностью сорбируются и хлорид-ион, и ацетат-ион. Затем значение pH в слое сорбента плавно снижается до 6.8 за счет обмена ионов хлорида на ацетат-ионы (рис. 4, кривая 1). Вторая ступень на профиле градиента в области pH 4.6–4.7 выражена слабо, поскольку в этой области фронты выхода хлорид и ацетат-ионов частично перекрыва-

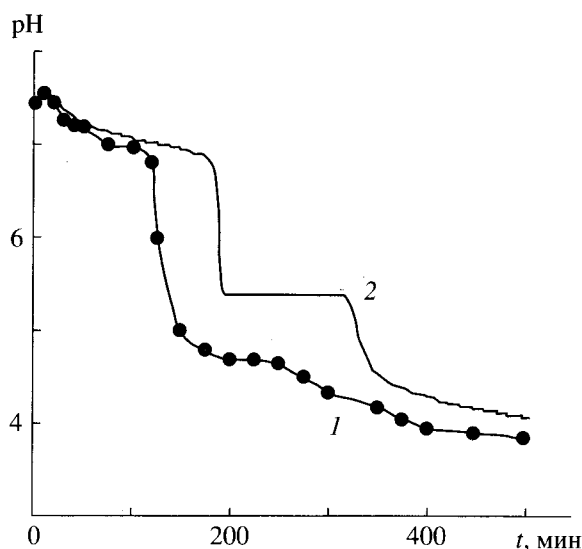


Рис. 4. Сравнение экспериментального (1) и расчетного (2) градиентов pH; стартовый раствор – 0.025 М *трис*-HCl (pH 7.5, $I = 0.002$), элюент – 0.005 М уксусная кислота (pH 3.5, $I = 0.005$), 1 мл/мин; 1 – колонка – Dien-SiO_2 , 300×9 мм; 2 – сорбент – модель Tetren-SiO_2 ; $K(\text{Cl}^-, \text{CH}_3\text{COO}^-) = 0.1$.

ются, кроме того, влияют полиэлектролитные свойства аминогрупп сорбента.

На профиле расчетного градиента pH можно выделить те же участки – начальный подъем pH до 7.6, плавное уменьшение до 6.9, резкий спад до второй ступени (pH 5.3) и далее – плавное уменьшение до pH элюента (рис. 4, кривая 2). Вероятно, различие в форме и положении вторых ступеней связано с недостаточно точным моделированием свойств сорбента [12]: а) в модель заложены свойства близкого к Dien-SiO_2 сорбента Tetren-SiO_2 с привитыми группами тетраэтиленпенамина; б) для описания протолитических и полиэлектролитных свойств сорбента мы использовали уравнение

$$\lg K_p = f(I^{1/2}, \alpha),$$

где K_p – константа протонирования аминогрупп сорбента, I – ионная сила, α – степень протонирования сорбента. Однако, несмотря на некоторое различие между экспериментальным и расчет-

ным градиентами pH, модель можно успешно использовать для предсказания формы градиента при выборе системы сорбент–элюент для разделения. Из моделирования следует, что сорбент должен быть полифункциональным (например, Dien-SiO_2 или Tetren-SiO_2). Моделирование также показало, что слабоосновный несорбируемый компонент в составе элюента, используемый для подведения pH, влияет на форму ступеней на профиле градиента pH. Поэтому для получения более плавного, линейного градиента pH предпочтительно использовать либо элюенты с минимальным содержанием слабоосновного компонента, либо для сглаживания участка *a–b–c* (рис. 1, кривая 1) заменять его на слабокислотный практически несорбируемый компонент.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sluyterman L.A.AE., Kooistra C. // J. Chromatogr. 1989. V. 470. P. 317.
2. Hutchens T.W., Gibbons W.E., Besch P.K. // Ibid. 1986. V. 359. P. 157.
3. Гармаш А.В., Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // Журн. физ. химии. 1997. Т. 71. № 10. С. 1872.
4. Nesterenko P.N., Ivanov A.V. // Mendeleev Commun. 1994. № 5. P. 174.
5. Jones P., Nesterenko P.N. // J. Chromatogr. A. 1997. V. 789. P. 413.
6. Тессман А.Б., Иванов А.В., Курочкина Е.В. и др. // Теория и практика сорбционных процессов. Воронеж: РАН, 1998. Т. 23. С. 347.
7. Нестеренко П.Н., Иванов А.В., Галева Н.А. и др. // Журн. аналит. химии. 1997. Т. 52. № 8. С. 814.
8. Тессман А.Б. // Тез. докл. Междунар. конф. "Ломоносов-98". М.: Изд-во МГУ, 1998.
9. Murel A., Vilde S., Pank M. et al // J. Chromatogr. 1985. V. 347. P. 325.
10. Шнигун О.А., Золотов Ю.А. // Ионная хроматография и ее применение в анализе вод. М.: Изд-во МГУ, 1990. 199 с.
11. Subramonian S., Clifford D. // Reactive Polymers. 1988. V. 9. P. 195.
12. Гармаш А.В., Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // Журн. физ. химии. 1997. Т. 71. № 9. С. 1683.