

УДК 543.544:681.3

ВНУТРЕННИЕ ГРАДИЕНТЫ pH В ИОНООБМЕННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ: МОДЕЛИРОВАНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОВЕРКА

А.В. Иванов

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

Систематизированы литературные данные о моделировании внутренних градиентов pH, формируемых внутри ионообменных колонок с применением техники хроматофокусирования или индуцирования. Обсуждены преимущества и ограничения существующих физико-химических моделей формирования градиентов pH. Приведено сравнение экспериментально полученных градиентов с рассчитанными по различным моделям.

Одним из наиболее эффективных средств улучшения разрешающей способности хроматографической системы в целом и увеличения нагрузочных характеристик ионообменной колонки является элюирование с заданным градиентом pH. Градиенты pH в хроматографических системах создают по двум принципиальным схемам [1–4]. По первой схеме градиент получают до хроматографической колонки за счет смешивания двух или нескольких буферных растворов при разных значениях pH в системе смесителей, регулируя скорость подачи подвижных фаз по определенной программе [2, 5] или при помощи программируемого градиентного насоса [1, 2, 6]. Полученные таким способом градиенты pH можно назвать предколоночными или внешними. Они линейны в ограниченном интервале pH (не более 1,5–2,5 ед.), а для их создания необходимо дополнительное хроматографическое оборудование или специальное программное обеспечение. В качестве неподвижной фазы в этом случае обычно используют сильноосновные анионо- или слабокислотные катионообменники, сохраняющие постоянный заряд функциональных групп, гораздо реже – неионогенные сорбенты. Поскольку концентрация протолитов в составе подвижной фазы в десятки или даже в сотни раз превышает концентрацию ионогенных групп сорбента внутри хроматографической колонки, то обычно полагают, что сорбент не оказывает влияния на установление равновесий в системе, т.е. значения pH подвижной фазы на входе в колонку и на выходе совпадают [1, 3, 6, 7]. Другими словами, внешний градиент pH формируется только за счет установления протолитических равновесий в гомогенной системе до хроматографической колонки; теория формирования внешних градиентов

pH не рассматривает гетерогенные равновесия в динамической системе [1, 3]. Математический аппарат для расчета внешних градиентов pH был достаточно хорошо разработан уже к середине 1980-х гг. [1, 6], появление более поздних публикаций связано с изменением техники формирования градиента pH за счет предколоночной электрохимической или фотохимической реакции [8–11].

В 1978 г. Слайтерманом была предложена принципиально новая схема градиентного элюирования в ионообменной хроматографии [12–18], состоящая в формировании градиентов pH внутри хроматографической колонки за счет буферных свойств подвижной фазы и ионогенных групп сорбента. Для создания внутреннего градиента pH колонку, заполненную слабоосновным анионообменником, реже слабокислотным катионообменником, уравнивают стартовым буферным раствором при начальном значении градиента pH, а затем пропускают буферный элюент, представляющий собой либо раствор высокомолекулярного полиамфолита, либо смесь низкомолекулярных амфолитов и протолитов, при значении pH, соответствующем конечной точке градиента [4, 12, 15–18]. При этом функциональные группы ионообменного сорбента последовательно взаимодействуют с компонентами буферного элюента, и в динамической системе устанавливаются как гомогенные, так и гетерогенные равновесия. Внутренние градиенты отличаются более широким рабочим интервалом pH (до 4–5 ед.), высокой воспроизводимостью, а также относительной простотой аппаратного оформления. Для регенерации колонки после градиентного элюирования ее достаточно промыть стартовым раствором до установления постоянного значения pH. Вариант ионообмен-

ной хроматографии с внутренним градиентом рН авторы метода назвали хроматофокусированием (по аналогии с изоэлектрофокусированием), а предложенную технику формирования градиентов рН – техникой хроматофокусирования [12, 17]. Фокусирующий эффект в колонке приводит к тому, что пики разделяемых компонентов получаются симметричными и, как правило, достаточно узкими [4, 15–20]. Более 25 лет внутренние градиенты рН используют в хроматографии для разделения и определения или препаративной очистки биологических веществ биполярного строения, например, белков [3, 4, 21–22]. Существует возможность проводить хроматофокусирование в высокоэффективном [4] или микроколоночном [21] вариантах. В начале 1990-х гг. была разработана новая техника формирования внутренних градиентов рН, названная индуцированием [23–26]. В отличие от техники хроматофокусирования, например для индуцирования нисходящего градиента рН, через колонку постоянно пропускают разбавленный буферный элюент при низком значении рН (3–4), затем вводят в поток элюента ограниченный объем (~1–2 мл) концентрированного индуцирующего раствора при более высоком значении рН (>9). В результате система быстро уравнивается индуцирующим раствором, и на выходе из колонки наблюдается резкое повышение рН. Далее функциональные группы сорбента постепенно титруются кислотным элюентом, происходит постепенное возвращение к исходному значению рН элюента и формирование нисходящего градиента рН. При этом изократический насос подает элюент неизменного состава. Над совершенствованием техники индуцирования градиентов рН в разных вариантах (колоночной ионообменной и капиллярной хроматографии со свободной неподвижной фазой) в настоящее время активно работают П.Н. Нестеренко и А.В. Иванов на кафедре аналитической химии МГУ [27–30].

Применение техники индуцирования позволяет уменьшить время формирования градиента в 3–4 раза (поскольку нет необходимости заново уравнивать колонку стартовым раствором до начального значения рН градиента), использовать простые двух-трехкомпонентные элюенты для формирования градиента рН, а также значительно сократить расход реактивов при подборе оптимальных условий разделения [23, 30].

Несмотря на кажущуюся простоту аппаратного оформления хроматофокусирования и большой экспериментальный материал по практическому приме-

нению метода, теория формирования внутренних градиентов рН долгое время находилась на уровне самых начальных представлений. Исследователи уделяли основное внимание фокусирующему эффекту при разделении белков и приложению существующих методик к анализу новых объектов. Не существовало даже единого мнения о механизме формирования градиента рН внутри колонки [31–34]. При выборе сорбентов, а также при оптимизации состава подвижных фаз в хроматофокусировании преобладал эмпирический подход, состоящий в практическом подборе компонентов для подвижных фаз из ряда слабых кислот, оснований и амфолитов, у которых значения констант ионизации (pK) или изоэлектрические точки (pI) попадают в требуемый диапазон градиента рН [21, 35–41]. В результате получают подвижные фазы, включающие до 20–30 простых протолитов и амфолитов [36], или несколько дорогостоящих полиамфолитов [40, 41], позволяющие получить линейный градиент протяженностью до 4–5 ед. рН. Однако такой эмпирический подход чрезвычайно трудоемок, а связать форму градиента рН с составом и свойствами подвижной фазы и тем более оценить вклад отдельных компонентов не удастся. Второй подход направлен не только на выбор систем для формирования внутренних градиентов рН с помощью физико-химического и математического моделирования, но и на понимание происходящих в системе процессов и на объяснение наблюдаемых эффектов. Долгое время теоретические подходы к описанию формы получаемых градиентов рН носили иллюстративный характер, базировались в основном на аналогиях с гомогенными протолитическими равновесиями и предполагали использование таких параметров, которые трудно определить по экспериментальным данным [12, 31, 42]. Тем не менее с помощью первых физико-химических моделей, предложенных в работах [12, 13, 16, 42, 43], были установлены некоторые закономерности, связывающие форму градиента с составом и свойствами хроматографической системы. Рассмотрим эти модели подробнее.

Модели для описания гомогенной системы

Модель “буферных взаимодействий” или “последовательного титрования” (модель Слайтермана)

Первая попытка модельного описания формы градиента в зависимости от состава подвижных фаз и свойств сорбента предпринята в 1978 г. [12–13]. В модели учитывали только буферные свойства элюента и буферирующую способность ионогенных групп сорбента, поэтому в литературе ее иногда называют

моделью “буферных взаимодействий” [3, 31]. Авторы модели представляли процесс формирования градиента рН внутри ионообменной колонки в первом приближении как последовательное титрование, например, слабого полиоснования (слабоосновного сорбента) порциями слабой поликислоты или полиамфолита (т.е. буферным элюентом), поэтому предложенную модель называют также моделью “последовательных титрований” [1, 16, 17].

Колонку, заполненную ионообменным сорбентом, представляют в виде набора из N поперечных секций – зон фокусирования (по аналогии с теоретическими тарелками в изократическом варианте хроматографии); буферный элюент представляют в виде набора равных порций или аликвот. Свойства стартового раствора данной моделью не учитываются. Каждая секция колонки характеризуется определенным значением рН (pH_s); каждая аликвота элюента – значением pH_m . Объем аликвоты равен свободному объему внутри секции в колонке. В первом приближении рассчитанная на одну секцию колонки удельная буферная емкость как сорбента, так и элюента постоянна. Величины pH_s (pH_m) можно представить в виде:

$$pH_{s(m)} = pH_0 + \frac{B_{s(m)}}{a_{s(m)}}, \quad (1)$$

где pH_0 – начальное значение рН в секции колонки и соответствующей аликвоте элюента; B_s (или B_m) – количество сильного основания, которое надо добавить к порции сорбента (элюента), чтобы значение рН изменилось от начального значения pH_0 до pH_s (или pH_m соответственно); a_s (a_m) – удельные буферные емкости сорбента (элюента). Как уже отмечалось выше, при формировании градиента рН происходит титрование полибуферного сорбента полибуферным элюентом, причем одна из фаз является полиамфолитом или поликислотой, а другая – полиоснованием (так, при нисходящем градиенте сорбент выполняет роль полиоснования) [1, 12, 16]. По мере передвижения порции элюента по колонке для каждой секции устанавливается конечное значение рН:

$$pH = pH_0 + \frac{B_m + B_s}{a_m + a_s}. \quad (2)$$

Выражая B_s (B_m) через рН и буферную емкость a , получаем:

$$pH = \frac{a_m pH_m + a_s pH_s}{a_m + a_s} = \frac{pH_m + R_c pH_s}{1 + R_c}, \quad (3)$$

где R_c – отношение удельных буферных емкостей сорбента и элюента (a_s/a_m). В [12] рассмотрено формирование градиента в ограниченном диапазоне рН внутри 10-секционной анионообменной колонки, при этом объем аликвоты буферного элюента полагается равным свободному объему секции колонки. Величина рН каждой аликвоты, проходящей последовательно по секциям колонки, устанавливается в каждой секции в соответствии с уравнением (3). При определенных условиях (начальные значения рН 10 и 8 для анионообменного сорбента и буферного элюента соответственно; $R_c = 1$; через колонку пропускают 20 аликвот элюента) рассчитанный нисходящий градиент линеен в области рН от 10 до 8 [12].

Таким образом, уже первоначальное моделирование показало, что для получения плавного линейного градиента рН следует использовать подвижные фазы и сорбенты, обладающие постоянной буферной емкостью в достаточно широком диапазоне рН. Однако модель целиком базировалась на теории гомогенных равновесий, следовательно, не учитывала явлений, происходящих при распределении веществ (например, компонентов элюента) между двумя фазами. Поэтому модель “буферных взаимодействий” не позволяет объяснить многие экспериментально наблюдаемые особенности профиля градиента (например, образование ступеней).

Модель “фронтального разделения” (модель Мурела)

Из-за существенных ограничений модель “буферных взаимодействий” была пригодна только в начальный период развития теории хроматофокусирования. Рассмотрение процесса формирования градиента рН только в рамках буферного действия элюента и ионообменного сорбента не позволяет объяснить целый ряд экспериментальных фактов. Так, при использовании элюентов разного химического состава были получены сильно отличающиеся выходные кривые рН, несмотря на то, что зависимость буферной емкости от рН для этих элюентов практически идентична [14, 15, 42]. Кроме того, в терминах “буферного механизма” невозможно объяснить образование хорошо выраженных ступеней на градиентах рН, наблюдавшихся во многих экспериментах [19, 35, 36, 44–46]. Эти эффекты, по предположению А. Мурела, можно интерпретировать в рамках представлений фронтального разделения компонентов элюента, составленного из смеси амфолитов и протолитов.

В 1985–1986 гг. А. Мурелом была предложена новая модель, учитывающая гетерогенный характер си-

стемы [42, 43]. Эта модель была предложена вначале для частного случая, когда используют сильноосновной анионообменник в ОН-форме, а элюент представляет собой смесь из L полиамфолитов с концентрациями $c_{i,0}$ и значениями изоэлектрических точек pI_i ($i = 1, \dots, L$), Q – суммарная концентрация компонентов элюента. Так же, как и в модели Слайтермана, хроматографическая колонка условно разделена на N секций. Общая концентрация i -го компонента в j -й секции обозначена как $c_{i,j}$, а соответствующие концентрации для сорбента и подвижной фазы отмечены индексами s и m . В модели принимается, что концентрация ионообменных групп сорбента также равна Q (это одно из существенных допущений модели), тогда при поступлении порции элюента в первую секцию колонки все компоненты элюента полностью сорбируются. При поступлении следующей порции наблюдается перераспределение компонентов между двумя фазами. Использование коэффициента распределения i -го компонента

$$D_i = c_i^s / c_i^m \quad (4)$$

и введение величины

$$k_i = \frac{1}{1 + 1/D_i} \quad (5)$$

позволяет найти концентрацию компонента в j -й секции сорбента:

$$c_{i,j}^s = \frac{c_{i,j} k_i}{(\sum_i c_{i,j} k_i) \cdot Q} \quad (6)$$

Величину c_i^m находят по уравнению материального баланса

$$c_{i,j}^m = c_{i,j} - c_{i,j}^s \quad (7)$$

С учетом распределения компонентов элюента между фазами можно приближенно рассчитать pH эффлюента:

$$pH_j = \sum_i c_{i,j}^m pI_i / \sum_i c_{i,j}^m \quad (8)$$

Полученная система уравнений позволяет рассчитать выходные концентрационные кривые и профили градиента pH. Расчетный градиент pH и концентрационные кривые для элюента, составленного из трех амфолитов с одинаковыми значениями pI_i при $k_1:k_2:k_3 = 4:2:1$, приведены на рис. 1 (а, б). На профиле градиента отчетливо видны три участка, каждый из которых обусловлен выходом соответствующего

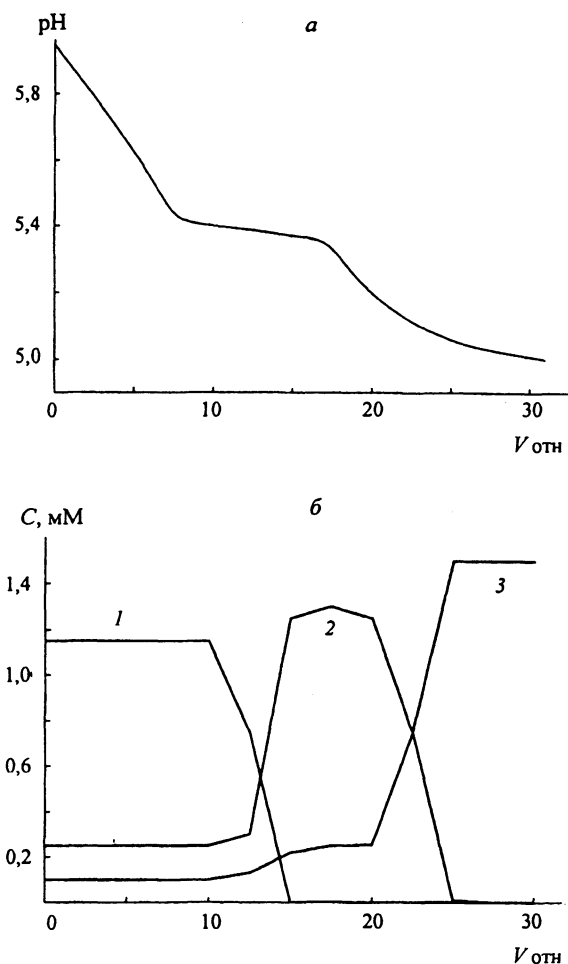


Рис. 1. Градиент pH (а) и выходные концентрационные кривые компонентов элюента (б) при пропускании 30 аликвот трехкомпонентного элюента, рассчитанные по модели Мурела. Колонка: общий объем 9 мл, $V_{\text{секции}} = 1$ мл. Элюент: трехкомпонентная смесь амфолитов ($pI_i = 4$, $c_{i,0} = 0,005$ М). $V_{\text{аликвоты}} = 1$ мл. Остальные условия приведены в тексте

этого компонента из колонки. Подобный ступенчатый профиль градиента pH невозможно объяснить в рамках модели Слайтермана.

Итак, преимущество модели Мурела по сравнению с моделью Слайтермана состоит, во-первых, в способности описывать фронтальное разделение компонентов буферного элюента. Во-вторых, Мурел впервые рассчитал и экспериментально получил нисходящие градиенты внутри колонок, заполненных анионообменными сильноосновными сорбентами, не проявляющими буферные свойства [43]. В модели Слайтермана такие сорбенты не рассматривали. Недостатки модели Мурела заключаются в том, что хотя она и учитывает гетерогенность системы, но построена на теории экстракционных равновесий и включает параметр k_i , не поддающийся непосредственному экспериментальному определению (для этого необходимо найти концентрацию i -го компонента в каждой

секции колонки). Модель Мурела не объясняет образование “аномальных” участков на профиле экспериментальных градиентов при рН, превышающем значения кислотности стартового раствора, что неоднократно наблюдали в работах [35–37, 43–45]. Более строгий подход к описанию формирования внутреннего градиента рН может быть основан на модели, учитывающей в явном виде гомогенные и гетерогенные ионообменные равновесия в динамической системе. Очевидно, что для проверки адекватности модели необходим весьма длительный и трудоемкий эксперимент, не осуществленный, к сожалению, в работах [42, 43].

Дальнейшему развитию рассмотренных “гомогенных” моделей посвящены работы [23–26, 47], где за основу взята модель “буферных взаимодействий” и сделана попытка учета гетерогенных равновесий (по аналогии с экстракционными равновесиями в модели “фронтального разделения”). Эта модель используется при расчете нисходящих и восходящих градиентов рН, получаемых по методу индуцирования. С его помощью удастся выбрать компоненты из ряда амфолитов и протолитов, сократив их число в составе элюента до 4–5, и оптимизировать их концентрацию, а также объяснить форму индуцированного градиента рН. Буферная область функциональных групп сорбента определяется экспериментально по результатам кислотно-основного титрования [25]. Однако ряд параметров (в первую очередь параметры сорбента) либо остается практически за рамками этой модели, либо заменяется “экстракционными” характеристиками, при том, что анионообменные свойства сорбентов в дальнейшем попытались учесть в феноменологической модели индуцирования градиентов ионной силы [48, 49]. Экстракционные равновесия в сочетании с полученными экспериментально протолитическими характеристиками фаз были использованы в работах [50, 51] при создании модели индуцирования восходящих градиентов рН внутри капилляров со свободной неподвижной фазой, а также в работе [52] при моделировании градиентов рН в обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Модели, учитывающие гетерогенный характер системы

Вслед за моделями Слайтермана и Мурела в 1995–1998 гг. появились модели, предложенные Д. Фреем и сотр. [31, 32, 53–57]. В отличие от предыдущих исследователей, рассматривавших систему в рамках буферных гомогенных взаимодействий или учитывавших только распределение буферных компо-

нентов между фазами, Фрей предложил две модели – модель “локальных равновесий” и модель “точного численного решения”, действительно учитывающие гетерогенность системы, что позволяет детально предсказывать форму внутреннего градиента рН в достаточно большом числе хроматографических систем [53–65]. Работы Фрея отличаются тщательной экспериментальной проверкой расчетных систем и применением подходящих систем для задач разделения. Здесь моделирование преследует несколько важных целей: а) разработку численного метода для расчета градиентов рН в ионообменных системах; б) сравнение расчетов с экспериментальными данными; в) использование расчетных данных для иллюстрации факторов, определяющих выбор системы “сорбент – буферный элюент” с учетом их общих ионных концентраций; г) использование численных методов для исследования процесса разделения белков методом хроматофокусирования.

“Гетерогенные” модели Фрея учитывают:

- 1) протолитические равновесия, протекающие в жидкой и твердой фазах;
- 2) изменение сорбционной емкости слабоосновного или слабокислотного сорбента при изменении рН в колонке;
- 3) процессы анионного обмена на функциональных группах сорбента;
- 4) массоперенос в системе, в том числе и диффузионные процессы в порах частицы сорбента (эти процессы учтены только в модели “точного численного решения”).

Кроме того, модели описывают форму внутреннего градиента рН, и процессы разделения белков на данном градиенте.

Однако моделирование по Фрею допускает ряд приближений, ускоряющих расчеты при большом числе компонентов системы, при этом не учитываются:

- 1) действительные ионные формы буферных компонентов элюента и функциональных групп сорбента, что позволяет рассчитывать их одним способом;
- 2) полиэлектролитные свойства сорбента и соответственно не полностью учитывается влияние природы сорбента на форму градиента рН [66–68];
- 3) процессы вторичной сорбции, возможные при наличии свободных функциональных групп у сорбированных веществ, например катионный обмен на сорбированных анионах двухосновных карбоновых кислот [33, 69, 70];
- 4) возможное полидентатное связывание компонентов элюента.

В работах Д. Фрея предложена стратегия выбора рабочих условий для получения градиента рН (т.е. сорбента и буферного элюента) и для разделения белков или других амфолитов в условиях градиентного элюирования [31, 54, 56, 57].

Модель “локальных равновесий”

Модель локальных равновесий учитывает только протолитические и ионообменные равновесия, протекающие в системе, и не учитывает процессы массопереноса.

Равновесия в жидкой фазе учитываются только три равновесные формы (A^- , A^0 , A^+) для каждого буферного компонента в элюенте, например,



При этом формы, в которых существует, например, двухосновная кислота, можно также представить в виде A^- , A^0 , A^+ . Тогда для равновесий можно записать выражения констант, соответствующих, например, для двухосновной кислоты константам кислотной диссоциации по первой и второй ступеням:

$$K_{A_i, \text{жид}}^1 = c_{A_i^0} c_{H^+} / c_{A_i^+}. \quad (11)$$

Далее для каждой из форм (A^- , A^0 , A^+) рассчитывают равновесную концентрацию, выражая ее стандартным образом через общую концентрацию буферного компонента, константы равновесий и концентрацию протонов в жидкой фазе. Например, для ионной формы A_i^- :

$$c_{A_i^-} = \frac{c_{A_i}}{1 + K_{A_i, \text{жид}}^1 / c_{H^+} + K_{A_i, \text{жид}}^1 K_{A_i, \text{жид}}^{\text{II}} / c_{H^+}^2}. \quad (12)$$

Выражение электронейтральности жидкой фазы выглядит следующим образом:

$$\sum_{i=1}^{N_A} (z_{A_i^+} c_{A_i^+} + z_{A_i^0} c_{A_i^0} + z_{A_i^-} c_{A_i^-}) + c_{H^+} - \frac{K_{w, \text{жид}}}{c_{H^+}} = 0, \quad (13)$$

где $K_{w, \text{жид}}$ – константа автопротолиза воды в жидкой фазе (в элюенте). Для жидкой фазы получается нелинейное уравнение $f(c_{H^+}) = 0$ с одной переменной (концентрация протонов), решенное с помощью метода Ньютона [31, 62]. Подстановка полученной концентрации протонов в уравнение (12) позволяет

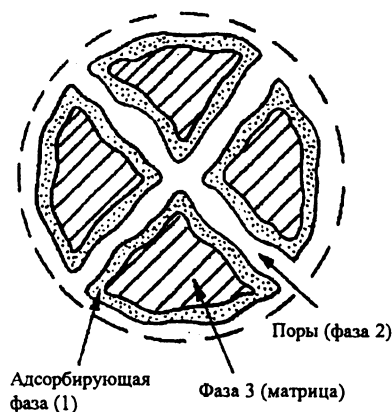


Рис. 2. Структура частицы сорбента в соответствии с моделью Фрея [31] (пояснения в тексте)

рассчитать равновесные концентрации каждой из форм буферного компонента.

Равновесия в твердой фазе. В моделях Фрея типичный сорбент можно представить в виде трех фаз [31, 63] (рис. 2). Фаза 1 (адсорбирующая или активная) содержит функциональные ионообменные группы и адсорбированные на них компоненты буферного элюента. Эта фаза является в первом приближении концентрированным раствором слабого электролита с однородно распределенными в нем функциональными группами. Фаза 2 содержит заполненные элюентом поры сорбента. Фаза 3 – инертная матрица. Функциональные группы сорбента участвуют в равновесиях, аналогичных представленным в уравнениях (9), (10):



где R^- , R^0 , R^+ – равновесные формы функциональной группы сорбента.

Для адсорбированных компонентов буферного элюента выражения констант равновесий записывают аналогично уравнению (11):

$$K_{A_i, \text{адс}}^1 = q_{A_i^0, \text{адс}} q_{H^+, \text{адс}} / q_{A_i^+, \text{адс}}, \quad (16)$$

$$K_{A_i, \text{адс}}^{\text{II}} = q_{A_i^-, \text{адс}} q_{H^+, \text{адс}} / q_{A_i^0, \text{адс}}, \quad (17)$$

где индекс “адс” обозначает концентрацию на единицу объема фазы 1. Тогда равновесные концентрации каждой из форм буферных компонентов в фазе 1 выражают аналогично равновесным концентрациям в жидкой фазе (12):

$$q_{A_i^-, \text{адс}} = \frac{q_{A_i, \text{адс}}}{1 + K_{A_i, \text{адс}}^1 / q_{H^+, \text{адс}} + K_{A_i, \text{адс}}^1 K_{A_i, \text{адс}}^{\text{II}} / q_{H^+, \text{адс}}^2}. \quad (18)$$

Выражение электронейтральности для адсорбирующей фазы выглядит так:

$$\sum_{i=1}^{N_A} (z_{A_i^+} q_{A_i^+, \text{ адс}} + z_{A_i^0} q_{A_i^0, \text{ адс}} + z_{A_i^-} q_{A_i^-, \text{ адс}}) + \sum_{i=1}^{N_R} (z_{R_i^+} q_{R_i^+} + z_{R_i^0} q_{R_i^0} + z_{R_i^-} q_{R_i^-}) + q_{H^+, \text{ адс}} - \frac{K_w, \text{ сорб}}{q_{H^+, \text{ адс}}} = 0, \quad (19)$$

где $K_{w, \text{ адс}}$ – константа автопротолиза воды в фазе сорбента. В результате получаем для фазы 1 нелинейное уравнение $g(q_{H^+, \text{ адс}} = 0)$ с одной переменной (концентрация H^+ в данной фазе), решенное методом Ньютона [31, 62].

Подстановка полученной концентрации протонов в уравнение вида (18) позволяет рассчитать равновесные концентрации каждой из форм буферного компонента в адсорбирующей фазе.

Общая концентрация ионов буферного компонента в твердой фазе, например $q_{A_i^-, \text{ адс}}$, включает в себя также концентрацию несорбированных ионов, содержащихся в порах частицы сорбента, что необходимо только для учета массопереноса в таких системах, т.е. при переходе от модели “локальных равновесий” к модели “точного численного решения”. Таким образом, “точное численное решение” не является принципиально новой моделью, его можно также назвать “моделью локальных равновесий с учетом массопереноса”. При расчете концентраций отдельных сильно адсорбирующихся ионов (наиболее характерный случай) автор модели пренебрегает этим учетом.

Межфазные равновесия. Адсорбирующую фазу можно рассматривать как гомогенный раствор. Равновесный химический потенциал любых электронейтральных комбинаций ионов один и тот же для адсорбирующей и внешней жидкой фазы, поэтому набор межфазных равновесий для отдельной ионной формы A_i^- можно представить как

$$(q_{H^+, \text{ адс}})^{-z_{A_i^-}} q_{A_i^-, \text{ адс}} = K_{A_i^-, \text{ адс}} (c_{H^+})^{-z_{A_i^-}} c_{A_i^-}, \quad (20)$$

где $K_{A_i^-, \text{ адс}}$ – равновесный параметр (коэффициент адсорбции) может быть функцией от состава адсорбирующей фазы, так как он учитывает отклонения от термодинамически идеальной системы и осмотическое давление между адсорбирующей и внешней жидкой фазами. Тогда для ионов A_i^- и A_j^- получают выражение константы стехиометрического ионного обмена:

$$K_{A_j^- A_i^-, \text{ адс}} \equiv \left(\frac{q_{A_j^-, \text{ адс}}}{c_{A_j^-}} \right)^{z_{A_i^-}} / \left(\frac{q_{A_i^-, \text{ адс}}}{c_{A_i^-}} \right)^{z_{A_j^-}} = \frac{K_{A_j^-, \text{ адс}}^{z_{A_i^-}}}{K_{A_i^-, \text{ адс}}^{z_{A_j^-}}}. \quad (21)$$

Выражая концентрации ионов в адсорбирующей фазе через их концентрации во внешней жидкой фазе и коэффициенты, можно получить функцию от одной переменной, решаемую с помощью метода Ньютона.

В общем случае параметры внешней жидкой фазы и протолитических равновесий известны, а параметры адсорбционных равновесий подбираются на основе экспериментальных данных.

В работах [31, 32, 53–65] проведено численное изучение формирования внутреннего градиента для ряда реальных хроматографических систем при расчете по модели “локальных равновесий” со следующим приближением: значения pK_a функциональных групп большинства типичных амфотерных буферных компонентов существенно различаются между собой. Титрование одной группы определяет только ее ионообменное поведение, поэтому можно считать, что все буферные компоненты являются монофункциональными слабыми электролитами. На рис. 3 показаны профиль расчетного градиента pH и выходные концентрационные кривые, типичные для экспе-

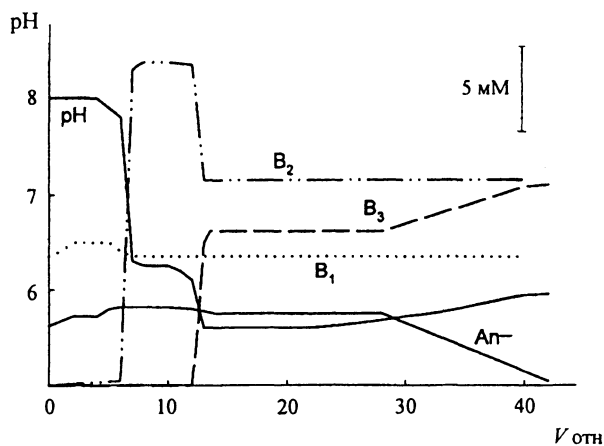


Рис. 3. Градиент pH и концентрационные кривые буферных компонентов элюента, рассчитанные по модели “локальных равновесий” Фрея [31]. Стартовый раствор: 0,05 М буфер 1 (B_1); 0,025 М инертный анион (An^-); pH 8. Элюент: 0,05 М буфер 1 (B_1); 0,083 М буфер 2 (B_2); 0,083 М буфер 3 (B_3). Остальные условия приведены в тексте

риментальных условий [31, 32, 35–37]. Анионообменная колонка уравновешена стартовым раствором (рН 8), содержащим сильную кислоту (инертный анион 1) и буферный компонент – слабое основание (буферный компонент 1) с pK_a 8. Элюент (рН 6) состоит из смеси буферных компонентов – того же слабого основания и двух слабых кислот, значения pK_a которых лежат в рабочем диапазоне рН градиента (7,0 и 6,0 соответственно). Заряды равновесных форм основания и двух кислот (z_i) составляют соответственно 1; 0; 0. Значения pK_a функциональных групп сорбента были выбраны близкими к значениям pK_a полиэтиленimina, иммобилизованного на агарозе или сефарозе [18, 19, 46]. Подобные сорбенты содержат два типа функциональных групп: сильноосновные и слабоосновные. При проведении расчетов принималось, что количество этих групп на сорбенте одинаково. Для слабоосновной функциональной группы сорбента $pK_a = 8,25$. Емкость сорбента (общая концентрация функциональных групп) составляет 1,0 М, диаметр частиц сорбента – 100 мкм, а коэффициент диффузии в порах сорбента для всех заряженных форм – 10^{-6} см²/с. Коэффициенты адсорбции всех форм буферных компонентов элюента ($K_{A_i^-, адс}$ и $K_{A_i^0, адс}$) равны 1. Наличие несорбированных веществ в порах сорбента не учитывали. Как показано на рис. 3, на начальном участке градиента наблюдается небольшое увеличение рН. Впоследствии было установлено, что это связано с наличием достаточного количества незаряженной формы буферного компонента 1 (слабого основания) в сорбенте после пропускания стартового раствора, так как значение рН стартового раствора близко к величине pK_a буферного компонента 1 [69, 71, 72]. Затем следуют два участка резкого падения рН, связанные с адсорбцией буферных компонентов 2 и 3 соответственно и выходом первоначально адсорбированного инертного аниона. Концентрационные кривые, представленные на рис. 3, подтверждают зависимость емкости сорбента и общей ионной концентрации, способствующей десорбции белков [31, 63], от величины рН.

Сравнение расчета по модели “локальных равновесий” и “точного численного решения” (с учетом массопереноса в системе)

В публикациях [54–59] проведено сравнение профилей градиентов рН, рассчитанных с учетом массопереноса в системе (DNS, Detailed Numerical Solution) и без учета (LEQ Th, Local Equilibrium Theory). На рис. 4 показаны два профиля градиента

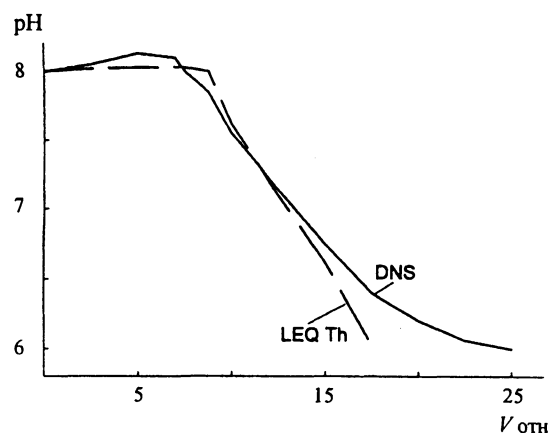


Рис. 4. Сравнение градиентов рН, рассчитанных по модели “локальных равновесий” без учета массопереноса (LEQ Th) и “точного численного расчета” (DNS) в анионообменной системе [56, 57]. Колонка: заполнена слабоосновным анионообменником, свободный объем 0,35 относительно объема колонки. Стартовый раствор (рН 8) и элюент (рН 6) одинакового состава. Остальные условия приведены в тексте

рН для следующей системы: сорбент с тремя типами слабоосновных функциональных групп (pK_a 9,6; 8,6; 7,6; концентрация каждого вида групп в колонке 0,3333 М); стартовый раствор и элюент содержат три слабых основания, значения pK_a которых составляют 8; 7 и 6, а концентрация – 0,1 и 0,0362 М, и хлорид-ион (концентрация не указана). Коэффициенты адсорбции и коэффициент диффузии такие же, как и в условиях, приведенных для рис. 3. Профили градиента рН (DNS) и рН (LEQ Th) соответствуют расчету с учетом и без учета массопереноса в системе соответственно. Очевидно, что градиенты различаются незначительно, в основном на начальном участке (рН ~8) и в области рН ниже 6,5. Они имеют одинаковую протяженность линейного участка в ед. рН, но профиль, соответствующий точному расчету (DNS), несколько протяженнее в единицах относительных объемов колонки. Проведено сравнение профилей градиентов рН, рассчитанных с учетом и без учета массопереноса, и экспериментальных градиентов. На рис. 5 представлены нисходящие градиенты рН для анионообменного сорбента РВЕ-94, широко используемого в хроматофокусировании [4, 18, 56]. Стартовый раствор (диэтаноламин, DEA) и элюент (смесь би-(2-гидроксиэтил)имино-три(гидроксиэтил)метана, Bis-Tris, и диэтанолamina) часто используют в реальных системах для хроматофокусирования [18, 35–37]. Значения pK_a для Bis-Tris и DEA равны 6,5 и 8,9 соответственно. Коэффициенты адсорбции компонен-

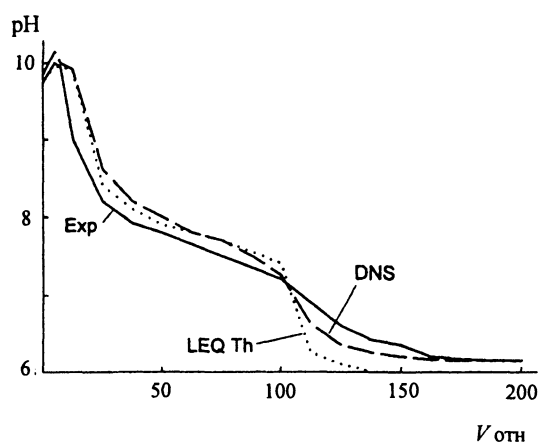


Рис. 5. Сравнение экспериментального градиента pH (Exp) с рассчитанными по модели “локальных равновесий” с учетом массопереноса (DNS) и без учета (LEQ Th) для реальной системы [56, 57, 62]. Колонка: 12,8r1,0 см, сорбент PBE-94, емкость сорбента q_R 0,75 М. Стартовый раствор: 0,05 М DEA – HCl (pH 10,2). Элюент: 0,017 М DEA и 0,017 М Bis-Tris – HCl (pH 6,1), скорость подачи элюента 1,0 мл/мин. Остальные пояснения приведены в тексте

тов элюента и коэффициент диффузии внутри частицы сорбента такие же, как и в условиях, приведенных для рис. 3. В системе учитывали присутствие так называемого “инертного иона” – иона Cl^- , что, вероятно, было учтено в модели Фрея после появления публикаций [33, 66–68]. Коэффициент адсорбции иона Cl^- составляет 0,85. Профили расчетных градиентов (DNS и LEQ Th) практически симбатны при значениях pH от 10 до 7, экспериментально полученный градиент (Exp) хорошо согласуется с расчетными данными. Некоторое отличие в форме участков при pH < 7 (в случае расчета по модели “локальных равновесий” без учета массопереноса они выражены более резко) не имеет особого значения, так как протяженность рабочего участка pH (от ~8,5 до ~7,2 ед. pH) совпадает, а этого достаточно, чтобы судить о пригодности данного градиента pH для решения практических задач.

Таким образом, на основании расчетов Фрея можно сделать вывод о том, что во многих случаях при моделировании внутренних градиентов pH процессы массопереноса в хроматографической системе можно не учитывать, так как они незначительно влияют на профиль градиента. Учет процессов массопереноса значительно замедляет расчет, что не всегда оправдано [59, 62, 70].

С помощью моделирования Фрей с соавт. показал и экспериментально подтвердил, что для получения

внутренних градиентов pH принципиально возможно использовать в качестве жидкой фазы элюенты, состоящие из небольшого числа буферных компонентов (“элюенты простого состава”), вместо обычно применяемых синтетических полиамфолитных элюентов или многокомпонентных буферных элюентов, что позволяет существенно снизить стоимость метода хроматофокусирования при его рутинном препаративном и аналитическом использовании [56, 57, 59, 61, 62, 65]. В работах Фрея впервые много внимания уделено количественной проверке результатов, полученных при моделировании, и, наоборот, мало – объяснению наблюдаемых ранее эффектов при помощи модельных представлений. Однако, как уже говорилось выше, модели Фрея не лишены недостатков, самый существенный из которых – игнорирование полиэлектролитных свойств полифункциональных сорбентов. Кроме того, при расчетах максимальное число буферных компонентов в стартовом растворе не превышает двух, а в элюенте – трех.

Ионообменная динамическая модель

На кафедре аналитической химии МГУ в научной группе П. Нестеренко накоплен большой экспериментальный материал по формированию внутренних градиентов в различных системах [3, 27, 30, 71, 72], что позволило разработать собственную модель для расчета градиентов pH внутри ионообменных колонок. В 1996–1997 гг. А. Гармаш с соавт. предложил “ионообменную динамическую модель” для системы, содержащей анионообменник, набор кислот в качестве типичного неамфолитного элюента, а также ионы Na^+ и Cl^- [33, 34, 66–68]. В этой модели впервые уделено внимание ионной силе подвижных фаз. В дальнейшем А. Тессман и А. Иванов дополнили модель с учетом присутствия слабого основания в стартовом растворе и элюенте [69–71, 73, 74]. Рассмотрим подробнее равновесия в системе и ее характеристики.

Физико-химическая модель. Сорбент – слабоосновный анионообменник на основе кремнезема, химически модифицированного аминок группами. Он характеризуется максимальной удельной емкостью и константами (или коэффициентами) соответствующих равновесий (см. ниже), рассчитанными на основе экспериментальных данных. Химическую неоднородность сорбента и его термодинамическую неидеальность формально учитывали с помощью эмпирической зависимости константы протонирования (K_p) аминок групп от степени протонирования (α) и ионной

силы раствора (I) [66, 75]. Заметим, что K_p в данной гетерогенной системе имеет размерность ммоль/г/моль²/л². Коэффициенты остальных равновесий в модели Гармаша принимали постоянными.

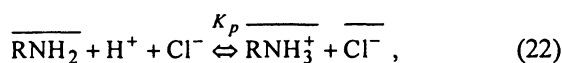
Характеристиками хроматографической колонки в модели служили число секций (или зон фокусирования по терминологии Слайтермана) и отношение массы сорбента (γ) к свободному объему колонки (мл). Число секций варьировали от 50 до 200.

В качестве стартового рассматривали раствор, содержащий слабое основание (pK_a 8,06)* и сильный электролит NaCl, разные концентрации которого позволяли создавать требуемые значения ионной силы и pH. Природа катиона в данной модели не играет существенной роли.

В качестве элюента рассматривали модельный раствор, содержащий в заданных концентрациях кислоты и сильный электролит NaCl. Анионы слабых кислот в подвижной фазе названы активными (pH-определяющими) компонентами, а ионы Na^+ и Cl^- – инертными компонентами (не определяющими pH в явном виде). Элюенты, содержащие только один активный компонент, независимо от числа инертных, названы в модели однокомпонентными.

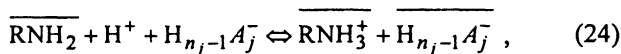
Рассмотрим подробнее основные равновесия в модельной системе.

Аминогруппы сорбента протонируются с одновременным связыванием противоиона Cl^- :



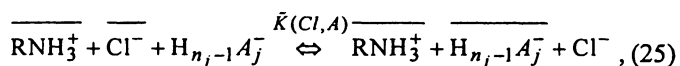
$$K_p = \frac{[\overline{\text{RNH}_3^+}][\text{Cl}^-]}{[\overline{\text{RNH}_2}][\text{H}^+][\text{Cl}^-]} . \quad (23)$$

Возможно также протонирование аминогрупп сорбента со связыванием противоиона H_{n_j}A_j либо с образованием ионов в фазе сорбента



либо с образованием ионных пар.

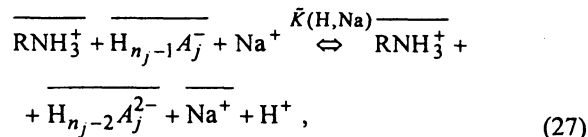
В модели учтен собственно ионный обмен – модондентатное связывание противоиона Cl^- либо с образованием ионов в фазе сорбента



$$\bar{K}(\text{Cl}, A) = \frac{[\overline{\text{H}_{n_j-1}\text{A}_j^-}][\text{Cl}^-]}{[\overline{\text{H}_{n_j-1}\text{A}_j^-}][\text{Cl}^-]} , \quad (26)$$

либо с образованием ионных пар.

При сорбции анионообменником многоосновных кислот, т.е. при $n_j > 1$, возможен вторичный катионный обмен H^+ на Na^+ , как для ионов в фазе сорбента



$$\bar{K}(\text{H}, \text{Na}) = \frac{[\overline{\text{H}_{n_j-2}\text{A}_j^{2-}}][\text{Na}^+][\text{H}^+]}{[\overline{\text{H}_{n_j-1}\text{A}_j^-}][\text{Na}^+]} , \quad (28)$$

так и для ионных пар. В работах [33, 34, 66–68] отмечается, что в системе возможны также полидентатное связывание противоионов и сверхэквивалентная сорбция протолитов, однако при моделировании их не учитывали. Образование ионных пар на первом этапе не рассматривали. Модель включает также выражения констант всех гомогенных равновесий в подвижной фазе и уравнения материальных балансов для каждого активного компонента, т.е. каждой кислоты, инертных ионов Cl^- и Na^+ и ионогенных групп ионообменника, например, для кислоты A_j (заряды ионов для простоты опущены):

$$N_j = V \sum_{i=0}^{n_j} [\text{H}_i\text{A}_j] + m \sum_{i=0}^{n_j} [\overline{\text{H}_i\text{A}_j}] , \quad (29)$$

где N_j – количество моль j -й кислоты, V – объем подвижной фазы, m – масса сорбента в колонке. Для ионогенных групп сорбента материальный баланс имеет вид:

$$[\overline{\text{RNH}_3^+}] + [\overline{\text{RNH}_2}] = q' , \quad (30)$$

где q – максимальная удельная обменная емкость сорбента.

В модели также учтена электронейтральность обеих фаз, например, при эквивалентном ионном обмене уравнение электронейтральности имеет вид:

*Это значение pK_a такое же, как и у Трис, часто используемого в качестве компонента подвижных фаз для хроматофокусирования.

$$\overline{[\text{RNH}_3^+]} = \overline{[\text{Cl}^-]} + \sum_j \overline{[\text{H}_{n_j-1}\text{A}_j^-]}, \quad (31)$$

$$\overline{[\text{Na}^+]} = \sum_j \sum_{i=2}^{n_j} (i-1) \overline{[\text{H}_{n_j-i}\text{A}_j^-]}, \quad (32)$$

Математическая модель формирования внутреннего градиента pH основана на предварительном расчете состава фазы анионообменного сорбента, уравновешенного стартовым раствором и послынным расчете состава в секциях колонки при пропуске элюента. Предварительный расчет состава фазы сорбента при условии постоянства K_p аминокрупп сводится к единственному квадратному уравнению относительно равновесной концентрации RNH_3^+ или Cl^- ; при непостоянстве K_p используется итерационная процедура по методу Давидона–Флетчера–Пауэла [33, 70, 76, 77]. Послынный расчет состава фаз в секциях колонки включает две чередующиеся операции: перенос порции подвижной фазы из $(i-1)$ -й в i -ю зону и расчет равновесных составов обеих фаз i -й зоны. Для такого расчета необходимо использовать систему уравнений (23), (26), (28), дополненную уравнениями материальных балансов (29), (30) и электронейтральности (31), (32), а также уравнениями всех протолитических равновесий, протекающих в подвижной фазе с участием кислот H_{n_j}A_j , поскольку на этом этапе равновесный состав элюента в каждой секции в отличие от стартового раствора заранее не задан и должен рассчитываться совместно с составом фазы анионообменника. При условии постоянства K_p аминокрупп сорбента была получена система из трех уравнений с переменными $[\text{H}^+]$, $[\text{Na}^+]$, $[\text{Cl}^-]$, т.е. из уравнения электронейтральности подвижной фазы

$$\sum_{j=1}^m a_j (\text{H}^+, \text{Na}^+, \text{Cl}^-) \left[\frac{K_{j1}^{(a)}}{[\text{H}^+]} + 2 \frac{K_{j1}^{(a)} K_{j2}^{(a)}}{[\text{H}^+]^2} + \dots \right. \\ \left. + n_j \frac{K_{j1}^{(a)} \dots K_{jn_j}^{(a)}}{[\text{H}^+]^{n_j}} \right] + [\text{Cl}^-] + \frac{K_w}{[\text{H}^+]} = [\text{Na}^+] + [\text{H}^+], \quad (33)$$

и уравнений электронейтральности сорбента

$$\frac{K_p [\text{H}^+] [\text{Cl}^-] q (m/V)^2}{K_p [\text{H}^+] [\text{Cl}^-] m/V + c_{\text{Cl}^-} [\text{Cl}^-]} = c_{\text{Cl}^-} - [\text{Cl}^-] + \\ + \sum_{j=1}^m a_j (\text{H}^+, \text{Na}^+, \text{Cl}^-) \cdot \frac{\bar{K}(\text{Cl}^-, \text{A}_j^-) K_{j1}^{(a)} (c_{\text{Cl}^-} - [\text{Cl}^-])}{[\text{Cl}^-] [\text{H}^+]}, \quad (34)$$

$$c_{\text{Na}^+} - [\text{Na}^+] = \sum_{j=1}^m a_j (\text{H}^+, \text{Na}^+, \text{Cl}^-) \times$$

$$\times \frac{\bar{K}(\text{Cl}^-, \text{A}_j^-) K_{j1}^{(a)} (c_{\text{Cl}^-} - [\text{Cl}^-])}{[\text{Cl}^-] [\text{H}^+]}$$

$$\times \left[2 \bar{K}_{n_j-1} \frac{[\text{Na}^+]}{(c_{\text{Na}^+} - [\text{Na}^+]) [\text{H}^+]} + \dots \right.$$

$$\left. \dots + n_j \bar{K}_{n_j-1} \dots \bar{K}_1 \left(\frac{[\text{Na}^+]}{(c_{\text{Na}^+} - [\text{Na}^+]) [\text{H}^+]} \right)^{n_j-1} \right], \quad (35)$$

где a_j – концентрация молекулярной формы j -й кислоты в растворе, являющаяся функцией от $[\text{H}^+]$, $[\text{Na}^+]$, $[\text{Cl}^-]$; c_{Cl^-} и c_{Na^+} – общая концентрация ионов сильного электролита, K – константа или коэффициент соответствующего равновесия (22), (24), (25), (27). При отсутствии многоосновных кислот система (33)–(35) сводится к системе из двух уравнений (33), (34) с переменными $[\text{H}^+]$ и $[\text{Cl}^-]$, решаемой методами, хорошо известными из работ [76–78].

Для учета непостоянства протолитических свойств аминокрупп сорбента в систему уравнений (33)–(35) или (33), (34) включали экспериментальную функцию $\lg K_p$ от I и α [75]. Коэффициенты гетерогенных равновесий $K(\text{Cl}, \text{A})$ и $K(\text{H}, \text{Na})$ (26), (28), принимаемые в ходе расчета постоянными, разработчики модели оценивали из литературных данных, но чаще – на основе специально поставленных экспериментов [79, 80]. В большинстве предыдущих моделей константы или коэффициенты равновесий нередко подгоняли.

Результаты, полученные с помощью ионообменной динамической модели, разделяют на три группы [66–68, 70].

1. Факты и закономерности, ранее неоднократно наблюдаемые в реальных экспериментах и достаточно легко объяснимые на основе наиболее общих, качественных представлений о механизмах процессов (эти закономерности частично отражены и в разработанной ранее гомогенной модели Мурела [42, 43]). К таким результатам относят резкое снижение pH при использовании однокомпонентных элюентов или же элюентов с малым (до 3) количеством активных компонентов вследствие фронтального разделения (кривая pH на рис. 3); сглаживание профиля градиента pH при увеличении числа активных компонентов элюента (рис. 6, а), при использовании многоосновных кислот или полифункциональных анионообменных сорбентов.

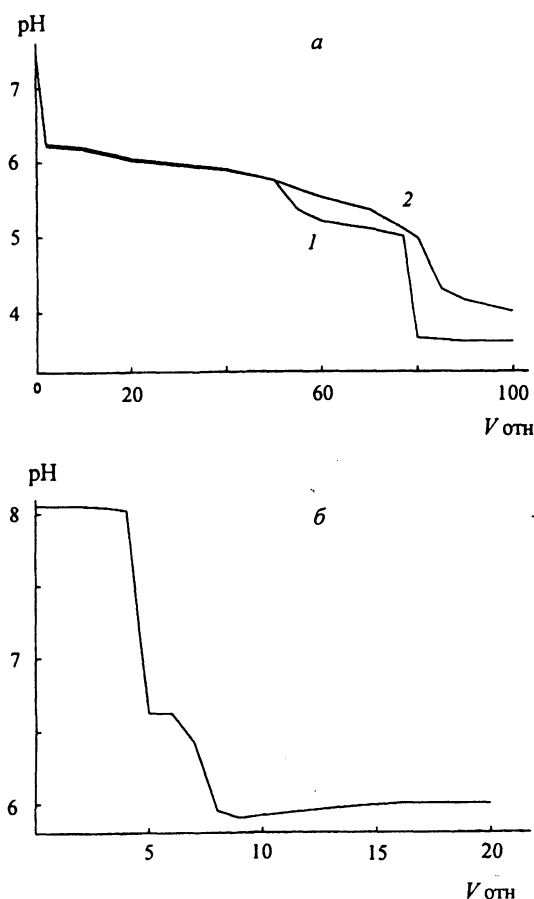


Рис. 6. Градиенты рН для многокомпонентных элюентов, рассчитанные по ионообменной динамической модели [66, 67, 70]. Сорбент: анионообменный, $\lg K_p$ 8,0; $K(\text{Cl}, \text{A})$ 0,1: а – элюент – смесь трех одноосновных кислот HA_j (по 0,7 мМ каждой), pK_a 3,0; 5,0; 7,0 (1) и 9 кислот HA_j (по 0,2 мМ каждой), pK_a 3,0; 3,5; ...; 6,5; 7,0 (2); инертный компонент 0,001 М NaCl ; б – расчет для системы, приведенной на рис. 3

2. Эффекты, которые ранее неоднократно наблюдали в экспериментах [13–16, 19, 35–37, 42–46], однако не могли объяснить в рамках гомогенных моделей формирования градиента рН. Например, эффект “аномального” повышения рН в первых порциях эфлюента [35, 36, 43–45], который был обнаружен расчетным путем для монофункционального слабоосновного анионообменного сорбента ($\lg K_p$ 8) при наличии в элюенте многоосновных кислот, а также для монофункционального сильноосновного ($\lg K_p$ 11–12) и для полифункционального слабоосновного сорбентов [68, 70]. При экспериментальной проверке было получено заметное “аномальное” увеличение рН (превышающее значения рН стартового раствора) для систем, аналогичных рассмотренным модельным [69, 71, 73, 74], что говорит о преимуществах предложенной модели по сравнению с “гомогенными”.

3. Эффекты, проявившиеся в результате моделирования, но ранее не наблюдавшиеся при формировании внутренних градиентов рН. К ним надо отнести все явления, связанные с параметрами ионного обмена и существенным влиянием ионной силы. На этих эффектах следует остановиться особо. В соответствии с представлениями о “буферном” или “фронтальном” механизмах формирования градиента рН ранее совершенно не уделялось внимания инертным компонентам элюента, не обладающим протолитическими свойствами, а эксперименты по влиянию сильных электролитов на профиль градиента рН вообще не проводились. Между тем роль сильного электролита в подвижных фазах весьма существенна, поскольку инертные компоненты (Na^+ , Cl^-) непосредственно участвуют во всех процессах анионного и катионного обмена в хроматографической системе. Сюда же следует отнести образование двух ионообменных фронтов при использовании однокомпонентных элюентов, когда первый фронт вызывается обменом сорбированных ионов Cl^- на анион кислоты, а второй – дополнительной сорбцией Cl^- за счет увеличения степени протонирования при снижении рН [34, 66, 67]. Расчетным путем показано, что более плавные градиенты рН с квази-линейными участками могут быть получены в случае низких (до 10^{-2}) коэффициентов анионного обмена $K(\text{Cl}, \text{A})$ [34, 67, 70], а также когда концентрация инертного компонента сравнима с концентрацией протолитов в элюенте [34]. Существенное влияние ионной силы подвижных фаз на профиль внутреннего градиента рН подтверждено экспериментально на примере различных ионообменных систем. Так, удается полностью устранить “аномальное” увеличение рН на начальном участке и сделать более плавным профиль градиента при правильном выборе сильного электролита и его концентрации в стартовом растворе и элюенте [34, 81]. С помощью эксперимента и физико-химического моделирования обосновано, что в анионообменных системах для формирования плавного градиента рН следует создавать ионную силу в элюенте ниже, чем в стартовом растворе (до 0,01–0,05) [69, 70, 82], а в катионообменных системах – достаточно высокую (до 0,1), равную в обеих подвижных фазах [72, 83]. Показано, что при правильном выборе ионной силы возможно формирование квази-линейного градиента протяженностью более 2,5 ед. рН даже при использовании однокомпонентного элюента – на основе щавелевой [82], уксусной [30] или глутаминовой [72] кислоты. Подобные системы авторы использовали

для разделения модельных смесей аминокислот или ионов переходных металлов [30, 82].

Как уже отмечалось выше, учет инертных компонентов в модели Гармаша заинтересовал и других исследователей, моделирующих градиенты рН в хроматофокусировании. Так, в модель “локальных равновесий” Фрея были включены представления об инертных компонентах [58, 59, 61–64].

Сравнение “гомогенных” моделей с “гетерогенными”. Экспериментальная проверка моделей

“Гомогенные” модели Слайтермана и Мурела, позволившие в свое время сформулировать ряд принципов для выбора подвижных фаз и сорбентов в хроматофокусировании, не позволяют рассчитывать профили градиентов с “аномальными” увеличениями рН (таблица). В рамках моделей [12–17, 42, 43] при смешении двух гомогенных растворов (“раствора” сорбента и элюирующего буферного раствора элюента с разными значениями рН) никогда не может образоваться эфлюент с “аномальным” значением рН, превышающим рН стартового раствора. Таким же “аномальным” в рамках этих моделей можно считать снижение рН эфлюента ниже значения, созданного в элюенте, что наблюдается в ряде экспериментов [31, 56, 57, 70]. Первые модели не учитывают природу сорбента (кроме упрощенного учета протолитических свойств), влияние ионной силы подвижных фаз и гетерогенность хроматографической системы в целом. Экспериментальная проверка моделирования в работах Слайтермана и Мурела еще не была систематической, и профили экспериментальных градиентов зачастую совпадали с расчетными лишь на отдельных участках. Вопрос о количественной проверке модели в этих работах даже не ставился, а полученные результаты носили сугубо иллюстративный характер (таблица).

“Гетерогенные” модели. Сравнение градиентов, рассчитанных по модели Гармаша [34, 66–68, 70, 71, 73], с градиентами, полученными по модели Фрея, учитывающей гетерогенность системы и процессы массопереноса [31, 32, 53–65], показывает, что для двух-трехкомпонентных смесей одноосновных кислот результаты схожи. На рис. 6, б приведен профиль внутреннего градиента рН, рассчитанного [70] по ионообменной динамической модели для системы, аналогичной представленной на рис. 3 (кривая рН). Даже несмотря на то, что в ионообменной динамической модели не учтены процессы массопереноса (таблица), основные характерные участки на профи-

ле этих градиентов совпадают, и в обоих случаях в последних порциях эфлюента наблюдается незначительное повышение рН. Экспериментальный градиент, полученный внутри колонки с аминопропил-силикагелем AP-SiO₂ [70], также хорошо согласуется с представленными на рис. 3 и 6, б кривыми. Объяснение возникновения характерных участков градиента в моделях Гармаша и Фрея также во многом совпадает. Поскольку учет массопереноса незначительно сказывается на профиле модельного градиента, но заметно увеличивает продолжительность расчета, то в большинстве случаев можно обойтись без такого учета – это не приведет к неполноценности ионообменной динамической модели. Тем более что и Фрей в своих последних работах практически отказался от рассмотрения процессов массопереноса [62–65].

Как уже отмечалось выше, Фрей и сотр. никогда не проводили расчеты для элюентов или стартовых растворов с числом активных компонентов больше трех, тогда как в работах Гармаша и соавт. показаны результаты моделирования для девятикомпонентных элюентов [34, 66–68, 70] (рис. 6, а). В работах Фрея не приведены также расчеты для многоосновных кислот в составе элюента. Однако системы из многоосновных кислот при расчете по ионообменной динамической модели вычисляются достаточно долго (до 10–20 ч, а иногда и значительно дольше, особенно для полифункциональных сорбентов), и учет каждого дополнительного компонента в такой системе значительно увеличивает продолжительность расчета. Поэтому для ускорения расчетов, когда необходимо выяснить значение рН только на отдельных характерных участках градиента, была предложена программа “ABC”, описывающая систему как гетерогенную смесь кислот и оснований [70, 84].

Доработанные версии моделей “локальных равновесий” и “точного численного расчета” учитывают влияние ионной силы элюента, но только в виде протекания дополнительных ионообменных процессов [58, 59, 61–64]. Влияние ионной силы на кислотно-основные свойства сорбента (учет полиэлектролитных свойств функциональных групп сорбента) в моделях Фрея не рассматривался (таблица). Поэтому возникновение начальных “аномальных” участков на профиле градиента рН в модели “локальных равновесий” и “точного численного решения” связывается только с наличием несорбируемого слабого основания (например, Три или гистидина) в подвижных фазах [57–63], что во многих случаях не совсем верно.

Основные характеристики моделей формирования внутренних градиентов pH

Модель	Система			Основные равновесия в системе	Ограничения	Экспериментальная проверка	Литература
	сорбент	стартовый раствор	элюент				
"Буферных взаимодействий" (1978–1981 гг.)	слабоосновный анионообменник, слабокислотный катионообменник (как гомогенный раствор)	не учтен	смесь слабых одноосновных кислот (не более трех)	гомогенные протолитические	совсем не учтен гетерогенный характер системы	единичные эксперименты (качественное совпадение линейных участков градиентов)	[12–15, 17]
"Фронтального разделения" (1985–1986 гг.)	слабоосновный или сильноосновный анионообменники (как экстрагент)	не учтен	смесь слабых кислот (не более трех)	гомогенные протолитические, экстракционные	не учтен ионный обмен в системе	проверка некоторых модельных градиентов (качественное совпадение "ступеней" на профиле градиентов)	[42, 43]
"Локальных равновесий" (LEQ Th) (1995–1998 гг.)	слабоосновный, реже – сильноосновный анионообменник	слабое основание	смесь слабых кислот и оснований (не более трех)	протолитические в гетерогенной системе с учетом изменения емкости сорбента	не учтены полиэлектролитные свойства сорбентов и влияние сильного электролита	систематическая проверка всех модельных градиентов (полное совпадение на линейных участках градиентов)	[31, 32, 53–65]
"Точное численное решение" (DNS) (1997–2000 гг.)	тот же	тот же	смесь слабых кислот и оснований (не более трех)	те же с учетом массопереноса в системе, включая диффузию в порах сорбента	те же	систематическая проверка (полное совпадение на линейных участках градиентов, "аномальных" начальных участков)	[32, 58–62, 65]
Дополненные версии LEQ Th и DNS (с учетом ионного обмена) (2000–2003 гг.)	тот же	тот же	смесь слабых кислот и оснований (не более трех), инертный анион	те же, с учетом дополнительного ионного обмена для инертных анионов	не учтены полиэлектролитные свойства сорбентов	проверка некоторых модельных градиентов (совпадение линейных участков, качественное совпадение "ступеней")	[58, 59, 61–64]
Ионнообменная динамическая модель (1997–2000 гг.)	слабоосновный анионообменник с полиэлектролитными свойствами	слабое основание и сильный электролит (инертный компонент)	смесь слабых кислот (для одноосновных – до 9 компонентов) и оснований; сильный электролит	протолитические и ионообменные в гетерогенной системе; вторичный катионный обмен (на кислотах)	не учтены массоперенос в системе, влияние матрицы сорбента	Проверка влияния основания и сильного электролита в подвижных фазах, подтверждение предсказанных эффектов. Совпадение всех характерных участков градиентов	[33, 34, 66–71, 73, 84]

Совпадение расчетных и экспериментальных градиентов рН. Проверка адекватности модели включает проверку как предпосылок, положенных в ее основу, так и эффектов, предсказанных с ее помощью. Экспериментальное подтверждение предпосылок или нахождение ряда модельных параметров может оказаться весьма трудоемкой задачей. Поэтому в первую очередь следует хотя бы на качественном уровне проверять эффекты, предсказанные с помощью моделирования, но экспериментально пока не наблюдавшиеся. Для рассмотренных “гетерогенных” моделей это эффект влияния слабог сорбируемого основания и инертного электролита в подвижных фазах. Влияние перечисленных компонентов подвижной фазы на профиль градиента рН экспериментально проверено в работах [32, 56, 58, 59–62], а также в [30, 69, 72–74, 81–83]. Варьирование не только концентрации сильного электролита, но и его природы, т.е. модельного параметра $K(\text{Hal}, \text{A})$, может оказаться весьма эффективным средством управления формой градиента, позволяющим сглаживать ступени на профиле градиента и получать квази-линейные градиенты рН, что уже подтверждается рядом предварительных экспериментов [70, 81, 82].

На рис. 7 показан экспериментальный градиент рН, полученный при пропускании 0,005 М уксусной кислоты через колонку с сорбентом Tetrap-SiO₂ (силикагель с привитыми группами тетраэтиленпентамина), предварительно уравновешенную 0,025 М раствором Трис-НСl до рН 7,5. Ионную силу в подвижных фазах создавали добавлением NaCl. Для сравнения приведены градиенты рН, рассчитанные для данной системы по “гомогенным” и “гетерогенным” моделям. На профиле экспериментального градиента (рис. 7, кривая 2), наблюдается увеличение рН на 0,1–0,2 ед., затем рН эфлюента плавно снижается до 6,8–6,9 за счет ионного обмена (в данном случае хлорида на ацетат). Вторая ступень на профиле градиента в области рН 4,6–4,7 несколько сглажена, поскольку здесь фронты выхода ионов Cl⁻ и CH₃COO⁻ частично перекрываются. Сглаживанию второй ступени способствуют также полиэлектролитные свойства аминогрупп сорбента. На профиле градиента рН (кривая 1), рассчитанного по модели Гармаша или Фрея, можно выделить те же участки: начальное увеличение рН до 7,6, плавное уменьшение рН до 6,9, резкое падение рН до второй ступени (5,2–5,3) и снова плавное уменьшение до значения рН элюента. Некоторое различие в профиле и положении вторых ступеней градиента связано, вероятно,

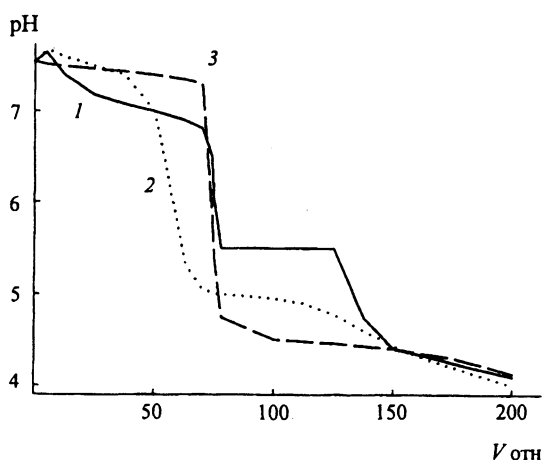


Рис. 7. Сравнение экспериментального и модельных градиентов рН [61, 70] для системы: стартовый раствор: 0,025 М Трис-НСl (рН 7,5, I_{NaCl} 0,002); элюент: 0,005 М уксусная кислота (рН 3,5, I_{NaCl} 0,005), 1 мл/мин; колонка: сорбент Tetrap-SiO₂, (7,5 мкм) или его модель, $K(\text{Cl}^-, \text{CH}_3\text{COO}^-)$ 0,1. 1 – градиент рН по моделям Гармаша и Фрея; 2 – экспериментальный градиент; 3 – градиент по моделям Слайтермана или Мурела

с недостаточно точным моделированием свойств сорбента (для описания протолитических и полиэлектролитных свойств сорбента в ионообменной динамической модели использован полином $\lg K_p = f(I^{1/2}, \alpha)$, а в модели “локальных равновесий” полиэлектролитные свойства сорбента не учтены). Таким образом, хотя и существует некоторое различие между экспериментальным и расчетным градиентами рН, подобное совпадение можно считать достаточным, если учесть большую сложность процессов, протекающих в хроматографической системе.

На рис. 7 (кривая 3) показан усредненный профиль градиента, рассчитанного по “гомогенным” моделям Слайтермана и Мурела. Видно, что “гетерогенные” модели воспроизводят характерные участки на профиле градиента рН (аномальное увеличение рН на начальном участке и наличие двух фронтов для однокомпонентной системы), т.е. их можно успешно использовать для предсказания формы градиента при выборе системы “сорбент–элюент”. Более того, полное совпадение расчетного и экспериментального градиентов рН в большинстве случаев и не требуется. Положение и протяженность характерных участков, а также профиль градиента позволяют грамотным пользователям, имеющим большой практический опыт по формированию внутренних градиентов рН, судить о пригодности градиента в данных хроматографических условиях для решения поставленных задач [70, 85].

Заключение

Анализ моделей “локальных равновесий” и “точного численного решения”, а также ионообменной динамической модели, позволяют предположить, что их дальнейшее развитие будет связано с более точным описанием полиэлектролитных свойств слабоосновных анионообменных сорбентов, а также с учетом природы анионов сильного электролита, особенно при совместном присутствии нескольких электролитов.

Вероятно также, что “гетерогенные” модели, описывающие формирование градиентов рН по классической схеме, будут дополнены описанием индуцированных градиентов, тем более что “гомогенные” модели индуцирования градиентов уже существуют

[23–26, 48, 50]. Появляются отдельные работы, посвященные теоретическим основам формирования нисходящих градиентов рН в колонках с неполярными сорбентами в варианте ОФ ВЭЖХ [52, 86–89] или в капиллярных колонках, заполненных сильноосновными анионообменниками [90].

Вместе с тем внимание исследователей все чаще обращается на формирование в слабокислотных катионообменных колонках как восходящих [32, 64, 65], так и нисходящих [72, 83, 86, 87] градиентов рН, видимо, из-за более быстрой кинетики процессов. Поэтому следует ожидать появления в ближайшее время физико-химических и математических моделей для описания внутренних градиентов рН в катионообменных системах.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 05-03-33096).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jandera P., Churachek J. Gradient elution in column liquid chromatography: theory and practice. Amsterdam-Oxford-New York-Tokio, 1985.
- Жидкостная колоночная хроматография / Под ред. З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака. М., 1978.
- Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // ЖАХ. 1999. 54. № 6. С. 566.
- Amersham Biosciences Biodirectory (Catalogue). Uppsala, 2003.
- Young J.L., Webb B.A. // Sci. Tools. 1978. 25. N 4. P. 54.
- Perkins R.V., Nau V.J., McParthland A. // Chromatogr. Review. 1987. 14. N 1. P. 13.
- Piez K.A. // Anal. Chem. 1956. 28. N 9. P. 1451.
- Salamoun J., Slais K. // J.Chromatogr. 1990. 522. P. 205.
- Островидов Е.А. / Тез. докл. V Всес. семинара по молекулярной жидкостной хроматографии. Рига, 1990. С. 270.
- Kaltenbrunner O., Tauer C., Brunner J., Jungbauer A. // J. Chromatogr. A. 1993. 639. P. 41.
- Weiss J. // Abstr. of Internat. Seminar on Ion Chromatography. M., 1998. P.40
- Sluyterman L.A.A., Elgersma O. // J. Chromatogr. 1978. 150. P. 17.
- Sluyterman L.A.A., Wijdenes J. // J.Chromatogr. 1978. 150. P. 31.
- Sluyterman L.A.A., Wijdenes J. // J.Chromatogr. 1981. 206. P. 429.
- Sluyterman L.A.A., Wijdenes J. // J.Chromatogr. 1981. 206. P. 441.
- Sluyterman L.A.A., Kooistra C. // J.Chromatogr. 1989. 470. P. 317.
- Sluyterman L.A.A., Kooistra C. // J.Chromatogr. 1990. 519. P. 217.
- Хроматофокусирование Полибуфером на ПБИ (russian trans). Stockholm, 1981.
- Separation News (Pharmacia Bull.). 1983. 11. N 2. P. 1.
- Hearn M.T.W., Lyttle D.J. // J.Chromatogr. 1981. 218. P. 483.
- Li C.M., Hutchens T.W. // Methods in Molecular Biology. 1992. 11. P. 237.
- Frey D.D., Narahari C.R., Bates R.C. Chromatofocusing / Encyclopedia of Life Sciences., 2001.
- Slais K. // J. Microcol. Sep. 1991. 3. P. 191.
- Janecek M., Salamoun J., Slais K. // Chromatographia. 1991. 32. N 1–2. P. 61.
- Slais K., Friedl Z. // Chromatographia. 1992. 33. N 5–6. P. 231.
- Janecek M., Slais K. // Chromatographia. 1993. 36. Special issue. P. 246.
- Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // Изв. вуз. Химия и химическая технология. 1999. 42. № 2. С. 122.
- Иванов А.В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2002. 43. № 5. С. 296.
- Иванов А.В., Кубышев С.С., Нестеренко П.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2004. 45. № 4. С. 240.
- Иванов А.В., Вахитейн М.С., Хасанова Е.М., Нестеренко П.Н. // ЖФХ. 2005. 79. № 5. С. 940.
- Frey D.D., Barnes A., Strong J. // AIChE Journal. 1995. 41. № 5. P. 1171.
- Kang X., Frey D.D. // Biotechnol. Bioeng. 2004. 87. P. 376.
- Гармаш А.В., Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // ЖФХ. 1997. 71. № 9. С. 1683.
- Тессман А.Б., Иванов А.В., Курочкина Е.В. и др. // Теория и практика сорбционных процессов. 1998. 23. С. 347.
- Hutchens T.W., Li C.M., Besch P.K. // J. Chromatogr. 1986. 359. P. 157.
- Hutchens T.W., Li C.M., Besch P.K. // J. Chromatogr. 1986. 359. P. 169.
- Hutchens T.W. // Protides Biol. Fluids. 1986. 34. P. 749.
- Anderson D.J., Liu Y.S. // Clinical Chem. 1996. 42. N 6. P. 408.
- Liu Y.S., Anderson D.J. // J. Chromatogr. A. 1997. 762. P. 47.
- Liu Y.S., Anderson D.J. // J.Chromatogr. A. 1997. 762. P. 207.
- Lu T., Gray H.B. // J.Chromatogr. A. 1994. 686. P. 339.
- Murel A., Vilde S., Pank M. et al. // J.Chromatogr. 1985. 347. P. 325.
- Murel A., Vilde S., Pank M. et al. // J.Chromatogr. 1986. 362. P. 101.
- Hutchens T.W., Gibbons W.E., Besch P.K. // J. Chromatogr. 1984. 297. P. 283.
- Hutchens T.W., Dunaway H.E., Besch P.K. // J.Chromatogr. 1985. 327. P. 247.
- Separation News (Pharmacia Bull.). 1984. 12. N 1. P. 5.
- Slais K. // J. Microcol. Sep. 1993. 5. P. 469.
- Slais K. // J. Chromatogr. 1989. 469. P. 223.
- Rejtar T., Slais K. // J.Chromatogr. A. 1999. 838. P. 71.
- Тессман А.Б., Иванов А.В. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2004. 45. № 6. С. 386.

51. Иванов А.В., Тессман А.Б., Кубышев С.С. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2004. 45. N 5. С. 339.
52. Kaliszan R., Wiczling P., Markuszewski M. // Anal. Chem. 2004. 76. N 3. P. 749.
53. Frey D.D. // Biotechnol. Prog. 1996. 12. P. 65.
54. Strong J., Frey D.D. // J. Chromatogr. A. 1997. 769. P. 129.
55. Farnan D., Frey D.D., Horvath C. // Biotechnol. Progr. 1997. 13. N 4. P. 429.
56. Bates R.C., Frey D.D. // J. Chromatogr. A. 1998. 814. P. 43.
57. Narahari C.R., Strong J.C., Frey D.D. // J. Chromatogr. A. 1998. 825. P. 115.
58. Bates R., Kang X., Frey D.D. // J. Chromatogr. A. 2000. 890. P. 25.
59. Kang X., Bates R.C., Frey D.D. // J. Chromatogr. A. 2000. 890. P. 37.
60. Narahari C.R., Randers-Eichhorn L., Strong J.C. et al. // Biotechnol. Prog. 2001. 17. P. 150.
61. Kang X., Frey D.D. // Anal. Chem. 2002. 74. P. 1038.
62. Frey D.D., Narahari C.R., Butler C.D. // AIChE Journal. 2002. 48. P. 561.
63. Farnan D., Frey D.D., C. Horvath. // J. Chromatogr. A. 2002. 959. P. 65.
64. Kang X., Frey D.D. // J. Chromatogr. A. 2003. 991. P. 117.
65. Shen H., Frey D.D. // J. Chromatogr. A. 2004. 1034. P. 55.
66. Гармаш А.В., Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // ЖФХ. 1997. 71. № 10. С. 1872.
67. Гармаш А.В., Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // ЖФХ. 1997. 71. № 11. С. 2054.
68. Garmash A.V., Tesson A.B., Nesterenko P.N., Ivanov A.V. // Fresenius' J. Anal. Chem. 1998. 361. N 3. P.274.
69. Тессман А.Б., Иванов А.В., Вахитейн М.С., Нестеренко П.Н. // ЖФХ. 2001. 75. № 2. С. 342.
70. Тессман А.Б. Дис. канд. хим. наук. М., 2000.
71. Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н., Гармаш А.В. // ЖФХ. 1999. 73. № 8. С. 1476.
72. Иванов А.В., Вахитейн М.С., Нестеренко П.Н., Хасанова Е.М. // ЖФХ. 2003. 77. № 12. С. 2241.
73. Тессман А.Б., Иванов А.В., Нестеренко П.Н., Гармаш А.В. // Теория и практика сорбционных процессов. 1999. 24. С. 20.
74. Иванов А.В., Тессман А.Б., Нестеренко П.Н., Рунов В.К. // ЖФХ. 2000. 74. № 6. С. 1103.
75. Тессман А.Б., Иванов А.В., Вахитейн М.С., Нестеренко П.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2002. 43. № 1. С. 13.
76. Банди Б. Методы оптимизации: вводный курс. М., 1988.
77. Химмельблау Д. Прикладное нелинейное программирование. М., 1975.
78. Евсеев А.М., Николаева Л.С. Математическое моделирование химических равновесий. М., 1988.
79. Иванов А.В., Тессман А.Б., Нестеренко П.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2001. 42. № 1. С. 22.
80. Иванов А.В., Хасанова Е.М., Махшина Е.В., Нестеренко П.Н. и др. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2002. 43. № 1. С. 28.
81. Иванов А.В., Тессман А.Б., Вахитейн М.С. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2000. 41. № 4. С. 255.
82. Иванов А.В., Тессман А.Б., Нестеренко П.Н. и др. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2001. 42. № 2. С. 109.
83. Иванов А.В., Вахитейн М.С., Нестеренко П.Н. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2002. 43. № 3. С. 180.
84. Тессман А.Б., Иванов А.В. // ЖАХ. 2002. 57. № 1. С. 6.
85. Иванов А.В., Тессман А.Б., Матвеев А.В. и др. // ЖАХ. 2001. 56. № 4. С. 374.
86. Chong B.E., Yan F., Lubman D.M., Miller F.R. // Rapid Commun. Mass Spectrom. 2001. 15. N 4. P. 291.
87. Lubman D.M., Kachman M., Wang H.X. et al. // J. Chromatogr. B. 2002. 782. P. 183.
88. Yan F., Subramanian B., Nakeff A. et al. // Anal. Chem. 2003. 75. N 10. P. 2299.
89. Yan F., Chong B.E., Barder T.J., Lubman D.M. // Us Patent Application. 2002. № 09/778-548.
90. Andersen T., Pepaj M., Trones R. et al. // J. Chromatogr. A. 2004. 1025. P. 217.

Поступила в редакцию 11.03.04

THE INTERNAL pH GRADIENTS IN ION-EXCHANGE CHROMATOGRAPHY: SIMULATING AND EXPERIMENTAL VERIFICATION

A.V. Ivanov

(Division of Analytical Chemistry)

The literature data about the simulating of internal pH gradients, formed within ion-exchange columns by chromatofocusing or inducing technique, were systemized. The advantages and limitations of existing physico-chemical models of internal pH gradients formations were discussed. The comparison of experimental gradients with gradients, simulated at use the different models, was shown.