



УДК 543.544.5.068.7

Тонкослойная хроматография ряда переходных металлов

Малахова И.И.¹, Беляев А.Н.², Красиков В.Д.¹¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук (ИВС РАН), Санкт-Петербург²Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)

Поступила в редакцию 30.11.2015 г.

В результате исследований была показана возможность использования тонкослойной хроматографии (ТСХ) для разделения группы катионов переходных металлов. Разработаны способы модификации отечественных ТСХ пластин 3-аминопропил-3-этоксисиланом. Сконструированы хроматографические системы для экспресс-анализа ионов Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} на силикагеле и аминофазе. Показана возможность количественного определения катионов металлов в биологических жидкостях на примере катионов Zn^{2+} .

Ключевые слова: тонкослойная хроматография, ТСХ пластины, модификация сорбентов, аминофаза, катионы переходных металлов.

Thin layer chromatography of transition metals

Malakhova I.I.¹, Belyaev A.N.², Krasikov V.D.¹¹Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg²Federal State Educational Institution of Higher Professional Education "Saint-Petersburg State Technological Institute (Technical University)

Quantitative analysis of trace elements, contained in cultural liquids, could be and informative method of diagnosis of human health. Thus, the decreasing of zinc content in blood plasma is an urgent consequence of myocardial infarction, and the level of zinc in the semen and urine can indicate on prostate cancer.

The aim of this study is to develop method for the analysis of transition metal ions by thin layer (planar), chromatography (TLC). Thin-layer plates with the native protonated silica (so-called "acidic" phase) and silica gel modified with amino groups was used in the work. The latter was specially designed to enhance the selectivity in a moderately polar mode for separation of ions. For effective and fast separation of Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} ions on protonated silica and amino modified silica ethanol-acetone-acetic acid (4-5-2) and 3N HCL systems were used, respectively.

It was found that the selectivity and sensitivity of separation on domestic produced TLC plates with amino phase is better than that on non modified silica. On Zn^{2+} contained model urine mixtures, the possibility of using planar chromatography for diagnostic tests prostatitis and prostate cancer was demonstrated. Procedures of modification of silica plates for the selective quantitative analysis of transition metal ions and chromatographic systems (sorbent, eluents, detection reagents) for the fast analysis of transition metal ions were developed.

Keywords: thin-layer chromatography, TLC-plates, modification of sorbents, NH_2 -phase, metal cations

Введение

Количественный анализ макро- и микроэлементов, содержащихся в биологических жидкостях человека, может служить информативным методом тестирования и диагностирования состояния здоровья человека [1]. Дефицит и избыток элементов в организме человека проявляется в патологии в виде существенных биохимических, клинических и морфологических признаков [2]. С нарушением обмена микроэлементов в организме человека связан патогенез ряда заболеваний (болезнь Коновалова-Вильсона, серповидно-клеточная анемия, рак предстательной железы, болезнь Альцгеймера и др.) [3].

Даже незначительные отклонения содержания микроэлементов от нормы вызывают тяжелые заболевания. Анализ на содержание отдельных микроэлементов в органах и тканях - чувствительный диагностический тест, позволяющий обнаруживать и лечить различные заболевания. Так, снижение содержания цинка в плазме крови - обязательное следствие инфаркта миокарда. Также по уровню цинка в сперме или моче можно судить о раке простаты [4,5].

Тонкослойная планарная хроматография широко применяется для анализа неорганических веществ. Хорошо известны работы по качественному анализу неорганических ионов, развитые в 90-е годы прошлого века [6,7]. В последние годы высокоэффективная ТСХ стала современным инструментальным методом, позволяющим осуществлять количественный скоростной анализ органических и неорганических соединений [8].

Целью работы является разработка способа экспресс-анализа микроэлементов в биологических жидкостях методом планарной хроматографии.

Задачей разработки является выбор сорбентов и подбор условий для разделения и количественного определения ионов Zn^{2+} и Cu^{2+} , а также Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , сопутствующих им в биологических жидкостях.

Эксперимент

Использованные в работе реактивы имели чистоту х.ч. или о.с.ч., производство Sigma и Aldrich (США), «Вектон» и «Нева-Реактив» (Россия). Для приготовления водных растворов использовалась дистиллированная вода.

Элемент-органический анализ проводили на С-,Н-,N-S элементный анализатор «Vario EL III» с детектором Thermal Conductivity Detector (TCD) (Elementar Analysensysteme GmbH, D-63452 Hanau-Germany). Для ТСХ использовали кремнеземные пластины Sorbfil ПТСХ-П-А (Россия) и НРТLC NH_2 F₂₅₄ S (Merck, Германия).

Перевод силикагеля тонкослойных пластин в «кислую» форму осуществляли следующим образом. В концентрированную соляную кислоту (12 N HCL) объемом 10 мл добавляли 10 мл дистиллированной воды, перемешивали, в результате получили 6N HCL. В полученный раствор 6N HCL погружали пластины и выдерживали в течение 15 минут. После чего пластины отмывали дистиллированной водой и сушили в сушильном шкафу в течение 45 минут при температуре 120°C.

Модификацию пластин 3-аминопропил-3-этоксисилоном проводили двумя способами.

Способ 1. Пластины (Sorbfil, ПТСХ-П-А) помещают в ёмкость со 100 мл 5% раствора 3-аминопропил-3-этоксисилана в дистиллированной воде. Нагревают на водяной бане 30 минут при постоянном перемешивании. После чего

последовательно пластины промывают водой, водно-спиртовой смесью (1:1) и снова водой. Высушивают в сушильном шкафу при 120 °С в течение 1 часа.

Способ 2. Предварительно высушенные от влаги (выдерживают 2 часа в сушильном шкафу при температуре 120 °С) и охлажденные в эксикаторе над прокаленным CaCO₃ пластины ПТСХ-П-А выдерживают в 10% растворе 3-аминопропил-3-этоксисилана в бензоле от 19 до 22 часов. Затем бензол со слоя пластин испаряют под тягой до исчезновения характерного запаха бензола. Реакцию иммобилизации 3-аминопропил-3-этоксисиланом проводят в сушильном шкафу при 100 °С в течение 6 часов.

Детектирование хроматограмм осуществляли видеоденситометром «ДенСкан» (Ленхром, Россия) в видимой области с разными светофильтрами. Обработку полученных данных осуществляли при помощи программ «Dens» (Ленхром, Россия) и «Мультихром-ТСХ» (Ленхром-Амперсенд, Россия).

Обсуждение результатов

Определение катионов металлов (Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Fe³⁺) в природных и биологических объектах является одной из актуальных задач аналитической химии. Среди множества физико-химических методов анализа катионов металлов наиболее экспрессным, мало затратным и информативным является метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии. Как правило, растворы солей интересующих нас катионов не имеют окраски. Поэтому необходимо выбрать из предлагаемых известных детектирующих агентов специфические для данных ионов, окрашивающих полученные хроматограммы с наибольшей чувствительностью.

Исследования, проведенные с рядом окрашивающих ионы металлов реагентов показали, что дитизон (0.1 % раствор в CCl₄) при детектировании оказался универсальным красителем с достаточно высокой чувствительностью определения для всех анализируемых катионов. Остальные реагенты дали результаты на порядок ниже либо являлись лишь специфическими реагентами на определенный ион.

Высокая чувствительность анализа является основным требованием для диагностики. Для этого проведен ряд экспериментов по определению предела обнаружения ионов цинка и сопутствующих ему элементов: меди, кобальта, железа и никеля (табл. 1).

Традиционно исследования неорганических соединений методом ТСХ проводились большей частью на ионообменных модифицированных кремнеземах и целлюлозе. Сравнительно мало работ по анализу ионов металлов на нативном силикагеле [9,10]. Связано это с неудовлетворительной селективностью группового разделения ионов. Однако наши эксперименты показали, что применение протонированных форм силикагеля («кислые» ТСХ-пластины) дают хорошие результаты. После проведения ряда экспериментов были подобраны оптимальные условия для разделения ионов Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, Fe³⁺. Данные по групповому ТСХ – разделению металлов на силикагеле представлены в таблице 2.

Для расширения селективности в умеренно-полярном диапазоне, т.е. в диапазоне между полярными силикагелевыми слоями и неполярными RP фазами нами были разработаны аминофазы. Функциональная конечная группа и атом кремния разделены «прокладкой» из трех CH₂. (рис. 1). Таким образом, эти фазы могут использоваться как в нормально-фазовой, так и в обращено-фазовой хроматографии.

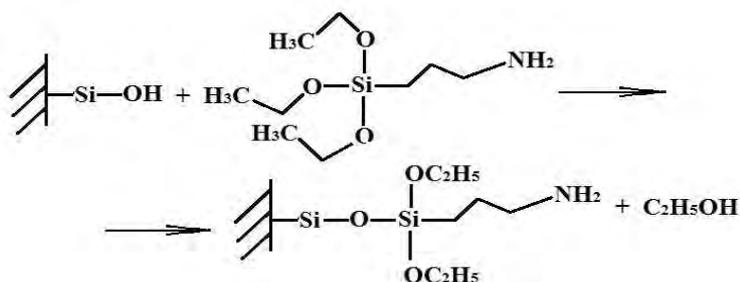


Рис. 1. Реакция силикагеля с 3-аминопропил-3-этоксисиланом

Таблица 1. Определение предела чувствительности детектирования анализируемых катионов

Реактив	Пластина ПСТХ-П-А					Пластина НPTLC NH ₂ F ₂₅₄ S				
	Zn ²⁺ , мкг	Cu ²⁺ , мкг	Co ²⁺ , мкг	Ni ²⁺ , мкг	Fe ²⁺ , мкг	Zn ²⁺ , мкг	Cu ²⁺ , мкг	Co ²⁺ , мкг	Ni ²⁺ , мкг	Fe ²⁺ , мкг
0.1% р-р дитизона в CCl ₄	0.125	0.5	0.3	0.3	1	1	1	1	1	1.5
1% р-р дитизона в CHCl ₃	0.5	1.0	0.8	0.8	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	2.0
1% р-р ализарина в воде	10	10	Не окрашивается	Не окрашивается	Не окрашивается	Не окрашивается	Не окрашивается	Не окрашивается	Не окрашивается	Не окрашивается
10% р-р калий железосинеродистого в воде	Не окрашивается	1	1	1	1	Не определяли	Не определяли	Не определяли	Не определяли	Не определяли

Таблица 2. Значение R_f катионов металлов на силикагеле

Элюент	Значение R _f				
	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺	Fe ³⁺
Ацетон - 6N HCl (9,9-0,1)	0.82	0.72	0.71	0.71	0.09
1M NaCl	0.17	0.09	0.94	0.97	0.00
Ацетон - 3N HCL (9,3-0,4)	0.98	1.00	0.96	0.55	0.95
Этанол - Ацетон - Уксусная кислота (4-5-2) (пластина модифицированная диэтиламино)	0.29	0.59	0.46	0.66	0.00
Этанол - Ацетон - Уксусная кислота (4-5-2)	0.37	0.73	0.5	0.57	0.94

Адсорбционный слой с аминофазой имеет пропиламинный радикал, ковалентно связанный с силикагелем и обладает основными свойствами [11].

Наличие солей в растворе подавляет слабые ионообменные свойства такого сорбента, а аминогруппы экранируются ионами противоположного заряда. Вещества адсорбируются за счёт взаимодействия с силанольными группами и конечными аминогруппами.

Ряд экспериментов позволил установить оптимальные условия для разделения катионов на отечественных пластинах ПТСХ-П-А, модифицированных аминофазой и на пластинах НРТLC NH₂ F₂₅₄ S (Merck, Германия). Последний вид ТСХ-пластин выбран нами в качестве «реперного» образца аминофазы сравнения (рис. 2).

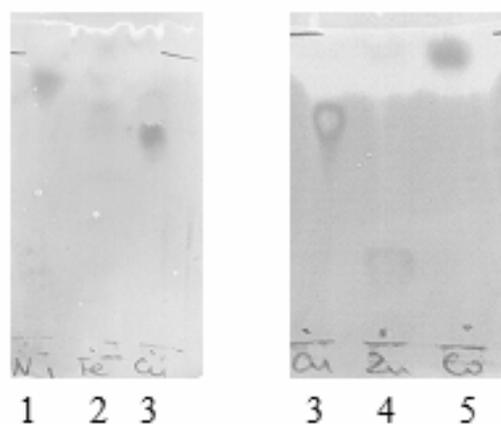


Рис. 2. Разделение катионов металлов на пластине, модифицированной 3-аминопропил-3-этоксисиланом. Пластина: ПТСХ-П-А, модифицированная 3-аминопропил-3-этоксисиланом, отмыта элюентом. Образцы: 1. Ni²⁺ - 1 мкг; 2. Fe³⁺ - 1 мкг; 3. Cu²⁺ - 1 мкг; 4. Zn²⁺ - 1 мкг; 5. Co²⁺ - 1 мкг; Элюент: 3N HCl; Детектирование: 0.1 % раствор дитизона в CCl₄.

Модификация кремнеземных слоев ТСХ-пластин по первому способу в водном 5%-ном растворе 3-аминопропил-3-этоксисилана проводится на кипящей водяной бане (примерно при T 90-95°C) в течение 30 минут. Вероятно, реакция термической модификации проходит быстро потому, что в водном растворе силикагель на пластине дополнительно гидроксيليруется, появляется больше доступных центров для присоединения аминопропилсилана..

Второй способ модификации отличается от первого тем, что процесс делится на две стадии и процесс получения аминокслоя проходит значительно дольше. Для определения элементного состава, полученных слоев с аминофазой использовался CHN элементный анализатор «Vario EL III» с детектором Thermal Conductivity Detector (TCD) (Elementar Analysensysteme GmbH, D-63452 Hanau-Germany).

Результаты элементного анализа (табл. 3) показали, что лабораторные пластины с аминофазой, полученные способом 1, по процентному составу N, C и H очень схожи спластинами фирмы Merck. Из серии пластин, модифицированных способом 2, наиболее подходящими по элементному составу к пластинам Merck, являются пластины, пропитка которых в 10%-ном бензольном растворе 3-аминопропил-3-этоксисилана проходила в течение 10 часов.

Количественное определение катионов Zn²⁺ и Cu²⁺, а также Co²⁺, Ni²⁺, Fe³⁺ проводили на модифицированных ПТСХ-П-А пластинах, показавших максимальный элемент-органический состав по N, C и H, которые оказались по данным показателям очень схожи при сравнении с пластинами Merck (табл.3). Несмотря на одинаковую степень модификации, отечественные ТСХ-пластины в одних и тех же условиях разделения показали большую чувствительность и эффективность

разделения (табл. 1 и табл. 4). Для оценки чувствительности метода и количественного ТСХ-анализа ионов переходных металлов при помощи оптического денситометра «ДенСкан» были построены графики построения калибровочных зависимостей для катионов исследуемой группы (рис.3)

Таблица 3. Данные элементного анализа ТСХ-пластин с привитой аминофазой, полученных в лабораторных условиях.

Анализируемая фаза	Элементный состав		
	% N	% C	% H
HPTLC NH ₂ F ₂₅₄ S, Merck	1.83	5.94	1.51
Пластина, модифицированная способом 1	1.79	6.18	1.38
Пластина, модифицированная способом 2(5 часов)	1.1	2.3	0.9
Пластина, модифицированная способом 2(10 часов)	1.9	6.3	1.5
Пластина, модифицированная способом 2(15 часов)	3.29	9.97	2.17
Пластина, модифицированная способом 2 (19 часов)	3.33	9.98	2.29

Таблица 4. Подвижность ионов металлов на аминофазе в элюенте 3N HCL

ФАЗА	Значение R _f				
	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺	Fe ³⁺
Аминофаза HPTLC NH ₂ F ₂₅₄ S, Merck	0.54	0.85	0.97	0.98	0.9
Аминофаза, модифицированная 3-аминопропил-3-этоксисиланом	0.24	0.68	0.9	0.82	0.83

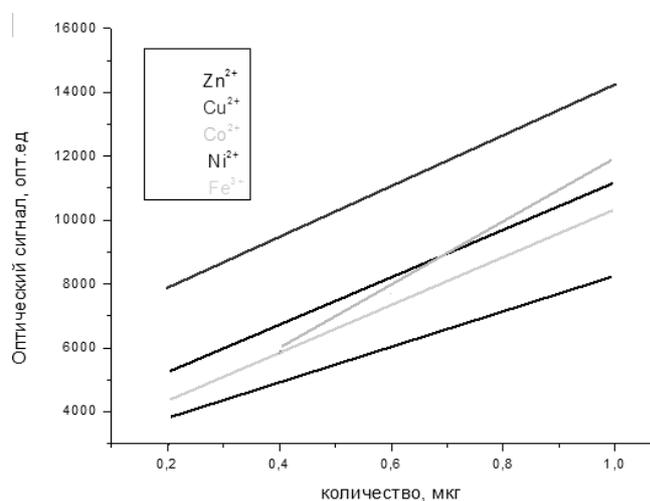


Рис. 3. График построения калибровочных зависимостей для количественного определения ионов Zn²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Fe³⁺ для ТСХ

Анализ модельных систем на примере солей Zn(NO₃)₂ в биологических жидкостях показал, что при использовании в качестве элюента 3N HCl все органические компоненты мочи уходят практически с фронтом – индекс удерживания R_f 0.95. В то время как местоположение ионов цинка на хроматограмме характеризуется R_f 0.5. Количественная обработка на денситометре показала довольно высокую чувствительность метода.

Прежде, чем приступить к количественному анализу реальных объектов, нами были построены при помощи программы Dens графики калибровочной зависимости оптического сигнала денситометра от количества нанесенных на пластину с аминофазой ионов Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} , подтверждающих возможность их денситометрической обработке (рис. 3).

При хроматографии модельной смеси мочи с раствором соли цинка $Zn(NO_3)_2$ в элюенте 3N HCl все органические компоненты мочи уходят практически с фронтом - R_f 0.95, а местоположение ионов цинка на хроматограмме характеризуется R_f 0.5 (рис. 4).

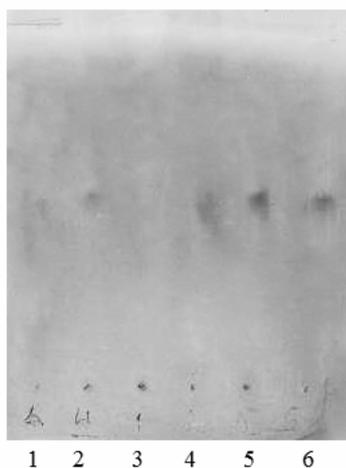


Рис. 4. Хроматограмма определения ионов Zn^{2+} в биологической жидкости. Образцы: 1 - Zn^{2+} - 2 мкг.; 2- Zn^{2+} - 4 мкг.; 3 – моча чистая; 4- модельная смесь мочи с цинком; 5 - Zn^{2+} - 6 мкг; 6 - Zn^{2+} - 8 мкг. Элюент: 3N HCl. Детектирование: 0,1 % раствор дитизона в CCl_4 . Пластина: ПТСХ-П-А, амино-модифицированная, отмыта элюентом

Далее была проведена количественная обработка хроматограммы на денситометре «ДенСкан», которая показала возможность ТСХ-анализа ионов металлов в биологических жидкостях. Протокол анализа, проведенного с помощью программного обеспечения Dens, приведен на рис. 5.

Калибровочная зависимость
 $y=A1*x+A0$ [линейная регрессия]
 $A1=2.03e-003$ $A0=1.35e+000$

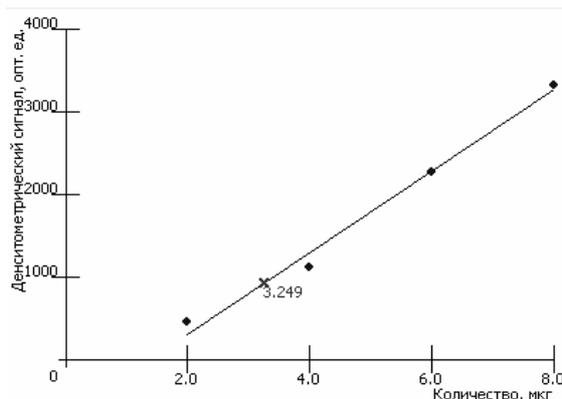


Рис. 5. Протокол отчета по количественной обработке хроматограммы

Заключение

В результате проведенной работы разработаны методики модификации кремнеземных планарных пластин для селективного количественного анализа ионов переходных металлов и разработаны хроматографические системы (сорбент, элюент, детектирующие реагенты) для экспресс-анализа ионов переходных металлов.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований № 14-08-00923.

Список литературы

1. Zaichik V.Ye, Sviridova T.V., Zaichick S.V. // *Int. Urol. Nephrol.* 1997. Vol. 29(5), pp. 565-574.
2. Войнар А.О. Биологическая роль микроэлементов в организме животных и человека, 2 изд., М.: Высшая школа. 1960. 544 с.
3. Коломийцева М.Г., Габович Р.Д. Микроэлементы в медицине. М.: Медицина. 1970. 375 с.
4. Wittrisch H., Conradi S., Rohde E., Vogt J., Vogt C. // *J. Chromatogr. A.* 1997. Vol. 781, No 1-2. pp. 407-416.
5. Фритц Д., Гьерде Д., Поланд К. Ионная хроматография. М.: Мир. 1984. 224 с.
6. Андреев В.П. // *Журн. аналит. химии.* 1999. Т.54. № 7. С.769-776.
7. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии. Т. 1. М. 1999. 203 с.
8. Красиков В.Д. Основы планарной хроматографии. СПб: ХИМИЗДАТ. 2005. 231 с.
9. Вольнец М.П. Количественная тонкослойная хроматография в неорганическом анализе. М.: Наука. 1993. С.172-185.
10. Soylak M., Tuzen M. // *J. of Hazardous Materials.* 2006. Vol. 11. pp. 1496-1501.
11. Руководство по современной тонкослойной хроматографии / под ред. Ларионова О.Г. Москва. 1994. 180 с.

References

1. Zaichik, V.Ye, Sviridova T.V., Zaichick S.V., *Int. Urol. Nephrol.*, 1997, Vol. 29(5), pp. 565-574. DOI: 10.1007/BF02552202.
2. Vojnar A.O. Biologicheskaja rol' mikrojelementov v organizme zhivotnyh i cheloveka, 2 izd., M. Vysshaja shkola, 1960, 544 p.
3. Kolomijceva M.G., Gabovich R.D., Mikrojelementy v medicine, M., Medicina, 1970, 375 p.
4. Wittrisch H., Conradi S., Rohde E., Vogt J., Vogt C., *J. Chromatogr. A*, 1997, Vol. 781, No 1-2, pp. 407-416. DOI:10.1016/S0021-9673(97)00417-2.
5. Fritc D., G'erde D., Poland K. Ionijaja hromatografija. M.. Mir, 1984, 224 p.
6. Andreev V.P., *Zhurn. Analit. himii*, 1999, Vol.54, No 7, pp. 769-776.
7. Gejss F. Osnovy tonkoslojnoj hromatografii. T. 1, M. 1999., 203 p.
8. Krasikov V.D. Osnovy planarnoj hromatografii, SPb: HIMIZDAT, 2005, 231 p.
9. Volinec M.P. Kolichestvennaja tonkoslojnaja chromatografija v neorganichskom analize. M., Nauka, 1993, pp. 172-185.
10. Rukovodstvo po sovremennoj tonkoslojnoj hromatografii, pod red. Larionova O.G., M., 1994, 180 p.
11. Shtykov S.N., Sunina E.G., Tyurina N.V., *J. Planar Chromatogr.*, 2000, Vol. 13, pp. 266-270.

Малахова Ирина Ивановна - к.х.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, с.н.с., Санкт-Петербург

Malakhova Irina I. – PhD, Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, senior researcher, Saint-Petersburg

Красиков Валерий Дмитриевич – д.х.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт высокомолекулярных соединений Российской академии наук, зав. аналитической лабораторией, Санкт-Петербург, +7 (812) 323-71-01

Беляев Александр Николаевич - д.х.н., Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», профессор, Санкт-Петербург

Krasikov Valerii D. – Dr.Sc.Chem, Institute of Macromolecular Compounds Russian Academy of Sciences, head of analytical laboratory, Saint-Petersburg, e-mail: lenchrom@hq.macro.ru.

Belyaev Alexander N. - Dr.Sc.Chem, Federal State Educational Institution of Higher Professional Education «Saint-Petersburg State Technological Institute (Technical University)», Professor, St. Petersburg