

УДК 543.544:54.412.2:542.61

ХРОМАТОФОКУСИРОВАНИЕ ИОНОВ МЕТАЛЛОВ НА КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩЕМ СОРБЕНТЕ TETREN-SiO₂ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПРОСТЫХ ЭЛЮЕНТОВ

А.В. Иванов

(кафедра аналитической химии; e-mail: sandro-i@yandex.ru)

Простые элюенты, состоящие из растворов трех- и четырехосновных кислот (лимонной и пиромеллитовой кислот и кислот ряда комплексонов – нитрилтриуксусной (НТА), этилендиаминтетрауксусной (ЭДТА), циклогексан-1,2-диамин-N,N,N,N-тетрауксусной (ЦГДТА)) или их двухкомпонентных смесей впервые применены для хроматофокусирования ионов металлов на комплексообразующем сорбенте Tetren-SiO₂ (Силохром С-120 с привитыми группами тетраэтиленпентамина). Наиболее плавные, квазилинейные градиенты рН получены для элюента на основе смеси лимонной кислоты и ЭДТА. Достигнуто разделение ионов Mn²⁺, Cr³⁺, Co²⁺ и Ni²⁺ при использовании простого двухкомпонентного элюента.

Ключевые слова: хроматофокусирование, внутренний градиент рН, комплексообразующий сорбент, простой элюент, разделение металлов.

Проблема сочетания стадии концентрирования веществ с последующим разделением или определением успешно решается в современных хроматографических методах для аналитов, относящихся к различным классам. Чаще всего для предварительного концентрирования используют предколонку или концентрирующий патрон, элюат из которого поступает затем в разделительную колонку [1]. Более перспективным представляется вариант концентрирования и разделения (определения) на одной хроматографической колонке. Применение техники хроматофокусирования для создания внутреннего градиента рН в комплексообразовательной хроматографии металлов относится как раз к таким вариантам: особенность способа состоит в возможности концентрирования и последующего разделения ионов металлов на одной хроматографической колонке [2]. Ионы металлов удерживаются за счет комплексообразования на сорбенте с привитыми аминогруппами или карбоксильными группами при более высоких значениях рН (в нейтральной и слабокислой областях, т.е. при уравновешивании сорбента стартовым раствором). Затем они элюируются благодаря плавному снижению рН в слое сорбента и последовательному разрушению комплексов с функциональными группами сорбента при пропуске элюента [2, 3]. Техника хроматофокусирования для концентрирования и разделения ионов металлов впервые применена на кафедре аналитической химии МГУ [3–7], до этого метод хроматофокусирования использовали только для разделения или препаративной очистки белков, пептидов и дру-

гих биологически важных соединений биполярного строения [8–10].

Сформировать практически линейный, протяженный градиент рН внутри хроматографической колонки позволяют как буферирующая способность ионообменных групп сорбента, так во многом и кислотно-основные свойства подвижных фаз. И если класс сорбентов, применяемых сегодня в хроматофокусировании, достаточно широк, то в качестве элюентов до сих пор в подавляющем большинстве случаев используют синтетический полиамфолитный «Полибуфер» и его аналоги – «Сервалит», «Буффалит», «Фармалит» и другие [2, 9, 11]. Недостатки коммерческих полибуферных элюентов, сужающие возможности хроматофокусирования, подробно рассмотрены в работах [2, 5, 12]. Актуален поиск новых простых подвижных фаз для хроматофокусирования в целях замены традиционных «полибуферов». Простые элюенты позволяют расширить области применения метода с точки зрения как хроматографических систем, так и объектов разделения [5, 13, 14]. Преобладавший ранее эмпирический выбор новых подвижных фаз в хроматофокусировании неэффективен, и в последние годы для поиска подвижных фаз все чаще используют физико-химическое моделирование [2, 12, 15, 16].

Нами предложена физико-химическая модель формирования нисходящих внутренних градиентов рН в динамической ионообменной системе [15]. В модели учтено влияние ионной силы обеих подвижных фаз (элюента и стартового раствора) на профиль градиента рН. При правильном выборе ионной силы в старто-

вом растворе и элюенте удается получить достаточно протяженный (более 2,5 ед.) квазилинейный градиент рН даже при использовании однокомпонентного элюента (2 мМ $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$) [17]. Увеличить диапазон линейности градиента можно либо с помощью однокомпонентных элюентов, состоящих из многоосновных кислот, либо путем добавления второго буферного компонента в элюенты. Возможности таких элюентов применительно к хроматофокусированию ионов металлов обсуждаются в данной статье.

Экспериментальная часть

Аппаратура. Для формирования градиентов рН с применением техники хроматофокусирования использовали хроматографическую систему, включающую насос ХПЖ-1 (Дзержинский ОКБА, Россия); пластмассовый четырехходовой кран («Pharmacia», Швеция) для ввода пробы; стеклянную хроматографическую колонку К9/30 (300×9 мм) («Pharmacia», Швеция), заполненную сорбентом Tetren-SiO₂; коллектор фракций «RediRac-2112» («LKB-Bromma», Швеция). Кислотность собранных фракций измеряли цифровым рН-метром «ТОА Electronics НМ-20S» (Япония) с комбинированным электродом GST-5211С в специальной ячейке объемом 1 мл. Оптическую плотность фракций определяли на колориметре КФК-2 при 540 нм ($l = 1$ см) по реакции с ПАР [18].

Реагенты и растворы. Раствор Трис (25 мМ), приготовленный из сухого препарата фирмы «Merck», использовали в качестве стартового раствора для уравнивания колонки; оптимальную кислотность стартового раствора (рН 7,5–7,8) создавали добавлением рассчитанного количества конц. HCl. В качестве компонентов для элюентов использовали 25 мМ растворы янтарной, лимонной, пиромеллитовой, нитрилтриуксусной (НТА), этилендиаминтетрауксусной (ЭДТА), циклогексан-1,2-диамин-N,N,N,N-тетрауксусной (ЦГДТА) кислот, приготовленные из сухих препаратов фирм «Reanal» (Венгрия), «Germed» и «Merck» (Германия). 20 мМ растворы солей Co^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} и Mn^{2+} готовили из нитратов или хлоридов («Реахим», Россия) растворением навесок в дистилляте. Все реагенты имели квалификацию «ч.д.а.».

Сорбент. Использовали комплексообразующий сорбент Tetren-SiO₂, синтезированный профессором П.Н. Нестеренко путем закрепления тетраэтиленпентамина по эпокси группам на основе на поверхности химически модифицированного Силохрома С-120. Размер частиц сорбента 100–160 мкм,

ионообменная емкость по результатам потенциометрического титрования 0,35 ммоль/г.

Методика эксперимента. Колонку уравнивали стартовым раствором до совпадения значения рН на входе и на выходе колонки, а затем пропускали элюент с более низким значением рН и регистрировали рН эффлюента – в собранных фракциях по 1–2 мл или непрерывно, в проточной ячейке. Пробу модельных смесей ионов металлов вводили в систему одновременно с переключением стартового раствора на элюент. При разделении модельной смеси ионов металлов собирали фракции эффлюента по 1–2 мл в коллекторе и контролировали содержание металла фотометрически по реакции с ПАР при 540 нм. Объемная скорость подвижных фаз составляла 1 мл/мин.

Результаты и их обсуждение

Лимонная кислота. В качестве трехосновной кислоты для формирования градиента использовали лимонную кислоту (величины pK_a приведены в табл. 1); при этом $\Delta pK_{2-1} = 1,53$, $\Delta pK_{3-2} = 1,74$. Влиянием ОН-группы ($pK_4 = 16,0$) на формирование градиента рН в данных условиях можно пренебречь. Градиент состоит из двух сегментов с линейным снижением рН: в областях 7,6–6,5 и 6,2–3,5, соединенных плато при рН 6,5–6,2 (рис. 1, кривая 1). В целом следует отметить более плавную форму градиента рН по сравнению с растворами двухосновных кислот такой же концентрации [2, 5]. Характеристики линейных сегментов градиента рН приведены в табл. 2. Однако, несмотря на широкий рабочий диапазон градиента рН, элюировать ионы металлов из хроматографической колонки не удалось. Вместе с тем окрашенные хроматографические зоны на сорбенте практически исчезли. Вероятно, это вызвано тем, что лимонная кислота в нейтральной среде об-

Т а б л и ц а 1

Термодинамические константы диссоциации (pK_a) исследованных карбоновых и аминополикарбоновых кислот [19]

Кислота	pK_1	pK_2	pK_3	pK_4
Янтарная	4,21	5,64	–	–
Лимонная	3,10	4,76	6,40	(16,0)
Пиромеллитовая	1,92	2,87	4,49	5,63
НТА	1,89	2,49	9,73	–
ЭДТА	1,99	2,67	6,16	10,26
ЦГДТА	2,51	3,60	6,20	11,78

Т а б л и ц а 2

Характеристики линейных сегментов на профиле градиентов pH

Элюент	Линейный сегмент	pH ₁	pH ₂	ΔpH	ΔpH/ΔV
однокомпонентные элюенты					
25 мМ лимонная кислота	1	7,6	6,5	1,1	0,06
	2	6,5	6,2	0,3	0,03
	3	6,2	3,5	2,7	0,16
25 мМ пиромеллитовая кислота	1	7,3	5,8	1,5	0,20
	2	5,8	4,7	1,1	0,02
	3	4,7	3,4	1,3	0,13
25 мМ ЦДТА	1	7,2	4,0	3,2	0,09
двухкомпонентные элюенты					
12 мМ янтарная и 12 мМ лимонная кислоты	1	7,0	6,2	0,8	0,03
	2	6,2	5,1	1,1	0,16
	3	5,0	3,5	1,5	0,17
20 мМ лимонная кислота и 5 мМ ЭДТА	1	7,7	7,2	0,5	0,03
	2	7,2	6,7	0,5	0,01
	3	6,4	3,5	2,9	0,09

П р и м е ч а н и я. pH₁ и pH₂ – начальное и конечное значения на линейном сегменте, ΔpH – интервал линейного сегмента, ед. pH, ΔpH/ΔV – наклон линейного сегмента.

разовала анионные комплексы с ионами металлов, которые могут прочно удерживаться на протонированных аминогруппах Tetren-SiO₂ за счет электростатических взаимодействий.

Пиромеллитовая кислота. На профиле градиента pH, сформированного при пропускании 25 мМ раствора четырехосновной пиромеллитовой кислоты, видны два участка с линейным снижением pH: 7,3–5,8 и 4,7–3,4 (рис. 1, кривая 2). В области 5,8–4,7 снижение pH происходит тоже линейно, но значительно медленнее, с меньшим наклоном ΔpH/ΔV (табл. 2). Такой вид градиента можно объяснить равномерным распределением констант диссоциации пиромеллитовой кислоты в более узком диапазоне, чем у лимонной. Градиент, образованный пиромеллитовой кислотой, следует отнести к квазилинейным, т.е. состоящим из нескольких линейных сегментов, плавно соединенных между собой [5–7, 13, 17]. Наиболее подходящий наклон ΔpH/ΔV для подобных систем составляет ~0,10 [2, 5]. Пиромеллитовая кислота может представлять интерес как буферный элюент для

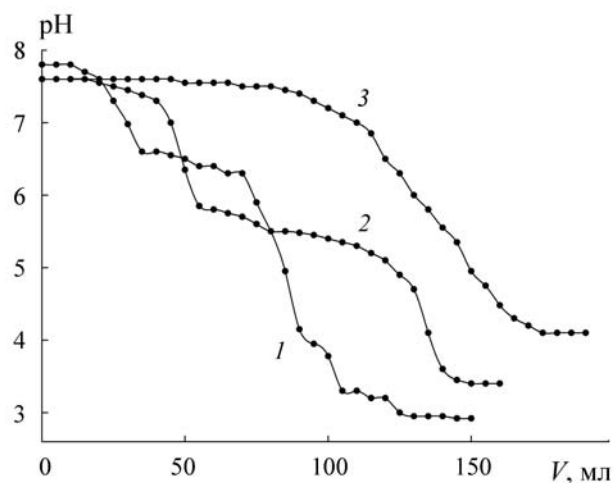


Рис. 1. Формирование градиентов pH 25 мМ растворами кислот: лимонной (1), пиромеллитовой (2) кислот и ЦДТА (3) при pH 3,1–3,5. Колонка: стеклянная 300×9 мм, Tetren-SiO₂, 100–160 мкм; стартовый раствор: 25 мМ Трис-HCl (pH 7,7), объемная скорость 1мл/мин. Контроль pH в собранных фракциях элюата

формирования внутреннего градиента pH в хроматофокусировании.

Комплексоны (трех- и четырехосновные кислоты). Поскольку НТА, ЭДТА и ЦГДТА в кислотной форме имеют низкую растворимость, навески ЦГДТА и НТА растворяли при добавлении по каплям 0,1 М раствора NaOH, а затем доводили pH до 3,0–3,5 конц. HCl, и после этого разбавляли водой до метки. Раствор ЭДТА готовили из фиксанала, добавляя по каплям 0,1 М HCl до pH 3,0–3,3, и разбавляли водой до метки.

При использовании 25 мМ растворов НТА и ЭДТА линейные градиенты получить не удалось: pH снижается медленно от 7,6 до 7,2 (в течение 120–150 мин), а затем резко – до 4,0 (в течение 10–15 мин), что можно объяснить высокой буферной емкостью комплексонов в нейтральной среде и достаточно низкой – в кислой среде. В случае ЦГДТА pH изменяется от 7,2 до 4,0 за 40–50 мин (рис. 1, кривая 3). Данный градиент наиболее линейен среди полученных для однокомпонентных элюентов (табл. 2), наклон $\Delta\text{pH}/\Delta V$ на линейном сегменте близок к оптимальному значению (0,10). Поэтому ЦГДТА можно использовать для создания градиента pH в хроматофокусировании. Однако при разделении модельных смесей из 3–4 переходных металлов мы не получили удовлетворительных результатов, поскольку на хроматограмме наблюдали два пика, первый из которых предположительно принадлежит Mn^{2+} , второй (размытый) – Cr^{3+} , Co^{2+} и Ni^{2+} . Это можно объяснить сильной комплексообразующей способностью ЦГДТА, сравнимой с комплексообразующей способностью функциональных групп на поверхности Tetren-SiO₂, а также конкурирующей реакцией ЦГДТА с комплексами металлов с ПАР при фотометрическом детектировании в собранных фракциях. С другой стороны, при хроматофокусировании биполярных макромолекул (пептидов, белков и т.д.) элюентом на основе ЦГДТА вполне можно заменить полибуферный элюент, благодаря широкому рабочему интервалу pH и плавному профилю градиента. Не исключено, что НТА и ЭДТА, как более слабые комплексоны по сравнению с ЦГДТА, можно использовать в качестве добавки к буферным элюентам, формирующим градиент, например, к лимонной или пиромеллитовой кислотам.

Двухкомпонентные буферные элюенты. Для формирования плавного градиента pH с использованием смеси кислот желательно, чтобы $\text{p}K_a$ этих кислот были равномерно распределены в рабочем интервале pH от 7,0 до 3,0. В случае смеси янтарной и лимонной кислот это условие соблюдает-

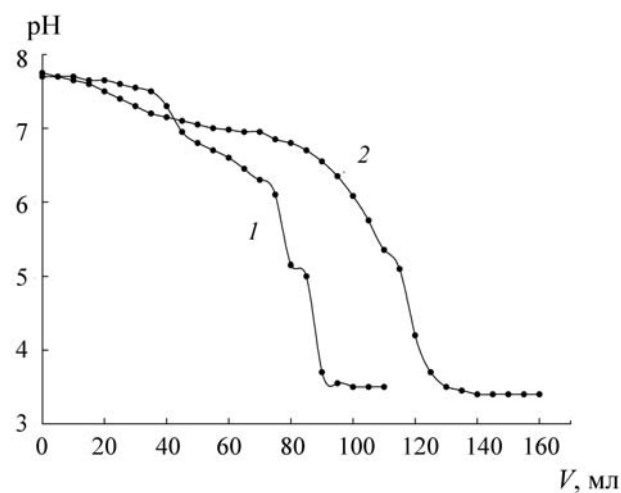


Рис. 2. Формирование градиентов pH двухкомпонентными элюентами: 1 – 12 мМ янтарная + 12 мМ лимонная кислоты, 2 – 20 мМ лимонная кислота + 5 мМ ЭДТА (pH 3,3). Остальные условия см. в подписи к рис. 1

ся: константы кислотности распределены именно в этом интервале $\text{p}K_a$: 3,10; 4,21; 4,76; 5,64; 6,40 (табл. 1). Тем не менее не удалось получить плавный градиент pH для такой смеси, pH снижалось скачкообразно от 6,2 до 5,1 и от 5,0 до 3,5 (рис. 2, кривая 1). В то же время для каждой из кислот по отдельности были получены более плавные градиенты pH. Профиль градиента, полученный для этой смеси кислот при непрерывном контроле pH элюата в проточной ячейке, полностью совпал с построенным по точкам. Возможно, в данном случае имеет место фронтальное разделение компонентов элюента [15]. Смесь 12 мМ янтарной и 12 мМ лимонной кислот не годится в качестве буферного элюента для хроматофокусирования, так как не выполняется одно из условий селективного разделения аналитов – плавность градиента (табл. 2), и при резком изменении pH возможно перекрытие хроматографических зон.

По результатам исследования влияния однокомпонентных элюентов на формирование градиента pH в анионообменной системе и возможности разделения переходных металлов с использованием градиентного элюирования мы можем говорить о двух крайних случаях.

Первый случай – буферный элюент формирует достаточно плавный градиент pH, но разделение металлов затрудняется вследствие либо низкой устойчивости комплексов, либо образования анионных комплексов, которые дополнительно удерживаются на протонированных аминогруппах сорбентов.

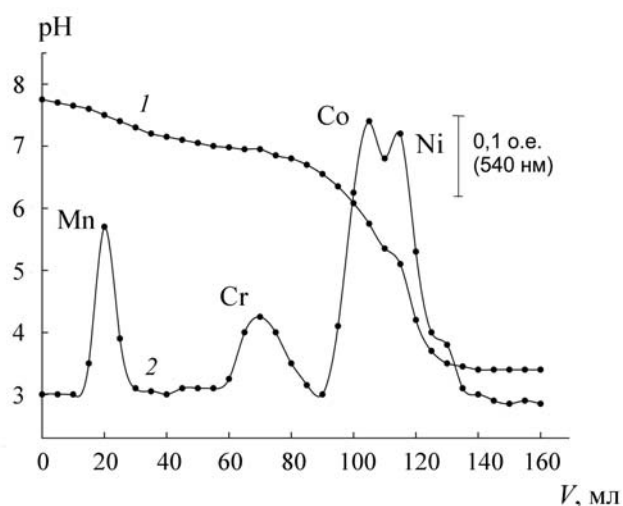


Рис. 3. Хроматофокусирование смеси переходных металлов (по 20 мМ) с использованием двухкомпонентного элюента (20 мМ лимонная кислота + 5 мМ ЭДТА, рН 3,3). Детектирование: по реакции с ПАР в собранных фракциях элюата. 1 – градиент рН, 2 – хроматограмма смеси. Остальные условия см. в подписи к рис. 1

Второй случай – использование элюентов на основе комплексонов (НТА, ЭДТА, ЦГДТА), образующих с металлами устойчивые комплексы, но формирующих недостаточно плавный градиент рН.

Для учета обоих факторов мы изучили влияние буферного элюента, состоящего из 20 мМ лимонной кислоты (активный компонент, в первую очередь формирующий градиент рН) и 5 мМ ЭДТА (сильный комплексообразующий реагент), на формирование градиента рН, а также проверили возможность разделения металлов. Константы кислотности активных компонентов pK_a (1,99; 2,67; 3,10; 4,76; 6,16; 6,40; 10,26) перекрывают широкий диапазон рН. В данном случае получить плавный линейный градиент на всем рабочем интервале рН не удалось, но изменение рН от 6,4 до 3,5 происходило за 35–40 мин (рис. 2, кривая

2), чему, вероятно, способствует распределение значений pK_a кислотных групп в данном интервале. В то же время фронтальное разделение компонентов элюента выражено не столь четко, возможно, из-за различия в концентрациях. В табл. 2 приведены характеристики сегментов на профиле градиента рН. Таким образом, получен типичный квазилинейный градиент с наклоном $\Delta pH/\Delta V$, близким к оптимальному.

При формировании градиента рН элюентом на основе 20 мМ лимонной кислоты и 5 мМ ЭДТА удалось разделить модельную смесь четырех ионов (по 20 мМ каждого): Mn^{2+} , Cr^{3+} , Co^{2+} и Ni^{2+} (рис. 3). Для упрощения рисунка на хроматограмме приведена каждая вторая точка из полученных значений оптической плотности при проведении послеклоночной реакции с ПАР. Возможность разделения ионов металлов объясняется тем, что ЭДТА в данных условиях является реагентом, в первую очередь определяющим селективность процесса. Вместе с тем на селективность и на порядок элюирования влияют состав и устойчивость комплексов, образующихся на поверхности сорбента: Mn^{2+} элюируется при рН 7,3–7,0; Cr^{3+} – при рН 6,8–6,5; Co^{2+} и Ni^{2+} – в области рН 5,8–4,6. Хроматографические пики Mn^{2+} , Co^{2+} и Ni^{2+} имеют симметричную форму вследствие фокусирующего эффекта; пик Cr^{3+} имеет размытый задний фронт – вероятно, из-за кинетической инертности его комплексов по отношению к аминогруппам сорбента. Пики Co^{2+} и Ni^{2+} частично перекрываются, возможно, из-за совпадения области рН их элюирования с областью более резкого снижения рН на профиле градиента. Разрешение хроматографических пиков Co^{2+} и Ni^{2+} составляет 0,55.

Итак, лимонную кислоту и ЭДТА можно использовать в качестве компонентов простого буферного элюента вместо «Полибуфера» для формирования внутренних градиентов рН и для градиентного разделения ионов металлов на комплексообразующем сорбенте Tetren-SiO₂.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Прикладной химический анализ / Под ред. Т.Н. Шевцовской, О.А. Шпигуна, М.В. Попика. М., 2010.
2. Иванов А.В. Хроматофокусирование: новые подходы в концентрировании и разделении ионов металлов и биологически важных макромолекул. Дис. ... докт. хим. наук. М., 2011.
3. Nesterenko P.N., Ivanov A.V. // J. Chromatogr. 1994. **671**. P. 95.
4. Иванов А.В., Нестеренко П.Н. // Изв. ВУЗов. Сер. Химия и химтехнология. 1999. **42**. С. 122.
5. Vakstein M.S., Nesterenko P.N., Ivanov A.V., Tessman A.B. // J. Liq. Chrom. & Related Techn. 2006. **29**. P. 485.
6. Иванов А.В., Смирнова Н.Ю., Вакиштейн М.С. // ЖФХ. 2007. **81**. С. 704.
7. Иванов А.В. // ЖФХ. 2014. **88**. № 9. С. 1435.
8. Sluyterman L.A.Ae, Kooistra C. // J. Chromatogr. 1989. **470**. P. 317.
9. Ion Exchange Chromatography and Chromatofocusing: Principles and Methods. Uppsala: Amersham Biosciences, 2004. P. 126.
10. Kim H., Lubman D.M. // J. Chromatogr. A. 2008. **1194**. P. 3.
11. Amersham Biotechnology BioDirectory. Sweden, Uppsala, 2003. P. 500.

12. Kang X., Kutzko J.P., Hayes M.L., Frey D.D. // J. Chromatogr. A. 2013. **1283**. P. 89.
13. Иванов А.В., Вакштейн М.С. // Молекулярные технологии. 2007. **1**. С. 15.
14. Иванов А.В., Десяткин В.Г. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2009. **50**. С. 47.
15. Garmash A.V., Tessman A.B., Nesterenko P.N., Ivanov A.V. // Fresenius J. Anal. Chem. 1998. **361**. P. 274.
16. Guo H., Li X., Frey D.D. // J. Chromatogr. A. 2014. **1323**. P. 57.
17. Тессман А.Б., Иванов А.В., Вакштейн М.С., Нестеренко П.Н. // ЖФХ. 2001. **75**. С. 342.
18. Иванов А.В., Фигуровская В.Н., Иванов В.М. // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 1992. **33**. С. 570.
19. Sillen L.G., Martell A.E. Stability constants of metal-ion complexes. Special publication N 25. L., 1971.

Поступила в редакцию 10.09.14

CHROMATOFOCUSING OF METAL IONS ON CHELATING SORBENT TETREN-SiO₂ USING THE SIMPLE ELUENTS

A.V. Ivanov

(Division of Analytical Chemistry)

The simple eluents, consisting of tri- or tetrabasic acids solutions (citric and pyromellitic acids and a number of complexon acids – nitrilotriacetic (NTA), ethylenediaminetetraacetic (EDTA), cyclohexane-1,2-diamine-N,N,N,N-tetraacetic (CDTA)) or their two-component mixtures were applied in the first time for chromatofocusing of metal ions on chelating sorbent Tetren-SiO₂ (Silohrom S-120 c with bonded tetraethylene pentamine groups). The smoother, quasi-linear pH gradients were formed for eluents, consisting of citric acid and EDTA mixture. The separation of Mn²⁺, Cr³⁺, Co²⁺ and Ni²⁺ were achieved using the simple two-component eluent.

Key words: chromatofocusing, internal pH gradient, chelating sorbent, simple eluent, separation of metal ions.

Сведения об авторе: Иванов Александр Вадимович – доцент кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (sandro-i@yandex.ru).