Jelena Bogojević

# Optimizacija postupka hromatografskog odvajanja kompleksa Cu(II) sa Šifovim bazama u uslovima hromatografije na tankom sloju (TLC)

Optimizacija hromatografskog postupka odvajanja kompleksa Cu(II) sa Šifovim bazama obuhvata izbor optimalnog sorbent-eluent sistema koji bi najuspešnije odvojio šest helatnih kompleksa \( \beta \)-ketoiminato tipa, tj. kompleksa u kojima je ligand Šifova baza. Ispitivani helatni ligandi dobijeni su kondenzacijom diamina i odgovarajućeg \(\beta\)-diketona: sintetisani su bakar(II) kompleksi sa helatnim ligandima koji sadrže 1,2-diaminoetan ili 1,2-diaminopropan kao aminski deo i pentan-2,4-dion ili 1-fenil-2,4-pentan-dion, kao  $\beta$ -diketon. Razdvajanje je vršeno u uslovima tankoslojne hromatografije primenom sledećih sorbenata: celuloze, silika-gela, silika-gela RP-18 i eluenta: mono- i dvokomponentnih rastvarača različite polarnosti. Sistem za odvajanje koji se pokazao kao najefikasniji, je sistem u kome je kao sorbent primenjen silika-gel RP-18, a kao eluent hloroform ili dvokomponentni sistem toluen-acetonitril (1:1, v/v), odnosno dihlormetan-ugljentetrahlorid~(4:1, v/v).

### Uvod

Tankoslojna hromatografija (TLC – Thin Layer Chromatography) se može uspešno primeniti za razdvajanje strukturno sličnih supstanci (supstanci sa sličnim fizičko-hemijskim osobinama), kao i za izolovanje, identifikaciju i određivanje komponenata u smeši. Mehanizmi koji dovode do odvajanja u uslovima tankoslojne hromatografije su adsorpcija i particija. Adsorpcija omogućava da supstanca bude privučena od strane sorbenta, zbog građenja vodo-

nične veze, Van der Vaalsovih sila ili interakcije sa  $\pi$ -elektronskim oblakom (u zavisnosti od strukture primenjenog sorbenta i strukture odvajanih supstanci), dok particija omogućava odvajanje supstance na osnovu raspodele između dve ili više faza u zavisnosti od njene rastvorljivosti, tj. od koeficijenta raspodele koji definiše raspodelu supstance između faza.

U tankoslojnoj hromatografiji možemo razlikovati normalno-faznu hromatografiju, kod koje je sorbent polaran u odnosu na rastvarač, i reverzno-faznu, kod koje je sorbent nepolaran u odnosu na rastvarač.

Zahvaljujući jednostavnosti izvođenja, brzini, činjenicama da je za analizu potrebno malo uzorka i da je metoda jeftina, postala je jedna od najzastupljenijih analitičkih metoda.

Nakon razvijanja hromatograma izračunava se retencioni faktor  $(R_F)$  primenom sledećeg izraza:

### $R_F=a/b$ ,

gde je a – pređeni put rastvarača, a b – pređeni put ispitivane supstance.

Retencioni faktor,  $R_F$ , definiše pokretljivost ispitivanih kompleksa pri primenjenim uslovima hromatografskog odvajanja.

Kako je  $R_F$  vrednost prema ovom obrascu vrednost izražena kao decimalni broj, radi preglednosti, uobičajeno je da se ona tabelarno prikazuje tako što se izračunava  $hR_F$  vrednost, to jest:

$$hR_F = R_F \times 100$$
.

 $hR_F$  može da ima vrednosti od 0 do 100. U slučaju kada je  $hR_F = 100$  u tabele se unosi oznaka F, što znači da se ispitivana supstanca "kreće" sa frontom rastvarača

Pored retencionog parametra  $hR_F$  koristi se i  $R_M$  vrednost. Retencioni faktor  $R_M$  je parametar koji se

Jelena Bogojević (1989), Požarevac, Dunavska ulica 51/31, učenica 4. razreda Požarevačke gimnazije

#### MENTOR:

dr Rada Baošić, Hemijski fakultet, Beograd

koristi pri grafičkom prikazivanju rezultata. Izračunava se primenom izraza (Chohan et al. 2006):

$$R_M = log (1/R_F - 1)$$

Zahvaljujući ovom retencionom parametru, kroz računanje  $\Delta R_M$  vrednosti možemo da računski proverimo uspešnost odvajanja supstanci koje posmatramo.  $R_M$  vrednosti se računaju kao:

$$\Delta R_M (i-i) = R_{Mi} - R_{Mi}$$

$$i = 1, 2 i 3; j = 4, 5 i 6.$$

Radi postizanja boljeg odvajanja nekad je pogodno razvijanje hromatograma dvokomponentnim sistemima približne polarnosti monokomponentnom sistemu koji je primenjen za odvajanje. Primena dvokomponentnog sistema za razvijanje omogućava pojavu oba mehanizma odvajanja, i adsorpcionog i particionog, što u nekim slučajevima dovodi do uspešnijeg odvajanja ispitivanih supstanci. Obrazac koji nam daje mogućnost da napravimo smešu odgovarajuće polarnosti, pri čemu su nam poznate polarnosti komponenata smeše se dobija po obrascu:

$$P_1 \times V_1 + P_2 \times V_2 = P$$

 $P_1$  je polarnost prvog organskog rastvarača a  $V_1$  njegova zapremina,  $P_2$  je polarnost drugog organskog rastvarača a  $V_2$  je njegova zapremina.

Šifove baze su jedinjenja koja nastaju kondenzacijom aldehida/ketona sa sekundarnim amino-grupama. Šifove baze, kao i njihovi kompleksi, imaju sposobnost da reverzibilno vezuju kiseonik (Jones *et al.* 1979), katalizuju hidrogenizaciju olefina (Olive i Olive 1984), učestvuju u transferu amino grupe (Dugas i Penney 1981), imaju fotohromne (Margerum i Miller 1971), antibakterijske i antifungicidne osobine (Raman *et al.* 2003). Njihova struktura omogućava, uvođenjem različitih supstituenata, dobijanje model sistema na kojima se mogu posmatrati različiti uticaji na gore navedene osobine (Mohamed 2006; Singh i Varshney 2006; Chohan *et al.* 2006).

Karakteristična obojenost ovih kompleksa daje mogućnost vizuelne detekcije, čak i malih količina supstance, što dodatno pojednostavljuje tehniku rada i dovodi do povećanja brzine detekcije.

Cilj ovog rada je bio izbor optimalnog sorbenteluent sistema koji bi najuspešnije odvojio šest helatnih kompleksa  $\beta$ -ketoiminato tipa, tj. kompleksa u kojima je ligand Šifova baza.

### Materijal i metode

Ispitivani su bakar(II) kompleksi sa helatnim ligandima koji sadrže 1,2-diaminoetan ili 1,2-diamino-propan kao aminski deo i pentan-2,4-dion ili 1-fenil-2,4-pentan-dion, kao  $\beta$ -diketon. Sastav ispitivanih kompleksa prikazan je na slici 1 i tabeli 1.

Slika 1. Sastav Cu(II) kompleksa β-ketoiminato tipa

Figure 1. Structure of the investigated Schiff base

Tabela 1. Sastav ispitivanih Cu(II) kompleksa βketoiminato tipa. Redni brojevi (rb) predstavljaju oznaku kompleksa na slici 1.

ok	R	R'	В	kompleks			
1.	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub>	Cu(acac <sub>2</sub> en)			
2.	$CH_3$	$C_6H_5$	$CH_2CH_2$	Cu(acacphacac en)			
3.	$C_6H_5$	$C_6H_5$	$CH_2CH_2$	Cu(phacac2 en)			
4.	$CH_3$	$CH_3$	CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub>	Cu(acac <sub>2</sub> pn)			
5.	$CH_3$	$C_6H_5$	CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub>	Cu(acacphacac pn)			
6.	$C_6H_5$	$C_6H_5$	CH(CH <sub>3</sub> )CH <sub>2</sub>	Cu(phacac2 pn)			
acac – acetilacetonato phacac – fenilacetilacetonato							

Nazivi ispitivanih jedinjenja (slika 1 i tabela 1):

- 1. Acetilacetonato-etilendiimino-bakar(II) kompleks
- 2. Acetilacetonato-fenilacetilacetonato-etilendi imino-bakar(II) kompleks
- 3. Fenilacetilacetonato-etilendiimino-bakar(II) kompleks
- 4. Acetilacetonato-propilendiimino-bakar(II) kompleks
- Acetilacetonato-fenilacetilacetonato-propilen diamino-bakar(II) kompleks
- Fenilacetilacetonato-propilendiimino--bakar(II) kompleks

Ispitivani kompleksi su svrstani u dve serije u odnosu na diaminski deo koji se nalazi u ligandu.

Pri ispitivanju njihovog hromatografskog ponašanja pri optimizaciji postupka odvajanja posmatrani su analogi kompleksi 1 i 4, 2 i 5, 3 i 6, dok se kompleksi 1 i 2, 2 i 3, 3 i 4, 4 i 5, 5 i 6, označavaju kao susedni.

Pre nego što se pristupi odvajanju kompleksa Cu(II) sa Šifovim bazama primenom tankoslojne hromatografije, neophodno je pažljivo izabrati stacionarnu (sorbent) i mobilnu (razvijač) fazu kao bi odvajanje bilo uspešno, tj. neophodno je izvršiti optimizaciju postupka hromatografskog odvajanja.

Rad je sastavljen iz dva dela. U prvom delu rada za razvijanje hromatograma su primenjeni monokomponentni razvijači. Posmatrano je hromatografsko ponašanje kompleksa Šifovih baza u hromatografskom sistemu, gde je kao stacionama faza primenjen silika-gel, silika-gel RP-18 i celuloza. Sastav, kao i polarnosti primenjenih monokomponentnih razvijača su date u tabeli 2.

Tabela 2. Polarnost upotrebljenih rastvarača

Rastvarač	Polarnost
cikloheksan	1,3
ugljentetrahlorid	1,8
ksilen	2,5
hloroform	4,1
aceton	5,1
etanol	4,3
toluen	2,4
benzen	2,7
n-butanol	3,9
etil-acetat	4,4
cikloheksanon	4,7
aceton	5,1
benzil alkohol	5,7
acetonitril	5,8

Pre nanošenja polaznih mrlja na sorbent, ispitivane supstance su rastvarane u hloroformu. Nanošenje mrlja vršeno je mikrokapilarama zapremine 0.5 μL. Pre razvijanja hromatograma kadice u kojima je vršeno razvijanje hromatograma su sićene parama rastvarača u toku 5 minuta.

Drugi deo rada obuhvata pronalaženje odgovarajućeg sistema za uspešno odvajanje, pri čemu je mobilna faza dvokomponentna, tj. mobilna faza je bila smeša dva rastvarača u pogodnim zapreminskim odnosima. Pogodan zapreminski odnos je odnos koji omogućava da smeša ima približnu polarnost kakvu poseduje monokomponentni razvijač koji je izvršio najuspešnije odvajanje ispitivanih jedinjenja.

Rastvarači koji su kombinovani da bi se dobio dvokomponentni razvijač, kao i odnosi u kojima su pomešani su dati u tabeli 3.

Tabela 3. Primenjene smeše dva rastvarača u adekvatnom zapreminskom odnosu

Dvokomponentni razvijači	v : v
Trietilamin – anilin	1:1
n-butanol – etanol	1:1
n-butanol – acetonitril	9:1
n-butanol – etil-acetat	3:2
Toluen – acetonitril	1 : 1
Toluen – etanol	1:9
Ksilen - benzil alkohol	1 : 1
Ksilen – etanol	1:9
Benzen – cikloheksanon	3:7
Dihlormetan – aceton	1:1
Dihlormetan – ugljentetrahlorid	4:1
Etilenhlorid – cikloheksanon	1:1

Ispitivane komplekse Cu(II), čija je struktura prikazana u tabeli 1 sintetisala je dr Rada Baošić na Katedri za analitičku hemiju Hemijskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Kao sorbenti, u ovom radu, su upotrebljeni:

- silika-gel, TLC aluminuim sheets 20×20, MERCK
- silika-gel RP-18, TLC aluminuim sheets 20×20, MERCK
- celuloza, TLC aluminuim sheets 20×20, MERCK

Kao razvijači primenjeni su sledeći rastvarači: cikloheksan, ugljentetrahlorid, ksilen, hloroform, aceton, etanol, toluen, benzen, n-butanol, etil-acetat, cikloheksanon, acetonitril, trietilamin, anilin, benzilalkohol, dihlor metan i etilen hlorid. Svi upotrebljeni rastvarači bili su p.a. kvaliteta.

# Rezultati i diskusija

Dobijene  $hR_F$ -vrednosti ( $R_F \times 100$ ) ispitivanih jedinjenja koje su dobijene primenom celuloze kao sorbenta su prikazane u tabeli 4.

Tabela 4. Dobijene  $hR_F$ -vrednosti ispitivanih kompleksa na celulozi

	C	U	K	Н	A	E
Cu(acac <sub>2</sub> en)	0	F	88	F	F	F
Cu(acacphacac en)	0	F	89	F	F	F
Cu(phacac2 en)	0	F	0	F	F	F
Cu(acac2 pn)	0	F	91	F	F	F
Cu(acacphacac pn)	0	F	94	F	F	F
Cu(phacac2 pn)	0	F	79	F	F	F
C - cikloheksan, U len, H - hloroform,	_					ksi-

Izračunate  $hR_F$ -vrednosti ( $R_F \times 100$ ) ispitivanih jedinjenja koje su dobijene primenom silika-gela RP-18 kao sorbenta su prikazane u tabeli 5.

Tabela 5. Dobijene hRF-vrednosti ispitivanih kompleksa na silika-gelu RP-18

	C	U	K	Н	A	E
Cu(acac <sub>2</sub> en)	0	12	12	55	83	72
Cu(acacphacac en)	0	20	5	40	75	88
Cu(phacac2 en)	0	0	30	83	94	0
Cu(acac2 pn)	21	13	30	72	86	70
Cu(acacphacac pn)	12	16	43	80	86	75
Cu(phacac2 pn)	9	28	60	90	86	67
C – cikloheksan, U – ugljentetrahlorid, K – ksilen, H – hloroform, A – aceton, E – etanol						

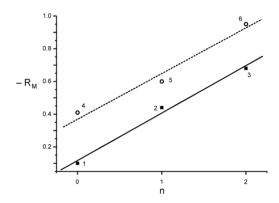
Izračunate  $hR_F$ -vrednosti ( $R_F$ x100) ispitivanih jedinjenja koje su dobijene primenom silika-gela su prikazane u tabeli 6.

Tabela 6. Dobijene  $hR_F$ -vrednosti ispitivanih kompleksa na silika-gelu

1 6							
	C	U	K	Н	A	E	
Cu(acac <sub>2</sub> en)	0	6	15	48	60	67	
Cu(acacphacac en)	0	9	9	43	83	70	
Cu(phacac2 en)	0	0	9	54	92	83	
Cu(acac2 pn)	0	18	18	43	81	80	
Cu(acacphacac pn)	0	12	12	39	89	82	
Cu(phacac2 pn)	0	30	30	66	81	77	
C – cikloheksan, U – ugljentetrahlorid, K – ksi- len, H – hloroform, A – aceton, E – etanol							

Nakon razvijanja hromatograma posmatranjem dobijenih  $hR_F$  vrednosti u tabelama 4,5 i 6 se može zaključiti da je uspešno odvajanje ispitivanih kompleksa postignuto sistemom u kome je kao sorbent primenjen silika-gel RP-18, a kao mobilna faza hloroform. Ovde je postignuta najbolja razlika u  $hR_F$  vrednostima između susednih kompleksa kao i pravilnost u odvajanju analogih kompleksa.

Pravilnost koja postoji u odvajanju kompleksa 1-3, kao i 4-6 (dve serije) može se prikazati grafički (slika 2). Na x-osu se nanosi broj metil-grupa supstituisanih fenil-grupama (n = 0, 1 i 2), a na y-osu retencioni parametar,  $R_M$ . Kada je n = 0 kompleks ne sadrži kao supstituent fenil-grupu, kada je n = 1 prisutna je jedna fenil-grupa,a kada je n = 2 prisutne su dve fenil-grupe.



Slika 2. Zavisnost *R<sub>M</sub>*-vrednosti od broja metil-grupa supstituisanih fenil-grupama (hromatografski sistem silika-gel RP-18 / hloroform)

Figure 2. Dependence between  $R_M$  values and number of substituted methyl groups

Primenom regresione analize izračunati su faktori odvajanja. Uspešno odvajanje ispitivanih jedinjenja može da se prati i izračunavanjem i poređenjem separacionih faktora, odnosno faktora odvajanja. Na taj način može da se kvantifikuje uspešno odvajanje, jer što je veći separacioni faktor i samo odvajanje posmatranih jedinjenja jedne serije je bolje. Takođe se može posmatrati uspešnost odvajanja analogih kompleksa na osnovu izračunavanja separacionih faktora kao razlike u njihovim  $R_M$  vrednostima. Posmatranjem analognih kompleksa (1-4, 2-5 i 3-6) može da se zaključi da je postignuto njihovo uspešno odvajanje. Dobijene su sledeće vrednosti:

 $\Delta R_M (1-4) = 0.31$ 

 $\Delta R_M (2-5) = 0.14$ 

 $\Delta R_M (3-6) = 0.27$ 

Zahvaljujući ovim podacima dobijena je i računska potvrda onoga što je vizuelno uočeno i određeno retencionim faktorima nakon razvijanja hromatograma, tako da sistem silika-gel RP-18 – hloroform i treba odabrati kako bi se uspešno odvojili kompleksi Cu(II) sa Šifovim bazama.

U sistemu sorbent – dvokomponentni eluent od svih mogućnosti koje su ispitane najbolje odvajanje je postignuto, ako se za razvijač odabere neka od sledećih smeša: toluen-acetonitril (1:1, v/v) i dihlormetan-ugljentetrahlorid (4:1, v/v).

Vrednosti razdvajanja u sistemu toluen-acetonitril (1:1, v/v) između analogih kompleksa (1-4, 2-5, 3-6) su sledeće:

 $\Delta R_M (1-4) = 0.12$ 

 $\Delta R_M (2-5) = 0.43$ 

 $\Delta R_M (3-6) = 0.31$ 

Vrednosti razdvajanja u sistemu dihlormetanugljentetrahlorid (4:1, v/v) između analogih kompleksa (1-4, 2-5, 3-6) su sledeće:

 $\Delta R_M (1-4) = 0.17$ 

 $\Delta R_M (2-5) = 0.14$ 

 $\Delta R_M$  (3-6) = 0.12

Jedan od značajnih faktora koji ima uticaja na izbor optimalnog hromatografskog sistema za odvajanje je svakako struktura samih kompleksa. Najmanje  $R_F$  vrednosti imaju prvi i četvrti kompleks zbog prisustva metil-grupa, drugi i peti imaju veću pokretljivost, dok treći i šesti imaju najviše  $hR_F$ -vrednosti, jer kao supstituente poseduju fenil-grupe.

# Zaključak

Na osnovu eksperimentalnih podataka dobijenih primenom hromatografije na tankom sloju i njihove analize primenom matematičkih relacija može se zaključiti koji hromatografski sistem zadovoljava zadati kriterijum da izvrši najuspešnije odvajanje.

Ispitivanih kompleksa bakra sa Šifovim bazama. Sistem za odvajanje koji se pokazao kao najefikasniji je sistem u kome je sorbent silika-gel RP-18, mobilna faza hloroform ili toluen-acetonitril (1:1, v/v), odnosno dihlormetan-ugljentetrahlorid (4:1, v/v). Ovi sistemi bi eventualno mogli da se primene i za odvajanje strukturno sličnih jedinjenja skupljim,

znatno preciznijim i reproduktivnijim metodama, kao što je npr. HPLC.

Zahvalnost. Veliku zahvalnost dugujem mentoru dr Radi Baošić, docentu Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, koja je predložila temu ovog rada, odgovarala na sva moja pitanja, puno me naučila i najbitnije od svega, bila uz mene u svakom trenutku pružajući mi veliku sigurnost i podršku.

### Literatura

Bauer K., Gros L., Sauer W. 1990. Thin Layer Chromatography. Merck

Bate-Smith E. C., Westall R. G. 1950. Chromatographic behavior and chemical structure. Some naturally occurring phenolic substances. *Biochimica et Biophysica Acta*, 4: 427.

Chohan Z. H., Pervez H., Rauf A., Khan K. M., Supuran C. T. 2006. Antibacterial cobalt(II), copper(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of mercaptothiadiazole-derived furanyl, thienyl, pyrrolyl, salicylyl and pyridinyl Schiff bases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 21: 193.

Dugas H., Penney C. 1981. *Bioorganic Chemistry*. Springer-Verlag

Jones R. D., Summerville D. A., Basolo F. 1979. Synthetic oxygen carriers related to biological systems. Chemical Reviews, 79: 139.

Margerum J. D., Miller L. J. 1971. Photochromic processes by tautomerism. *Techniques of Chemistry (New York)*, 3: 557.

Mohamed G. G. 2006. Synthesis, characterization and biological activity of bis(phenylimine) Schiff base ligands and their metal complexes. Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 64 (1): 188.

Olive G. H., Olive S. 1984. The Chemistry of the Catalyzes Hydrogenation of Carbon Monoxide. Berlin: Springer

Raman N., Kulandisamy A., Thangaraja C., Jeyasubramanian K. 2003. Redox and antimicrobial studies of transition metal(II) tetradentate Schiff base complexes. *Transition Metal Chemistry*, **28** (1): 29.

Singh H. L., Varshney A. K. 2006. Synthetic, structural and biochemical studies of organotin(IV) with Schiff bases having nitrogen and sulphur donor ligands. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 6: 1.

Jelena Bogojević

## Optimization of Chromatographic Methods for Separation of Some Schiff Base Complexes Copper(II) by Thin Layer Chromatography

Thin layer chromatography is successful in separation of similar substances, as well as the identification and finding of compounds in mixtures. This method is simple, fast and relatively inexpensive. In this project the best combination of a solvent and mobile phase was chosen, which would make the most successful separation of six chelate complexes in which the Schiff base is used as a ligand. In Figure 1 the structure of the investigated complexes is shown

Literature data points out that Schiff bases and complexes are interesting because of their properties, such as the ability to reversibly bind oxygen (Jones et al. 1979), catalytic activity in hydrogenation of olefins (Olive and Olive 1984), transfer of an amino group (Dugas and Penney 1981), photochromic properties (Margerum and Miller 1971), completing ability towards some toxic metals, antibacterial and antifungicidal properties (Raman et al. 2003). Moreover, the Schiff base complexes can be greatly modified by introducing different substituents (Mohamed 2006; Singh and Varshney 2006; Chohan et al. 2006).

This project was composed of two parts. In the first one a mono-component mobile phase was used, and in the second part of this project a two-component mobile phase was used for developing the chromatographic system. Silica gel, silica gel-RP-18 and cellulose were taken for sorbents.

The most successful separation was obtained under the conditions where the solvent was silica RP-18 and the mobile phase was chloroform. There was an accurate separation between complex 1-3 and complex 4-6 (two series) which can be seen in Figure 2. On the x-axis the number of methyl groups which are substituted with phenyl-groups (n = 0, 1, 2) is shown, and on the y-axis the retention parameter  $R_M$  is presented. For n = 0 the complex does not have a methyl group, when n = 1 the complex has one phenyl group and when n = 2 the complex has two methyl groups.

Contemplating the analogous complexes, we conclude that their successful separation is achieved.

 $\Delta R_M (1-4) = 0.31$ 

 $\Delta R_M (2-5) = 0.14$ 

 $\Delta R_M$  (3-6) = 0.27

The above given results are in accordance with the chromatographic behavior of the investigated compounds. It can be concluded that the system chloroform-silica RP-18 should be chosen for the separation of Schiff base complexes of copper(II).

In the system sorbent-two component mobile phase the successful separation was obtained when separation was performed on silica RP-18 by: toluene-acetonitrile (1:1, v/v) or methylenchloride-carbontetrahloride (4:1, v/v).