

УДК 543.544:546.9

ИЗУЧЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ КОМПЛЕКСОВ ОРГАНОКОБАЛЬТА(III) С ТРИДЕНТАТНЫМ ОСНОВАНИЕМ ШИФФА В УСЛОВИЯХ ОФ ВЭЖХ НА ПОЛИМЕРНОМ СОРБЕНТЕ

П.Н. Нестеренко, Н.А. Пеннер, М.В. Цикалова, И.Я. Левитин

(кафедра аналитической химии)

Изучены закономерности хроматографического удерживания комплексов состава $[RCo(acacsen)(en)]Br$, где R – этил, изопропил, циклогексил, октил, в условиях обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии на полистирол-дивинилбензольном сорбенте. Исследовано влияние природы и содержания органического растворителя в подвижной фазе, а также влияние концентрации и pH буферного раствора ТРИС на селективность разделения и форму хроматографических пиков комплексов.

Комплексы органокобальта(III) с тридентатным основанием Шиффа состава $[RCo(acacsen)(en)]Br$, где R – этил (Et), изопропил (*i*-Pr), циклогексил (с-Hex), октил (Oct) способны генерировать свободные радикалы в мягких условиях [1 – 3]. Они представляют собой новый класс источников радикальных частиц и интересны как с научной, так и с практической точек зрения (например, исследуется возможность применения препаратов на их основе для лечения злокачественных опухолей). Высокая реакционная способность и кинетическая лабильность комплексов в сочетании с высокими требованиями к индивидуальности лекарственных форм, применяемых для биохимических и фармакологических исследований, предъявляют особые требования к разработке надежных методов анализа. Ранее было изучено [4] поведение этих соединений в условиях ОФ ВЭЖХ на колонке, заполненной химически модифицированным силикагелем. Однако селективность разделения комплексов и продуктов их разложения в этих условиях недостаточна для полного разрешения хроматографических пиков, что связано с особенностями комплексов состава $[RCo(acacsen)(en)]Br$, для которых характерны невысокая устойчивость в кислых средах [1 – 5], ввиду чего комплексы заметно разлагаются в процессе разделения, так как сорбенты на основе силикагеля не могут быть использованы при pH выше 7,5, а также наличие лигандов, содержащих основные атомы азота, взаимодействие которых с остаточными силанольными группами на поверхности сорбентов на основе силикагеля вызывает искажение формы хроматографических пиков, снижает разрешающую способность метода и затрудняет количественный анализ [4, 6].

Поэтому задача поиска новых селективных и эффективных хроматографических систем для разделения и определения комплексов органокобальта(III) в различных объектах является актуальной. Возможным путем решения проблемы может быть использование полимерных сорбентов в качестве наполнителя хроматографической колонки, что позволило бы расширить рабочий интервал pH подвижной фазы и за счет этого стабилизировать разделяемые комплексы, а также ликвидировать в хроматографической системе вторичные взаимо-

действия разделяемых молекул с остаточными силанольными группами [6 – 9]. До настоящего времени полимерные неподвижные фазы не использовались для разделения β -дикетонатов, β -кетоиминатов и комплексов металлов с основаниями Шиффа. Имеются лишь единичные работы, посвященные ВЭЖХ комплексов металлов с N-метилфурил-гидроксамовой кислотой [7], 1,10-фенантролином [8] и α -оксизомаляной кислотой [9].

Цель настоящего исследования – изучение хроматографического поведения комплексов органокобальта(III) на колонке с полистирол-дивинилбензольным сорбентом, а также выбор оптимальных условий для разделения смеси этих комплексов.

Экспериментальная часть

Разделение хелатов проводили на жидкостном хроматографе, состоящем из насоса высокого давления “Beckman-114M” (США), фотометрического детектора “LKB Uvicord-2238” (Швеция), инжектора “Rheodyne-7125” (США) с объемом петли 250 мкл и стальной хроматографической колонки (100 x 4,6 мм), заполненной полистирол-дивинилбензольным сорбентом *PLRP-S* (Polymer Laboratories, UK), размер частиц 8 мкм. Заполнение колонки проводили суспензионным способом. В качестве среды для приготовления суспензии *PLRP-S* использовали смесь, состоящую из 60% ацетонитрила и 40% воды. Для сравнения разделяющей способности применяли колонку (250 x 4 мм) “Диасорб-130-Т-С16” (СП “БиоХимМак”, Россия), заполненную гексадецилсиликагелем. Хроматограммы регистрировали с помощью самописца “LKB-2066” (Швеция) или интегратора “Spectra Physics DP-700” (США). Измерение pH проводили на pH-метре “ЗИП pH-340” со стеклянным электродом.

В качестве подвижной фазы применяли смеси “хроматографически чистого” ацетонитрила или метанола марки “ч.” с 0,05 – 0,005 М водными растворами “ч.д.а.” ТРИС при различных значениях pH. Рабочие растворы ТРИС готовили растворением в дистиллированной воде точных навесок, pH растворов создавали уксусной кислотой (“х.ч.”) или

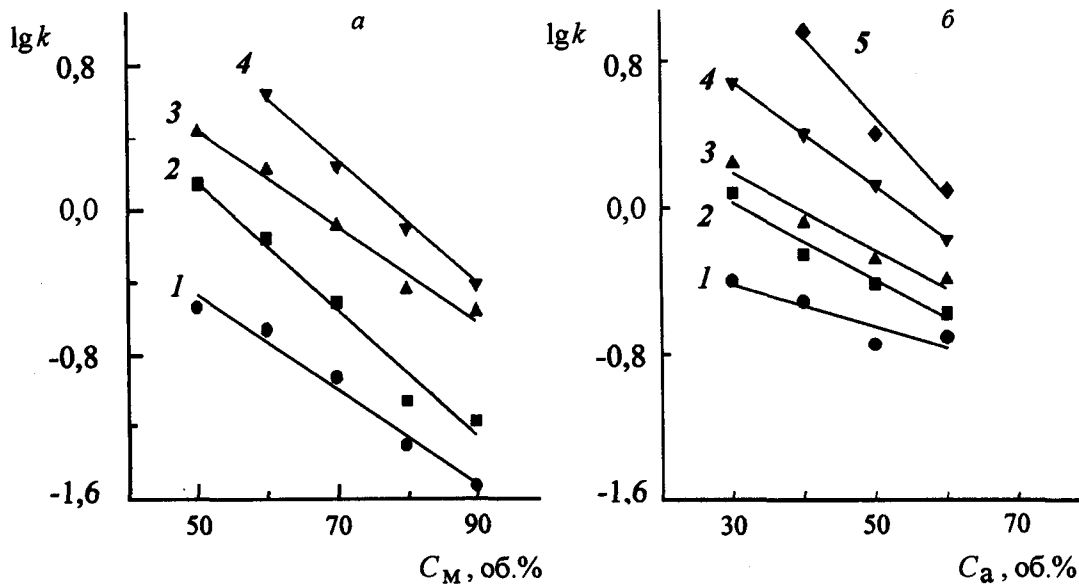


Рис.1. Зависимость логарифмов коэффициентов емкости комплексов от содержания: *a* – метанола, *б* – ацетонитрила в элюенте, об. % : 1 – [Co(асасен)₂]Br; 2 – [EtCo(асасен)(ен)]Br; 3 – [i-PrCo(асасен)(ен)]Br; 4 – [с-НехCo(асасен)(ен)]Br, 5 – [OctCo(асасен)(ен)]Br (сорбент PLR-P-S, элюент: ацетонитрил – 0,05 М раствор ТРИС; pH 7,5 (доведено уксусной кислотой); расход элюента 1,5 мл/мин

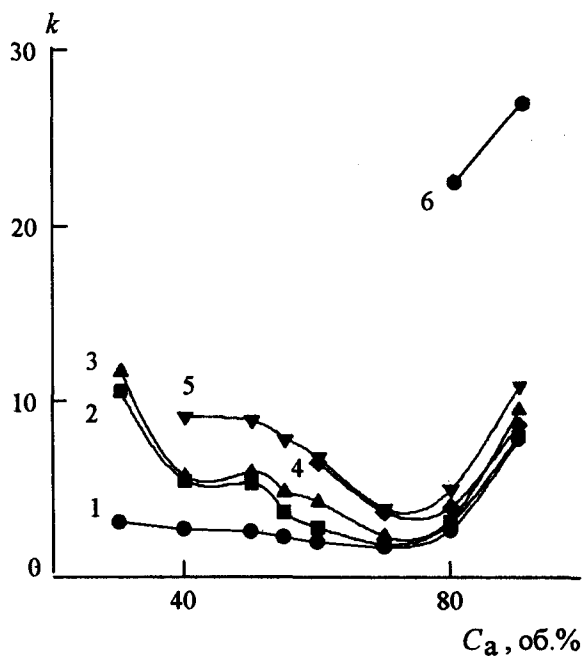


Рис.2. Зависимость коэффициентов емкости (*k*) комплексов от содержания ацетонитрила в элюенте: 1 – [Co(асасен)₂]Br; 2 – [EtCo(асасен)(ен)]Br; 3 – [i-PrCo(асасен)(ен)]Br; 4 – [с-НехCo(асасен)(ен)]Br; 5 – [OctCo(асасен)(ен)]Br, 6 – [CetCo(асасен)(ен)]Br (сорбент PLRP-S, элюент: ацетонитрил – 0,005 М раствор ТРИС, pH 9,6; расход элюента 1,5 мл/мин

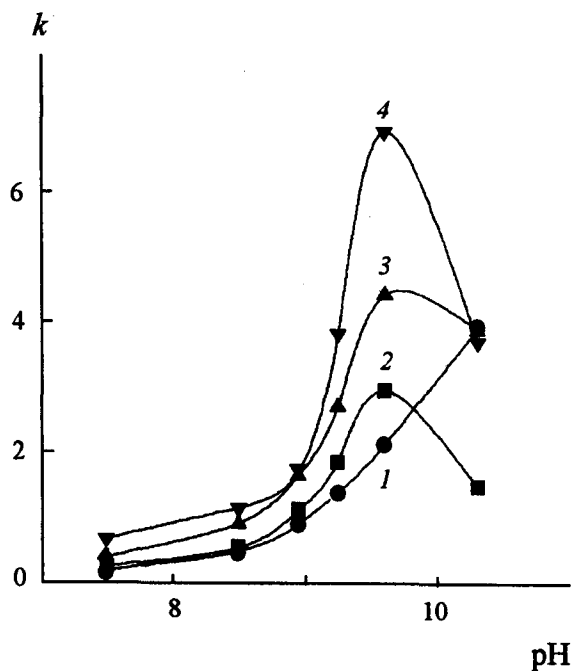


Рис.3. Зависимость коэффициентов емкости (*k*) комплексов от pH: 1 – [Co(асасен)₂]Br; 2 – [EtCo(асасен)(ен)]Br; 3 – [i-PrCo(асасен)(ен)]Br; 4 – [с-НехCo(асасен)(ен)]Br; 5 – [OctCo(асасен)(ен)]Br, 6 – [CetCo(асасен)(ен)]Br (сорбент PLRP-S, элюент: ацетонитрил – 0,005 М раствор ТРИС, pH 9,6; расход элюента 1,5 мл/мин

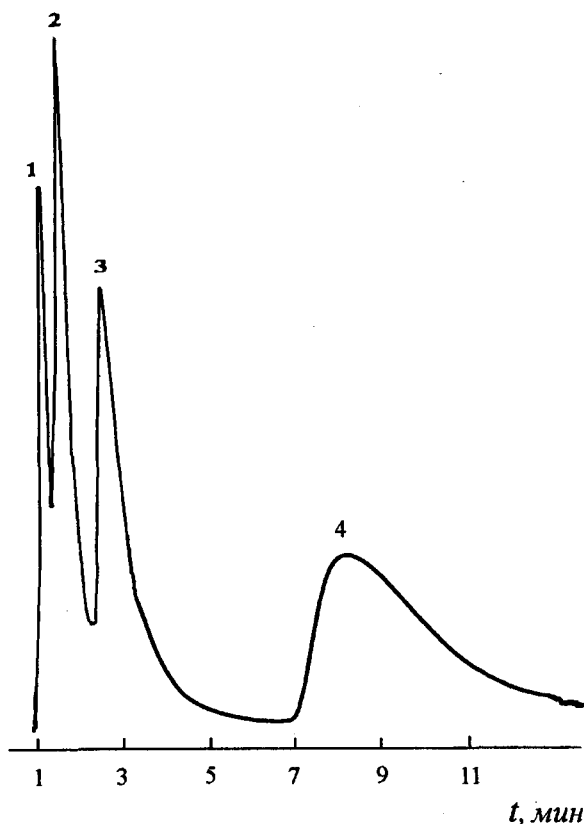


Рис.4. Хроматограмма смеси комплексов: 1 – $[\text{Co}(\text{acacen})_2]\text{Br}$, 2 – $[\text{i-PrCo}(\text{acacen})(\text{en})]\text{Br}$, 3 – $[\text{c-HexCo}(\text{acacen})(\text{en})]\text{Br}$, 4 – $[\text{OctCo}(\text{acacen})(\text{en})]\text{Br}$ (сорбент *PLRP-S*, элюент: ацетонитрил – 0,005 М раствор ТРИС, рН 9,6; расход элюента 1,5 мл/мин

бента, что может влиять на селективность разделения [6,10,11].

Хроматографическое поведение изучаемых катионных хелатов алкилкобальта(III) в условиях ОФ ВЭЖХ определяется природой и содержанием органического растворителя в элюенте, природой и концентрацией буферного раствора и значением рН подвижной фазы. Варьирование и учет перечисленных факторов позволяет определить закономерности удерживания комплексов и выбрать оптимальные условия разделения.

Большое значение при работе с полимерными сорбентами имеет выбор оптимальной величины объемной скорости подвижной фазы, при которой хроматографическая колонка имеет наибольшую эффективность разделения. Для этой цели была изучена зависимость высоты, эквивалентной теоретической тарелке, от объемной скорости элюента. Полученные результаты приведены ниже.

Скорость, мл / мин	ВЭТТ, мм
1.0	0.214
1.1	0.211
1.3	0.188
1.4	0.180
1.5	0.162
1.7	0.173
2.0	0.198
2.5	0.206

Зависимость имеет ярко выраженный минимум при скорости 1,4 – 1,6 мл/мин. Снижение эффективности при относительно малых скоростях подвижной фазы связано с проникновением небольших плоских молекул бензола внутрь сорбента. При более высоких скоростях элюента происходит частичное сжатие слоя сорбента, при этом появляется дополнительный мертвый объем в верхней части колонки, и ее эффективность несколько снижается. Дальнейшие исследования проводили при объемной скорости элюента 1,5 мл/мин, что соответствовало эффективности в 7500 теорет. т/м, тогда как по литературным данным максимальная эффективность колонок, заполненных сорбентом *PLRP-S* со средним раз-

2М раствором NaOH (“ч.д.а.”). Изучаемые комплексы, синтезированные в группе ИНЭОС им. А.Н. Несмеянова РАН и охарактеризованные данными элементного анализа и адекватными спектрами ^1H и ИК, растворяли в метаноле непосредственно перед проведением исследований.

Результаты и их обсуждение

Основное отличие полимерных сорбентов в сравнении с химически модифицированными силикагелями состоит в более широком рабочем интервале рН от 1 до 13, что на практике позволяет использовать элюенты, обеспечивающие в процессе хроматографии более высокую стабильность разделяемых комплексов, имеющих слабокислотные или сильноосновные функциональные группы в составе лигандов [6,10,11]. Кроме того, использование таких сорбентов позволяет получить более узкие симметричные пики для комплексов, включающих азотсодержащие лиганды, поскольку полимерная основа обычно не содержит активных групп, которые могли бы приводить к адсорбции веществ основной природы. В случае кремнезёмов подобные взаимодействия с остаточными силанольными группами сорбента приводят к заметному уширению хроматографических пиков и существенному увеличению времени анализа [4]. Необходимо также принять во внимание возможные π - π -взаимодействия этих комплексов с полистирол-дивинилбензольной основой полимерного сор-

Таблица 1
Характеристика хроматографических систем

Система	Сорбент	Размер колонки мм	Эффективность колонки, теорет. т/м	Состав подвижной фазы, %*
I	PLRP-S	100 46	7 500	40(ацетонитрил), 60(0,005 М ТРИС)
II	PLRP-S		7 500	70(метанол), 30(0,005 М ТРИС)
III	Диасорб Т-130-С-16	150 40	18 800	75(ацетонитрил), 25(0,005 М ТРИС)

* рН 7,5

Т а б л и ц а 2

Параметры, характеризующие разделение комплексов

Комплекс	Хроматографическая система					
	I		II		III	
	Параметр					
	R_s	A_{10}	R_s	A_{10}	R_s	A_{10}
Co / Et	4.73	1.55/3.43	4.19	1.31/1.42	3.45	4.66/5.86
Et / <i>i</i> -Pr	2.15	3.43/1.77	4.29	1.42/1.51	5.99	5.86/2.41
<i>i</i> -Pr / <i>c</i> -Hex	3.71	1.77/2,26	3.68	1.51/2.29	4.56	2.41/6.12

мером частиц 8 мкм, составляет 20000 теорет.т/м [6].

Природа органического растворителя в составе подвижной фазы при использовании полимерных сорбентов играет более важную роль, чем для других классов сорбентов. Зависимости удерживания комплексов от содержания ацетонитрила и метанола в подвижной фазе при pH 7,5 и концентрации ТРИС 0,005 М линейны в полулогарифмических координатах (рис.1), следовательно, удерживание комплексов органокобальта(III) происходит в основном по гидрофобному механизму [12]. Косвенным его подтверждением является выраженный рост удерживания комплексов с повышением их гидрофобности (с увеличением числа атомов углерода в органическом радикале при атоме кобальта). Как и следовало ожидать, содержание метанола для достижения оптимальной селективности разделения намного (на 30 об.%) превышает содержание ацетонитрила для достижения аналогичного разделения. Комплексы с длинноцепочечными радикалами (*n*-Ost и *n*-Set) имеют большие времена удерживания и сильно размытые пики в случае метанолсодержащих элюентов, что не позволяет использовать метанол для разделения этих соединений.

Для элюентов на основе ацетонитрила при pH 9,6 наблюдали более сложную зависимость, имеющую несколько точек перегибов (рис.2). Следует отметить неожиданное увеличение времен удерживания изучаемых соединений, которое наблюдали при высоких (более 80 об.%) содержаниях ацетонитрила в подвижной фазе. Этот эффект вызван, вероятно, переходом механизма удерживания от обращеннофазового (при концентрации органического модификатора менее 80 об.%) к распределительному (при увеличении содержания модификатора). Аналогичное хроматографическое поведение изучаемых хелатов для колонок, заполненных алкилсиликагелями, было связано с изменением гидрофобного механизма удерживания на ионообменный с участием остаточных силанольных групп [4]. Появление точек перегиба в области, соответствующей 50 – 60 об.% ацетонитрила связано, вероятно, с изменением третичной структуры полимерной матрицы. Следует отметить, что в присутствии ацетонитрила были получены более узкие и симметричные пики, чем в присутствии метанола, что согласуется с литературными данными [6].

Еще одним параметром, определяющим удерживание комплексов в хроматографической колонке, является pH элюента. Зависимость, приведенная на рис.3, имеет явно выраженный максимум для комплексов с R = Et, *i*-Pr и *c*-Hex. Рост времен удерживания в диапазоне pH 7,5 – 9,6 связан с

депротонированием азота в этилендиаминовом фрагменте (рKa₁ этилендиамина равно 9,72 [13]) молекулы комплексов и изменением их ионной формы. Это приводит к увеличению гидрофобности комплексов и, следовательно, к росту k' . Уменьшение k' при pH > 9,6, вероятно, вызвано частичным щелочным гидролизом изучаемых комплексов в подвижной фазе, что приводит к уширению пиков и ухудшению их разрешения. Следует отметить, что удерживание комплекса [Co(acacen)₂]Br₂ монотонно возрастает с ростом pH. В этом случае отсутствует транс-влияние органического радикала, и связи Co-N этилендиаминового фрагмента лиганда практически равноценны, поэтому не происходит разрушение комплекса. Снижение pH подвижной фазы приводит к существенно улучшению селективности разделения и уменьшению значений фактора асимметрии пиков A₁₀. Поэтому дальнейшее изучение хроматографического поведения комплексов органокобальта(III) проводили при pH 7,5.

Была изучена зависимость удерживания комплексов [RCo(acacen)(en)]Br от концентрации ТРИС в буферном растворе, входящем в состав подвижной фазы. Увеличение концентрации от 0,005 до 0,05 М приводит к незначительному уменьшению времен удерживания изучаемых хелатов. Это, вероятно, связано с тем, что катионы ТРИС адсорбируются на поверхности зерен сорбента и, таким образом, ослабляют его взаимодействие с разделяемыми комплексами ввиду электростатического отталкивания положительно заряженной поверхности сорбента и катионных хелатов алкилкобальта(III). Это приводит к частичному спрямлению изотермы адсорбции изучаемых комплексов на поверхности сорбента и улучшению формы их хроматографических пиков.

Таким образом, комплексы органокобальта(III) могут быть разделены на колонке, заполненной полимерным сорбентом PLRP-S, в следующих условиях: скорость подвижной фазы 1,5 мл/мин; концентрация ТРИС 0,05М; pH 7,5 (доведено уксусной кислотой); 40 об.% ацетонитрила.

Хроматограмма смеси комплексов Co – *i*-Pr – *c*-Hex – Ost представлена на рис. 4. Полного разрешения комплексов не удалось получить, поскольку эффективность колонки (7500 теор.т/м) была невысокой, а форма пиков недостаточно симметричной.

Тем не менее полученные результаты позволили оценить устойчивость комплексов органокобальта(III). Известно, что комплексы устойчивы в лиофилизованном виде по крайней мере в течение полугода [4]. Устойчивость их в растворах орга-

нических растворителей сильно зависит от строения органического радикала и уменьшается в ряду



Комплекс с изопропильным радикалом заметно разлагается в процессе определения, поэтому авторы методики синтеза предположили, что замена этилендиамина в структуре комплекса на 1,10-фенантролин позволит избежать его разложения в процессе определения. Было проведено сравнение устойчивости двух вышеупомянутых комплексов, для чего была изучена кинетика разложения этих соединений в метанольном растворе и рассчитаны эффективные константы скорости. Оказалось, что комплекс с фенантролином менее устойчив и практически полностью разлагается в течение часа. Кроме того, скорость разложения этого комплекса в колонке заметно увеличивается при понижении pH подвижной фазы, поэтому использование комплексов с фенантролиновым лигандом оказалось нецелесообразным.

Было проведено сравнение колонок, заполненных полимерным сорбентом и гексадецилсиликагелем. Были рассчитаны значения разрешающей способности R_s и факторы асимметрии A_{10} , характеризующие форму хроматографических пиков [12]. Результаты сравнения представлены в табл. 1, 2. Хотя колонка, заполненная полимерным сорбентом, заметно уступает колонке с химически модифицированным силикагелем по эффективности, ее разрешающая способность не ниже, а

симметричность пиков выше. Вероятно, использование более длинных колонок (до 15–20 см), заполненных полимерным сорбентом с меньшим диаметром частиц (3–5 мкм), позволило бы улучшить параметры разделения и привести к полному разрешению пиков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ryabov A.D., Levitin I.Y., Kitaigorodskii A.N. et al. // J. Organomet. Chem. 1985. 292. P.4.
2. Левитин И.Я., Яцимирский А.К., Вольпин М.Е. // Металлоорг. химия. 1990. 3. С.865.
3. Яцимирский А.К., Покровский В.А., Коваленко Ю.Е. и др. // Металлоорг. химия. 1989. 2. С.611.
4. Nesterenko P.N., Levitin I.Y., Tsikalova M.V. и др. // Inorg. Chim. Acta. 1995. 240. P. 665.
5. Levitin I.Y., Tsikalova M.V., Bakhmutov V.I. et al. // J. Organomet. Chem. 1987. 330. P. 161.
6. Tanaka N., Araki M. Polymer-Based Packing materials for RPLC. Advances in chromatography. N.Y., 1989. 30. P.81.
7. Palmieri M.D., Fritz J.S. // Anal. Chem. 1987. 59. P. 2226.
8. O'Laughlin I.M. // Anal. Chem. 1982. 54. P. 178.
9. Knight C.H., Cassidy R.M., Recoskie B.M. et al. // Anal. Chem. 1984. 56. P.474.
10. Nevegans I., Versele M. // J. Chromatogr. 1985. 350. P. 145.
11. Iskandarani J., Pietrzyk D.J. // Anal. Chem. 1981. 53. P. 489.
12. Шату В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига, 1988.
13. IUPAC - Stability Constants Database. Royal Society of Chemistry. SCQuery Version 1.38. 1994.

Поступила в редакцию 27. 06. 97