

УДК 615.07:543.544:547.233

# ПРИМЕНЕНИЕ РЕАКЦИОННОЙ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ. СООБЩЕНИЕ 1. СПОСОБ СЕЛЕКТИВНОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ПЕРВИЧНЫХ, ВТОРИЧНЫХ И ТРЕТИЧНЫХ АЛИФАТИЧЕСКИХ АМИНОВ

В.В.Болотов, Л.Ю.Клименко, И.М.Иванчук

Национальный фармацевтический университет,  
61002, г. Харьков, ул. Пушкинская, 53. E-mail: anchem@ukrfa.kharkov.ua*Ключевые слова: реакционная тонкослойная хроматография; первичные, вторичные, третичные алифатические амины***Разработан способ селективного обнаружения группы алифатических аминов — первичных, вторичных и третичных методом реакционной тонкослойной хроматографии.****APPLICATION OF DERIVATIVE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY IN THE ANALYSIS OF DRUGS. REPORT 1. METHOD OF PRIMARY, SECONDARY AND TERTIARY ALIPHATIC AMINES SELECTIVE DETECTION V.V.Bolotov, L.Yu.Klimenko, I.M.Ivanchuk****The method of selective detection of the aliphatic amines group — primary, second and tertiary — by the method of derivative thin layer chromatography has been developed.****ЗАСТОСУВАННЯ РЕАКЦІЙНОЇ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ В АНАЛІЗІ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ. ПОВІДОМЛЕННЯ 1. СПОСІБ СЕЛЕКТИВНОГО ВІЯВЛЕННЯ ПЕРВИННИХ, ВТОРИННИХ І ТРЕТИННИХ АЛІФАТИЧНИХ АМІНІВ****В.В.Болотов, Л.Ю.Клименко, І.М.Іванчук****Розроблено спосіб селективного виявлення групи аліфатичних амінів — первинних, вторинних і третинних методом реакційної тонкошарової хроматографії.**

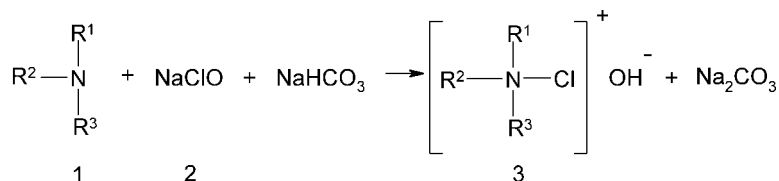
Многие лекарственные препараты содержат в своей структуре алифатическую аминогруппу — первичную, вторичную или третичную. Селективный метод идентификации алифатической аминогруппы отсутствует, а обнаружение их проводится при помощи реактивов для идентификации соединений, содержащих атом азота в гетероциклическом ядре или экзоциклической аминогруппе, — реактивов Драгендорфа, Вагнера, Бушарда и др. [1].

В литературе [2, 3] описана методика количественного определения алифатических аминов (1) в воздухе, в основе которой лежат последовательные реакции анализируемых веществ с натрием гипохлоритом (2), натрия нитритом и калия йодидом в присутствии крахмала. При этом происходит образование четвертичных N-хлораммониевых оснований (3), и, как показано авторами, наиболее оптимальными условиями проведения

реакции являются слабощелочная среда раствора (рН = 8,1-8,3), которую создают при помощи 6% раствора натрия гидрокарбоната, и использование раствора натрия гипохлорита с концентрацией активного хлора 5 г/л (схема).

Избыток раствора гипохлорита натрия, который мешает проведению определения, удаляют из раствора путем добавления к пробе раствора натрия нитрита, который при рН ≈ 8 разрушает натрий гипохлорит, но не взаимодействует с образовавшимися четвертичными N-хлораммониевыми основаниями [2].

Определение полученных N-хлораммониевых оснований проводят путем окисления ими восстановителя — раствора калия йодида в присутствии крахмала с образованием фиолетового окрашивания раствора и последующим измерением оптической плотности полученного окрашенного раствора при длине волны 582 нм [2].



Схема

где R<sub>1</sub> = H или Alk, R<sub>2</sub> = H или Alk, R<sub>3</sub> = Alk

Таблица

Значения  $R_f$  пятен некоторых алифатических аминов в использованных системах растворителей до и после обработки раствором натрия гипохлорита при  $pH = 8,3$

Вещество	Значения $R_f$ в системе растворителей			
	хлороформ - метанол (9:1)		гексан - диэтиловый эфир (2:1)	
	до обработки раствором натрия гипохлорита	после обработки раствором натрия гипохлорита	до обработки раствором натрия гипохлорита	после обработки раствором натрия гипохлорита
Донормил	0,10	0,84	0,00	0,35
Димедрол	0,34	0,85	0,00	0,64
Зопиклон	0,55	0,82	0,00	0,00
Кодеин	0,41	0,87	0,00	0,00
Кокаин	0,69	0,85	0,00	0,43
Амфетамин	0,31	0,84	0,00	0,54
Метамфетамин	0,34	0,82	0,00	0,62
Трамадол	0,48	0,84	0,00	0,19

Основным недостатком данной методики, на наш взгляд, является то, что она не предполагает обнаружения алифатических аминов, а предусматривает лишь количественное определение их суммы.

Нами же, на основании описанных данных, предложен способ селективного обнаружения первичных, вторичных и третичных алифатических аминов с использованием метода реакционной (derivативной) тонкослойной хроматографии, позволяющий не только их обнаружить, но и разделить.

В общем случае данный метод предусматривает получение производного (derivата) исследуемого вещества при помощи какой-либо химической реакции, элюирование его в соответствующей системе растворителей, проявление соответствующим проявителем и установление значения  $R_f$ . Такой подход позволяет в ряде случаев улучшить разделение исследуемого вещества с веществами-аналогами, а также подобрать для него селективный либо даже специфичный проявитель [4-8].

В основу селективного способа обнаружения первичных, вторичных и третичных алифатических аминов методом реакционной тонкослойной хроматографии мы положили описанную выше реакцию образования четвертичных N-хлораммониевых оснований (3) с последующим их разделением методом хроматографии в тонком слое сорбента.

Экспериментальным путем установлен оптимальный состав реактива для получения четвертичных N-хлораммониевых оснований — раствор натрия гипохлорита в 6% растворе натрия гидрокарбоната с концентрацией активного хлора 0,5 г/л.

Реакции между определяемыми веществами и раствором натрия гипохлорита проводили непосредственно на хроматографических пластинах.

Установлено, что при этом реакция протекает до конца.

В разработанном нами способе предусмотрено проведение обнаружения аминов в два этапа:

- на первом этапе проводится селективное групповое обнаружение алифатических аминов как группы методом ТСХ с использованием общей системы растворителей;
- на втором этапе проводится исследование методом ТСХ в частной системе растворителей, в которой получаемые derivаты имеют различную подвижность, что дает возможность, при наличии стандартных образцов, идентифицировать соответствующие алифатические амины.

Для проявления пятен derivатов нами использован реактив, предложенный в работе [2] — 1% раствор калия йодида в присутствии 0,3% крахмала. При этом получаются пятна, окрашенные в фиолетовый цвет. Недостатком этого проявителя является образование пятен, которые быстро размываются со временем. Поэтому нами подобран и предложен в качестве проявителя 1% водный раствор *n*-аминодиэтиланилинсульфата, использование которого приводит к образованию четких и стойких ярко-розовых пятен.

В качестве образцов первичных, вторичных и третичных алифатических аминов нами были использованы лекарственные препараты, содержащие в своей структуре соответствующие функциональные группы (табл.).

Экспериментальные исследования позволили подобрать две системы растворителей — общую и частную для проведения обнаружения аминов (табл.). В первой системе растворителей (хлороформ — метанол (9:1)) пятна четвертичных N-хлораммониевых оснований для всех исследованных алифатических аминов попадали в одну хроматографическую зону ( $R_f = 0,8-0,9$ ). В качестве частной системы растворителей нами отобрана

система гексан — диэтиловый эфир (2:1), в которой, как было отмечено выше, четвертичные N-хлораммониевые основания имеют различную подвижность.

Чувствительность предложенного способа достаточно велика и для всех исследованных соединений составляет не более 0,05 мкг вещества в пробе.

В разработанном нами способе обнаружения алифатических аминов необходимости удаления избытка натрия гипохлорита нет, поскольку, как показано рядом экспериментов, при элюировании пластин в предложенных системах растворителей он остается на линии старта и не мешает дальнейшему проявлению пятен. В случаях же, когда в частной системе растворителей четвертичные N-хлораммониевые основания также остаются на линии старта (см. таблицу), наблюдается различие в скорости проявления пятен (четвертичные N-хлораммониевые основания проявляются мгновенно, а натрия гипохлорит — через 7-10 мин). Кроме того, есть различия в окраске пятен — пятна натрия гипохлорита раствором калия йодида в крахмале окрашиваются в коричнево-фиолетовый цвет в отличие от фиолетового цвета для четвертичных N-хлораммониевых оснований, а раствором *n*-аминодиэтиланилинсульфата — в бледно-сиреневый в отличие от ярко-розового для четвертичных N-хлораммониевых оснований.

Путем выполнения предварительных экспериментов показана селективность разработанного способа именно в отношении алифатических аминов — проведению эксперимента не мешают ароматические амины, соединения, содержащие в своей структуре атом азота пиридинового типа, а также лекарственные препараты группы 1,4-бензодиазепина.

Таким образом, в случае использования разработанного способа при исследовании пробы неизвестного состава в общей системе растворителей можно установить наличие в анализируемом образце алифатической аминогруппы. При негативном результате поиск соединений, содержащих алифатическую аминогруппу, прекращают. В случае же положительного результата приступают ко второму этапу исследований с целью идентификации неизвестного вещества, пользуясь разработанными экспериментальными данными относительно значений  $R_f$  четвертичных N-хлораммониевых оснований, а также выполняя исследования в присутствии стандартных образцов.

Кроме того, отмечено, что в общей системе растворителей исходные вещества до обработки раствором натрия гипохлорита имеют различную подвижность (см. таблицу), в то время как в частной системе растворителей они все ведут себя одинаково, а именно — находятся на линии старта (в данных экспериментах в качестве проявителя использовали реактив Драгендорфа, модифицированный по Мунье). Отношение подвижностей исходных веществ в общей системе растворителей

и подвижностей их четвертичных N-хлораммониевых оснований в частной системе растворителей является дополнительным фактором в процессе идентификации исследуемого образца.

#### Экспериментальная часть

В работе нами были использованы лекарственные препараты (табл.) фармакопейной чистоты, для которых готовили стандартные растворы в этаноле с концентрацией 1 мг/мл.

В качестве тонких слоев использовали пластины Sorbfil ПТСХ-1А (силикагель СТХ-1А, тип подложки — ПЭТФ, связывающее вещество — силиказоль, фракция —  $12 \div 15$  мкм, толщина слоя — 100 мкм, размер пластинок —  $10 \times 10$  см).

Раствор калия йодида с крахмалом готовили следующим образом: 0,3 г крахмала, разведенного в небольшом количестве холодной воды, смешивали со 100 мл кипящей воды, прибавляли через 15 мин 1 г калия йодида и кипятили раствор еще в течение 5 мин; объем остывшего раствора доводили до 100 мл водой очищенной.

Гипохлорит натрия, содержащий 5 г/л активного хлора, готовили по следующей методике: 100 г хлорной извести размешивали в течение 15 мин со 170 мл воды и прибавляли раствор 70 г натрия карбоната в 170 мл воды. Масса вначале загустевает, затем разжижается. Жидкость фильтровали через воронку Бюхнера. Для установления концентрации активного хлора к 1 мл раствора натрия гипохлорита, помещенному в колбу с притертой пробкой, добавляли 20 мл воды, 10 мл 10% раствора серной кислоты, 10 мл 10% раствора калия йодида. Колбу закрывали, через 10 мин выделившийся йод титровали 0,1 М раствором натрия тиосульфата до слабо-желтой окраски, добавляли несколько капель 0,5% раствора крахмала и титровали до обесцвечивания раствора. 1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 0,00354 г активного хлора [2].

Для получения раствора гипохлорита натрия в 6% растворе натрия гидрокарбоната с концентрацией активного хлора 0,5 г/л в мерную колбу емкостью 50,0 мл вносили 5,00 мл раствора гипохлорита натрия с концентрацией активного хлора 5 г/л, приготовленного как указано выше, и доводили объем раствора до метки 6% раствором натрия гидрокарбоната, после чего раствор тщательно перемешивали.

Хроматографирование проводили в камере объемом 500 см<sup>3</sup>, в которую вносили 50 мл систем растворителей. Камеру насыщали в течение 30 мин. Длина пробега растворителей составляла 8 см.

Все химические реактивы, использованные в эксперименте, имели квалификацию “х. ч.” или “ч. д. а.”.

Значение рН растворов контролировали потенциометрически с помощью иономера ЭВ-74.

**Методика проведения хроматографического анализа.** На линии старта двух хроматографических

пластин наносили по 1 мкл стандартных растворов веществ в этаноле. После высушивания проб при комнатной температуре в эти же точки вводили по 2 мкл раствора натрия гипохлорита (0,5 г/л активного хлора) в 6% растворе натрия гидрокарбоната, пятна высушивали и элюировали пластины в системах растворителей хлороформ — метанол (9:1) и гексан — диэтиловый эфир (2:1) соответственно. Параллельно проводили контрольный опыт, для чего на линии старта этих же пластин наносили по 2 мкл указанного раствора натрия гипохлорита. После элюирования пластины высушивали и обрабатывали 1% водным раствором *n*-аминодиэтиланилинсульфата или 1% раствором калия йодида в присутствии 0,3% крахмала.

#### Выводы

1. Разработан способ селективного обнаружения первичных, вторичных и третичных алифатических аминов с использованием метода реакционной (деривативной) тонкослойной хроматографии.
2. Подобраны общая система растворителей, позволяющая провести групповое обнаружение алифатических аминов, и частная система растворителей, позволяющая разделить и идентифицировать отдельные алифатические амины.
3. Предложен реактив для проявления дериватов алифатических аминов — четвертичных *N*-хлораммониевых оснований — 1% раствор *n*-аминодиэтиланилинсульфата.

#### Литература

1. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals body fluids and postmortem material. — 2-nd ed. — London: The Pharm. Press, 1986. — 1200 p.
2. Ярым-Агаева Н.Т., Путилина О.Н. // Журн. аналит. химии. — 1986. — Т. XLI, вып. 3. — С. 543-547.
3. Dahlgren G. // Anal. Chem. — 1964. — Vol. 36. — P. 596.
4. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография: В 2 т. — М.: Мир, 1981. — Т. 1. — 616 с.
5. Болотов В.В., Клименко Л.Ю. // ЖОФХ. — 2005. — Т. 3, Вып. 1 (9). — С. 65-69.
6. Lawrence J.F., Frei R.W. Chemical derivatization in liquid chromatography. — N. Y., 1976. — 546 p.
7. Krull I.S. Reaction detection in liquid chromatography. — N. Y. — Basel, 1986. — 845 p.
8. Березкин В.Г. Химические методы в газовой хроматографии. — М., 1980. — 487 с.

Надійшла до редакції 12.12.2007 р.