



УДК 543.393:547:495:1:340.67

## Особенности определения отдельных биологически активных производных анилина в тонком слое обращенно-фазового сорбента

Шорманов В.К.<sup>1</sup>, Андреева Ю.В.<sup>1</sup>, Сухомлинов Ю.А.<sup>1</sup>, Омельченко В.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет», Курск  
<sup>2</sup>ЭКЦ УМВД России по Орловской области, Орел

Поступила в редакцию 10.11.2015 г.

Изучены особенности хроматографического поведения отдельных биологически активных производных анилина в тонком слое обращенно-фазового сорбента (модель привитой фазы C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>). Объектами исследования явились: 4-нитро-3-(трифторметил)-анилин, анилин, 4-нитроанилин, флутамид, 2-метил-N-(4-амино-3-(трифторметил)фенил)пропанамид и N-(4-ацетиламино-3-(трифторметил)фенил)ацетамид. Показана возможность использования предложенных условий хроматографирования для идентификации объектов исследования в биологическом материале. Рассчитаны хроматографические параметры, характеризующие условия определения исследуемых веществ методом обращенно-фазовой ТСХ. Разработана методика определения рассматриваемых производных анилина в биологическом материале методом обращенно-фазовой ТСХ с применением подвижной фазы вода-ацетон (5:5).

**Ключевые слова:** биологически активные производные анилина, ТСХ, идентификация.

## Features of determining the individual biologically active derivatives aniline in a thin layer of the reversed-phase sorbent

Shormanov V.K.<sup>1</sup>, Andreeva Y.V.<sup>1</sup>, Suhomlinov Y.A.<sup>1</sup>, Omelchenko V.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kursk State Medical University  
<sup>2</sup>Forensic science center UMVD of Russia across the Oryol region, Oryol

Peculiarities of chromatographic behaviour the individual biologically active derivatives aniline in a thin layer of the reversed-phase sorbent (models of grafted phase C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>) have been studied. Objects of the study were as follows: 4-nitro-3-(trifluoromethyl)aniline, aniline, 4-nitroaniline, flutamide, 2-methyl-N- (4-amino-3- (trifluoromethyl) phenyl) propanamide and N-(4- acetamino-3-(trifluoromethyl) phenyl)acetamide. A possibility of using the offered chromatographing conditions for the identification of the objects of investigation in the biological materials has been shown. Calculated additional chromatographic parameters describing the conditions of the determination of analytes by reverse-phase TLC. The method of determination discussed aniline derivatives in biological material by reverse-phase TLC using a mobile phase of water-acetone (5: 5).

**Keywords:** biologically active derivatives aniline, TLC, identification, biological material.

### Введение

Отдельные производные анилина являются биологически активными веществами, обладающими цитостатическим действием, широко используются в

качестве противоопухолевых средств, а также известны как продукты биотрансформации данных лекарственных веществ [1].

Данная группа химических соединений обладает значительно выраженными токсическими свойствами по отношению к теплокровным животным [2- 4]. В связи с этим, изучение данных веществ в химико-токсикологическом аспекте представляется актуальной задачей. Вопросы и методы химико-токсикологического анализа ряда биологически активных производных анилина являются недостаточно изученными. В частности, мало разработаны вопросы и методы идентификации данной группы соединений в биологическом материале. Одним из методов, позволяющих достаточно быстро и без применения дорогостоящего оборудования предварительно идентифицировать токсичные вещества в извлечениях из биоматериала, является тонкослойная хроматография [5, 6].

Целью работы явился поиск оптимальных условий хроматографирования отдельных биологически активных производных анилина в тонком слое обращённо-фазового сорбента.

## Эксперимент

Объектами исследования явились отдельные биологически активные производные анилина, в частности, 4-нитроанилин (4-НА) (ТУ 6-09-258-77, содержание вещества  $\geq 99.5\%$ ), флутамид - 2-метил-N-(4-нитро-3-(трифторметил)фенил)пропанамид (Фл) (LGC Standards, содержание вещества  $\geq 99\%$ ), 4-нитро-3-(трифторметил)-анилина (4-Н-3-ТФМА) (LGC Standards, содержание вещества  $\geq 99\%$ ), 2-метил-N-(4-амино-3-(трифторметил)фенил)пропанамид (4-А-3-ТФМФА) (PCO, содержание вещества  $\geq 97\%$ ) и N-(4-ацетамино-3-(трифторметил)фенил)ацетамид (N-4-АА-3-ТФМФАА) (PCO, содержание вещества  $\geq 99\%$ ). В качестве внутреннего стандарта применён анилин (Ан) (ГОСТ 5819-78, содержание вещества  $\geq 99.5\%$ ).

В качестве аналитического метода рассматривалась обращенно-фазовая тонкослойная хроматография (ТСХ). При определении методом ТСХ применяли обращённо-фазовый сорбент, представлявший собой силикагель (размер частиц 5 мкм), модифицированный алканами с длиной цепи C<sub>14</sub>-C<sub>15</sub>. Модель тонкого слоя обращённо-фазового сорбента готовили путём обработки силикагеля СТХ-1А на стандартных пластинах «Сорбфил» марки ПТСХ-АФ-А-УФ с люминесцентным индикатором 10% раствором вазелинового масла в гексане с последующим высушиванием пластин на воздухе и удалением остатков вазелинового масла с тыльной стороны подложки.

В работе использовались хроматографические пластины «Сорбфил» размером 10×5 см с люминесцентным индикатором, связующим веществом силиказоль и подложкой из алюминия. Исследуемые вещества наносили на хроматографические пластины в виде 0.02% ацетоновых растворов (по 5-10 мкл). Хроматографировали восходящим методом в стеклянных камерах с внутренним объёмом около 600 см<sup>3</sup>. Камеры предварительно насыщали парами подвижной фазы в течение 30 минут. В качестве подвижных фаз рассмотрены вода и водные растворы различной реакции, а также их двухкомпонентные смеси с гидрофильными органическими растворителями.

Хроматограммы проявляли в УФ-свете. Рассчитывали значения абсолютной (Rf) и относительной (по отношению к анилину) (Rs) хроматографической подвижности. Для оптимальных подвижных фаз, индекс полярности P' [7] которых

составил 7.65-8.44, рассчитывали дополнительные хроматографические параметры:  $i_{тсх}$  – степень разделения веществ,  $H$  - высота, эквивалентная теоретической тарелке,  $K$  – коэффициент распределения,  $N$  - число теоретических тарелок [8, 9].

### Обсуждение результатов

Результаты изучения особенностей хроматографической подвижности рассматриваемой группы производных анилина в тонком слое обращённо-фазового сорбента (модель привитой фазы  $C_{14}$ - $C_{15}$ ) с применением двухкомпонентных подвижных фаз представлены в табл. 1.

Таблица 1. Хроматографическая подвижность отдельных биологически активных производных анилина в тонком слое обращённо-фазового сорбента при использовании двухкомпонентных подвижных фаз

Подвижная фаза	Объёмное соотношение компонентов	Значения Rf					
		Ан	4-НА	Фл	4-НА-3-ТФМА	4-А-3-ТФМФА	N-4-АА-3-ТФМФАА
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>
Вода	-	0.00	0.18	0.00	0.00	0.00	0.01
Буферный раствор (рН=1.98)	-	0.00	0.14	0.00	0.00	0.02	0.15
Буферный раствор (рН=8.95)	-	0.00	0.20	0.00	0.00	0.05	0.08
Вода –ацетонитрил	2:8	0.96	0.96	0.92	0.79	0.91	0.97
	5:5	0.61	0.68	0.41	0.64	0.73	0.85
	6:4	0.71	0.67	0.22	0.67	0.72	0.80
	8:2	0.34	0.42	0.00	0.07	0.14	0.53
Буферный раствор (рН=1.98) - ацетонитрил	2:8	0.83	0.77	0.88	0.88	0.88	0.82
	5:5	0.68	0.80	0.28	0.41	0.75	0.78
	6:4	0.85	0.71	0.18	0.54	0.62	0.79
	8:2	0.10	0.43	0.00	0.08	0.18	0.53
Буферный раствор (рН=8.95) - ацетонитрил	2:8	0.67	0.75	0.71	0.67	0.84	0.78
	5:5	0.63	0.79	0.41	0.68	0.67	0.36
	6:4	0.50	0.75	0.33	0.52	0.77	0.85
	8:2	0.17	0.47	0.00	0.14	0.52	0.58
Вода –ацетон	2:8	0.82	0.66	0.81	0.78	0.82	0.77
	5:5	0.64	0.77	0.40	0.62	0.68	0.77
	6:4	0.56	0.62	0.13	0.37	0.31	0.76
	8:2	0.77	0.41	0.00	0.12	0.30	0.64
Буферный раствор (рН=1.98) – ацетон	2:8	0.43	0.45	0.43	0.61	0.50	0.70
	5:5	0.36	0.57	0.12	0.43	0.09	0.59
	6:4	0.49	0.65	0.13	0.34	0.47	0.72
	8:2	0.00	0.43	0.00	0.07	0.22	0.45
Буферный раствор (рН=8.95) – ацетон	2:8	0.37	0.60	0.62	0.58	0.45	0.28
	5:5	0.56	0.77	0.21	0.38	0.22	0.60
	6:4	0.50	0.63	0.14	0.41	0.53	0.77
	8:2	0.18	0.23	0.19	0.12	0.30	0.74
Вода -диоксан-1,4	2:8	0.80	0.67	0.75	0.87	0.75	0.70
	5:5	0.59	0.76	0.46	0.71	0.62	0.75
	6:4	0.48	0.66	0.27	0.52	0.64	0.81
	8:2	0.62	0.57	0.00	0.30	0.47	0.71

1	2	3	4	5	6	7	8
Буферный раствор (рН=1.98) - диоксан-1,4	2:8	0.76	0.69	0.81	0.76	0.69	0.60
	5:5	0.54	0.75	0.30	0.65	0.67	0.73
	6:4	0.47	0.69	0.24	0.49	0.43	0.25
	8:2	0.18	0.31	0.32	0.20	0.29	0.41
Буферный раствор (рН=2.85) - диоксан-1,4	2:8	0.34	0.44	0.50	0.53	0.39	0.43
	5:5	0.27	0.50	0.18	0.53	0.18	0.39
	6:4	0.43	0.66	0.18	0.67	0.50	0.78
	8:2	0.30	0.61	0.50	0.14	0.29	0.38

В дальнейшем подвижная фаза вода-ацетон (5:5) была применена для идентификации производных анилина в биологическом материале методом обращённо-фазовой ТСХ в случаях индивидуального присутствия каждого из анализируемых веществ в биологическом объекте и в случае присутствия в биологических объектах суммы данных соединений. Для этого применяли следующую методику.

Методика определения рассматриваемых производных анилина в биологическом материале методом обращённо-фазовой ТСХ. В каждом опыте к 25 г искусственной смеси ткани трупной печени с одним из рассматриваемых веществ, прибавляли 50 г ацетона и выдерживали 1.5 часа при периодическом перемешивании. Осуществляли двукратное изолирование производных анилина при соотношении изолирующего агента и биологического материала 2:1 (по массе). Продолжительность каждого настаивания составляла 45 минут. Первое и второе извлечения, полученные из каждой искусственной смеси, объединяли и перемешивали. По 0.3 см<sup>3</sup> каждого объединённого извлечения и растворы свидетелей производных анилина наносили микропипеткой на линию старта хроматографической пластины «Сорбфил» с люминесцентным индикатором. Хроматографировали, используя в качестве подвижной фазы систему растворителей вода-ацетон (5:5), пластины высушивали в токе воздуха и детектировали пятна в видимом и УФ-свете. Рассчитывали значения параметров хроматографирования исследуемых соединений. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2. Результаты хроматографирования отдельных биологически активных производных анилина, выделенных из биологического материала, методом обращённо-фазовой ТСХ при использовании подвижной фазы вода-ацетон (5:5)

Вещество	Rf	Rs	K	N	H	i <sub>ТСХ</sub>
1	2	3	4	5	6	7
Исследование биологических объектов, содержащих одно вещество						
4-НА	0.77±0.04	1.20	0.30	2704.00	0.003	-
Ан	0.64±0.04	1.00	0.56	1296.00	0.006	-
Фл	0.40±0.03	0.63	1.50	49.00	0.163	-
4-А-3-ТФМФА	0.68±0.04	1.05	0.47	2079.36	0.004	-
N-4-АА-3-ТФМФАА	0.77±0.03	1.20	0.30	1820.44	0.004	-
4-НА-3-ТФМА	0.62±0.04	0.96	0.61	650.25	0.012	-
Исследование биологических объектов, содержащих сумму веществ						
4-НА	0.79±0.04	1.20	0.27	2712.00	0.003	1.84
Ан	0.65±0.05	1.00	0.54	1298.00	0.006	1.31
Фл	0.42±0.04	0.63	1.38	51.00	0.156	1.84
4-А-3-ТФМФА	0.69±0.04	1.05	0.45	2080.36	0.004	1.12
N-4-АА-3-ТФМФАА	0.78±0.04	1.20	0.28	1824.00	0.004	1.86
4-НА-3-ТФМА	0.64±0.05	0.96	0.56	654.52	0.012	

Как свидетельствуют полученные данные (табл. 2), параметры хроматографирования, рассчитанные для рассматриваемых биологически активных производных анилина, выделенных из биоматериала, в значительной степени совпадают с параметрами хроматографирования стандартов этих же веществ (табл. 3). Значения степени разделения ( $i_{TСХ}$ ) отдельных пар ближайших по хроматографической подвижности соединений превышают единицу, что свидетельствует о полном разделении всех анализируемых веществ при их совместном присутствии в хроматографируемой пробе.

Таблица 3. Параметры хроматографирования отдельных биологически активных производных анилина в тонком слое обращённо-фазового сорбента при использовании оптимальных подвижных фаз

Вещество	Rf	Rs	K	N	H	$i_{TСХ}$
Вода - ацетонитрил (6:4) ( $P'=8.44$ )						
4-НА	0.67±0.02	0.95	0.49	635.00	0.012	0.1
Ан	0.71±0.03	1.00	0.41	676.00	0.011	3.33
Фл	0.22±0.02	0.31	3.54	12.81	0.624	3.84
4-А-3-ТФМФА	0.72±0.03	1.01	0.39	2540.16	0.003	6.67
N-4-АА-3-ТФМФАА	0.80±0.02	1.13	0.25	277.78	0.028	4.46
4-НА-3-ТФМА	0.67±0.02	0.95	0.49	1797.76	0.004	
Вода - ацетон (5:5) ( $P'=7.65$ )						
4-НА	0.77±0.02	1.20	0.30	2704.00	0.003	1.84
Ан	0.64±0.03	1.00	0.56	1296.00	0.006	1.33
Фл	0.40±0.02	0.63	1.50	49.00	0.163	1.84
4-А-3-ТФМФА	0.68±0.03	1.05	0.47	2079.36	0.004	1.16
N-4-АА-3-ТФМФАА	0.77±0.02	1.20	0.30	1820.44	0.004	1.86
4-НА-3-ТФМА	0.62±0.03	0.96	0.61	650.25	0.012	
Вода - диоксан-1,4 (6:4) ( $P'=8.04$ )						
4-НА	0.66±0.03	1.37	0.52	484.00	0.016	1.66
Ан	0.48±0.03	1.00	1.08	243.36	0.033	1.00
Фл	0.27±0.02	0.57	2.70	16.00	0.5	2.15
4-А-3-ТФМФА	0.64±0.03	1.32	0.56	1730.56	0.004	2.33
N-4-АА-3-ТФМФАА	0.81±0.02	1.67	0.23	1089.00	0.007	2.70
4-НА-3-ТФМА	0.52±0.02	1.07	0.92	309.76	0.026	

## Заключение

Таким образом, условия хроматографирования, включающие использование модели обращённо-фазового сорбента с привитой фазой  $C_{14}$ - $C_{15}$  и подвижной фазы вода-ацетон (5:5) могут быть применены для определения ряда биологически активных производных анилина по отдельности и в сумме методом ТСХ и являться основой для экспресс-методики предварительной идентификации 4-нитро-3-(трифторметил)-анилина, анилина, 4-нитроанилина, флутамида, 2-метил-N-(4-амино-3-(трифторметил)фенил)пропанамида и N-(4-ацетимино-3-(трифторметил)фенил)ацетамида в объектах биологического происхождения при проведении химико-токсикологических исследований.

## Список литературы

1. Машковский М.Д. Лекарственные средства 16-е изд.-М. Новая волна, 2012. 1216 с.
2. Lazaros G. et al. // *Annals of gastroenterology*. 2001. Vol. 14. No 2. pp. 125-127.
3. Hung H.C., Lin I.H., Shiue K.F., Huang B.C. // *Journal Intern. Med. Taiwan* 2007. Vol. 18. pp. 35-39.
4. Bakdash A. et al. // *Toxichem+Krimtech*. 2006. Vol. 73. No 2. pp. 61-65.
5. Шорманов В.К. и др. // *Судебно-медицинская экспертиза*. 2013. Т. 56. № 4. С. 30-34.
6. Шорманов В.К., Чупак В.В., Салыкина Е.О. // *Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»*. 2015. № 1. С. 109-114.
7. Отто М. Современные методы аналитической химии. М. Техносфера. 2003. Т. 1-2. 684 с.
8. Шорманов В.К., Фурсова И.А. // *Судебно-медицинская экспертиза*. 1995. Т. 38. № 3. С. 33-36.
9. Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Угланова В.З., Кулакова Н.В. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение. Саратов. Изд-во Саратовского государственного университета. 2012. 128 с.

## References

1. Mashkovskij M.D., Lekarstvennye sredstva. M., Novaja volna Publ., 2012, 1216 p.
2. Lazaros G. et al., *Annals of gastroenterology*, 2001, Vol. 14, No 2, pp. 125-127.
3. Hung H.C., Lin I.H., Shiue K.F., Huang B.C., *Journal Intern. Med. Taiwan*, 2007, Vol. 18, pp. 35-39.
4. Bakdash A. et al., *Toxichem+Krimtech*, 2006, Vol. 73, No 2, pp. 61-65.
5. Shormanov V.K. et al., *Sudebno-medicinskaja jekspertiza*, 2013, Vol. 56, No 4, pp 30-34.
6. Shormanov V.K., Chupak V.V., Salykina E.O., *Kurskij nauchno-prakticheskij vestnik «Chelovek i ego zdorov'e»*, 2015, No 1, pp. 109-114.
7. Otto M. *Sovremennye metody analiticheskoy himii*. Moskva, Tehnosfera, 2003, T.1-2, 684 p.
8. Shormanov V.K., Fursova I.A., *Sudebno-medicinskaja jekspertiza*, 1995, Vol. 38, No 3, pp. 33-36.
9. Sumina E.G., Shtykov S.N., Uglanova V.Z., Kulakova N.V. *Tonkoslojnaja khromatografija. Teoreticheskie osnovy i prakticheskoe primenenie*. Saratov, Izdatel'stvo Saratovskogo gosudarstvennogo universiteta, 2012, 128 p.

**Шорманов Владимир Камбулатович** – д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск

**Андреева Юлия Владимировна** – аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск

**Сухомлинов Юрий Анатольевич** – к.фарм.н., доцент кафедры фармакогнозии и ботаники Курского государственного медицинского университета, Курск

**Омельченко Владимир Александрович** – к.фарм.н., начальник – полковник полиции ЭКЦ УМВД России по Орловской области, Орел

**Shormanov Vladimir K.** – Doctor of pharmaceutical science, professor of department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry, Kursk State Medical University, Kursk, e-mail: [R-WLADIMIR@yandex.ru](mailto:R-WLADIMIR@yandex.ru)

**Andreeva Julia V.** – Postgraduate student of department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry, Kursk State Medical University, Kursk, e-mail: [dzhulia.andreeva2012@yandex.ru](mailto:dzhulia.andreeva2012@yandex.ru)

**Suhomlinov Yury A.** - Candidate of pharmaceutical science, associate professor of department of pharmacognosy and botany, Kursk State Medical University, Kursk

**Omelchenko Vladimir A.** - Candidate of pharmaceutical science, chief - colonel of Police Forensic Science Center of the MOI of Russia Orel, Orel