



УДК 543.544.943.3.068.7:547.551.53

Применение хроматографических методов для определения 2-нитропроизводных анилина в биологическом материале

Шорманов В.К., Шилова А.С., Сухомлинов Ю.А., Герасимов Д.А.

ГОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет», Курск

Гашпоренко В.Н.

ГУЗ «Липецкое областное бюро судебно-медицинской экспертизы», Липецк

Поступила в редакцию 10.08.2010 г.

Аннотация

Изучены особенности хроматографического поведения ряда 2-нитроанилинов в тонких слоях и колонках гидроксированных сорбентов в зависимости от полярности подвижных фаз. Определены параметры, характеризующие условия определения исследуемых веществ методами ТСХ, колоночной хроматографии низкого давления и ВЭЖХ. Разработана методика химико-токсикологического исследования рассматриваемых нитроанилинов с применением хроматографических методов анализа.

Ключевые слова: 2-нитроанилины, ТСХ, колоночная хроматография, ВЭЖХ, химико-токсикологическое исследование.

Peculiarities of chromatographic behaviour of the row 2-nitroanilines in thin layers and columns of hydroxylated sorbents depending on the polarity of the mobile phases have been studied. Parameters, characterizing the conditions of defining the investigated substances using the TLC methods, column chromatography of low pressure and high pressure liquid chromatography (HPLS) have been determined. Methods for chemico-toxicological investigation of the considered nitroanilines with application of chromatographic analysis methods have been developed.

Keywords: 2-nitroanilines, TLC, column chromatography, HPLS, chemico-toxicological investigation

Введение

Различные моно- и полинитроанилины широко применяются в качестве полупродуктов органических синтезов, в производстве красителей, лекарственных средств, взрывчатых веществ, используются в качестве пестицидов, азокрасителей и др. [5].

Многие соединения данной группы обладают токсическими свойствами по отношению к теплокровным организмам [1, 4, 6]. Известны случаи отравления людей нитроанилинами, в том числе с летальным исходом [2, 3, 8].

Вопросы химико-токсикологического анализа данной группы соединений до настоящего времени остаются недостаточно изученными. Для нитроанилинов отсутствует нормативная документация, регламентирующая особенности их определения в биологических объектах химическими методами при экспертизах случаев отравления.

В практике подобных исследований широкое распространение получили различные виды хроматографии. Например, использование жидкостной колоночной хроматографии низкого давления позволяет очищать биообъекты до необходимой чистоты, тонкослойная хроматография является универсальным экспресс-методом и используется для предварительной идентификации токсичных соединений, а для подтверждающей идентификацию и количественного определения отравляющих веществ часто применяют метод ВЭЖХ.

Цель настоящего исследования – изучение особенностей хроматографического определения отдельных 2-нитропроизводных анилина в извлечениях из биологического материала.

Эксперимент

Объектами исследования явились: трифлуралин (2,6-динитро-4-(трифторметил) - N,N-дипропиланилин) (ФГУП «ВНИИХСЗР», НПК «БЛОК-1» ГСО 7722-99, содержание вещества не менее 99,2 %), 2-нитроанилин (фирма «Across Organic», содержание вещества 99,8%) и 2-нитро-4-метиланилин (ОАО «Заволжский химический завод им. М.В. Фрунзе», содержание вещества 99,3%).

В качестве аналитических методов рассматривались тонкослойная хроматография (ТСХ), жидкостная колоночная хроматография низкого давления (ЖКХНД) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

Исследовались особенности хроматографического поведения рассматриваемых 2-нитроанилинов в тонких слоях и колонках сорбентов с гидроксилированной поверхностью при использовании моно- и двухкомпонентных подвижных фаз различной полярности.

Определение методом ТСХ осуществляли в тонком слое силикагеля СТХ-1ВЭ с размером частиц 8-10 мкм (пластины «Сорбфил» UV-254), используя хроматографические камеры с внутренним объёмом около 600 см³, которые предварительно насыщались парами растворителей в течение 30 минут. Анализируемые вещества наносили на пластины в виде 0,04% этанольных растворов (объём наносимой пробы составлял 5-10 мкл). Хроматограммы проявляли в УФ-свете. Рассчитывали значения абсолютной (R_f) и относительной (по отношению к анилину) (R_s) хроматографической подвижности.

Строили графики зависимости значений хроматографической подвижности анализируемых веществ от процентного содержания полярного компонента в двухкомпонентных подвижных фазах.

При определении методом ЖКХНД использовали колонку силикагеля 40/100 мкм размерами 120×12 мм (общая масса сорбента 10 г).

В колонку вводили по 2 мл 0,25% растворов анализируемых веществ в элюентах. Элюат собирали в виде отдельных фракций по 1 или 2 мл.

Присутствие нитроанилинов во фракциях определяли после испарения из них элюента фотометрическим методом (растворяющая среда - диметилформамид). Учитывая найденные объёмы удерживания (V_R) исследуемых веществ и объём удерживания неудерживаемого вещества (V_0), для каждого анализируемого

соединения рассчитывали значения времени удерживания (t_R), коэффициента ёмкости (k'), числа теоретических тарелок (N) по формулам 1-3:

$$t_R = V_R/v \quad (1)$$

$$k' = \frac{V_R - V_0}{V_0} = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2)$$

$$N = 16(t_R/\omega)^2, \quad (3)$$

где v – скорость истечения элюента (мл/мин), t_0 – время удерживания неударживаемого вещества, ω – ширина пика у основания (мин).

Определение методом ВЭЖХ осуществляли на приборе «Милихром» (объединение «Научприбор», г. Орёл) с УФ – детектором в колонке (64×2 мм) гидроксилированного сорбента «Силасорб–600». Скорость подачи подвижных фаз составляла 100 мкл/мин, скорость движения диаграммной ленты – 720 мм/час, масштаб регистрации – 0,8 ед. о. п., время измерения – 0,6 сек. Оптическую плотность регистрировали при длинах волн 238 нм (2-нитроанилин и 2-нитро-4-метиланилин) и 260 нм (трифлуралин). По известным формулам рассчитывали значения времени (t_R) и объёма удерживания (V_R), коэффициента ёмкости (k'), числа теоретических тарелок (N) и коэффициента разделения (R_s).

Для количественного определения рассматриваемых нитроанилинов методом ВЭЖХ строили градуировочные графики, отражавшие прямо пропорциональную зависимость площади пика от количества хроматографируемого вещества и рассчитывали их уравнения.

Обсуждение результатов

Результаты хроматографирования исследуемых 2-нитроанилинов при использовании однокомпонентных подвижных фаз представлены в табл. 1.

Таблица 1. Подвижность отдельных 2-нитроанилинов при хроматографировании с использованием однокомпонентных подвижных фаз

Подвижные фазы	Диэлектрическая проницаемость подвижных фаз (ϵ)	2-нитро-4-метиланилин		2-нитроанилин		Трифлуралин	
		Rf	R _s	Rf	R _s	Rf	R _s
Гексан	1.89	0.04	1.00	0.04	1.00	0.46	12.16
Гептан	1.92	0.04	1.00	0.07	1.52	0.42	9.59
Диоксан-1,4	2.21	0.89	0.98	0.88	0.98	0.90	1.00
Тетрахлорметан	2.23	0.08	0.89	0.10	1.20	0.66	7.78
Бензол	2.28	0.54	1.56	0.56	1.61	0.93	2.70
Толуол	2.38	0.58	1.37	0.56	1.33	0.93	2.20
Хлороформ	4.70	0.94	1.12	0.91	1.08	0.97	1.15
Этилацетат	6.02	0.86	1.04	0.86	1.04	0.95	1.15
Пропанол-2	18.3	0.78	0.98	0.78	0.98	0.83	1.04
Пропанол-1	20.1	0.88	1.12	0.88	1.12	0.93	1.18
Ацетон	20.7	0.88	1.00	0.88	1.00	0.90	1.02
Этанол	24.3	0.85	1.00	0.85	1.00	0.89	1.05
Ацетонитрил	36.2	0.93	1.04	0.95	1.06	0.93	1.04

Как свидетельствуют данные табл. 1, с ростом диэлектрической проницаемости однокомпонентных элюентов в интервале значений 1,89-6,02 абсолютная хроматографическая подвижность анализируемых веществ в целом резко возрастает (прирост значений R_f составляет 0,8-0,9). При увеличении диэлектрической проницаемости подвижных фаз в интервале 6,02-36,2 значения R_f изменяются незначительно и характеризуются относительной стабильностью (их колебания не превышают 0,1). При использовании однокомпонентных подвижных фаз не удавалось достичь полного разделения всех трёх нитропроизводных анилина при их совместном присутствии в анализируемой смеси.

В связи с этим была предпринята попытка оптимизации условий хроматографирования с целью достижения полного разделения исследуемых соединений путём применения двухкомпонентных элюентов.

Результаты исследования хроматографической подвижности анализируемых нитроанилинов с применением нескольких групп двухкомпонентных подвижных фаз, одним из которых являлся растворитель с очень низким значением диэлектрической проницаемости (гексан, гептан), а вторым – диоксан-1,4 или растворитель с достаточно высокой диэлектрической проницаемостью (ацетон, этанол, пропанол-2), представлены на рис. 1-4.

Как свидетельствуют полученные данные, для каждой группы подвижных фаз, являющихся смесями двух каких-либо растворителей, наблюдается зависимость хроматографической подвижности нитроанилинов в тонком слое силикагеля от процентного содержания полярного компонента подвижной фазы: с увеличением содержания полярного компонента величины R_f адсорбатов вначале резко возрастают, а затем, по достижению определённых значений, стабилизируются и уже не претерпевают заметных изменений.

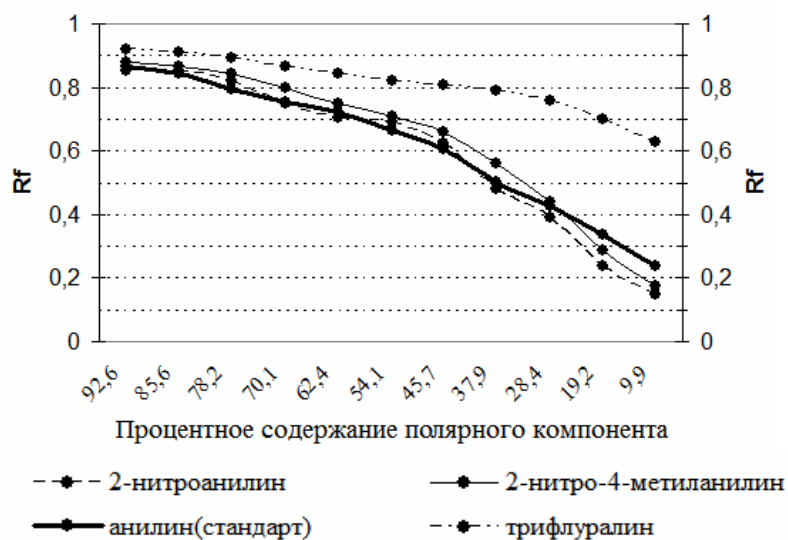


Рис. 1. Определение 2-нитроанилинов методом ТСХ при использовании подвижных фаз 1,4-диоксан-гептан

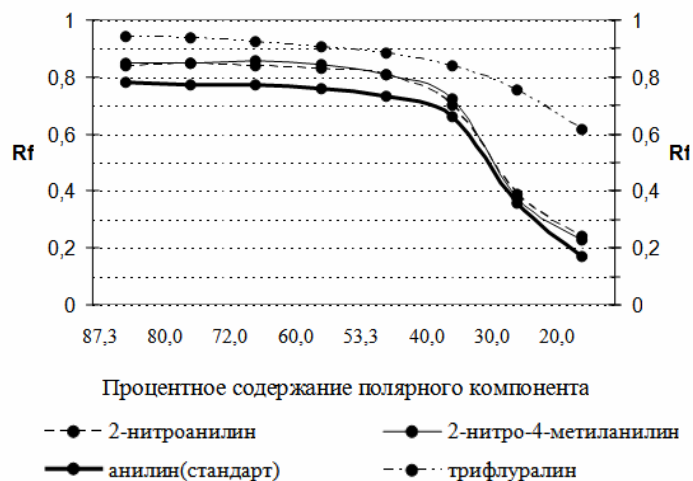


Рис. 2. Определение 2-нитроанилинов методом ТСХ при использовании подвижных фаз Пропанол-2-Гексан

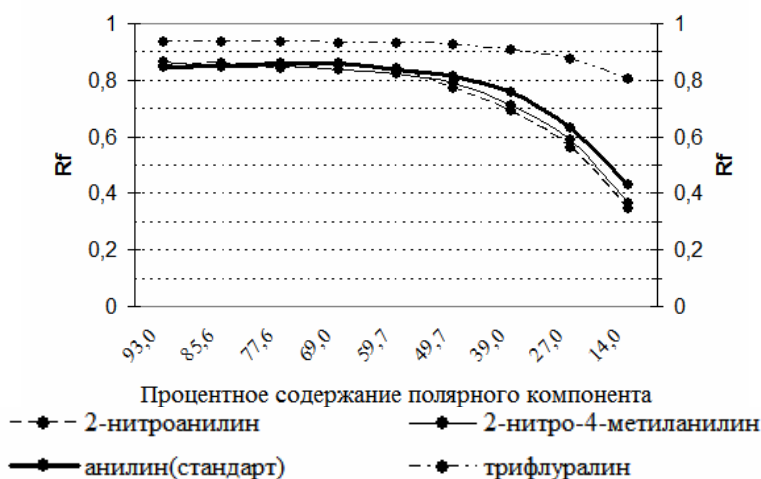


Рис. 3. Определение 2-нитроанилинов методом ТСХ при использовании подвижных фаз Ацетон-Гексан

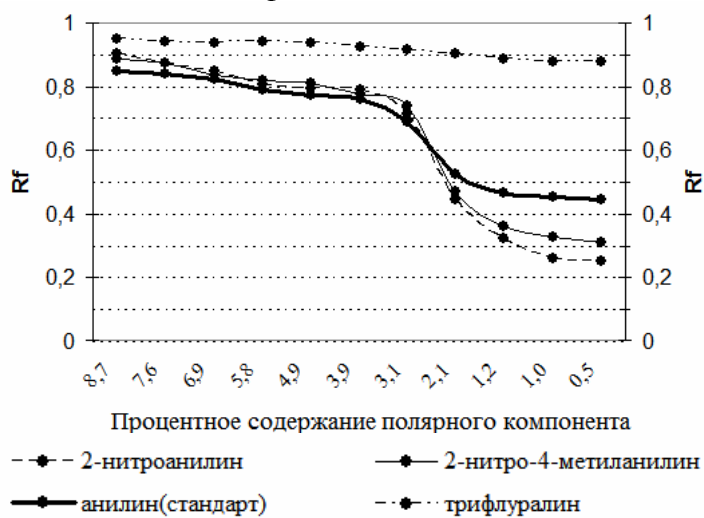


Рис. 4. Определение 2-нитроанилинов методом ТСХ при использовании подвижных фаз Этанол-Гексан

Полное разделение всех анализируемых веществ на пластинах «Сорбфил» удаётся добиться, используя подвижную фазу гексан-этанол (9:1). При этом наименьшую хроматографическую подвижность обнаруживает 2-нитроанилин. Имея в своей структуре нитрогруппу и первичную аминогруппу, он достаточно активно взаимодействует с гидроксильной поверхностью сорбента за счёт способности к образованию с ней водородных связей. 2-нитро-4-метиланилин, имея метильный радикал, обладает большей гидрофобностью, и, таким образом, большим по сравнению с 2-нитроанилином сродством к подвижной фазе, состоящей, в основном, из гидрофобного растворителя гексана. Поэтому он быстрее, чем 2-нитроанилин, продвигается вместе с элюентом и имеет более высокое значение R_f . Самой высокой хроматографической подвижностью среди группы анализируемых веществ обладает трифлуралин, у которого отсутствует первичная аминогруппа, две нитрогруппы располагаются симметрично, а у атома азота, связанного с ароматическим ядром, имеются два пропильных радикала, которые, очевидно, пространственно затрудняют взаимодействие нитрогрупп с поверхностью силикагеля и вместе с тем обуславливают значительные гидрофобные свойства молекулы адсорбата и её сродство по этой причине с малополярным гидрофобным элюентом.

Параметры хроматографирования рассматриваемых нитроанилинов методом ЖКХНД с применением ряда подвижных фаз (гексана, ацетона, а также смесей этих растворителей в различных объёмных соотношениях) представлены в табл. 2.

Таблица 2. Параметры хроматографирования 2-нитроанилинов в колонке силикагеля L 40/100 мкм с использованием различных элюентов

Элюент	V_o , мл	v , мл/мин	ω , мин	V_{R_1} , мл	k'	t_{R_1} , мин	N
Трифлуралин							
Гексан	4.2	0.19	321.05	107.4	24.57	565.26	50
Гексан – Ацетон (9,5:0,5)	4.0	0.26	29.61	27.6	5.9	106.15	206
Гексан – Ацетон (9:1)	4.8	0.27	17.78	18.7	2.90	69.26	243
Гексан – Ацетон (8,5:1,5)	4.5	0.24	18.75	14.2	2.16	59.17	159
Гексан – Ацетон (8:2)	4.6	0.23	8.70	8.7	0.89	37.83	303
Ацетон	4.1	0.20	9.0	5.3	0.29	26.5	139
2-нитроанилин							
Гексан – Ацетон (9:1)	4.8	0.27	88.89	29.5	5.15	109.26	24
Гексан – Ацетон (8,5:1,5)	4.5	0.24	52.08	27.1	5.02	112.92	75
Гексан – Ацетон (8:2)	4.6	0.23	24.78	13.5	1.93	58.70	90
Ацетон	4.1	0.20	10.00	5.7	0.39	28.5	130
2-нитро-4-метиланилин							
Гексан – Ацетон (9:1)	4.8	0.27	118.52	46.2	8.63	171.11	33
Гексан – Ацетон (8,5:1,5)	4.5	0.24	40.83	23.3	4.18	97.08	90
Гексан – Ацетон (8:2)	4.6	0.23	43.04	14.8	2.22	64.35	36
Ацетон	4.1	0.20	11.00	6.2	0.51	31.00	127

Как свидетельствуют полученные данные, в качестве универсальной подвижной фазы, позволяющей достичь хороших результатов элюирования всех исследуемых веществ из колонки силикагеля, может быть применена смесь растворителей гексан-ацетон (8,5:1,5).

Она позволяет при относительно небольшом для ЖКХНД времени удерживания адсорбатов обеспечить их достаточно селективное элюирование как по

отношению друг к другу, так и по отношению к группе гидрофобных соэкстрагирующихся веществ биоматериала, присутствующих в первых 6-8 мл элюата.

Для хроматографирования 2-нитроанилинов методом ВЭЖХ применяли подвижную фазу гексан-диоксан-пропанол-2 (40:5:1), которая использовалась нами ранее при исследовании моно- и полинитрофенолов [7].

Параметры хроматографирования объектов исследования методом ВЭЖХ в колонке с сорбентом «Силасорб 600» с использованием подвижной фазы гексан-диоксан-пропанол-2 (40:5:1) представлены в табл. 3.

Как свидетельствуют данные таблицы, выбранная хроматографическая система обеспечивает достаточную эффективность колонки по отношению к объектам исследования и позволяет полностью разделить анализируемые объекты в случае их совместного присутствия в пробе.

Открываемый минимум исследуемых нитроанилинов методом ВЭЖХ в предлагаемых условиях составляет 0,01-0,02 мкг в хроматографируемой пробе.

Таблица 3. Основные параметры хроматографирования 2-нитроанилинов методом ВЭЖХ

Хроматографируемые вещества	t_R	V_R	k'	N	R_s
Трифлуралин	2.07	207	0.23	801	
					9.25
2-нитро-4-метиланилин	5.27	527	2.14	2791	
					2.96
2-нитроанилин	6.51	651	2.88	3520	

Уравнения градуировочных графиков для количественного определения объектов исследования методом ВЭЖХ имеют следующий вид:

$$S=8,30650 \cdot C - 0,01443 \text{ (для трифлуралина),}$$

$$S=18,71756 \cdot C - 0,00454 \text{ (для 2-нитро-4-метиланилина),}$$

$$S= 22,64298 \cdot C + 0,01403 \text{ (для 2-нитроанилина),}$$

где S—площадь пика, C— содержание вещества в хроматографируемой пробе, мкг.

Относительная ошибка определения рассматриваемых веществ методом ВЭЖХ в субстанциях не превышает 1,5 % (n=6; P=0,95).

Результаты, полученные при изучении хроматографических свойств рассматриваемых 2-нитроанилинов в тонких слоях и колонках сорбентов, явились основой для разработки схем очистки, идентификации и количественного определения объектов исследования в биологическом материале с применением методов ЖКХНД, ТСХ и ВЭЖХ.

Методика определения 2-нитроанилинов в биологическом материале

При разработке методики готовили модельные смеси различных количеств анализируемых веществ (2,5-50,0 мг) с мелкоизмельчённой (размер частиц 0,2-0,5 см) тканью трупной печени человека, герметично закрывали и выдерживали при комнатной температуре в течение 1,5 часа.

По истечении указанного времени к 25 г модельной смеси, содержащей определённое количество того или иного анализируемого соединения, прибавляли 50 г бензола и выдерживали 45 минут при периодическом перемешивании. Извлечение отделяли от частиц биоматериала декантацией, а операцию настаивания повторяли в вышеописанных условиях. Отдельные извлечения объединяли,

фильтровали через стеклянный фильтр диаметром 3,6 см со слоем безводного сульфата натрия толщиной 1,5 см. Фильтр с сульфатом натрия после фильтрования промывали 20 мл бензола. Порции фильтрата и промывной жидкости объединяли и упаривали в токе воздуха при температуре 18-22°C до сухого остатка. Остаток растворяли в 2-3 мл смеси растворителей гексан-ацетон (8,5:1,5) и вносили раствор в колонку силикагеля L 40/100 мкм (120×12 мм). После полного вхождения раствора в слой сорбента хроматографировали, используя элюент гексан-ацетон (8,5:1,5). Элюат собирали фракциями по 2 мл. Фракции, содержащие то или иное анализируемое вещество, объединяли, испаряли в токе воздуха при температуре 18-22°C. Остаток растворяли в 5 мл смеси растворителей гексан-диоксан-пропанол-2 (40:5:1) (исходный раствор).

Предварительная идентификация методом ТСХ. 0,3 мл исходного раствора наносили на линию старта хроматографической пластины «Сорбфил». Хроматографировали двукратно в присутствии вещества-свидетеля, используя подвижную фазу гексан-этанол (9:1). Хроматограммы проявляли в УФ-свете. Исследуемые вещества идентифицировали по величине R_f.

Подтверждающая идентификация и количественное определение методом ВЭЖХ. 1 мл исходного раствора вносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки смесью растворителей гексан-диоксан-пропанол-2 (40:5:1). 2-8 мкл полученного раствора вводили в хроматограф. Хроматографировали, используя подвижную фазу гексан-диоксан-пропанол-2 (40:5:1). Скорость подачи подвижной фазы - 100 мкл/мин. Оптическую плотность регистрировали при 238 нм (2-нитроанилин и 2-нитро-4-метиланилин) и 260 нм (трифлуралин). Вещества идентифицировали на основе характерного значения времени (объёма) удерживания. Количественное содержание того или иного вещества рассчитывали по площади хроматографического пика с использованием уравнения градуировочного графика. Результаты определения представлены в табл. 4.

Как свидетельствуют полученные данные, при изменении содержания веществ в биологическом материале в интервале концентраций 2,5-50,0 мг при постоянной массе навески трупной печени (25 г) изменение среднего значения степени извлечения незначительно и не превышает 2,5%. Это позволяет предположить, что анализируемые соединения с веществами биологических тканей не образует достаточно прочных связей.

На хроматограмме, полученной при определении трифлуралина, 2-нитроанилина и 2-нитро-4-метиланилина методом ВЭЖХ, после их изолирования по разработанной методике из биологического материала, в сравнении с хроматограммой веществ-стандартов, не обнаруживались дополнительные пики или заметное увеличение фонового поглощения. Параметры хроматографирования соединений, извлечённых из печени, совпадали с соответствующими параметрами стандартных веществ. Это позволяет сделать выводы о достаточной эффективности предлагаемой схемы очистки, основой которой является ЖКХНД.

Разработанная методика позволяет идентифицировать и определить в модельных смесях с тканью трупной печени 40-55 % анализируемых веществ от первоначально внесённого их количества с достаточными для подобного рода исследований воспроизводимостью и правильностью. Открываемый минимум рассматриваемых соединений методами ТСХ и ВЭЖХ составляет соответственно 0,5-0,6 и 0,3-0,4 мг в 100 г биологического материала.

Таблица 4. Результаты определения различных концентраций 2-нитроанилинов в тканях трупной печени человека (n=5; P=0,95)

Анализируемое вещество	Внесено анализируемого вещества, мг в 25 г биологического объекта	Найдено, %			
		\bar{x}	S	$S_{\bar{x}}$	$\Delta\bar{x}$
2-Нитро-4-метиланилин	2.5	51.86	3.44	1.54	4.28
	5.0	52.63	2.95	1.32	3.66
	10.0	53.09	2.53	1.13	3.13
	25.0	53.31	2.21	0.99	2.76
	50.0	53.59	2.06	0.92	2.55
2-Нитроанилин	2.5	53.77	3.24	1.45	4.04
	5.0	54.24	2.75	1.23	3.41
	10.0	54.66	2.44	1.09	3.02
	25.0	54.92	2.17	0.97	2.69
	50.0	55.12	1.97	0.88	2.44
Трифлуралин	2.5	39.77	3.11	1.39	3.87
	5.0	40.46	2.62	1.17	3.24
	10.0	40.99	2.30	1.03	2.85
	25.0	41.32	2.01	0.90	2.50
	50.0	41.60	1.88	0.84	2.32

Список литературы

1. Василенко Н.М. Особенности токсического действия изомеров мононитроанилинов/ Н.М. Василенко, В.И. Звездой, Ф.А. Колодуб // Гигиена и санитария. 1974. № 8. С. 103-104.
2. Василенко Н.М. Сравнительная оценка изменений в крови при острой и подострой интоксикации ароматическими нитро-и аминсоединениями/ Н.М. Василенко, В.И. Звездой // Фармакология и токсикология. 1972. Т.35. № 8. С. 108-110
3. Доброриз А.М. Обнаружение нимесулида в биологическом материале // Судебно-медицинская экспертиза. 2009. Т. 52. № 4. С. 32-34.
4. Кожуро Ю.И. Анализ цитогенетического действия гербицидов трефлана и зенкора на растения ячменя/ Ю.И. Кожуро, Н.П. Максимова// Беловежская пуца на рубеже третьего тысячелетия.–Минск, 1999. С. 216-218.
5. Химический энциклопедический словарь / под ред. И.Л. Кнунянц. М.: Сов. энциклопедия, 1983. 792 с.
6. Шеваль Е.В. О цитогенетическом действии трефлана на клетки корешков *Nordenum vulgare L.* / Е.В.Шеваль, Ю.И.Кожуро, Н.П.Максимова, В.Ю. Поляков // Сельскохозяйственная биология. 2005. № 1. С.120-125.
7. Шорманов В.К. Определение отдельных групп нитросоединений ароматического и гетероциклического ряда при химико-токсикологических исследованиях. Курск, 2005. 104 с.
8. Bakdash A. Lethal Poisoning with p-Nitroaniline / A.Bakdash, M.Ganswindt, S.Herre e.a. // Toxichem+Krimtech. 2006. Vol. 73. № 2. P. 61-65.

Шорманов Владимир Камбулатович – д.ф.н., проф. кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск, тел. (4712)-58-13-23

Шилова Алина Сергеевна – аспирант кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского государственного медицинского университета, Курск

Сухомлинов Юрий Анатольевич – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии и ботаники Курского государственного медицинского университета, Курск

Герасимов Дмитрий Александрович – студент 5 курса фармацевтического факультета Курского государственного медицинского университета, Курск

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

Shilova Alina S. – Postgraduate student of department of pharmaceutical, toxicological and analytical chemistry, Kursk State Medical University

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

Gerasimov Dmitry A. - A 5th year student of Pharmaceutical Department, Kursk State Medical University