



УДК 544.551.53:543.544.943.3.068.7

Особенности определения отдельных нитропроизводных анилина в биологических объектах в тонком слое обращеннофазового сорбента

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

ГОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет», Курск

Поступила в редакцию 10.08.2010 г.

Аннотация

Изучены особенности хроматографического поведения четырёх моонитроанилинов в тонком слое обращеннофазового сорбента (модель привитой фазы $C_{14}-C_{15}$). Показана возможность использования предложенных условий хроматографирования для идентификации объектов исследования в биологическом материале.

Ключевые слова: моонитроанилины, ТСХ, идентификация, биологический материал

Peculiarities of chromatographic behaviour of the four mononitroanilines in a thin layer of the reversed-phase sorbent (models of grafted phase $C_{14}-C_{15}$) have been studied. A possibility of using the offered chromatographing conditions for the identification of the objects of investigation in the biological materials has been shown.

Keywords: mononitroanilines, TLC, identification, biological material

Введение

Моонитроанилины широко используются для получения красителей, пигментов, лекарственных средств, взрывчатых веществ, пестицидов и др. Многие из этих соединений сами являются красителями, например, 2-нитроанилин – азоамин оранжевый О, 2-нитро-4-метиланилин – азоамин красный А [3,5].

Данная группа химических соединений обладает значительно выраженными токсическими свойствами по отношению к теплокровным животным и человеку [1,2]. Все изомеры нитроанилина являются метгемоглобинообразующими ядами [8]. Известны случаи острого и хронического отравления людей, а также отравления с летальным исходом [1,7].

Вопросы химико-токсикологического анализа моонитроанилинов являются недостаточно изученными. В частности, мало разработаны вопросы идентификации данной группы соединений в биологическом материале.

Одним из методов, позволяющих достаточно быстро и без применения дорогостоящей аппаратуры предварительно идентифицировать отравляющие вещества в извлечениях из биоматериала, является тонкослойная хроматография.

Целью работы явился поиск оптимальных условий хроматографирования моонитропроизводных анилина в тонком слое обращённофазового сорбента и разработка методики их идентификации в биологическом материале.

Эксперимент

Объектами исследования явились три изомера моонитроанилина («ч.»), содержание основного вещества не менее 99%) и 2-нитро-4-метиланилин (ОАО «Заволжский химический завод им. М.В. Фрунзе» с содержанием основного вещества 99,3%).

Хроматографирование осуществляли в тонком слое обращённофазового сорбента, представлявшего собой силикагель, модифицированный алканами с длиной цепи C_{14} - C_{15} .

Модель тонкого слоя обращённофазового сорбента готовили путём обработки силикагеля СТХ-1ВЭ на стандартных пластинах «Сорбфил» 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 полиэтилентерефталата.

Исследуемые вещества наносили на хроматографические пластины в виде 0,02% спиртовых растворов (по 5-10 мкл). Хроматографировали восходящим методом в стеклянных камерах с внутренним объёмом около 600 см^3 . 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.

Полученные хроматограммы высушивали в токе воздуха при комнатной температуре, проявляли в УФ-свете и рассчитывали значения абсолютной подвижности (R_f) веществ - объектов исследования.

Для наиболее оптимальных подвижных фаз по известным формулам рассчитывался дополнительные параметры, характеризующие особенности хроматографического поведения и разделения анализируемых веществ в тонком слое сорбента с привитой фазой C_{14} - C_{15} : относительная подвижность (R_s), фактор удерживания (K), число теоретических тарелок (N), высота, эквивалентная теоретической тарелке (H), степень разделения (i_{TCX}) [4,6].

Обсуждение результатов

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

Таблица 1. Хроматографическая подвижность мононитроанилинов в тонком слое обращеннофазового сорбента при использовании двухкомпонентных подвижных фаз

Подвижная фаза	Объемное соотношение компонентов	Значения Rf			
		2-Н-4-МА	2-НА	3-НА	4-НА
<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
Вода	—	0	0,07	0,10	0,13
Буферный раствор (рН=2,0)	—	0,01	0,05	0,08	0,09
Буферный раствор (рН=9,0)	—	0,01	0,04	0,08	0,09
Буферный раствор (рН=2,0) – пропанол-2	2:8	0,15	0,27	0,16	0,20
	5:5	0,11	0,15	0,21	0,15
	8:2	0,04	0,08	0,12	0,11
Буферный раствор (рН=9,0) – диоксан	2:8	0,66	0,68	0,82	0,82
	5:5	0,79	0,85	0,84	0,85
	8:2	0,90	0,91	0,91	0,91
Вода – этанол	2:8	0,90	0,90	0,90	0,90
	5:5	0,58	0,71	0,76	0,81
	8:2	0,13	0,27	0,39	0,38
Вода – Диоксан	2:8	0,88	0,87	0,97	0,92
	5:5	0,54	0,65	0,69	0,76
	8:2	0,11	0,21	0,28	0,44
Вода – Ацетонитрил	2:8	0,93	0,94	0,94	0,96
	5:5	0,61	0,68	0,73	0,78
	8:2	0,17	0,26	0,34	0,37
Буферный раствор (рН=9,0) – ацетонитрил	2:8	40	0,52	0,57	0,62
	5:5	0,50	0,62	0,66	0,66
	8:2	0,59	0,65	0,67	0,73
Буферный раствор (рН=2,0) – ацетонитрил	2:8	0,68	0,72	0,72	0,74
	5:5	0,34	0,46	0,50	0,57
	8:2	0,11	0,21	0,29	0,36
Вода – Ацетон	2:8	0,92	0,93	0,98	0,95
	5:5	0,49	0,60	0,64	0,685
	8:2	0,10	0,21	0,24	0,30
Буферный раствор (рН=2,0) – ацетон	2:8	0,93	0,93	0,93	0,93
	5:5	0,84	0,88	0,88	0,90
	8:2	0,08	0,17	0,23	0,29
Буферный раствор (рН=9,0) – ацетон	2:8	0,85	0,85	0,91	0,93
	5:5	0,43	0,54	0,57	0,67
	8:2	0,09	0,20	0,25	0,30

1	2	3	4	5	6
Вода – Метанол	<u>2:8</u>	<u>0,80</u>	<u>0,80</u>	<u>0,88</u>	<u>0,88</u>
	<u>5:5</u>	<u>0,46</u>	<u>0,61</u>	<u>0,68</u>	<u>0,75</u>
	<u>8:2</u>	<u>0,01</u>	<u>0,20</u>	<u>0,30</u>	<u>0,35</u>
Буферный раствор (рН=2,0) – метанол	<u>2:8</u>	<u>0,83</u>	<u>0,83</u>	<u>0,85</u>	<u>0,85</u>
	<u>5:5</u>	<u>0,38</u>	<u>0,50</u>	<u>0,64</u>	<u>0,62</u>
	<u>8:2</u>	<u>0,05</u>	<u>0,17</u>	<u>0,29</u>	<u>0,29</u>
Буферный раствор (рН=9,0) – метанол	<u>2:8</u>	<u>0,62</u>	<u>0,64</u>	<u>0,62</u>	<u>0,64</u>
	<u>5:5</u>	<u>0,33</u>	<u>0,50</u>	<u>0,62</u>	<u>0,65</u>
	<u>8:2</u>	<u>0,04</u>	<u>0,14</u>	<u>0,25</u>	<u>0,28</u>
Буферный раствор (рН=2,0) – диоксан	<u>2,0:8,0</u>	<u>0,59</u>	<u>0,67</u>	<u>0,79</u>	<u>0,75</u>
	<u>5,0:5,0</u>	<u>0,54</u>	<u>0,60</u>	<u>0,66</u>	<u>0,72</u>
	<u>6,0:4,0</u>	<u>0,36</u>	<u>0,46</u>	<u>0,53</u>	<u>0,62</u>
	<u>7,0:3,0</u>	<u>0,18</u>	<u>0,29</u>	<u>0,36</u>	<u>0,45</u>
	<u>8,0:2,0</u>	<u>0,10</u>	<u>0,20</u>	<u>0,26</u>	<u>0,34</u>
	<u>8,5:1,5</u>	<u>0,09</u>	<u>0,16</u>	<u>0,24</u>	<u>0,28</u>
	<u>9,0:1,0</u>	<u>0,04</u>	<u>0,11</u>	<u>0,16</u>	<u>0,17</u>
<u>9,5:0,5</u>	<u>0,03</u>	<u>0,10</u>	<u>0,16</u>	<u>0,15</u>	

Параметры хроматографирования изомеров мононитроанилина и 2-Н-4-МА в тонком слое модели сорбента с привитой фазой C₁₄-C₁₅ при использовании оптимальных подвижных систем отражены в табл. 2.

Таблица 2. Параметры хроматографирования мононитроанилинов в тонком слое обращённофазового сорбента при использовании оптимальных подвижных фаз

Вещество	Rf	Rs	K	N	H	i _{ТСХ}
1	2	3	4	5	6	7
Вода – метанол (5:5)						
2-Н-4-МА	0,46	0,49	1,19	338,56	0,014	1,77
2-НА	0,61	0,67	0,63	541,62	0,011	0,70
3-НА	0,68	0,74	0,48	1024,00	0,008	0,80
4-НА	0,75	0,82	0,34	825,26	0,009	
Вода – диоксан (8:2)						
2-Н-4-МА	0,11	0,26	8,52	26,45	0,050	2,43
2-НА	0,21	0,51	3,74	220,73	0,020	1,12
3-НА	0,28	0,67	2,60	289,00	0,015	1,25
4-НА	0,44	1,06	1,29	484,00	0,011	
Вода – ацетонитрил (8:2)						
2-Н-4-МА	0,17	3,08	4,75	16,00	0,063	1,39

2-НА	0,26	4,62	2,83	76,17	0,029	
						0,75
3-НА	0,34	5,96	1,97	83,59	0,027	
						0,14
4-НА	0,37	6,54	1,70	94,37	0,026	
Вода – этанол (5:5)						
2-Н-4-МА	0,58	0,76	0,71	432,64	0,012	
						1,00
2-НА	0,71	0,92	0,41	427,11	0,012	
						0,60
3-НА	0,76	0,99	0,32	1225,00	0,007	
						0,56
4-НА	0,81	1,05	0,23	876,16	0,008	
Вода – ацетон (5:5)						
2-Н-4-МА	0,49	0,78	1,04	256,00	0,016	
						1,17
2-НА	0,60	0,94	0,68	427,11	0,012	
						0,45
3-НА	0,64	1,01	0,56	739,84	0,009	
						0,64
4-НА	0,68	1,08	0,46	608,44	0,010	
Вода – метанол (8:2)						
2-Н-4-МА	0,10	0,13	9,10	25,00	0,050	
						1,44
2-НА	0,20	0,26	3,90	77,44	0,028	
						1,43
3-НА	0,30	0,38	2,38	256,00	0,016	
						0,70
4-НА	0,35	0,44	1,90	196,00	0,018	
Буферный раствор (pH=2,0) – диоксан (8:2)						
2-Н-4-МА	0,10	0,22	8,90	19,75	0,563	
						1,30
2-НА	0,20	0,44	3,93	64,00	0,031	
						0,70
3-НА	0,26	0,56	2,83	144,00	0,021	
						1,00
4-НА	0,34	0,74	1,93	177,78	0,019	
Буферный раствор (pH=2,0) – ацетон (8:2)						
2-Н-4-МА	0,08	0,16	11,99	44,44	0,038	
						1,01
1	2	3	4	5	6	7
2-НА	0,17	0,35	4,92	50,57	0,035	
						0,88
3-НА	0,23	0,48	3,33	92,16	0,026	
						0,60
4-НА	0,29	0,61	2,42	144,00	0,021	

Как видно из полученных результатов при использовании в качестве подвижной фазы системы растворителей вода-диоксан (8:2) значения степени разделения ($i_{TСХ}$) для всех пар наиболее близких по хроматографической подвижности соединений превышают единицу, что

свидетельствует о полном разделении анализируемых веществ в предлагаемых условиях.

В дальнейшем подвижная фаза вода-диоксан (8:2) была применена для идентификации рассматриваемых моонитроанилинов в биологическом материале методом обращённофазовой ТСХ в случаях индивидуального присутствия каждого из анализируемых веществ в биологических объектах и в случае присутствия в биологических объектах суммы данных соединений. Для этого применяли следующую методику.

Методика определения моонитроанилинов в биологическом материале.

В каждом опыте к 25 г искусственной смеси ткани трупной печени с одним из рассматриваемых веществ или с их суммой, прибавляли 50 г бензола и выдерживали 45 минут при периодическом перемешивании. Извлечение отделяли, процесс изолирования повторяли по вышеописанной схеме. Первое и второе извлечения, полученные из каждой искусственной смеси, объединяли и перемешивали. По 0,3 мл каждого объединённого извлечения и растворы свидетелей анализируемых моонитроанилинов наносили микропипеткой на линию старта хроматографической пластины «Сорбфил» с люминесцентным индикатором. Хроматографировали, используя в качестве подвижной фазы систему растворителей вода-диоксан (8:2), пластины высушивали в токе воздуха и детектировали пятна в видимом и УФ-свете. Рассчитывали значения параметров хроматографирования исследуемых соединений. Полученные результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3. Результаты хроматографирования моонитроанилинов, выделенных из биологического материала, методом обращённофазовой ТСХ при использовании подвижной фазы вода-диоксан (8:2)

Вещество	Rf	Rs	K	N	H	$i_{TСХ}$
Исследование биологических объектов, содержащих одно вещество						
2-Н-4-МА	0,11	0,26	8,52	26,45	0,050	—
2-НА	0,21	0,51	3,74	220,73	0,020	—
3-НА	0,28	0,67	2,60	289,00	0,015	—
4-НА	0,45	1,06	1,22	488,41	0,011	—
Исследование биологических объектов, содержащих сумму веществ						
2-Н-4-МА	0,12	0,26	7,33	27,64	0,048	2,43
2-НА	0,22	0,51	3,55	224,14	0,017	1,09
3-НА	0,28	0,67	2,60	289,00	0,015	1,25
4-НА	0,44	1,06	1,29	484,00	0,011	—

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

Таким образом, условия хроматографирования, включающие использование модели обращённофазового сорбента с привитой фазой C_{14} - C_{15} и подвижной фазы вода-диоксан (8:2) могут быть применены для определения рассматриваемых моонитроанилинов по отдельности и в сумме методом ТСХ и являться основой для экспресс-методики предварительной идентификации 2-нитро-4-метиланилина, 2-нитроанилина, 3-нитроанилина и 4-нитроанилина в объектах биологического происхождения при проведении химико-токсикологических исследований.

Список литературы

1. Василенко Н.М. Гигиенические значения патологических дериватов гемоглобина у работающих с ароматическими нитро- и аминсоединениями/ Н.М. Василенко, В.И. Звездой, А.И. Гнездилова//Врачебное дело. 1971. №2. С.130-134.
2. Василенко Н.М. Особенности токсического действия изомеров моонитроанилинов/ Н.М. Василенко, В.И. Звездой, Ф.А. Колодуб // Гигиена и санитария. 1974. № 8. С. 103-104.
3. Грушко Я.М. Вредные органические соединения в промышленных сточных водах: Справочник – 2-е изд., перераб. и доп. – Л.: Химия. 1982. 216 с.
4. Сикорская А.С. Подбор оптимальных условий разделения фосфолипидных комплексов, полученных из семян подсолнечника/ А. С. Сикорская, А.А. Назарова, В.Ф. Селеменев// Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т.9. Вып.2. С.215-220
5. Химическая энциклопедия: в 5 т.: Т.3/ Редкол.: Кнунянц И.Л. и др. – М.: Большая российская энциклопедия. 1992. 639 с.: ил.
6. Шорманов В.К. Химико-токсикологическое исследование отдельных классов ароматических соединений кислотного характера и их эфиров: Дисс. д-ра фармацевт. наук: 15.00.02. – Защищена 01.03.1999; 01960012564. – М. 1999. 643 с.
7. Bakdash A. Lethal Poisoning with p-Nitroaniline / A.Bakdash, M.Ganswindt, S.Herre e.a. // Toxichem+Krimtech. 2006. Vol. 73. № 2. P. 61-65.
8. French C. L. Potency ranking of methemoglobin-forming agents / C. L.French, S.4. Yam, L. A. Baldwin e.a. // Journal of applied toxicology. 1995. Vol. 15. № 3. P. 167-174.

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,

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

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

Гашпаренко Василий Николаевич – зав. химико-токсикологической лаборатории Липецкого областного бюро судебно-медицинской экспертизы, Липецк (4742)-43-07-19

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

Gashparenko Vasily N. – Head of chemichotoxicological laboratory of bureau of forensic medical examination (Липецкого областного бюро судебно-медицинской экспертизы, Липецк) e-mail: R-WLADIMIR@yandex.ru