

Р. А. Клищенко<sup>1</sup>, З. А. Темердашев<sup>1</sup>, Н. В. Киселева<sup>1</sup>, А. В. Удалов<sup>2</sup>**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ТСХ-СКРИНИНГА ПРОИЗВОДНЫХ ФЕНОТИАЗИНА**<sup>1</sup> Кубанский государственный университет, Краснодар;<sup>2</sup> Краснодарский краевой наркологический диспансер, Краснодар

Исследованы хроматографические свойства семи представителей производных фенотиазина методом ТСХ на силикагеле в однокомпонентных элюентах. Подобраны элюенты, содержащие аммиак. Установлены оптимальные составы элюентов в бинарных и тройных смесях растворителей для разделения исследуемых соединений. Опробовано использование аммиака в качестве модификатора силикагеля. Реализовано полное разделение исследуемых веществ методом двухмерной тонкослойной хроматографии.

В терапевтической практике, а также при диагностике отравлений несомненный практический интерес представляет разработка унифицированной методики контроля нейролептических препаратов. Однако разделение и идентификация методом ТСХ соединений ряда фенотиазина представляет определенную сложность ввиду близости их физико-химических свойств и, как следствие, характеристик удерживания и характера взаимодействия с подвижной и неподвижной фазами.

В настоящей работе проведены исследования по оптимизации условий элюирования для скрининга производных фенотиазина с использованием семи представителей данного класса соединений.

В настоящее время используются несколько стандартных схем для ТСХ-определения производных фенотиазина [1]. В качестве элюентов применяют следующие смеси растворителей: 1 — бензол — диоксан — 25 % аммиак (70:25:5), 2 — бензол — диоксан — 25 % аммиак (60:35:5), 3 — этилацетат — ацетон — 25 % аммиак в этаноле (1:1) (50:45:4), 4 — этанол — уксусная кислота (ледяная) — вода (50:30:20), 5 — хлороформ — этанол (70:30), 6 — бензол — диоксан — 25 % аммиак (10:80:10). В работах [2 – 7] также описаны условия разделения многих фенотиазинов, однако часть из них уже не используется в практике, а условия определения других не являются оптимальными на новых хроматографических сорбентах.

*Экспериментальная часть*

Экспериментальные исследования проводили на пластинках Sorbfil (силикагель СТХ-1А, зернение 5 – 17 мкм, размер 10 × 10 см, подложка ПЭТФ). Перед нанесением образца пластины очищали смесью вода – ацетонитрил (8:2) в ненасыщенной камере. Экспериментальные исследования показали, что наносимые в солевой форме вещества не вымываются с линии старта элюентами и требуется использование пластин с pH ≥ 8. Для этого предварительно проверяли значение pH пластин по индикаторной бумаге, при pH меньше 8 пластины пропитывали 0,1 М раствором КОН. Пропитка пластин возможна как опрыскиванием, так и погружением в раствор. Эта процедура необходима для перевода солевой формы наносимого вещества в основную, поскольку щелочной силикагель нейтрализует кислоту, связанную с исследуемым веществом. При использовании элюентов, содержащих аммиак, проверка значения pH пластины не требуется.

Обработку методик ТСХ-скрининга проводили на образцах индивидуальных веществ, приготовленных из лекарственных форм, таких как таблетки и ампулы, с приблизительной концентрацией растворов 2,5 – 10 мг/мл. Для этого таблетки измельчали и заливали 1 мл ацетонитрила. Извлечение веществ проводили в течение 1 ч. Для хроматографирования на линию старта наносили 1 – 5 мкг каждого вещества.

Таблица 1

**R<sub>f</sub> веществ в однокомпонентных элюентах с добавлением аммиака**

Соединение	Элюент					
	Me <sub>2</sub> CO:NH <sub>3</sub>		MeCN:NH <sub>3</sub>			
	99:1	90:10	100:1	100:2,5	100:5	90:10
Аминазин	0,67	0,90	0,25	0,47	0,66	0,80
Перициазин	0,64	0,87	0,17	0,34	0,54	0,67
Этаперазин	0,36	0,83	0,08	0,20	0,42	0,58
Нонахлазин	0,39	0,87	0,06	0,16	0,43	0,63
Сонапакс	0,58	0,90	0,14	0,32	0,60	0,76
Трифтазин	0,39	0,87	0,08	0,22	0,50	0,68
Тизерцин	0,78	0,90	0,49	0,68	0,82	0,87

Таблица 2

**R<sub>f</sub> веществ в бинарных элюентах с добавлением аммиака**

Соединение	Элюент			
	Hex:Me <sub>2</sub> CO		Hex:Me <sub>2</sub> CO:NH <sub>3</sub>	
	6:4	5:5	6:4:насыщ	5:5:насыщ
Аминазин	0,22	0,25	0,48	0,70
Перициазин	0,08	0,11	0,17	0,36
Этаперазин	0,06	0,07	0,16	0,33
Нонахлазин	0,06	0,07	0,21	0,40
Сонапакс	0,10	0,12	0,39	0,61
Трифтазин	0,04	0,05	0,28	0,51
Тизерцин	0,21	0,26	0,63	0,74

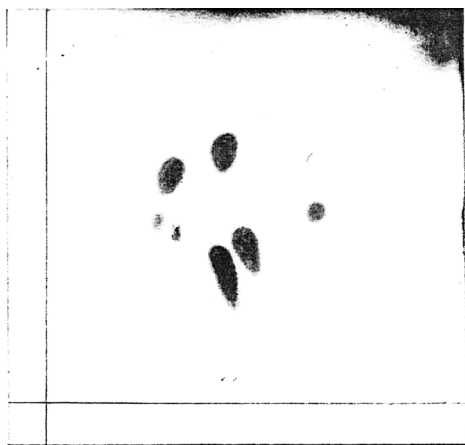


Рис. 1. Двухмерная хроматограмма в системах ацетонитрил — аммиак (95:5) — метанол

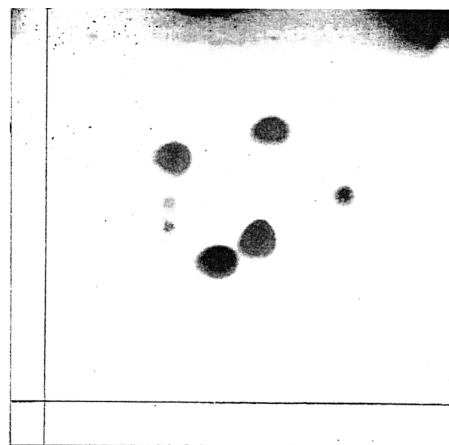


Рис. 2. Двухмерная хроматограмма в системах ацетон — 25 % аммиак (99:1) — метанол

Разделение проводили в восходящем потоке в герметичных N-камерах, насыщенных парами растворителей, при комнатной температуре. Длина пути растворителя составляла каждый раз 9 см. По окончании хроматографирования пластины высушивали на нагревательном устройстве УСП-1. Проявление проводили 10% раствором серной кислоты в этаноле.

Предварительные экспериментальные исследования с использованием различных органических растворителей при их различном соотношении бинарных и тройных смесей показали, что значения  $R_f$  исследуемых веществ низкие и их использование неэффективно. Исключение составлял только метанол. Значения  $R_f$  в этом случае были достаточно высоки. Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что для получения эффективной системы элюирования необходим особый модификатор, аналогичный по природе разделяемым веществам и обладающий основными свойствами. Таким модификатором может быть аммиак, который использовался авторами [1, 3] или третичный алифатический амин (например, триметиламин или триэтиламин). В этом случае основная сложность связана с тем, что аммиак используется в виде водного раствора, а вода не смешивается со многими органическими растворителями, что требует использования гидрофильных растворителей как в чистом виде, так и

в качестве добавки для повышения взаимной растворимости компонентов элюентов.

Нами проведены экспериментальные исследования с аммиаком в качестве модификатора с использованием гидрофильных растворителей (ацетона и ацетонитрила). Данные по  $R_f$  исследуемых веществ при использовании их в смеси с водным раствором аммиака приведены в табл. 1.

Добавление аммиака к смеси гексан — ацетон приводит к уменьшению удерживания производных фенотиазина и улучшению их разделения. Так как аммиак с такой смесью смешивается ограниченно, ее насыщали аммиаком при контакте с его водным раствором в течение 30 мин. Хроматографическое поведение исследуемых веществ изучили при двух составах элюентов. Предварительно были определены  $R_f$  веществ при составе элюента гексан — ацетон (1:1). Полученные данные по значениям удерживания представлены в табл. 2, там же для сравнения приведены результаты, полученные без использования аммиака.

Другим способом оптимизации разделения может быть модификация сорбента, которая достигается насыщением аммиаком объема камеры. Такой подход также приводит к положительному результату. В этом случае добавление его в элюент необязательно. Недостатком такого способа модификации хроматографической системы является то, что для получения воспроизводимых результатов необходимо насыщение камеры перед каждым экспериментом. Кроме того, устройство хроматографической камеры должно позволять одновременно использовать две жидкости без их смешивания, то есть необходимо как минимум два разделенных отдела для растворителей, что реализуется в специальных типовых камерах. Полученные данные для системы хлороформ — ацетон в таком варианте приведены в табл. 3.

#### Результаты и их обсуждение

В результате серии экспериментов были установлены составы элюентов, обеспечивающие приемлемое разделение компонентов: 1 — гексан — ацетон —

Таблица 3

$R_f$  веществ в бинарных элюентах с насыщением силикагеля аммиаком

Соединение	CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO		CHCl <sub>3</sub> :Me <sub>2</sub> CO; NH <sub>3</sub>	
	8:2	5:5	8:2, насыщ	5:5, насыщ
Аминазин	0,06	0,18	0,74	0,78
Перициазин	0,03	0,13	0,24	0,53
Этаперазин	0,05	0,08	0,29	0,46
Нонахлазин	0,04	0,11	0,62	0,69
Сонапакс	0,07	0,15	0,74	0,77
Трифтазин	0,06	0,11	0,65	0,69
Тизерцин	0,09	0,35	0,81	0,83

Значения  $R_f$  соединений в различных системах элюирования

Соединение	Элюент							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Аминазин	0,48	0,70	0,66	0,80	0,74	0,78	0,67	0,45
Перициазин	0,17	0,36	0,54	0,67	0,24	0,53	0,64	0,69
Этаперазин	0,16	0,33	0,42	0,58	0,29	0,46	0,36	0,59
Нонахлазин	0,21	0,40	0,43	0,63	0,62	0,69	0,39	0,52
Сонапакс	0,39	0,61	0,60	0,76	0,74	0,77	0,58	0,37
Трифтазин	0,28	0,51	0,50	0,68	0,65	0,69	0,39	0,44
Тизерцин	0,63	0,74	0,82	0,87	0,81	0,83	0,78	0,54

25 % аммиак (60:40:насыщ); 2 — гексан — ацетон — 25 % аммиак (50:50:насыщ); 3 — ацетонитрил — 25 % аммиак (95:5); 4 — ацетонитрил — 25 % аммиак (90:10); 5 — хлороформ — ацетон — 25 % аммиак (80:20; насыщ); 6 — хлороформ — ацетон — 25 % аммиак (50:50; насыщ); 7 — ацетон — 25 % аммиак (99:1); 8 — метанол. Значения  $R_f$  исследуемых веществ в системах 1 — 8 приведены в табл. 4. Приведенные семь систем (кроме 7) ранее для подобных разделений не использовались.

Эффективность разделения высока при использовании однокомпонентного элюента — метанола. Как видно из табл. 1 и 2, добавление в элюент аммиака приводит к увеличению значений  $R_f$  исследуемых веществ и в результате способствует их разделению. Это подтверждает эффективность использования аммиака в качестве модификатора элюента для ТСХ-определения производных фенотиазина.

Характер влияния аммиака на величину удерживания соответствует теоретической зависимости  $R_f$  от объемной доли полярного модификатора в элюенте, вид которой определяется базовыми уравнениями теории Снайдера [8].

Приведенные системы результативны для ТСХ-скрининга производных фенотиазина и могут использоваться в рутинном анализе, однако при наличии в пробе соединений других классов со сходным хроматографическим поведением может потребоваться более высокая разрешающая способность предварительного анализа. В этом случае целесообразнее использование метода двухмерной тонкослойной хроматографии. Для подбора пар систем элюирования изучено наличие корреляции между значениями  $R_f$  компонентов в предложенных системах. Наименьшие коэффи-

циенты корреляции были получены для следующих сочетаний элюентов: ацетон — 25 % аммиак (99:1) — метанол ( $r = 0,25$ ) и ацетонитрил — аммиак (95:5) — метанол ( $r = 0,42$ ). Полученные хроматограммы двухмерной ТСХ показаны на рис. 1 и 2 соответственно.

Проведенное системное исследование возможных хроматографических систем элюирования позволило установить составы элюентов, обеспечивающие наибольшую эффективность разделения производных фенотиазина, определить условия детектирования исследуемых веществ и обосновать перспективность использования аммиака в качестве модификатора адсорбента и элюента в нормально-фазовом варианте ТСХ. Учитывая совместное применение исследованных препаратов в клинической практике, подобранные условия разделения могут быть рекомендованы для лабораторных исследований реальных образцов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Е. М. Саломатин, *Методические рекомендации по химико-токсикологическому определению психотропных соединений фенотиазинового ряда*, Казань (1988).
2. J. Kofoed, C. Fabierkievicz, and G. H. W. Lucas, *J. Chromatogr.*, **23**, 410 — 416 (1966).
3. I. Zingales, *J. Chromatogr.*, **31**, 405 — 419 (1967).
4. T. J. Mellinger and C. E. Keller, *J. Pharm. Sci.*, **51**, 1169 — 1173 (1962).
5. J. Cochlin and J. W. Daly, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **139**, 160 — 165 (1963).
6. I. Ojanpera, *Trends in Analytical Chemistry*, **11**(6), 222 — 230 (1992).
7. В. А. Карташов, В. М. Овсянникова, Л. Е. Кудрикова, *Суд.-мед. экп.*, № 3, 39 — 41 (1982).
8. F. Geiss, *Die Parameter der Dunnschichtchromatografie*, Vieweg, Braunschweig (1972).

Поступила 21.10.04

## OPTIMIZATION OF THE CONDITIONS FOR TLC SCREENING OF PHENOTHIAZINE DERIVATIVES

R. A. Klishchenko<sup>1</sup>, Z. A. Temerdashev<sup>1</sup>, N. V. Kiseleva<sup>1</sup>, and A. V. Udalov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Kuban State University, Krasnodar, Russia

<sup>2</sup> Krasnodar Regional Narcology Prophylactic Center, Krasnodar, Russia

Chromatographic properties of seven phenothiazine derivatives have been studied by TLC on silica gel plates in single-component eluent systems. Eluents containing ammonia are selected as providing the optimum results. Optimum compositions of binary and triple solvent mixtures for the best separation of phenothiazine derivatives have been determined and the possibility of modifying silica gel with ammonia has been studied. The complete separation of the compounds studied is achieved using two-dimensional TLC.