

О. А. Горошко, О. А. Чеча, В. П. Пахомов, Ю. В. Рувинов, Т. Д. Исмагилов

**СОРБЕНТЫ ДЛЯ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ**

Институт клинической фармакологии НЦ ЭСМП, Москва, Россия

Для разделения отдельных соединений лекарственного растительного сырья и DL триптофана методом ТСХ показана возможность использования различных сорбентов: целлюлозы, обращеннофазного силикагеля, хирально модифицированного силикагеля, пластинок с концентрирующей зоной.

**Ключевые слова:** тонкослойная хроматография, сорбенты, лекарственные средства.

Метод тонкослойной (планарной) хроматографии (ТСХ) включен в Российскую ГФ XI [1], а также в зарубежные фармакопеи (Британии, Европы, США, Франции и др.). В большинстве фармакопейных статей, где применяется метод ТСХ, используются готовые пластинки различных фирм-производителей, преимущественно со слоем силикагеля.

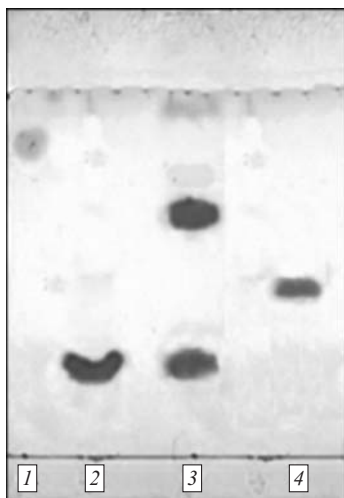
Несмотря на то, что на силикагеле возможно разделять многие соединения, некоторые классы веществ все же лучше разделяются на других сорбентах. Существует большой ассортимент сорбентов и пластинок для ТСХ, которые в фармацевтическом анализе используются крайне редко. Это пластинки со слоем целлюлозы, модифицированного силикагеля, с концентрирующей зоной кизельгура, хиральные сорбенты и др. [2, 3].

Различные типы адсорбентов проявляют неодинаковую селективность по отношению к соединениям разной химической и пространственной структуры. Полярные адсорбенты (силикат магния, двуокись кремния, окись алюминия, целлюлоза) селективно ад-

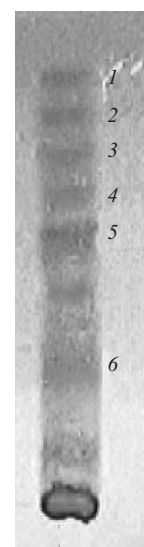
сорбируют ненасыщенные, ароматические и полярные молекулы (спирты, амины, кислоты). Неполярные адсорбенты (кизельгур, активированный уголь, модифицированные силикагели с привитыми силанольными группами) проявляют селективность к полярным молекулам [4]. Причем у модифицированных силикагелей полярность зависит от количества привитых групп. По уменьшению полярности модифицированные сорбенты можно разместить в ряд амино- > циано- > диол- > RP-2 > RP-8 > RP-18.

В таблице представлены данные о сорбентах, используемых на пластинках, и классах соединений, которые можно разделять на данных сорбентах [3, 5, 6].

На пластинках с различными сорбентами мы проанализировали несколько классов соединений, присутствующих в лекарственном растительном сырье: флавоноиды, антоцианидины, аминокислоты, аскорбиновая кислота.



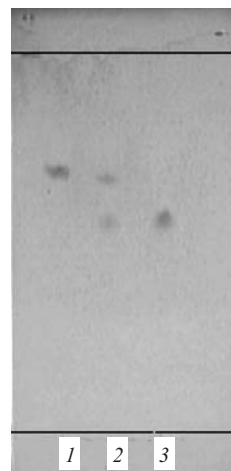
**Рис. 1.** Хроматограммы продуктов кислотного гидролиза лейкоантоцианов соплодий хмеля и отдельных стандартов на пластинке со слоем целлюлозы, ПФ уксусная кислота-соляная кислота – вода (50:10:5): 1 — рутин, 2 — цианидина хлорид, 3 — продукты кислотного гидролиза лейкоантоцианов соплодий хмеля, 4 — пеларгонидина хлорид.



**Рис. 2.** Хроматограмма водно-спиртового извлечения соплодий хмеля на пластинке с силикагелем G60, ПФ петролейный эфир — хлороформ — муравьиная кислота (10:4:1): 1 — бензойная кислота, 2 — салициловая кислота, 3 — ванилиновая кислота, 4 — кофейная кислота, 5 — галловая кислота, 6 — аскорбиновая кислота.



**Рис. 3.** Хроматограммы аскорбиновой кислоты на пластинке с обращеннофазовым силикагелем RP-18, ПФ этилацетат — уксусная кислота (80:20): 1 — водно-спиртовое извлечение соплодий хмеля, 2 — аскорбиновая кислота.



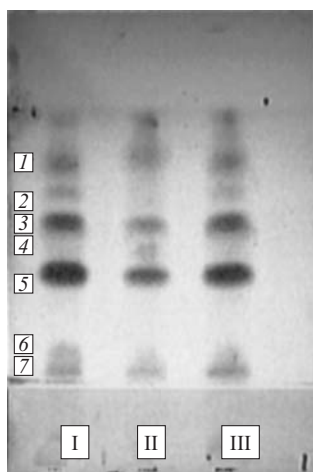
**Рис. 4.** Хроматограммы рацемической субстанции триптофана и стандартов на пластинке с RP-силикагелем модифицированным L-4-оксипролином, ПФ вода — ацетонитрил (1:3): 1 — L-триптофан, 2 — субстанция LD-триптофана, 3 — D-триптофан.

### Экспериментальная часть

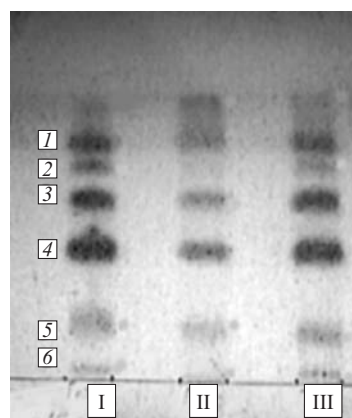
Исследования проводили методом ТСХ с использованием пластинок со слоем силикагеля Kieselgel G60 F<sub>254</sub>, немодифицированной целлюлозы Cellulosa F, двухфазной пластинки с концентрирующей зоной кизельгура и силикагелем Kieselgel G60 F<sub>254</sub>, обращеннофазовые пластинки со слоем модифицированного силикагеля TLC plates RP-18 F<sub>254s</sub> фирмы “Merck”. Обозначение F<sub>254</sub> показывает, что в сорбент введен флуоресцентный индикатор с рабочей длиной волны 254 нм. Разделение оптически активной субстанции триптофана проводили на пластинках с RP-силикагелем, модифицированным L-оксипролином, связанным с ионами Cu<sup>2+</sup> фирмы “Macherey-Nagel” — Chiralplate.

Хроматографирование во всех случаях проводили без насыщения камер на высоту 8 см. Обнаружение компонентов и видеодокументирование хроматограмм — с помощью соответствующих реактивов и видеоденситометра “Сорбфил”.

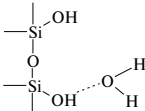
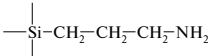
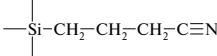
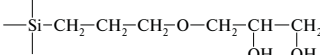
Исследовались водно-спиртовое извлечение соплодий хмеля, матричные настойки горцев перечного, почечуйного и птичьего, субстанция D, L-триптофана. Извлечение из соплодий хмеля 50 % этанолом готовили в соотношении 1:25. Для обнаружения лейкоантоцианов хмеля проводили гидролиз их при нагревании водно-спиртового извлечения соплодий с концентрированной соляной кислотой до образования окрашенных антоцианидинов и хроматографировали полученные продукты реакции [7]. Матричные настойки готовили по общей фармакопейной статье “Настойки гомеопатические матричные” [8]. В работе использовали стандартные образцы рутина, цианидина хлорида, пеларгонидина хлорида, бензойной, салициловой,



**Рис. 5.** Хроматограммы матричных настоек на пластинке с силикагелем и концентрирующей зоной, ПФ изопропанол — вода (7:3): I — настойка горца птичьего, II — настойка горца перечного, III — настойка горца почечуйного, 1 — триптофан, 2 — глутаминовая кислота, 3 — треонин, 4 — неидентифицировано, 5 — серин, 6 — неидентифицировано, 7 — гистидин.



**Рис. 6.** Хроматограммы матричных настоек на пластинке с силикагелем G60 ПФ изопропанол — вода (7:3): I — настойка горца птичьего, II — настойка горца перечного, III — настойка горца почечуйного, 1 — триптофан, 2 — глутаминовая кислота, 3 — треонин, 4 — серин, 5 — неидентифицировано, 6 — гистидин.

Сорбент	Анализируемые классы соединений
Силикагель	<b>Немодифицированный силикагель</b>
	Органические кислоты, флавоноиды, сапонины, стероиды, афлатоксины, жирные кислоты, липиды, гликозиды, сульфаниламиды, тетрациклины, сахара, витамины, терпеноиды
Пластинки со слоем силикагеля и концентрирующей зоной кизельгура	Дополнительная очистка образцов со сложной матрицей (кровь, моча, настойки, растительные экстракты) и концентрирование сильно разбавленных проб
С привитыми силанольными группами C <sub>2</sub> RP-2 С привитыми силанольными группами C <sub>8</sub> RP-8 С привитыми силанольными группами C <sub>18</sub> RP-18 С привитыми аминогруппами	<b>Модифицированный силикагель</b>
	Алкалоиды, аминокислоты, барбитураты, стероиды, тетрациклины, пептиды, флавоноиды, фенолы, салицилаты, аскорбиновая кислота и др.
С привитыми циано-группами	Нуклеотиды, пестициды, фенолы, пуриновые производные, стероиды, витамины, сульфоновые кислоты, сахара, карбоксикислоты, ксантины
	Пестициды, фенолы, эфиры галловой кислоты, производные бензодиазепина, стероиды, тетрациклины
С привитыми диольными группами	Стероиды, гликозиды, пестициды, антибиотики, ароматические амины, дигидробензойные кислоты
	Хиральные соединения: аминокислоты, аминоспирты, дипептиды, производные тиазолидина, лактонов и α-гидроксикарбоновых кислот
RP-силикагель с хиральным селектором -Si-L-4oxyPro+Cu <sup>2+</sup>	<b>Алюминия оксид</b>
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Алкалоиды, стероиды, терпены, алифатические и ароматические соединения, жирорастворимые витамины
Немодифицированная целлюлоза	<b>Целлюлоза</b>
Ацетилованная целлюлоза	Аминокислоты, карбоксикислоты, сахара, флавоноиды, катехины, полициклические ароматические углеводороды
Анионообменная целлюлоза (аминоэтилцеллюлоза, диэтиламиноэтилцеллюлоза, полиэтиленимидцеллюлоза)	Антрахиноны, антиоксиданты, ароматические углеводороды, карбоксикислоты, нитрофенолы, сахара
Полиамид	Аминокислоты, пептиды, ферменты, нуклеотиды
	<b>Полиамид</b>
	Фенольные и полифенольные соединения, танины, аминокислоты, карбоксикислоты, спирты

ванилиновой, кофейной, галловой, аскорбиновой кислот (фирмы “Fluka”), стереоизомеров L и D триптофана, треонина, серина, гистидина, глутаминовой кислоты (фирмы “Merck”).

Лейкоантоцианы соплодий хмеля после кислотного гидролиза исследовали на пластинках со слоем силикагеля в различных подвижных фазах (ПФ). Наиболее полное разделение было получено в ПФ хлороформ — метанол — вода (63:37:7). Экспозиция 20 мин. После хроматографирования было обнаружено 2 зоны розового цвета с  $R_f \pm 0,36$  и 0,42. Учитывая, что лейкоантоцианы являются гидрофильными соединениями, мы взяли другой, более полярный сорбент целлюлозу, и более полярную ПФ: уксусная кислота — соляная кислота — вода (50:10:5). Экспозиция 45 мин. При разделении на пластинках с целлюлозой обнаружены 4 зоны с  $R_f \approx 0,32$  (розовый — цианидин), 0,59 (розовый), 0,66 (желтый), 0,88 (розово-коричневый) (рис. 1).

Идентификация аскорбиновой кислоты в растительных объектах методом ТСХ обычно вызывает определенную трудность. На пластинках с силикагелем в системе растворителей петролейный эфир — хлороформ — муравьиная кислота (10:4:1) после обработки хроматограммы смесью бромкрезолового зеленого с перманганатом калия и нагревания при 120 °С в течение 1 мин [7] аскорбиновую кислоту идентифицировали по стандарту в виде трудно различимой коричневой зоны с  $R_f \approx 0,34$  (рис. 2). Время хроматографирования 15 мин. При использовании другого элюента (этилацетат — уксусная кислота, 80:20) разделения не происходило. Для того чтобы использовать полярные подвижные фазы, имеющие сродство к аскорбиновой кислоте как гидрофильному веществу, была взята пластинка с обращеннофазным силикагелем RP-18 и ПФ этилацетат — уксусная кислота (80:20). Экспозиция 25 мин. В УФ-свете при 254 нм обнаружены 2 зоны: с

$R_f \approx 0,9$  (аскорбиновая кислота) и  $R_f \approx 0,93$  (неидентифицированная зона) (рис. 3).

Для разделения оптически активных веществ были использованы хиральные лигандообменные неподвижные фазы, где разделение основано на образовании диастереомерных комплексов между ионом меди, хиральным селектором и молекулами пробы. Комплексы *D* и *L* изомеров имеют при этом различную стабильность и, как следствие, различную подвижность на пластинке [5].

На пластинках с хиральным сорбентом нами успешно поделены на стереоизомеры рацемические субстанции аминокислот: триптофана (рис. 4), метионина, лизина и лейцина. Подвижные фазы подбирались для разделения каждой конкретной смеси веществ. Разделение LD-триптофана осуществляли в системе растворителей вода — ацетонитрил (1:3). Экспозиция 15 мин. Зоны проявлялись после опрыскивания пластинки 0,25 % раствором нингидрина в ацетоне и при нагревании при 120 °С в течение 1 мин в виде розово-оранжевых пятен на белом фоне. Значения  $R_f$  *L*-триптофана  $\approx 0,62$ ; *D*-триптофана  $\approx 0,45$ .

Исследования аминокислотного состава матричных настоек горца перечного, птичьего и почечуйного проводились в сравнении на двухфазной пластинке с концентрирующей зоной (рис. 5) и пластинке с силикагелем (рис. 6). Подвижная фаза — изопропанол — вода (7:3), экспозиция 55 мин. Зоны обнаруживались после опрыскивания хроматограммы 0,25 % раствором нингидрина в ацетоне и при нагревании при 120 °С в течение 1 мин в виде лилово-розовых пятен на белом фоне.

### Результаты и их обсуждение

Таким образом, при разделении гидрофильной пробы на пластинках с силикагелем наблюдается низкая селективность (2 зоны) и эффективность (критерий разрешения этих зон  $R_s = 0,48$ ) адсорбента. При разделении этой же пробы на целлюлозе повышается и селективность (4 зоны) и эффективность разделения (критерий разрешения ( $R_s$ ) цианидина и зоны с  $R_f \approx 0,59$  равен 7,9).

При сравнении хроматограмм аскорбиновой кислоты на немодифицированном и обращеннофазном силикагеле RP-18 видно, что лучшее разделение в по-

следнем случае происходит с критерием разрешения  $R_s = 1,14$ . Идентификации также не мешают сопутствующие гидрофобные вещества, которые остаются на старте.

При исследовании сложных многокомпонентных смесей, таких как настойки, экстракты и другие фитопрепараты, целесообразно использовать двухфазные пластинки с силикагелем и концентрирующей зоной, на которых зона кизельгура выполняет концентрирующую и фильтрующую функцию для проб, содержащих сопутствующие высокомолекулярные соединения.

При сравнении хроматограмм, полученных на двухфазной пластинке (рис. 5) и пластинке с силикагелем (рис. 6), видно, что границы зон на хроматограмме двухфазной пластинки более четко очерчены, в стойке горца перечного проявилась зона 4, не обнаруживаемая на пластинке без концентрирующей зоны. Эффективность разделения выше на пластинке с концентрирующей зоной (ЧТТ (число теоретических тарелок) = 1164, а  $R_s = 1,77$  зон 3 и 4, рис. 5) по сравнению с обычным силикагелем (ЧТТ = 1085,  $R_s = 1,51$  зон 3 и 5, рис. 6). Поэтому идентификацию соединений в растительных объектах целесообразней проводить на пластинках с концентрирующей зоной.

Разделение энантиомеров аминокислот успешно осуществляется на пластинках “Chiralplate” с критерием разрешения более 1. Это позволяет рекомендовать шире использовать тонкослойную хиральную хроматографию для анализа оптически активных лекарственных средств.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея СССР, XI изд., Т. 1. Медицина, Москва (1987), сс. 95 – 105.
2. *Chromatography*, Macherey-Nagel, Duren (1997), pp. 257 – 304.
3. *Chrom Book 2006 – 2007*, Merck, Darmstadt (2004), pp. 152 – 175.
4. С. Перри, Р. Амос, П. Брюер, *Практическое руководство по жидкостной хроматографии*, Чмутов К. В. (ред.), Мир, Москва (1974), сс. 72 – 89.
5. В. Д. Красиков, *Основы планарной хроматографии*, Химиздат, Санкт-Петербург (2005), сс. 27 – 40.
6. В. П. Пахомов, О. А. Чеча, О. А. Горошко, *Фармац. пром.*, 6, 69 – 72 (2006).
7. О. А. Горошко, *Дис. ... канд. фарм. наук*, Москва (2005).
8. ВФС 42-2799-96 “Настойки гомеопатические матричные”.

Поступила 18.09.09

## SORBENTS FOR THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS

O. A. Goroshko, P. A. Chechya, V. P. Pakhomov, Uy. V. Ruvinov, and T. D. Ismagilov

Institute of Clinical Pharmacology, Scientific Center for Expertise of Medical Products, Moscow, Russia

Compounds contained in raw medicinal plant material and DL tryptophan have been separated by thin-layer chromatography using various sorbents, including cellulose, RP modified silica gel, a plates with a concentrating zone, chiral precoated plates.

**Key words:** Thin-layer chromatography, sorbents, drugs