

Рекомендована д.ф.н., професором П.О.Безуглим

УДК 615.218.2:543.544.42

КОЛЬОРОВІ РЕАКЦІЇ І ТОНКОШАРОВА ХРОМАТОГРАФІЯ КЕТОТИФЕНУ

В.В.Болотов, Е.Ю.Ахмедов, Ю.О.Мирошніченко

Національний фармацевтичний університет
Донецький національний медичний університет ім. М.Горького

Вивчено кольорові реакції кетотифену із загальноалкалоїдними реактивами: кислотою сірчаною концентрованою, реактивом Маркі, реактивом Драгендорфа, розчином кобальту тіоціанату. Запропоновано реакцію на $=C=O$ групи з розчином 2,4-динітрофенілгідразину, з діазотованою сульфаніловою кислотою на групу $-CH_2-C=O$ та реакцію з модифікованим реактивом Маркі. Вивчено поведінку кетотифену методом ТШХ в 14 стандартних системах розчинників.

Кетотифен (задитен) — 4,9-дигідро-4-(1-метил-4-піперидилден-10Н)-бензо[4,5]-циклогепта [1,2-б]тіофен-10-ону гідрофумарат виявляє протиалергійну активність та застосовується для лікування бронхіальної астми, алергійних бронхітів, сінної лихоманки, алергійних ринітів, алергійних шкірних реакцій. Проте потрібно зазначити, що препарат може чинити седативну дію, посилює дію снодійних та седативних препаратів і алкоголю [1, 4, 5]. Відомі випадки отруєнь цим препаратом, проте методи його хіміко-токсикологічного аналізу розроблено недостатньо (схема) [6-9].

У літературі [5] наведені результати деяких кольорових реакцій кетотифену з реактивами, що застосовують в аналізі алкалоїдів, а також дані щодо використання хроматографії в тонких шарах сорбенту (ТШХ) при аналізі біологічних об'єктів на наявність кетотифену. Наведені в зазначеній літературі кольорові реакції на кетотифен неспецифічні; крім того, деякі з них (з реактивом Маркі, реактивом Манделіна) ми не змогли відтворити.

Стосовно досліджень методом ТШХ слід зазначити відсутність даних відносно поведінки кетотифену в стандартних системах розчинників, рекомендованих Міжнародним комітетом з систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів [2].

У зв'язку з цим у даній роботі поставлено за мету розробити більш специфічні кольорові реакції на кетотифен, вивчити поведінку кетотифену методом ТШХ у системах розчинників, рекомендованих Міжнародним комітетом з система-

тичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів, а також у системах розчинників, що використовуються в загальному ТШХ-скринінгу органічних речовин основного характеру [2, 6].

Експериментальна частина

Для підвищення чутливості кольорових реакцій їх виконували на хроматографічних пластинах "Sorbfil" ПТСХ-ІІВ розміром 2×2 см (силікагель СТХ-1ВЕ, тип підложки — ПЕТФ, зв'язуюча речовина — силіказоль, фракція — 8÷12 мкм, товщина шару — 100 мкм). Розчин основи кетотифену в етанолі (концентрація 1000 мкг/мл) за допомогою каліброваного капіляра наносили на пластину в точку. Після висушування плям при кімнатній температурі пластини обробляли відповідними реактивами.

Хроматографічну поведінку кетотифену (метод ТШХ) вивчали в 14 системах розчинників, серед яких системи 1-10 визнано стандартними Міжнародним комітетом з систематичного токсикологічного аналізу Міжнародної асоціації судових токсикологів, а системи 11-14 застосовують у загальному ТШХ-скринінгу органічних речовин.

Як тонкі шари використовували пластини для високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) виробництва Естонії (сорбент КСКГ, фракція — 5÷20 мкм, товщина шару — 130±25 мкм, розмір пластин — 10×10 см); пластини Silufol UV-254 (силікагель, підложка — фольга, зв'язуюча речовина — крохмаль, розмір пластин — 10×10 см); пластини "Sorbfil" ПТСХ-ІІВ (силікагель СТХ-1ВЕ,

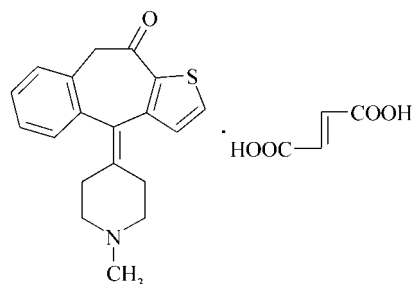


Схема. Кетотифену фумарат.

Таблиця 1

Результати проявлення плям кетотифену на хроматографічних пластинах "Sorbfil"

Проявник	Забарвлення плям/чутливість, мкг у пробі (особливість обробки пластин реактивом)
УФ-світло ($\lambda = 254$ нм)	На пластинах без УФ-індикатора плями не виявляються; на пластинах з УФ-індикатором спостерігають фіолетові плями/0,25
Кислота сірчана концентрована	Жовто-зелене без світіння в УФ-світлі ($\lambda = 365$ нм)/5,0 (пляму обробляли прокочуванням скляної палички, змоченої концентрованою H_2SO_4)
Пари йоду	Коричневе/0,5
Модифікований реактив Маркі*	Червоне з жовтогарячим світінням в УФ-світлі ($\lambda = 365$ нм)/0,5 (плями на пластині обробляли прокочуванням скляної палички, змоченої реактивом, пластини поміщали на столик для нагрівання хроматографічних пластин (80-90°C на 30 хв; через 5 хв плями набували жовто-зеленого забарвлення, яке поступово змінюється на червоне; забарвлення плям ставало яскравішим після промивання пластин у проточній воді)
Розчин 2,4-динітрофенілгідрозину**	Жовтогаряче/0,1 (обприскування пластин розчином; забарвлення плям з'являється у міру висихання пластин (20-30 хв))
Діазотована сульфанілова кислота в лужному середовищі***	Жовте/0,5 (обприскування пластин розчином)
Реактив Драгендорфа за Мунье	Жовте/0,1 (обприскування пластин)
Розчин кобальту тіоціанату	Блакитне/0,5 (обприскування пластин)

Примітки:

* Модифікований реактив Маркі: до 3 мл льодяної оцтової кислоти додавали 4 краплі формаліну (37-40%) і 1 мл кислоти сірчаної концентрованої (реактив використовують свіжоприготованим).

** Розчин 2,4-динітрофенілгідрозину: до 0,1 г 2,4-динітрофенілгідрозину додають 4 мл концентрованої кислоти хлористоводневої і 20 мл води.

*** Діазотована сульфанілова кислота в лужному середовищі: до 0,5 г сульфанілової кислоти додають 75 мл води і 25 мл 5 М розчину кислоти хлористоводневої (розчин А). До 40 мл охолодженого до 3°C розчину А повільно додають 10 мл 0,7% розчину натрію нітриту (розчин Б). Для обприскування пластин використовують розчин, отриманий змішуванням 2 мл розчину Б з 1 мл 5 М розчину їдкого натру (розчин С). Всі розчини зберігають в холодильнику. Розчини Б і С готують безпосередньо перед обприскуванням пластин.

тип підложки — ПЕТФ, зв'язуюча речовина — силіказоль, фракція — 8÷12 мкм, товщина шару — 100 мкм, розмір пластин — 10×10 см); пластини Armsorb (силікагель КСКГ, підложка — фольга, зв'язуюча речовина — крохмаль, фракція — 5÷20 мкм, товщина шару — 100±10 мкм, розмір пластин — 5×10 см); скляні пластини фірми "Merck" (Німеччина) (силікагель GF₂₅₄, розмір пластин — 10×10 см).

Таблиця 2

Значення R_f кетотифену в різних системах розчинників та тонких шарах (n = 3)

Тонкий шар**	Система розчинників*													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
А	0,04	0,00	0,65	0,34	0,38	0,16	0,54	0,40	0,66	0,34	0,34	0,66	0,00	0,82
Б	0,00	0,00	0,62	0,38	0,36	0,16	0,46	0,24	0,40	0,18	0,56	0,58	0,00	0,74
В	0,02	0,00	0,16	0,12	0,05	0,20	0,60	0,38	0,76	0,50	0,42	0,40	0,05	0,50
Г	0,00	0,00	0,30	0,14	0,24	0,16	0,38	0,18	0,47	0,50	0,44	0,42	0,00	0,60
Д	0,00	0,00	0,54	0,42	0,36	0,24	0,38	0,50	0,72	0,52	0,60	0,64	0,06	0,78

Примітки:

* 1. хлороформ — ацетон (80:20); 2. етилацетат; 3. хлороформ — метанол (90:10); 4. етилацетат — метанол — 25% розчин амоніаку (85:10:5); 5. метанол; 6. метанол — *n*-бутанол (60:40); 7. метанол — 25% розчин амоніаку (100:1,5); 8. циклогексан — толуен — діетиламін (75:15:10); 9. хлороформ — метанол (90:10); 10. ацетон; 11. хлороформ — діоксан — ацетон — 25% розчин амоніаку (47,5:45:5:2,5); 12. толуен — ацетон — етанол — 25% розчин амоніаку (45:45:7,5:2,5); 13. етилацетат — метанол — 25% розчин амоніаку (85:10:2,5); 14. хлороформ — *n*-бутанол — 25% розчин амоніаку (70:40:5). При використанні систем розчинників 7, 8, 9, 10 пластини попередньо обробляли 0,1 М розчином калію гідроксиду в метанолі, а потім висушували при 110°C протягом 30 хв. В системі розчинників 6 пластини попередньо обробляли 0,1 М розчином натрію броміду.

** А — Sorbfil; Б — Armsorb; В — Silufol UV-254; Г — Merck; Д — ВЕТШХ.

Результати та їх обговорення

Результати кольорових реакцій кетотифену на хроматографічних пластинах у зазначених умовах наведено в табл. 1.

Дані табл. 1 свідчать про те, що для виявлення кетотифену на хроматографічних пластинах можуть використовуватися такі широко вживані проявники, як УФ-світло, кислота сірчана концентрована, пари йоду, реактив Драгендорфа, розчин кобальту тїоціанату.

Як було зазначено вище, згідно з даними [5] плями кетотифену на хроматографічних пластинах при обробці реактивом Маркі забарвлюються в бузково-фіолетовий колір. Проте ми не спостерігали появи будь-якого забарвлення. Червоне забарвлення плям з'являлося тільки після нагрівання пластин при температурі 80-90°C протягом 30 хв на столику для нагрівання пластин. При цьому результати погано відтворювалися. У зв'язку з цим нами було модифіковано склад реактиву Маркі (табл. 1) та запропоновано методику обробки плям кетотифену цим реактивом — як результат були отримані червоні плями, що мають жовтогаряче світіння в УФ-світлі, та поява яких добре відтворюється.

Найбільш специфічними і чутливими для виявлення кетотифену є реакції утворення 2,4-динітрофенілгідрозону кетотифену (реакція на $=C=O$

групу [3], реакція 5), реакція утворення азобарвника кетотифену (реакція 6 з діазотованою сульфаніловою кислотою в лужному середовищі, реакція на $-CH_2-C=O$ групу [3]), а також реакція з модифікованим реактивом Маркі при нагріванні.

Всі запропоновані реактиви використовували для проявлення плям кетотифену на пластинах при його дослідженні методом ТШХ.

Результати хроматографічного дослідження кетотифену наведено в табл. 2.

Дані табл. 2 свідчать, що серед досліджених стандартних систем для ТШХ є системи, які можуть бути використані для ефективного виявлення кетотифену, а також такі, що надалі при вивченні витяжок з біологічного матеріалу можуть бути використані для очищення плям кетотифену від співекстрактивних речовин.

ВИСНОВКИ

1. Вивчено кольорові реакції кетотифену з рядом загальноалкалоїдних реактивів (кислота сірчана концентрована, реактив Маркі, реактив Драгендорфа, розчин кобальту тїоціанату). Запропоновано реакцію на $=C=O$ групу з 2,4-динітрофенілгідразинном, на метиленову групу в складі угруповання $-CH_2-C=O$ з діазотованою сульфаніловою кислотою і реакцію з модифікованим реактивом Маркі.

2. Вивчено поведінку кетотифену методом ТШХ у 14 стандартних системах розчинників.

ЛІТЕРАТУРА

1. Балткayс Я.Я., Фатеев В.А. *Взаимодействие лекарственных веществ*. — М.: Медицина, 1991. — 304 с.
2. Еремин С.К., Изотов Б.Н., Веселовская Н.В. *Анализ наркотических средств: руководство по химико-токсикологическому анализу наркотических и других одурманивающих средств*. — М.: Мысль, 1993. — 272 с.
3. Коренман И.М. *Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений*. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Химия, 1975. — 360 с.
4. Машковский М.Д. *Лекарственные средства*. — 15-е изд., перераб., испр. и доп. — М.: Новая волна, 2006. — 1200 с.
5. Хомов Ю.А., Говорова Е.Г., Гаранин В.П., Кокшарова Н.В. // *Проблемы экспертизы в медицине*. — 2003. — Т. 3, №1. — С. 16-20.
6. Clarke's isolation and identification of drugs in pharmaceuticals body fluids and postmortem material. — 2-nd ed. — London: The Pharm. Press, 1986. — 1200 p.
7. Lahti R.A., Vuori E. // *Forensic Sci. Int.* — 2002. — Vol. 126. — P. 203-209.
8. Lahti R.A., Vuori E. // *Forensic Sci. Int.* — 2003. — Vol. 136. — P. 35-46.
9. Koski A., Ojanpera I., Vuori E. // *Hum. Exp. Toxicol.* — 2003. — May. — Vol. 22 (5). — P. 281-288.

УДК 615.218.2:543.544.42

ЦВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ И ТОНКОСЛОЙНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ КЕТОТИФЕНА

В.В.Болотов, Э.Ю.Ахмедов, Ю.А.Мирошниченко

Изучены цветные реакции кетотифена с общеалкалоидными реактивами: кислотой серной концентрированной, реактивом Марки, реактивом Драгендорфа, раствором кобальта тїоціаната. Предложена реакция на $=C=O$ группу с раствором 2,4-динітрофенілгідразина, с діазотированной сульфаниловой кислотой на группу $-CH_2-C=O$ и реакцию с модифицированным реактивом Марки. Изучено поведение кетотифена методом ТСХ в 14 стандартных системах растворителей.

UDC 615.218.2:543.544.42

THE COLOURED REACTIONS AND THIN LAYER CHROMATOGRAPHY OF KETOTIFEN

V.V.Bolotov, E.Yu.Akhmedov, Yu.O.Miroshnichenko

The ketotifen coloured reactions with general alkaloid reagents such as the concentrated sulphuric acid, the Marqui's reagent, the Dragendorf's reagent, the cobalt thiocyanate solution have been studied. The reaction for $=C=O$ group with the 2,4-dinitrophenylhydrazine solution, with diazotized sulphanic acid for $-CH_2-C=O$ group and the reaction with the modified Marqui's reagent have been offered. The behaviour of ketotifen in 14 standard solvent systems has been studied by the TLC method.