

Oddelovanie kyseliny benzoovej, kyseliny salicylovej, ich solí, esterov a komplexných zlúčenín s purínovými bázami

M. ŠARŠŮNOVÁ, V. SCHWARZ, L. KRASNEC, KIM CHI

*Laboratórium pre kontrolu liečiv, Krajský ústav národného zdravia,
Bratislava*

*Výzkumný ústav přírodních léčiv,
Praha*

*Vedeckovýskumný ústav Farmaceutickej fakulty Univerzity Komenského,
Bratislava*

Študovalo sa oddelovanie kyseliny benzoovej, kyseliny salicylovej, kyseliny *p*-hydroxybenzoovej, ich solí, esterov a komplexných zlúčenín s purínovými bázami chromatografiou na vrstvách silikagélu spevneného spájadlom, ako aj na sypaných vrstvách kysličníka hlinitého. Sledoval sa vplyv vzájomnej interakcie medzi chromatografovanými látkami a rozpúšťadlovou sústavou, ako aj vplyv pH rozpúšťadlovej sústavy na oddelovanie látok o blízkej chemickej štruktúre. Zistilo sa, že ich rozdelenie v zmesiach je výhodnejšie na silikagéli so spájadlom, keďže sa tu uplatňuje ďalšia možnosť tvorby vodíkových väzieb medzi silikagélom a chromatografovanými látkami, čo vedie k väčším rozdielom v ich hodnotách R_F . Na kysličníku hlinitom sa javia iba malé rozdiely v hodnotách R_F pri väčšine týchto látok, keďže vzniká chelát medzi hliníkom v adsorbente a karboxyhydroxylovým zoskupením niektorých z oddelovaných látok.

Chromatografia aromatických kyselín na tenkej vrstve sa opisuje vo viacerých prácach. Prvú prácu z tejto oblasti publikovali R. L. Lyman a spolupracovníci [11], ktorí úspešne oddelovali kyselinu salicylovú, kyseliny rezorcylové, ako aj mnohé iné látky na vrstve silikagélu spevneného škrobom. Súčasť rozpúšťadlovej sústavy tvoril Skellysolve B. Polyetylén glykol ako zložku adsorbenta za účelom solubilizácie použili na oddelenie niektorých alifatických a aromatických kyselín E. Knappe a D. Peteri [8]. E. Stahl a P. J. Schorn [17] používali na oddelovanie týchto látok silikagél so sadrou. G. Pastuska a H. Trinksová [14] oddelovali aromatické kyseliny chromatografiou alebo elektroforézou na tom istom adsorbente. Niekoľko prác je venovaných chromatografii kyseliny benzoovej, kyseliny salicylovej a iných kyselín v súvislosti so štúdiom oddelovania konzervačných prostriedkov [3, 10, 14, 17, 18].

Chromatografiou aromatických kyselín z farmaceutického hľadiska sa zapodievali práce [3, 5, 7, 9, 12, 15, 16]. Napríklad J. W. Frankenfeld [6] úspešne oddelil viaceré kyseliny v kyslej sústave heptán—kyselina octová. V ďalšej práci sa ako adsorbent použila okrem silikagélu aj zmes silikagélu a kremeliny [13], silikagélu a celulózy [15] alebo celulóza [4]. Opisuje sa aj chromatografia kyselín vo forme amónnych solí na silikagéli [1].

Experimentálna časť

Chemikálie a reagentie

Pracovalo sa na vrstvách silikagélu G Merck, pripravených technikou podľa E. Stahla, ktoré sa pred použitím aktivovali 30-minútovým zahrievaním v termostate pri 105 °C. Ďalej sa použil kysličník hlinitý ČSN 685 132, ktorý sa aktivoval a štandardizoval obvyklým spôsobom; pH bolo 8,6, aktivita ca III (hodnoty R_F : azobenzén 0,70, *p*-metoxyazobenzén 0,42, sudánová žlt 0,20, sudánová červeň 0,08). Zrnitosť bola 0,075 mm, hrúbka vrstvy 0,6 mm. Okrem toho sa pracovalo na kysličníku hlinitom deaktivovanom 6 % váh. ľadovej kyseliny octovej; pH takto upraveného kysličníka hlinitého bolo 4,6, aktivita ca V (hodnoty R_F : azobenzén 0,95, *p*-metoxyazobenzén 0,88, sudánová žlt 0,80, sudánová červeň 0,60).

Všetky chemikálie boli p. a. Etanol použitý na prípravu rozpúšťadlových sústav bol 99,5 %. Použil sa aj bezvodý chloroform pripravený z chloroformu p. a.

Analyzované látky sa detegovali po vysušení chromatogramu parami jódu. Kofeín sa detegoval aj Dragendorffovým činidlom modifikovaným podľa Muniéra. Teobromín a teofylín sa detegovali 1 % vodným roztokom dusičnanu ortuťného.

Pracovný postup

Použil sa postup bežný pri chromatografickom oddeľovaní na tenkých vrstvách. Pred chromatografickým oddeľovaním na vrstvách silikagélu sa chromatografická komora pol hodiny sýtila používaným rozpúšťadlovým systémom, kým pri chromatografii na kysličníku hlinitom trvalo sýtenie dve hodiny. Skúmané látky sa nanášali v množstve 50 µg z etanolového roztoku.

Výsledky a diskusia

Výsledky chromatografického oddeľovania študovaných látok na vrstvách silikagélu so spájadlom, a to kyseliny benzoovej, kyseliny salicylovej a kyseliny *p*-hydroxybenzoovej, ďalej salicylanu sodného, kyseliny acetylsalicylovej, metylparabénu a propylparabénu, metylsalicylanu a fenylsalicylanu, kofeínu, teobromínu ich komplexných zlúčenín s benzoanom a salicylanom sodným, ako aj teofylínu, sú zhrnuté v tab. 1.

V tab. 2 sú uvedené výsledky oddeľovania týchto látok v dvoch neutrálnych a v dvoch kyslých sústavách na rozličných adsorbentoch.

Ako vidieť v tab. 1, purínové bázy kofeín, teobromín a teofylín bolo možné oddeliť z viacerých študovaných sústav. Ako vhodné sa javili sústavy s alifatickým alkoholom, akými sú systémy 1, 2 a 6 (tab. 1). Kyselina octová nemá vplyv na oddelenie purínov, keďže sa ako silne polárne rozpúšťadlo pevne púta k adsorbentu, čím dochádza k postupnému obsadzovaniu aktívnych centier adsorbenta týmto rozpúšťadlom, ktoré je odnímané z elučnej sústavy. Vidieť to z toho, že pri sústavách s obsahom kyseliny octovej sa vytvára druhé čelo, tzv. vedľajšie, ktoré je bližšie ku štartu. Po toto čelo, ako je známe, prebieha vyvíjanie kompletným použitým elučným systémom. Okrem toho vzniká aj hlavné čelo, ktoré tvorí elučná sústava ochudobnená o polárnu zložku [2]. Tento úkaz sa zaujímavým spôsobom uplatňuje pri sústave chloroform—ľadová kyselina octová—etanol, kde kofeín sa nachádza až za druhým, čiže vedľajším čelom, keďže sú pre túto látku výhodné sústavy obsahujúce chloroform a etanol. Rozdiely v pohyblivosti uvedených troch purínových

derivátov na tenkých vrstvách chromatogramu sa môžu vysvetliť ich chemickou štruktúrou. V prípade teobromínu sa pri chromatografickom oddeľovaní uplatňuje enolforma amidického zoskupenia. Pri teofylíne a kofeíne je pre substitúciu dusíkového atómu v polohe 1 a 3 metylovou skupinou enolizácia karbonylovej skupiny nemožná, v dôsledku čoho pohyblivosť teofylínu je väčšia než pri teobromíne. Nižšie hodnoty R_F teofylínu v porovnaní s kofeínom vyplývajú z toho, že vodík na dusíku v polohe 7 má kyslý charakter, kým kofeín vplyvom metylácie túto vlastnosť nemá. Najväčšiu rýchlosť putovania kofeínu pri oddeľovaní chromatografiou na vrstvách si vysvetľujeme prítomnosťou metylových skupín, čím sa znižuje stérická prístupnosť. Tieto látky možno oddeľovať takmer vo všetkých študovaných sústavách uvedených v tab. 1 a 2.

Vzájomné oddelenie salicylanu a benzoanu sodného bolo možné v sústave 7 a 8 (tab. 1). V oboch prípadoch bolo oddelenie látok spôsobené čiastočne vplyvom pH, avšak predovšetkým možnosťou tvorby vodíkových väzieb medzi salicylanom sodným a donorovou zložkou elučnej sústavy. Tieto látky bolo možné oddeliť aj v sústave dioxán—ľadová kyselina octová—chloroform na kyslíčniku hlinítom (tab. 2).

Metylestery a propylestery kyseliny *p*-hydroxybenzoovej sa dobre oddeľujú v sústavách benzén—éter—ľadová kyselina octová (pozri sústavu 3, tab. 1), kde zložky elučnej sústavy majú donorový charakter. Propylparabén javí vyššie hodnoty R_F než metylparabén v dôsledku rozdielnej priestorovej stavby ich molekuly.

Oddeľovanie metylsalicylanu a fenylsalicylanu je dobré v sústave benzén—dioxán—

Tabuľka 1
Oddeľovanie študovaných látok na silikagéle G

Látka	Hodnoty R_F a rozpúšťadlové sústavy							
	1	2	3	4	5	6	7	8
kofeín	0,58	0,59	0,25	0,39	0,48	0,67	0,38	0,79
teofylín	0,36	0,48	0,15	0,15	0,36	0,57	0,26	0,73
teobromín	0,22	0,33	0,07	0,13	0,22	0,47	0,18	0,50
benzoan sodný	0,82	0,78	0,83	0,93	0,77	0,82	0,75	0,75
salicylan sodný	0,84	0,80	0,87	0,95	0,80	0,85	0,80	0,80
propylparabén	0,78	0,87	0,81	0,86	0,76	0,88	0,84	0,70
metylparabén	0,74	0,82	0,68	0,82	0,70	0,85	0,74	0,60
kyselina salicylová	0,88	0,77	0,96	0,96	0,86	0,93	0,88	0,79
kyselina benzoová	0,78	0,71	0,94	0,94	0,79	0,90	0,84	0,73
kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	0,66	0,31	0,38	0,38	0,52	0,58	0,53	0,71
kyselina acetylsalicylová	0,88	0,78	0,86	0,96	0,89	—	—	0,80
fenylester kyseliny salicylovej	0,83	0,90	0,91	0,95	0,89	0,91	0,86	0,84
metylester kyseliny salicylovej	1,00	1,00	1,00	0,97	0,90	0,93	0,96	0,90

- Sústava: 1. chloroform—etanol—ľadová kyselina octová 95 : 2,5 : 2,5;
 2. chloroform—cyklohexán—ľadová kyselina octová—etanol 80 : 10 : 5 : 5;
 3. benzén—éter—ľadová kyselina octová—metanol 30 : 15 : 4,5 : 0,25;
 4. pentán—izopropyléter—ľadová kyselina octová 60 : 40 : 5;
 5. benzén—dioxán—ľadová kyselina octová 70 : 26 : 4;
 6. benzén—metanol—ľadová kyselina octová 40 : 5,5 : 4,5;
 7. benzén—dioxán—ľadová kyselina octová 90 : 25 : 4;
 8. etanol—voda—amoniak 25 % 25 : 3 : 0,25.

Tabuľka 2

Oddelovanie skúmaných látok na rozličných adsorbentoch

Látka	Hodnoty R_F , adsorbenty, rozpúšťadlové sústavy							
	I			II		III	IV	
	A	B	C	A	B	A	A	B
teobromín	0,30	0,32	0,67	0,17	0,29	0,22	0,22	0,30
teofylín	0,36	0,42	0,77	0,25	0,37	0,36	0,36	0,43
kofeín	0,44	0,67	0,87	0,52	0,62	0,58	0,48	0,73
benzoan sodný	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,82	0,77	0,75
salicylan sodný	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,84	0,80	0,18
kyselina benzoová	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78	0,84	0,00
kyselina salicylová	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,88	0,88	0,00
metylparabén	0,40	0,62	0,75	0,20	0,28	0,74	0,70	0,55
propylparabén	0,48	0,65	0,75	0,23	0,33	0,78	0,76	0,65
metylester kyseliny salicylovej	0,50	0,67	0,80	0,80	—	1,00	0,89	0,65
fenylester kyseliny salicylovej	0,45	0,67	0,75	0,80	0,58	0,83	0,89	0,55
kyselina <i>p</i> -hydroxybenzoová	0,50	—	—	0,00	0,00	0,66	0,52	0,35
kyselina acetylsalicylová	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,88	0,80	0,10

A. silikagél G;

B. kysličník hlinitý alkalický, aktivity III, pH 8,6;

C. kysličník hlinitý kyslý, aktivity V, pH 4,6;

I. benzén—etanol 80 : 20;

II. chloroform—etanol 95 : 5;

III. chloroform—ladová kyselina octová—etanol 95 : 2,5 : 2,5;

IV. chloroform—dioxán—ladová kyselina octová 70 : 26 : 4.

—ladová kyselina octová (tab. 1), kde dochádza k zníženiu adsorpcie týchto látok vplyvom obsadzovania aktívnych centier silne polárnou kyselinou octovou [2]. Tým sa zvýši možnosť oddelenia uvedených látok, keďže sú málo naadsorbované a tým unášané elučnou sústavou.

Oddelenie kyseliny benzoovej, kyseliny acetylsalicylovej a kyseliny *p*-hydroxybenzoovej bolo dobré iba v sústave benzén—dioxán—ladová kyselina octová na silikagéli so spájadlom (tab. 1). Rozdiely v oddelovaní sú ovplyvnené ich chemickou štruktúrou a z toho vyplývajúcou rozdielnou schopnosťou vytvárať vodíkové väzby. Polarita tohto systému má zasa vplyv aj na rozdielnu pohyblivosť kyseliny salicylovej a kyseliny acetylsalicylovej, ktorá je nižšia pri kyseline salicylovej než pri kyseline acetylsalicylovej vplyvom karboxyhydroxylového zoskupenia kyseliny salicylovej. Maximálna pohyblivosť kyseliny acetylsalicylovej v tejto sústave je ovplyvnená donor-akceptorovým charakterom karboxylovej a esterovej skupiny, ktorý umožňuje tvorbu vodíkových väzieb so zložkami elučnej sústavy. Oddelenie kyseliny salicylovej a kyseliny benzoovej je možné v sústave 1, 2 a 5 (tab. 1) vplyvom ich rozdielnej možnosti tvoriť vodíkové väzby so zložkami rozpúšťadlovej sústavy.

Oddelenie týchto látok bolo výhodnejšie na silikagéli, čo vyplýva z ďalšej možnosti tvorby vodíkových väzieb medzi silikagélom a chromatografovanou látkou a vedie k väčšiemu rozdielu v hodnotách R_F týchto látok o blízkej chemickej štruktúre. Na kysličníku hlinitom táto možnosť pri uvedenej skupine látok nielenže odpadá, ale dochádza aj k vzniku chelátov medzi hliníkom a karboxyhydroxylovým zoskupením [19].

Kyslíčník hlinitý sa ako adsorbent osvedčil na oddelenie purínových báz bez prítomnosti komplexotvornej zložky, na oddelenie metylparabénu a propylparabénu, ako aj fenylsalicylanu a metylsalicylanu. Metylparabén a propylparabén v benzéne s 20 % etanolu na silikagéli G bolo možné oddeliť v zmesi s kyselinou boritou, ďalej s tanínom a tetraboritanom sodným v oftalmologických prípravkoch, ako aj vo vodnom roztoku cukru za prítomnosti kodeínu. Oddelenie kodeínu od benzoanu a salicylanu sodného sa uskutočnilo v tabletách po jeho vytrepaní do chloroformu za prítomnosti ľukového výťažku, fenobarbitálu, fenacetínu, kodeínu, antipyrínu a ďalších iných látok.

РАЗДЕЛЕНИЕ БЕНЗОЙНОЙ И САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТ, ИХ СОЛЕЙ, ЭФИРОВ И КОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ПУРИНОВЫМИ ОСНОВАНИЯМИ

М. Шаршунова, В. Шварц, Л. Краснец, Ким Хи

Контрольная лаборатория лекарств Областного института здравоохранения,
Братислава

Научно-исследовательский институт природных лекарств,
Прага

Научно-исследовательский институт Фармацевтического факультета Университета
им. Коменского, Братислава

Изучалось разделение бензойной, салициловой и *n*-гидроксibenзойной кислот, их солей, эфиров и комплексных соединений с пуриновыми основаниями с помощью хроматографии на слоях. Исследовалось влияние взаимодействия между хроматографированными веществами и системой растворителей, а также влияние рН системы растворителей на разделение веществ с близкой химической структурой. Нашли, что их разделение в смесях на силикагеле со связующим веществом происходит лучше, т. к. при этом создается возможность образования водородных связей между силикагелем и хроматографированными веществами, что приводит к большим расхождениям их значений R_F . На окиси алюминия происходят только малые расхождения значений R_F для большинства этих веществ при образовании хелатов между алюминием в адсорбенте и карбоксигидроксильной группировкой некоторых разделяемых веществ.

Перевела Т. Диллингерова

THE SEPARATION OF BENZOIC ACID, SALICYLIC ACID, THEIR SALTS, ESTERS AND COMPLEX COMPOUNDS WITH PURINES

M. Šaršúnová, V. Schwarz, L. Krasnec, Kim Chi

Laboratory for Supervision of Drugs, District Institute of National Health,
Bratislava

Research Institute of Natural Drugs,
Prague

Institute for Scientific Research, Faculty of Pharmacy, Komenský University,
Bratislava

The separation of benzoic acid, salicylic acid, *p*-hydroxybenzoic acid and their salts, esters and complex compounds with purines was studied on thin layer chromatography. The interaction between the substrates and solvent system, as well as the influence of

pH of the solvent system on the separation of the closely related substances was investigated. It has been found that the separation of these mixtures is more favourable on silica gel with a binding matter, since there is a further possibility to form hydrogen bonding between silica gel and substrates which results in a greater difference in their R_F values. On alumina, there is only little difference in R_F values of most of these substances because of the chelating character of the bond between aluminium in the absorption material and carbohydroxy grouping of some of the substances to be separated.

Translated by Z. Votický

LITERATÚRA

1. Braun D., Geenen H., *J. Chromatography* **7**, 56 (1962).
2. Brenner M., Niederwieser H., Pataki G., Weber R. v knihe E. Stahl, *Dünnschicht-Chromatographie*, 118. Springer-Verlag, Berlin 1962.
3. Calvarano I., *Essenze Deriv. Agrumari* **34**, 137 (1964); *Chem. Abstr.* **63**, 2845 (1965).
4. Copius-Peereboom J. W., Beekes H. W., *J. Chromatography* **14**, 417 (1964).
5. Cuzzoni M. T., *Farmaco Pavia (Ed. Prat.)* **19**, 323 (1964).
6. Frankenfeld J. W., *J. Chromatography* **18**, 179 (1965).
7. Fresen J. A., *Pharm. Weekbl.* **100**, 532 (1965).
8. Knappe E., Peteri D., *Z. anal. Chem.* **188**, 352 (1963).
9. Liebich H., *Deut. Apotheker-Ztg* **99**, 1246 (1959).
10. Lück E., Courtial W., *Deut. Lebensmittel-Rundschau* **61**, 78 (1965).
11. Lyman R. L., Livingston A. L., Bickoff E. M., Booth A. N., *J. Org. Chem.* **23**, 756 (1958).
12. Machata G., *Mikrochim. Acta* **1960**, 79.
13. Pastuska G., *Z. anal. Chem.* **179**, 355 (1961).
14. Pastuska G., Trinks H., *Chemiker Ztg* **85**, 535 (1961).
15. Pinzon R., Kapétanidis I., *Mikrochim. Ichnoanal. Acta* **1965**, 269.
16. Pinzon R., Mirimanoff A., Kapétanidis I., *Pharm. Acta Helv.* **40**, 141 (1965).
17. Stahl E., Schorn P. J., *Hoppe-Seylers' Z. physiol. Chem.* **325**, 263 (1961).
18. Van Sumere C. F., Wolf G., Touchy H., Kint J., *J. Chromatography* **20**, 48 (1965).
19. Šaršúňová M., Schwarz V., *Stationary Phase in Paper and Thin-Layer Chromatography*, 256. Nakladatelství ČSAV, Praha 1965.

Do redakcie došlo 22. 12. 1966

V revidovanej podobe 14. 7. 1967

Adresa autorov:

RNDr. PhMr. Magda Šaršúňová, CSc., Nguyen-thi Kim Chi, Laboratórium pre kontrolu liečiv KÚNZ, Bratislava, Vazovova 34.

RNDr. Vladimír Schwarz, CSc., Výzkumný ústav přírodních léčiv, Praha 9, U Elektry 8.

Prof. RNDr. Ludovít Krasnec, Vedeckovýskumný ústav Farmaceutickej fakulty UK, Bratislava, Kalinčiakova 8.