

CHROM. 7833

## QUANTITATIVE DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE ANALYSE VON BARBITURSÄUREDERIVATEN (BARBITURATEN)

MONIR AMIN

Forschungslaboratorium der Schering AG, Department Galenik, Berlin/Bergkamen (B.R.D.)

(Eingegangen am 13. Mai, 1974)

---

### SUMMARY

#### *Quantitative analysis of barbiturates by thin-layer chromatography*

A number of barbiturates were determined quantitatively by the reflection method on a silica gel plate following conversion into their Na, K, or Ba salts. By the formation of salts the sensitivity and accuracy of the determination are increased, so that the reproducibility, under conditions of standardized working procedures, is good. Since the method is so simple and rapid, it is particularly suitable for the quantitative measurement of barbiturates in pharmaceutical preparations. It can also be well reproduced, with a maximum relative standard deviation of 1%, as several examples have demonstrated.

---

### EINLEITUNG

Zur Bestimmung von Barbitursäurederivaten stehen neben der direkten Messung der UV-Lichtabsorption eine Reihe chemischer Bestimmungsmethoden<sup>1-28</sup> zur Verfügung. Über Trennung und Nachweis von Barbituraten auf Dünnschichtplatten sind einige Arbeiten erschienen<sup>1,8-10</sup>, wogegen auf eine direkte quantitative Bestimmung auf der Dünnschichtplatte bisher kaum eingegangen wurde<sup>29-32</sup>. Es wurde daher versucht, eine einfache, schnelle und zuverlässige direkte quantitative dünnschichtchromatographische Analysenmethode für Barbiturate auszuarbeiten.

### EXPERIMENTELLER TEIL

#### *Untersuchte Barbiturate*

*Reinsubstanzen.* Die Tabelle I zeigt die Kurzbezeichnung und chemische Bezeichnung der Reinsubstanzen.

*Pharmazeutische Präparate.* Die folgenden Präparaten wurden analysiert: Tabletten mit je 150 mg Phenobarbital pro Tablette (Präparat A), Tabletten mit je 70 mg Aprobarbital und 50 mg Butabarbital pro Tablette (Präparat B) und Tabletten mit je 56.96 mg Barbital und 143.04 mg Aminophenazon pro Tablette (Präparat C).

**TABELLE I**  
**UNTERSUCHTE BARBITURATE (REINSUBSTANZEN)**

<i>Kurzbezeichnung</i>	<i>Chemische Bezeichnung</i>
Allobarbital	5,5-Diallylbarbitursäure
Allylbarbital	5-Allyl-5-isobutylbarbitursäure
Aprobarbital	5-Allyl-5-isopropylbarbitursäure
Barbital	5,5-Diäthylbarbitursäure
Barbital-Natrium	5,5-Diäthylbarbitursaures Natrium
Butabarbital	5-Äthyl-5- <i>sek.</i> -butylbarbitursäure
Hexobarbital	5-(1-Cyclohexen-1-yl)-1,5-dimethylbarbitursäure
Methylphenobarbital	5-Äthyl-1-methyl-5-phenylbarbitursäure
Phenobarbital	5-Äthyl-5-phenylbarbitursäure
Phenobarbital-Natrium	5-Äthyl-5-phenylbarbitursaures Natrium
Thiopental-Natrium	5-Äthyl-5-(1'-methylbutyl)-2-thiobarbitursaures Natrium

### *Extraktion und Dünnschichtchromatographie der Barbiturate*

Die Barbiturate wurden in Methanol-Chloroform (1:1) gelöst bzw. aus den pharmazeutischen Präparaten mit diesem Lösungsmittelgemisch herausgelöst. Chromatographiert wurde auf Kieselgel-60-F<sub>254</sub>-Fertigplatten (Merck, Darmstadt, B.R.D.) von 20 × 20 cm Grösse und 0,25 mm Schichtdicke in den mit Fließmitteln gesättigten Kammern. Jeweils 1–5 µg der Eichsubstanz und der Analysenproben wurden auf derselben Platte mit einem der nachstehenden Laufmittel chromatographiert: (1) Chloroform-Aceton (1:1) und (2) Chloroform-Dioxan-Aceton-25%ige Ammoniaklösung (15:45:30:15).

### *Detektion der Barbiturate auf Dünnschichtplatten*

Die Barbiturate wurden zur Detektion auf den entwickelten und im warmen Luftstrom getrockneten Platten in ihre Salze<sup>33</sup> überführt. Die Salzbildung erfolgte: (a) Durch Besprühen der Platte mit 1,0%iger methanolischer KOH-, NaOH- bzw. gesättigter methanolischer Ba(OH)<sub>2</sub>-Lösung und anschliessendem Trocknen. (b) Durch 15 minütiges Einstellen der Platten in eine mit Ammoniakdampf gesättigte Kammer.

Die Substanzflecken auf diesen Platten wurden mit einem Chromatogramm-Spektralphotometer PMQ II nach der Reflexionsmethode direkt gemessen.

### *Auswertung*

Der Gehalt an Barbituraten in den pharmazeutischen Präparaten erfolgte unter Bezugnahme auf den Remissionsgrad eines Vergleichsflecks bekannter Konzentration<sup>34</sup>.

## **ERGEBNISSE UND DISKUSSION**

### *Reinsubstanzen*

Wegen der Absorption im kurzwelligen UV-Lichtbereich (210–220 nm) sind der direkten quantitativen Bestimmung der Barbiturate in ihrer protonierten Form mit Ausnahme des Thiopentals Grenzen gesetzt, wie die Tabelle II zeigt. Die Lichtintensität des Chromatogrammspektralphotometers ist in diesem Bereich gering, so

TABELLE II

ABSORPTIONSMAXIMA ( $\lambda_{max.}$ ) DER UNTERSUCHTEN BARBITURATE AUF DEN ENTWICKELTEN PLATTEN VOR UND NACH DEM BESPRÜHEN

Substanz	$\lambda_{max.}$ (nm)	
	Vor dem Besprühen	Der Na-, K-, Ba- oder NH <sub>4</sub> -Barbiturate nach dem Besprühen
Allobarbitol	215	242
Allylbarbitol	216	238
Aprobarbitol	215	240
Barbitol	215	238
Barbitol-Natrium	215*	238
Butabarbitol	215	238
Hexobarbitol	221	242
Methylphenobarbitol	210	244
Phenobarbitol	210	240
Phenobarbitol-Natrium	210*	240
Thiopental-Natrium	290	300

\* Diese Barbiturate hydrolysieren während der Chromatographie und liegen daher nicht mehr als Na-Salze vor.

TABELLE III

NACHWEISGRENZE DER UNTERSUCHTEN BARBITURATE UND IHRER SALZE

Substanz	Nachweisgrenze ( $\mu\text{g}$ )	
	Der Barbiturate vor dem Besprühen	Der K-, Na-, oder Ba-Barbiturate nach dem Besprühen
Allobarbitol	2	0.1
Allylbarbitol	7	0.1
Aprobarbitol	12	0.1
Barbitol	7	0.3
Barbitol-Natrium	7	0.3
Butabarbitol	12	0.1
Hexobarbitol	1	0.1
Methylphenobarbitol	1	0.1
Phenobarbitol	1	0.1
Phenobarbitol-Natrium	1	0.1
Thiopental-Natrium	0.5	0.1

dass mit grosser Verstärkung und weit geöffnetem Spalt gearbeitet werden muss, was zu einem hohen Rauschpegel, schlechtem spektralen Auflösungsvermögen und damit zu geringer Genauigkeit führt. Die Überführung der Barbiturate in ihre Salze dagegen bewirkt eine Verschiebung der Absorptionsmaxima zu höheren Wellenlängen<sup>34</sup>, wie die Tabelle II zeigt, wodurch die Genauigkeit der Messung verbessert und die Nachweisempfindlichkeit der Methode um etwa eine Zehnerpotenz erhöht wird (Tabelle III). Die lineare Beziehung zwischen Konzentration und dem relativen Remissionsgrad in dem Bereich von 1–5  $\mu\text{g}$  wurde für alle Substanzen festgestellt.

TABELLE IV  
BESTÄNDIGKEIT DER BARBITURATSALZE

X = Arithmetischer Mittelwert; SD = Standardabweichung der Einzelwerte.

Substanz	Remissionsgrad (%)											
	NH <sub>4</sub> -Salze						K-Salze*					
	Sofort		Nach 30 min		Nach 60 min		Sofort		Nach 30 min		Nach 60 min	
	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD	X	SD
Allobarbitol	61	2.0	84	2.1	93	0.92	59	0.65	59	0.65	60	0.60
Allylbarbitol	65	2.6	81.5	1.6	93	0.46	59	0.77	60	0.60	60	0.60
Aprobarbitol	67	2.9	82	2.1	93	0.90	60	0.72	61	0.90	61	0.90
Barbitol	68	2.4	82	1.6	95	0.47	53	0.47	53	0.47	54	0.50
Barbitol-Natrium	69	2.2	83.5	1.7	97	0.20	52	0.50	53	0.64	53	0.64
Butabarbitol	68	3.2	81	1.6	95	0.92	57	0.55	57	0.55	58	0.70
Hexobarbitol	74	2.6	85	2.1	91.5	0.90	64	0.77	65	0.65	65	0.65
Methylphenobarbitol	63	2.6	72	2.2	86	1.3	56	0.56	57	0.55	57	0.55
Phenobarbitol	58	1.9	67.5	1.7	85	0.85	53	0.70	53	0.69	54	0.55
Phenobarbitol-Natrium	59	2.0	68	2.0	88	1.3	54	0.55	55	0.80	55	0.80
Thiopental-Natrium	34	0.35	34	0.35	34	0.35	35	0.30	35	0.30	35	0.30

\*Na- und Ba-Salze verhalten sich ebenso.

TABELLE V

ERGEBNISSE DER QUANTITATIVEN BARBITURATBESTIMMUNG IN DEN PHARMAZEUTISCHEN PRÄPARATEN A, B UND C

Präparat A (150 mg Phenobarbitol/ Tablette)		Präparat B 70.0 mg Aprobarbitol/ Tablette				Präparat C (56.96 mg Barbitol/ Tablette)	
Tabl. Nr.	Gefunden (mg/Tabl.)	Tabl. Nr.	Gefunden (mg/Tabl.)	Tabl. Nr.	Gefunden (mg/Tabl.)	Tabl. Nr.	Gefunden (mg/Tabl.)
1	148.5	1	69.55	1	50.60	1	56.40
2	149.0	2	70.50	2	51.00	2	56.20
3	149.0	3	71.00	3	50.80	3	56.00
4	150.8	4	70.90	4	49.70	4	56.15
5	151.0	5	70.80	5	51.00	5	57.20
6	150.5	6	70.15	6	49.80	6	57.50
7	149.5	7	68.90	7	49.90	7	57.10
8	150.2	8	69.60	8	50.40	8	57.05
9	149.5	9	69.80	9	51.00	9	56.80
10	151.0	10	70.20	10	50.60	10	56.70
11	149.5	11	71.50	11	50.30	11	57.30
X*	149.8		70.30		50.46		56.76
SD**	0.89		0.685		0.38		0.532
VK**, %	0.60		0.97		0.70		0.94

\* X = Arithmetischer Mittelwert.

\*\* SD = Standardabweichung der Einzelwerte.

\*\*\* VK = Variationskoeffizient.

Die Untersuchungen ergaben, dass die K-, Na- und Ba-Salze der Barbiturate keinen unterschiedlichen Remissionsgrad haben und somit zur direkten Messung gleich gut geeignet sind. Dagegen erwiesen sich die Ammoniumbarbiturate zur direkten Messung als ungeeignet, da sie wegen der Flüchtigkeit des Ammoniaks und ihrer Hydrolyse über längere Zeit nicht beständig sind. Der Remissionsgrad der K-, Na- und Ba-Salze ist dagegen bei allen untersuchten Barbituraten unabhängig von der Zeit, wie die in Tabelle IV als Beispiel dargestellten Kaliumsalze zeigen. Die Verwendung von ammoniakhaltigem Fließmittel (wie Fließmittel Nr. 2) bewirkt eine Ammoniumsalzbildung, der Remissionsgrad bleibt jedoch aus den angegebenen Gründen über längere Zeit nicht konstant.

#### Pharmazeutische Präparate

Die beschriebene Analysenmethode wurde zur Bestimmung des Barbituratgehaltes in pharmazeutischen Präparaten herangezogen. Die Ergebnisse und einige typische Chromatogramme sind in Tabelle V und den Fig. 1–3 zusammengestellt, und die gute Reproduzierbarkeit ist ersichtlich.

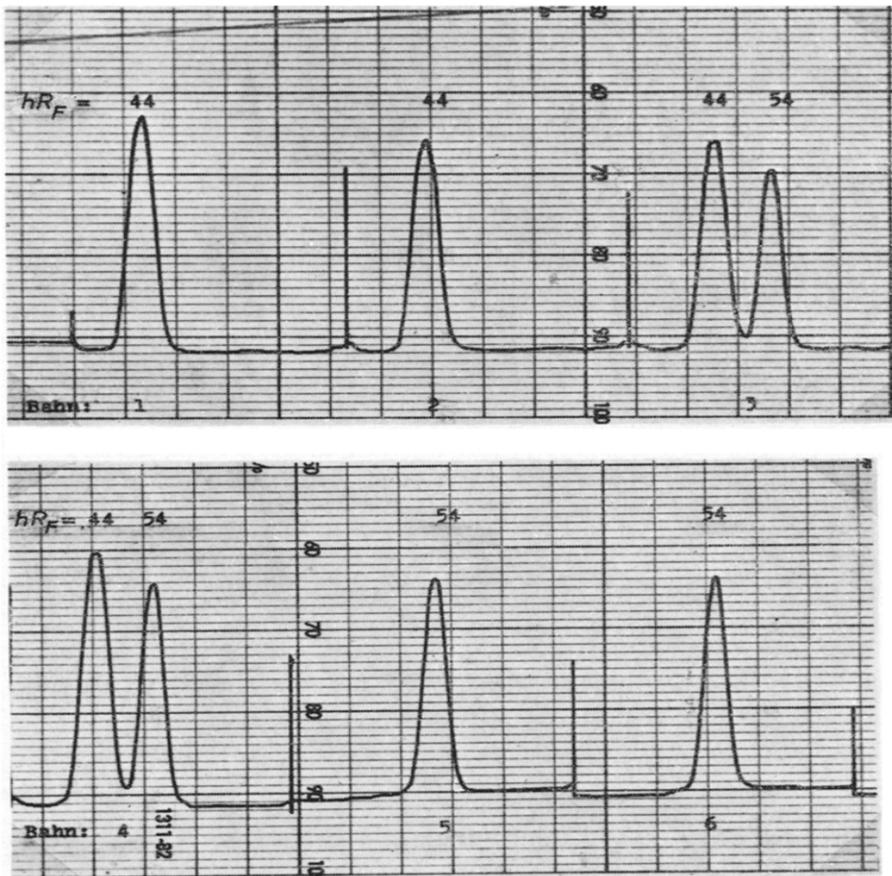


Fig. 1. Dünnschichtchromatogramm von Aprobarbital und Butabarbital in Präparat B. Aprobarbital:  $hR_F = 44$ ; Bahn 1 und 2: Vergleich; Bahn 3: Probe mit je 4.2  $\mu\text{g}$  Aprobarbital. Butabarbital:  $hR_F = 54$ ; Bahn 4: Probe; Bahn 5 und 6: Vergleich mit je 5.0  $\mu\text{g}$  Butabarbital. Laufmittel: Chloroform-Dioxan-Aceton- $\text{NH}_4\text{OH}$  (25%) (15:45:30:15).

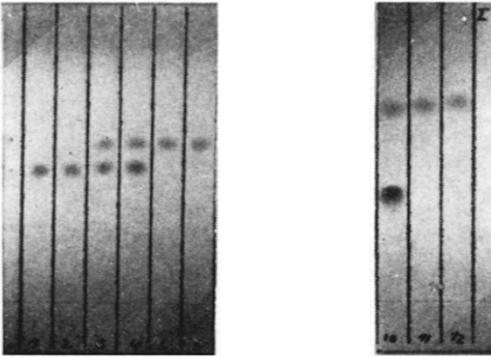


Fig. 2. Dünnschichtplatten der Präparate B und C. Laufmittel linker Teil: Chloroform-Dioxan-Aceton-NH<sub>4</sub>OH (25%) (15:45:30:15); Laufmittel rechter Teil: Chloroform-Aceton (1:1). Bahn 1 und 2: Vergleich Aprobarbital; Bahn 3 und 4: Präparat B; Bahn 5 und 6: Vergleich Butabarbital; Bahn 10: Präparat C; Bahn 11 und 12: Vergleich Barbital.

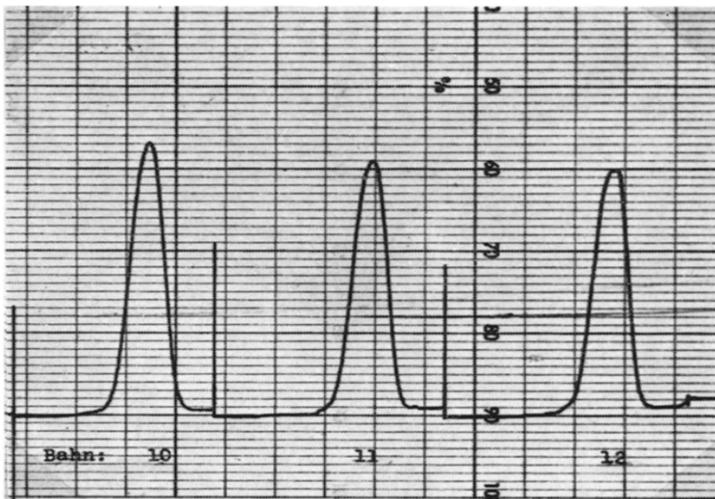


Fig. 3. Dünnschichtchromatogramm von Barbital in Präparat C. Auftragsmenge für Probe und Vergleich 5,7 µg.  $hR_f = 66$ . Bahn 10: Probe; Bahn 11 und 12: Vergleich. Laufmittel: Chloroform-Aceton (1:1).

#### DANK

Ich danke Herrn Dr. P. W. Schneider für die Diskussion dieser Arbeit und Herrn Chem. Ing. U. Jakobs für die technische Mitarbeit.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Eine Reihe von Barbituraten wurden nach Überführung in ihre Na-, K- oder Ba-Salze quantitativ auf der Kieselgelplatte nach der Reflexionsmethode bestimmt. Durch die Salzbildung wird die Empfindlichkeit und die Genauigkeit der Bestimmung erhöht, so dass bei Normierung der Arbeitsvorgänge eine gute Reproduzierbarkeit

gegeben ist. Durch ihre Einfachheit und Schnelligkeit ist diese Methode zur quantitativen Barbituratbestimmung in pharmazeutischen Präparaten besonders geeignet und lässt sich mit einer maximalen relativen Standardabweichung von 1 % gut reproduzieren, was durch einige Beispiele bewiesen wurde.

## LITERATUR

- 1 G. Hübner und E. Pheil, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 296 (1954) 225.
- 2 J. Büchi und X. Perlia, *Pharm. Acta Helv.*, 29 (1954) 290.
- 3 E. Hjelt, K. Leppänen und V. Tamminen, *Analyst (London)*, 80 (1955) 706.
- 4 W. Mohrschulz, *Arch. Pharm.*, 289 (1956) 11.
- 5 J. Bäumler und S. Rippstein, *Pharm. Acta Helv.*, 36 (1961) 382.
- 6 R. Deiniger, *Arzneim.-Forsch.*, 54 (1955) 472.
- 7 E. Stahl, *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl., 1967.
- 8 E. J. Algeria und J. F. Walker, *Amer. J. Clin. Pathol.*, 22 (1952) 37.
- 9 A. Wickström und B. Salvesen, *J. Pharm. Pharmacol.*, 4 (1952) 98.
- 10 W. Dietz und K. Soehring, *Arch. Pharm.*, 290 (1957) 80.
- 11 J. Knabe und H. Junginger, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 111 (1971) 1415.
- 12 W. Poethke und D. Horn, *Arch. Pharm.*, 59 (1954) 487.
- 13 M. Frahm, *Deut. Med. Wochenschr.*, 91 (1966) 81.
- 14 S. Goenechea, *J. Chromatogr.*, 40 (1969) 182.
- 15 E. K. J. Christensen, Th. Vos und T. Huizinga, *Pharm. Weekbl.*, 100 (1965) 517.
- 16 I. Sunshine, E. Rose und J. Lebeau, *Clin. Chem.*, 9 (1963) 312.
- 17 G. Schwenker, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 97 (1957) 238.
- 18 H. J. Uhlmann, *Pharm. Ztg.*, 52 (1964) 1998.
- 19 H. Kala, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 41 (1959) 1061.
- 20 J. C. Morrison und L. G. Chatten, *J. Pharmacol.*, 17 (1965) 655.
- 21 Z. F. Ahmed, Z. I. El-Darawy, M. N. Aboul-Encin, M. A. Abu El-Naga und S. A. El-Leithy, *J. Pharm. Sci.*, 4 (1966) 433.
- 22 J. T. Huang und K. T. Wang, *J. Chromatogr.*, 31 (1967) 587.
- 23 H. Kündig, *Anal. Biochem.*, 23 (1968) 6.
- 24 O. V. Olesen, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 20 (1967) 109.
- 25 A. M. Heaton und A. G. Blumberg, *J. Chromatogr.*, 41 (1969) 367.
- 26 M. Sahli und M. Oesch, *J. Chromatogr.*, 14 (1964) 526.
- 27 K. Macek, *Arch. Pharm.*, 65 (1960) 545.
- 28 H. P. Klöcking, *Pharmazie*, 20 (1965) 737.
- 29 W. Schlemmer, E. Kammerl und F. H. Klemm, *Deut. Apoth.-Ztg.*, 23 (1970) 833.
- 30 W. Schlemmer, *J. Chromatogr.*, 63 (1971) 121.
- 31 A. B. Hausen und S. S. Larsen, *Dansk Tidsskr. Farm.*, 46, No. 5A (1972) 105.
- 32 M. Melzacka und E. J. Shellard, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 16 (1971) 271.
- 33 A. Grieg, *Nature (London)*, 170 (1952) 845.
- 34 M. Amin und U. Jakobs, *Z. Anal. Chem.*, 2 (1974) 119.