

М. И. Евгеньев, И. И. Евгеньева

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА СРЕДЫ НА СЕЛЕКТИВНОСТЬ СИГНАЛА ПРИ ПРОТОЧНОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ АМИНОСОЕДИНЕНИЙ

Ключевые слова: проточно-инжекционный анализ, аминокосоединения, подвижная фаза.

Оценено влияние состава подвижной фазы на селективность определения аминокосоединений.

Keywords: flow-injection analysis, amino compounds, mobile phase.

Influence of structure of a mobile phase on selectivity of definition of amino compounds is estimated.

Соединения с аминными функциональными группами представляют собой важнейшие классы органических соединений и широко используются в химической технологии, биохимии и фармации [1]. В последние годы для их определения широко используются методы проточно-инжекционного анализа [2-6]. При этом определения проводятся, как правило, в виде производных. Для получения производных в проточных методах применяют различные («чисто» химические, фотохимические и энзиматические) реакции. Часто используют реакции, в ходе которых образуются соединения с новым составом, структурой и физико-химическими свойствами, отличными от свойств исходного вещества. Реакции могут протекать во время движения вещества в реакционной зоне до детектора или непосредственно в детекторе во время измерения аналитического сигнала. При дериватизации в ряде случаев достигается улучшение экстракционных характеристик определяемых соединений, повышается устойчивость их в процессе анализа, уменьшается предел обнаружения (ПрО) веществ.

При проведении дериватизации приходится учитывать сложность протекания ряда органических реакций [6]. Реакции дериватизации лекарственных веществ (ЛВ) во многих случаях протекают с невысокими скоростями, характеризуются сложным механизмом, зависимостью от состава среды, pH и других факторов. Часто незначительные изменения условий реакций могут вызвать радикальные изменения результатов определения. При выборе реакций нужно учитывать малую специфичность многих из них, которая может приводить к образованию аналитов и других компонентов смеси с однотипными аналитическими свойствами. Примером такой реакции может служить определение в системе ПИА сульфаниламидов в виде диазотированных производных с N-(1-нафтил)-этилендиамином, в которой, кроме аминов, участвуют фенолы и другие соединения, содержащие активную метиленовую группу [4]. Однако эти особенности реакций дериватизации не исключают возможности получать удовлетворительные по метрологическим характеристикам результаты определений, если правильно выбирать реагент, соблюдать условия проведения реакции, строго контролировать время пребывания пробы в системе ПИА и степень ее разбавления в потоке. Благодаря универсальности и невысокой стоимости наиболее распространенным методом детектирова-

ния при ПИ определении ЛВ является спектрофотометрия. Использование диодно-матричных детекторов обеспечивает достаточную избирательность определений. Определение самих ЛВ и примесей в фармпрепаратах достигается за счет эффективного использования спектральных свойств продуктов реакции, подбора растворителей в потоке; при этом можно уменьшить или полностью устранить мешающее влияние компонентов анализируемой матрицы. Повышенная избирательность отклика достигается при проведении в проточной системе селективных реакций, протекающих с образованием окрашенных соединений. Например, определение ароматических и N-замещенных аминов можно выполнить за счет их реакции с 4-хлор-5,7-динитробензофуразаном или 7-хлор-4,6-динитробензофураксаном [7 – 14].

Заметное влияние на аналитический сигнал может оказывать состав потока. На спектральные свойства производных определяемых веществ может влиять, например, их сольватация растворителем. Типичное влияние сольватационных эффектов в растворителях различной природы на спектральные характеристики производных представлено на рис. 1. Как видно, в диполярных апротонных растворителях для производного *n*-нитроанилина прослеживается очевидная зависимость положения длинноволновой полосы от основных (β) свойств растворителя [7, 9]. Это указывает на то, что растворенные вещества сольватируются по кислотной группе [15,16]. Повышение основности растворителя должно вызывать возрастание донорных свойств аминогруппы. Это в свою очередь вызывает bathochromный сдвиг полосы переноса заряда в ряду растворителей от бензола к диметилсульфоксиду.

Избирательность ПИ определений зависит и от скорости образования их производных. Так, для реакций ариламинов с такими электрофилами, как 4-хлор-5,7-динитробензофуразан и 7-хлор-4,6-динитробензофураксан, влияние *m*- и *p*-заместителей в замещенных анилина (толуидины, аминофенолы, бром-, хлор- и нитроанилины) описывается корреляционными уравнениями с использованием обычных σ -констант заместителей $\lg k = (1.78 \pm 0,08) - (3.4 \pm 0,3) \sigma_x$ ($r = 0.985$, $n = 8$) для реакции с 4-хлор-5,7-динитробензофуразаном и $\lg k = (2.38 \pm 0,09) - (3.3 \pm 0,3) \sigma_x$ ($r = 0.987$, $n = 8$) для реакции с 7-хлор-4,6-динитробензофураксаном [7-9]. Экспериментальные значения констант реак-

ции для них имеют более низкие значения, чем для реакций ариламинов с бензоилгалогенидами, пикрилгалогенидами и другими электрофилами (4–5 ед.) [17]. Это указывает на то, что бензофуразан и бензофуроксан имеют более высокую реакционную способность по сравнению указанными выше реагентами. Кроме того, для них характерна меньшая чувствительность к влиянию заместителей в ядре нуклеофила по мере возрастания электрофильности реагента.

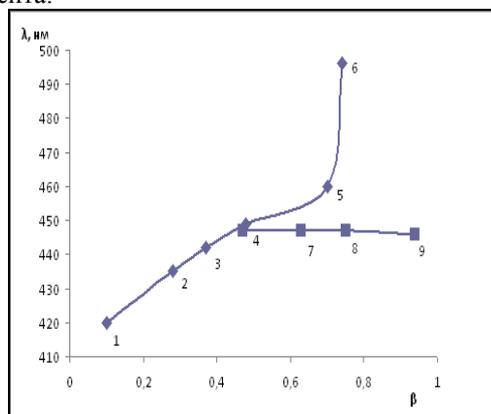


Рис. 1 - Зависимость положения максимумов длинноволновых полос поглощения 4-(4-нитроанилино)-5,7-динитробензофуразана от параметра основности (β) растворителя: 1- бензол; 2 – ацетонитрил; 3 – 1,4-диоксан; 4 – ацетон; 5 – диметилформамид; 6 – диметилсульфоксид; 7 – метанол; 8- этанол; 9 – пропанол-2

Все это указывает на возможность использования приема кинетической «дискриминации» реакций образования дериватов определяемых веществ для повышения избирательности определений в неравновесных условиях ПИА. Этот прием может быть основан на использовании различий в кислотно-основных свойствах аминокислот, которые отражаются в изменении нуклеофильности определяемых соединений в зависимости от наличия и положения заместителей в ароматическом ядре. Нитроанилины имеют более низкую основность по сравнению с анилином (значения pK_a равны, соответственно, 2,5, 0,3, 1,0, 4,6, для *m*-, *o*-, *p*-нитроанилинов и анилина) [8]. Поэтому для нитроанилинов следует ожидать меньшей степени завершенности реакций образования производных в условиях ПИА по сравнению с анилином. Это является предпосылкой к избирательному определению компонентов сложной смеси.

Выявленные при ПИ определении анилина и его замещенных закономерности использованы для разработки методик определения некоторых лекарственных препаратов. Так, в работе [11] изучено взаимодействие замещенных триптамина (серотонин, мексамин, мелатонин, суматриптан, замещенные индолилуксусной кислоты) с 4-хлор-5,7-динитробензофуразаном, проведено их ПИ определение в различных лекарственных формах. Предел обнаружения веществ достигает 0,01 мкг/мл при производительности 35 проб/ч. Токсичные ароматические амины *p*-аминофенол и *o*-фенилендиамин

определяли в виде 4,6-динитробензофуроксановых производных в смесях на основе парацетамола и дибазола [12]. Интервал определяемых содержаний веществ составляет 0,03–0,98 мкг/мл при пределе обнаружения 0,01 мкг/мл.

Влияние состава потока на скорость аналитической реакции можно рассмотреть на примере реакции 4-хлор-5,7-динитробензофуразана и 7-хлор-4,6-динитробензофуроксана с нуклеофилами, различающимися по основности (анилин и его замещенные). В большой степени состав потока должен определять интенсивность аналитического сигнала в неравновесных условиях ПИА. На рис. 2 показано влияние природы растворителя на интенсивность аналитического сигнала при определении анилина и *m*-нитроанилина. Традиционные критерии, характеризующие полярность среды (диэлектрическая проницаемость, дипольный момент растворителя) не позволяют объяснить влияния компонентов потока на интенсивность аналитического сигнала. В то же время такие эмпирические критерии, как полярности по Райхардту-Димроту ($E_t N$) и основности по Камлету-Тафту (β) [15] хорошо отражают влияние неводных растворителей в потоке на аналитический сигнал. При анализе влияния основных и полярных свойств на интенсивность аналитического сигнала обращает внимание антибатный характер зависимостей, полученных при определении анилина и *m*-нитроанилина. Так, в случае анилина интенсивность сигнала растет по мере возрастания основности используемого растворителя (рис. 2). В случае же *m*-нитроанилина наблюдается обратная зависимость в ряду спиртов, и только точка, соответствующая ацетонитрилу, выпадает из общей зависимости.

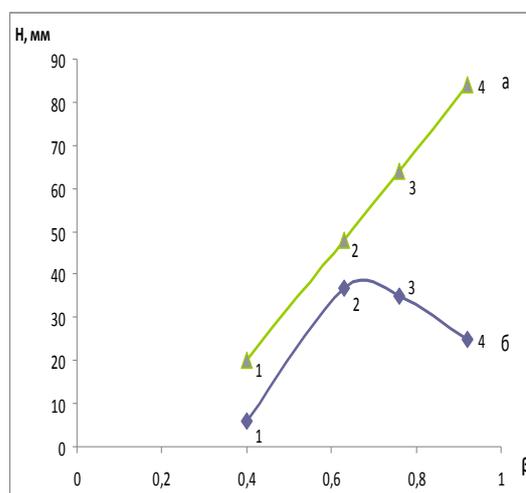


Рис. 2 - Влияние основности растворителей (β) на интенсивность сигнала при ПИ определении анилина (а) и *m*-нитроанилина (б): 1 – ацетонитрил; 2 – метанол; 3 – этанол; 4 – пропанол-2. Скорость потока 0,9 мл/мин. Реагент – 7-хлор-4,6-динитробензофуроксан, $\lambda = 510$ нм

Повышение полярных свойств среды при ПИ определениях анилина, напротив, приводит к уменьшению интенсивности аналитического сигнала (рис. 3), в то время как для *m*-нитроанилина это влияние обратно.

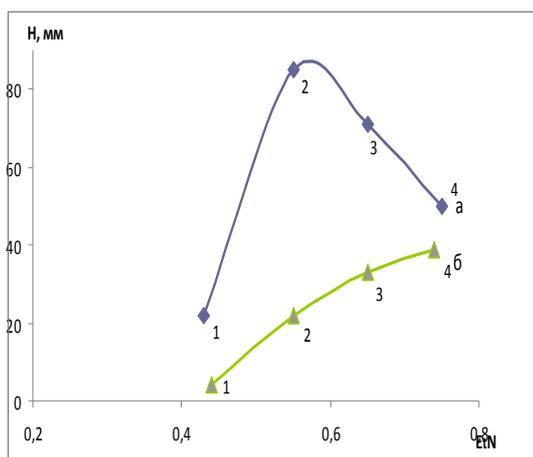


Рис. 3 - Влияние полярности растворителей (E_rN) на интенсивность сигнала при ПИ определении анилина (а) и *m*-нитроанилина (б): 1 – ацетонитрил; 2 – пропанол-2; 3 – этанол; 4 – метанол. Реагент – 7-хлор-4,6-динитробензофуоксан, $\lambda = 510$ нм

Ацетонитрил, как и в предыдущем случае, выпадает из общей зависимости, но уже для *m*-нитроанилина. Такое влияние свойств растворителей, очевидно, связано с механизмом аналитических реакций. По-видимому, скоростьопределяющей стадией при взаимодействии реагента с более основными арилами является элиминирование уходящей группы в ходе распада полярного промежуточного соединения. В то же время зависимость интенсивности сигнала от полярных свойств растворителя при определении соединения с пониженной основностью (нитроанилинов) указывает на то, что скоростьопределяющей стадией реакции является образование анионного σ -комплекса. Полярность среды на этой стадии является фактором стабилизации полярного промежуточного соединения. Полученные данные, таким образом, определяют принцип формирования состава потока для избирательного и чувствительного определения веществ, различающихся по кислотности.

Специфическое влияние ацетонитрила на интенсивность сигнала, по-видимому, связано с концепцией микрогетерогенности смесей ацетонитрила с водой [18, 19]. В условиях, когда обезвоженные неводные растворители содержат остаточные количества воды, на несколько порядков превосходящие концентрацию аналита в растворе, может иметь место избирательная сольватация микрогетерогенными фазами реагирующих веществ или конечных продуктов. Это приводит к уменьшению степени завершения аналитической реакции в неравновесных условиях. По-видимому, этим же объясняется практическое постоянство интенсивности аналитического сигнала при определении более основного анилина в бинарных смесях ацетонитрилдioxан, содержание компонентов в которых варьировалось в широком диапазоне (от 80:20 до 20:80, % об.). Практическое постоянство аналитического сигнала наблюдается и при определении *m*-нитроанилина в смеси тетрагидрид углерода-ацетонитрил. Все эти данные указывают на необхо-

димость учета эмпирических параметров полярности и основности растворителей при выборе условий определения ариламинов в проточных системах с использованием приема кинетической «дискриминации».

Результаты ПИ определений зависят и от рН потока. Так, при ПИ определении антиоксиданта 2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (ацетонанила) зависимость аналитического сигнала от рН имеет вид, показанный на рис. 4. По мере повышения рН растет интенсивность регистрируемого сигнала, а в области рН 5.5–6.5, наблюдается плато. Затем сигнал резко понижается, что связано с влиянием конкурирующих реакций гидролитического взаимодействия реагента с водой. Кислая среда, кроме того, затрудняет взаимодействие малоосновного гетероциклического амина с реагентом, также вызывая уменьшение аналитического сигнала.

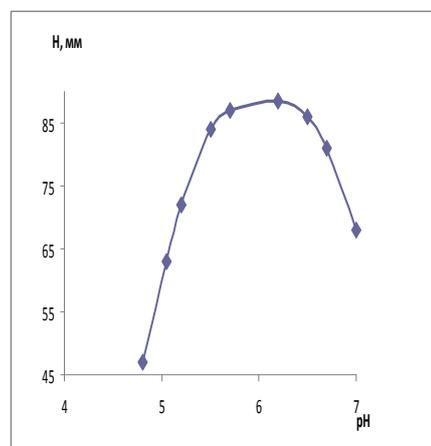


Рис. 4 - Зависимость интенсивности сигнала H (мм) при ПИ определениях 2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина от рН фосфатного буферного раствора. Состав потока – ацетонитрил-буферный раствор 70 : 30 (об. %), скорость потока 0,85 мл/мин

Эти результаты указывают на необходимость учета состава среды при выборе условий фотометрического детектирования веществ в системе ПИА.

Несимметричный 1,1-диметилгидразин (НДМГ) используется в качестве компонента синтеза лекарственных веществ и в качестве жидкого ракетного топлива. При попадании в организм он вызывает его интоксикацию. Состав потока при этом также влияет на интенсивность регистрируемого сигнала (рис. 5). Во всех случаях, за исключением ДМСО, повышение содержания воды в бинарной смеси растворителей приводит сначала к возрастанию регистрируемого сигнала, затем к его уменьшению. При этом интенсивность сигнала в чистой воде значительно ниже, чем в неводных средах или их смесях с водой. При рассмотрении влияния совокупности свойств использованных растворителей на интенсивность сигнала еще раз вытекает важная роль их основности. Особенно наглядно это проявляется при сопоставлении интенсивности сигнала в ряду этанол, пропанол, метанол при равном содержании в них воды. Экспериментальные данные ука-

зывают на проявлении основного катализа растворителем взаимодействия НДМГ с реагентом. Такой же эффект наблюдается для реакций ароматических и гетероароматических аминов. Оптимальное сочетание основных и полярных свойств растворителя достигается в водно-этанольных средах при соотношении объемов этанол-фосфатный буферный раствор 50:50 (объемных).

Предел обнаружения НДМГ в виде 5,7-динитробензофуразанового производного составляет 0,02 мкг/мл, производительность – 24 проб/ч. Интервал определяемых содержаний составляет 0.03–0.42 мкг/мл ($r=0.9991$, $n=35$) [13].

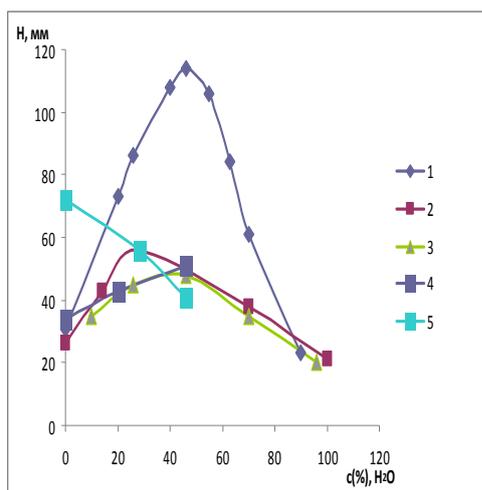


Рис. 5 - Влияние содержания воды в потоке на интенсивность сигнала при ПИ определении 1,1-диметилгидразина. Концентрация: 1,1- диметилгидразина в потоке 4×10^{-6} , инжестируемого реагента 1×10^{-2} . Растворитель: 1 – этанол; 2 – пропанол; 3 – метанол; 4 – ацетонитрил; 5 – ДМСО. Скорость потока 0,75 мл/мин, $\lambda=520$ нм

Гидразин используется в синтезе противотуберкулезных и других лекарственных препаратов (изониазид, тубазид и др.). В организме он может появиться при N-ацетилировании этих веществ, вызывая токсические эффекты, вплоть до летального исхода. Применение спектрофотометрического детектирования при ПИ определении гидразина в виде 5,7-динитробензофуразанового производного обеспечивает ПрО 0,012 мкг/мл с производительностью 46 проб/ч [14]. В работе [19] показано, что при хемоллюминесцентном определении гидразина в системе ПИА люминол и BrO^- в щелочной среде обеспечивают чувствительность 0,003 мкг/мл в интервале концентраций 0.01–10 мкг/мл с погрешностью 3.7%. Примерно такая же чувствительность люминесцентного детектирования достигается при использовании натриевой соли изоцианурата или трихлоризоциануровой кислоты в щелочной среде [20,21]. Как видно, пределы обнаружения для разных вариантов детектирования сопоставимы. Поэтому во многих случаях используют более дешевый спектрофотометрический способ детектирования. Разработаны методики избирательного определения различных аминсоединений в смесях слож-

ного состава (фенолы, анилин, алкиламины, гидролизат белка, 1,1-гидразиндиуксусная кислота).

Таким образом, можно констатировать, что ПИА уверенно занимает место в одной из наиболее сложных по решаемым задачам областей аналитической химии – биохимических исследованиях, фармацевтическом и клиническом анализе. Это связано с возможностью получения удовлетворительных по селективности, чувствительности, производительности и метрологическим характеристикам результатов определения веществ в сложных по составу матрицах при правильном выборе используемой реакции, пробоподготовки в неравновесных условиях, строгом контроле времени пребывания пробы и ее разбавления в системе ПИА, использовании различных систем детектирования.

Литература

1. Николаев Ю.Т., Якубсон А.М. Анилин.- М., Химия, 1984. 152с.
2. Ruzicka J., Hansen E.H. Flow Injection Analysis. 1981. New York: John Wiley, 207 p.
3. Ueno K., Kino K. Introduction to Flow Injection Analysis: Principles and Applications. 1987. Chichester: Ellis Horwood. 415 p.
4. Kolev S. McKelvie I. *Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*. 2008. New York: Elsevier, 777 p.
5. Шнигун Л.К. Проточно-инжекционный анализ // Журн. аналит. химии. 1990. Т.45, № 6. С.1045.
6. Евгеньев М.И., Евгеньева И.И. Проточно-инжекционные определения в анализе биохимических и фармацевтических объектов. В книге Проблемы аналитической химии. Т. 17. «Проточный химический анализ» под ред. Золотова Ю.А. М: Наука, 2014. С. 362.
7. Евгеньев М.И., Евгеньева И.И., Левинсон Ф.С. Проточно-инжекционное определение ариламинов с фотометрическим детектированием //Зав. лаборат. 1996. Т.62, № 11. С.11.
8. Евгеньев И.И., Евгеньева И.И., Горюнова С.М., Левинсон Ф.С. Избирательное проточно-инжекционное определение анилина и м-нитроанилина в смесях, содержащих изомерные нитроанилины // Журн. аналит. химии. 1998. Т.53, № 5. С.546.
9. Левинсон Ф.С., Акимова С.А., Евгеньев М.И. Кинетика реакций хлординитробензофуразанов с анилином в бензоле. Вестник КГТУ. 2011. N 18. С. 56.
10. Евгеньев И.И., Евгеньева И.И., Горюнова С.М., Васкина А.Х. Избирательное проточно-инжекционное определение ароматических и гетероароматических аминов в смесях // Журн. аналит. химии. 1998. Т.53, № 4. С.432.
11. Евгеньев М.И., Гармонов С.Ю., Брысаев А.С., Гуревич Л.А. Проточно-инжекционные определения производных индола в лекарственных и реакционных смесях //Журн. аналит. химии. 2006. Т. 61, № 7. С. 751.
12. Евгеньев М.И., Гармонов С.Ю., Шакирова Л.Ш., Брысаев А.С. Проточно-инжекционные определения токсичных ароматических аминов в лекарственных препаратах //Журн. аналит. химии. 2002. Т.57, № 12. С. 1290.
13. Евгеньев И.И., Евгеньева И.И., Горюнова С.М., Гармонов С.Ю., Газизуллина Л.Ш. Избирательное проточно-инжекционное определение 1,1-диметилгидразина в смесях // Журн. аналит. химии. 1998. Т.53, № 6. С.650.
14. Евгеньев М.И., Гармонов С.Ю., Евгеньева И.И., Уричич-Требинский В.В. Избирательное проточно-инжекционное определение гидразина // Журн. аналит. химии. 1998. Т. 53, № 3. С. 272.
15. Райхардт К. Растворители и эффекты среды в органической химии. М.: Мир. 1991. 763 с.

16. Робертс Дж., Кассерио М. Основы органической химии. Т.2. М.: Мир. 1978. 884 с.
17. Литвиненко Л.М., Тицкий Г.Д., Шумейко А.Е. Исследование кинетики реакций пикрилгалогенидов с анилином в бензольном растворе // Журн. органич. химии. 1977. Т. 13, № 4. С. 767.
18. Kamlet M.J., Taft R.W. Linear Solvation Energy Relationships. Local Empirical Rules – or Fundamental Laws of Chemistry? A replay to the Chemometricans // Acta Chem. Scand. 1985. V. 39. P. 611.
19. Панов М.Ю., Соколова О.Б., Пикуза Н.Г. Кинетика щелочного гидролиза изомерных бутилацетатов в смешанных растворителях вода-ацетонитрия // Журн. общей химии. 1994. Т.64, № 3. С. 388.
20. Li B., Zhang Zh., Zheng X., Xu Ch. Flow injection chemiluminescence determination of isoniazid using on-line electrogenerated manganese(III) as oxidant //Chemia Analytyczna. 2000. V.45, N 5. P. 709.
21. Safavi A., Karimi V. Flow injection determination of isoniazid using N-bromosuccinimide- and N-chlorosuccinimide-luminol chemiluminescence systems//Talanta. 2002. V. 58, N 16. P. 785

© **М.И. Евгенийев** – профессор кафедры кафедры аналитической химии, сертификации и менеджмента качества ФГБОУ ВПО «КНИТУ», evgenev@kstu.ru; **И.И. Евгеньева**, канд. хим. наук, доцент той же кафедры evgenev@kstu.ru.

© **M. I. Evgen'ev** - Doct. Chem. Sci, professor, faculty of department of analytical chemistry, certification and quality management KNITU, evgenev@kstu.ru; **I. I. Evgeneva** - Cand.Chem.Sci., the senior lecturer of the same faculty evgenev@kstu.ru