

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 (PrO) 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 однопипными 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 детектирования 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-динитробензофуросаном [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 дипольных апротонных растворителях для производного п-нитроанилина прослеживается очевидная зависимость положения длинноволновой полосы от основных ( $\beta$ ) 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 батохромный 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-динитробензофуросан, влияние м- и п- заместителей в замещенных анилина (толуидины, аминофенолы, бром-, хлор- и нитроанилины) описывается корреляционными уравнениями с использованием обычных  $\sigma$ -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-динитробензофуросаном [7-9]. Экспериментальные значения констант реакции 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 бензофуросан 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 ( $\beta$ ) 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 аминосоединений, 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 м-, о-, п-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 п-аминофенол и о-фенилендиамин определяли в виде 4,6-динитробензофуруксановых 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-динитробензофуруксана 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 м-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 ( $\beta$ ) [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 м-нитроанилина. Так, в случае анилина интенсивность сигнала растет по мере возрастания основности используемого растворителя (рис. 2). В случае же м-нитроанилина наблюдается обратная зависимость в ряду спиртов, и только точка, соответствующая ацетонитрилу, выпадает из общей зависимости. Рис. 2 - Влияние основности растворителей ( $\beta$ ) на интенсивность сигнала при ПИ определении анилина (а) и м-нитроанилина (б): 1 - ацетонитрил; 2 - метанол; 3 - этанол; 4 - пропанол-2. Скорость потока 0.9 мл/мин. Реагент - 7-хлор-4,6-динитробензофуруксан,  $\lambda = 510$  нм. Повышение полярных свойств среды при ПИ определениях анилина, напротив, приводит к уменьшению интенсивности аналитического сигнала (рис. 3), в то время как для м-нитроанилина это влияние обратно. Рис. 3 - Влияние полярности растворителей

(EtN) на интенсивность сигнала при ПИ определении анилина (а) и м-нитроанилина (б): 1 - ацетонитрил; 2 - пропанол-2; 3 - этанол; 4 - метанол. Реагент - 7-хлор-4,6-динитробензофуроксан,  $\lambda = 510$  нм. Ацетонитрил, как и в предыдущем случае, выпадает из общей зависимости, но уже для м-нитроанилина. Такое влияние свойств растворителей, очевидно, связано с механизмом аналитических реакций. По-видимому, скоростьопределяющей стадией при взаимодействии реагента с более основными ариламинами 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  $\sigma$ -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 ацетонитрил-диоксан, содержание компонентов в которых варьировалось в широком диапазоне (от 80:20 до 20:80, % об.). Практическое постоянство аналитического сигнала наблюдается и при определении м-нитроанилина в смеси тетрахлорид углерода-ацетонитрил. Все эти данные указывают на необходимость 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 pH потока. Так, при ПИ определении антиоксиданта 2,2,4-триметил-1,2-дигидрохинолина (ацетонанила) зависимость аналитического сигнала от pH имеет вид, показанный на рис. 4. По мере повышения pH растет интенсивность регистрируемого сигнала, а в области pH 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 Н (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 указывают 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  $4 \times 10^{-6}$ , инжестируемого реагента  $1 \times 10^{-2}$ . 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 хемолюминесцентном определении гидразина в системе ПИА люминол и BrO<sup>-</sup> 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 аминосоединений в смесях сложного 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.