Методы и объекты химического анализа, 2008, т. 3, № 2, С. 147–156.

Особенности протекания индикаторной реакции на первичные ароматические амины в желатиновой плёнке

О. Ю. Коновалова, Л. П. Логинова

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина,
пл. Свободы, 4, 61077 Харьков, Украина; e-mail: loginova@univer.kharkov.ua

Поступила: 16 апреля 2008 / Принята к опубликованию: 24 июня 2008

Для обнаружения и фотометрического или визуально-тестового определения первичных ароматических аминов предложены новые индикаторные плёнки с иммобилизованными в желатиновый гель альдегидами (ванилин, п-диметиламинобензальдегид). Аналитический эффект усиливается, если поддерживать высокую кислотность (2 моль/л HCl) при иммобилизации реагентов в пленку или при проведении испытания, что объясняется структурными изменениями желатины вследствие перехода тройная спираль-статистический клубок. Разрыхление структуры и сопутствующее ей увеличение гидрофобности среды способствует внедрению и солюбилизации в желатиновом слое умеренно гидрофобных реагентов и продуктов индикаторных реакций. Пленки испытаны на примерах определения новокаина, стрептоцида белого и стрептоцида белого растворимого в фармацевтических препаратах; результаты фотометрического определения препаратов с окрашенными пленками согласуются с результатами, полученными по фармакопейным методикам. Приведены метрологические характеристики методик с использованием индикаторных плёнок.

O.Yu. Konovalova, L.P. Loginova. The features of indicatory reaction on primary aromatic amines in gelatinous film *– New indicator films with aldehydes (vanillin, p-dimethylaminobenzaldehyde) immobilized in gelatinous gel are suggested for detection and photometric or visually-test determination of primary aromatic amines.The analytical effect amplifies if the immobilization of reagents in film or the reactions are carried out at high acidity (2 mol/l HCl). This phenomenon is explained by the structural changes of gelatin owing to transition of the threefold spiral-a statistical ball. Loosening of the structure and the increase of the hydrophobicity of the medium accompanying it promote introduction and solubilization of the moderately hydrophobic reagents and products of the indicator reactions. Indicator films are tested at determination of novocaine, streptocide and streptocide soluble in pharmaceutical preparations; results of photometric determination of amines with colored films agreed with the results obtained by the pharmacopoeia techniques. Metrological characteristics of techniques with using of indicator films are presented.*

Ключевые слова: *индикаторная плёнка · желатиновый гель · первичный ароматический амин · основание Шиффа*
Keywords: *indicator film · gelatinous gel · primary aromatic amine · Shiff's base*

К первичным ароматическим аминам (ПАА) относятся вещества, широко используемые в промышленности [1] и медицине, в частности, сульфаниламиды и препараты местноанестезирующего действия.

Для тест-определения ПАА разработаны индикаторные порошки на основе α-нафтола [2], индикаторная бумага на основе 1-нафтиламина [3], индикаторные трубки на основе *п*-диметиламинокоричного альдегида [4], N,N-диэтил-*п*-фенилендиамина [5], тест-полоски на основе полимерных материалов с иммобилизованными 7-хлор-4,6-динитробензофуроксаном и 4-хлор-5,7-динитробензофуразаном [6, 7].

Перспективными носителями для создания новых тест-средств являются прозрачные полимерные материалы, позволяющие наблюдать аналитический эффект с помощью широко распространённого фотометрического оборудования. Одной из разновидностей таких материалов являются отверждённые желатиновые слои коммерческих фотографических плёнок. Желатиновые слои фотопленок использовали ранее как среды для синтеза и изучения спектральных свойств малорастворимых металлокомплексов [8–10], спектрофотометрического исследования механизма окрашивания желатины бромпроизводными флуоресцеина [11], изучения эффектов среды для кислотно-основных индикаторов [12]. Путем иммобилизации аналитических реагентов в желатиновом слое фотопленок нами ранее получены индикаторные плёнки (ИП) для обнаруже-

© О.Ю. Коновалова, Л.П. Логинова

ния и тест-определения лекарственных веществ нитроксолина [13], анальгина, аскорбиновой кислоты [14]. Недавно показано, что в желатиновом слое фотоплёнок можно иммобилизовать реагенты для проведения реакций диазотирования и азосочетания, на этой основе предложены чувствительные элементы для определения нитритов [15].

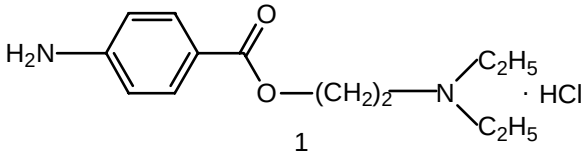
Для определения ПАА с помощью индикаторной пленки в качестве цветной реакции нами выбрана реакция ПАА с альдегидами с образованием оснований Шиффа [16]. В отличие от других цветных реакций на ПАА она выполняется в одну стадию и не связана с применением токсичных реагентов, таких как нитрит натрия или β-нафтол в фармакопейной методике [17].

Настоящая работа посвящена выяснению особенностей протекания индикаторной реакции на ПАА в среде желатинового геля фотографических плёнок и особенностей желатинового геля как реакционной среды.

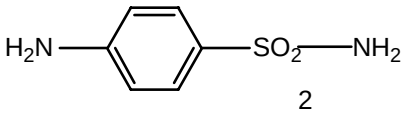
Экспериментальная часть

Реагенты

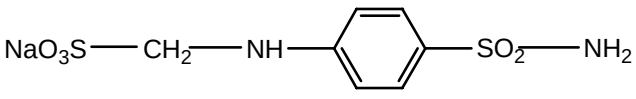
Определяемые вещества: фармацевтические субстанции: 1 — новокаин (гидрохлорид 2-диэтиламиноэтилового эфира *п*-аминобензойной кислоты); 2 — стрептоцид белый (*п*-аминобензолсульфамид); 3 — стрептоцид белый растворимый (*п*-сульфамидобензоламинометансульфат натрия):



1



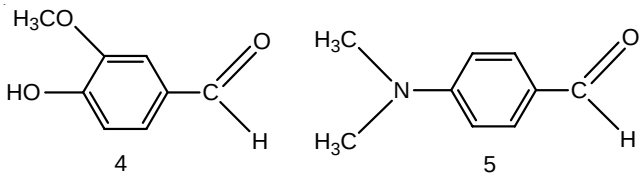
2



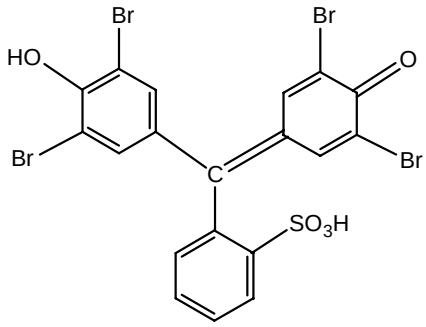
3

В соединении 3 нет первичной ароматической аминогруппы, однако в растворе 2 моль/л HCl стрептоцид белый растворимый омыляется, и освободившаяся первичная аминогруппа вступает в реакцию с альдегидом [18].

Аналитические реагенты: 4 — ванилин по ГОСТ 16599-71, 5 — *п*-диметиламинобензальдегид (*п*-ДМАБ), 6 — бромфеноловый синий (БФС) квалификации ч.д.а:



4 5



6

Вспомогательные реагенты: додецилсульфат натрия (ДСН) (AppliChem, Германия, масс. доля основного вещества 97%); этанол (объемн. доля 96 %). Для регулирования кислотности применяемых растворов использованы реагенты квалификации х.ч.: хлороводородная, хлорная, уксусная кислоты; ацетат натрия тригидрат.

Приготовление растворов

Для приготовления растворов использовали дистиллированную воду. Исходные растворы новокаина, стрептоцида белого и стрептоцида белого растворимого готовили растворением точных навесок в воде или в растворе 2 моль/л HCl. Рабочие растворы получали, разбавляя исходные водой или раствором 2 моль/л HCl.

Раствор ванилина (0,3 моль/л) готовили растворением точно взвешенной навески альдегида в этиловом спирте в мерной колбе и доводили до метки водой. Для приготовления раствора *п*-ДМАБ (0,1 моль/л) точно взвешенную навеску альдегида помещали в мерную колбу, растворяли в этиловом спирте, добавляли компоненты уксусно-ацетатного буферного раствора с pH 5 и доводили до метки водой. Отношение объёмов этанол : вода в полученных растворах составляло 40:60.

Приготовление исходных плёнок

В работе использовали отвержденные желатиновые слои фотографических плёнок “Микрат-300”, из которых предварительно удаляли соединения серебра по методике, описанной в [19]. Исходные бесцветные плёнки использовали для иммобилизации реагентов и получения ИП.

Оборудование

Спектры поглощения в видимой области регистрировали на фотоэлектроколориметре КФК-3 (Загорск, Россия). Растворы фотометрировали против холостого раствора, содержащего все реагенты, кроме ПАА. Плёнки, окрашенные после контакта с растворами ПАА, помещали в кюветодержатель и фотометрировали против исходной пленки, не содержащей реагентов. Другие образцы сравнения при фотометрировании пленок указаны в тексте.

Результаты исследований и их обсуждение

Иммобилизация реагентов. Из нескольких альдегидов (фурфурол, салициловый и терефталевый альдегиды, ванилин и *п*-ДМАБ) для иммобилизации в пленки были выбраны два последних, поскольку они обеспечивали наиболее контрастные реакции пленок на ПАА. Растворимость альдегидов в воде ограничена (в 100 мл воды растворяется 1 г ванилина при 14°С и 5 г при 80°С [20], 0,03 г *п*-ДМАБ при 20°С [21]). Для более эффективной сорбции альдегидов желатиновыми слоями пленок использовали более концентрированные растворы ванилина и *п*-ДМАБ в смешанном растворителе вода-этанол. Отрезки исходной плёнки (2×3 см) помещали в раствор соответствующего альдегида на 20 мин, вынимали и сушили на воздухе. Оказалось, что в качестве растворителя не стоит использовать смеси с объемной долей этанола выше 40%, поскольку в такой среде пленки сильно деформировались.

Плёнки с иммобилизованными альдегидами иногда имели желтоватый оттенок, возможно, вследствие взаимодействия альдегидов с концевыми аминогруппами аминокислот, составляющих макромолекулы желатины [22]. Этот оттенок исчезал при контакте с раствором 2 моль/л HCl, который использовался как среда для реакции с ПАА.

При выборе условий иммобилизации реагентов следует учесть особенности желатинового геля как среды для солюбилизации исходных альдегидов и продуктов реакции. Структура желатинового геля определяется наличием сетки-каркаса полипептидных цепей, пространственно связанных участками коллагеноподобных тройных спиралей [23]. Наибольшее количество тройных спиралей образуется при pH изоэлектрической точки; последняя для желатины в составе используемых фотопленок соответствует значению pH = 5 [24]. При удалении от изоэлектрической точки в область более низких и более высоких pH происходит развертывание тройных спиралей вследствие отталкивания одноименных зарядов макромолекул: при низких pH макромолекулы приобретают положительный заряд за счет протонирования атомов азота полипептидных связей и концевых аминогрупп, при высоких pH — отрицательный за счет кислотной диссоциации в боковых группах аминокислотных остатков. Вдали от изоэлектрической точки макромолекулы желатины принимают конфигурацию статистического клубка, причем переход спираль-клубок наблюдается как в растворе, так и в геле желатины [23, с. 69]. Желатина в целом гидрофильна, поэтому при контакте с водным раствором обеспечивается проникновение и воды, и растворенного вещества внутрь желатинового массива. В то же время в макромолекулах имеются неполярные участки, ответственные за гидрофобное взаимодействие и связывание неполярных веществ. Наибольшая солюбилизирующая способность по отношению к неполярным веществам наблюдается для макромолекул желатины в состоянии клубка, о чем свидетельствуют данные о растворимости бензола в растворах желатины [23].

Свойства среды желатинового слоя фотоплёнки мы изучили с помощью сольватохромных зондов — бетаиновых индикаторов Райхардта [25], чувствительных к полярности микроокружения. Индикаторы сорбировали пленкой из водно-спиртового раствора при pH 12, что соответствует области преобладания диссоциированной окрашенной формы индикатора. По сдвигу максимума в спектре поглощения сорбированного индикатора были рассчитаны значения эмпирического параметра полярности $E_T(30)$ = 46,5 и нормализованного параметра E_T^N = 0,488. Сопоставление результатов со шкалой полярности Райхардта для органических растворителей [25] показало, что среда желатинового геля в микроокружении индикаторов занимает промежуточное положение между средой ацетона с $E_T(30)$ = 42,2 и этанола с $E_T(30)$ = 51,9 и близка к среде таких растворителей как нитрометан, пентанол-2, пропиленкарбонат [26], которые лучше растворяют умеренно гидрофобные вещества, чем вода. Это наблюдение относится к рыхлой структуре желатины, образующейся при pH 12; вблизи изоэлектрической точки среда желатинового геля должна быть менее рыхлой и менее гидрофобной.

Как видно из табл. 1, умеренно гидрофобными являются исходные альдегиды и сам новокаин; новокаин образует с ванилином и *п*-ДМАБ более гидрофобные основания Шиффа, чем стрептоцид белый. Эффективность солюбилизации таких продуктов можно повысить, используя более гидрофобную среду.

Гидрофильно-липофильный баланс желатины изменяют путём модификации её макромолекул. Одним из направлений модификации является

Таблица 1. Параметры гидрофобности органических веществ

Вещество	lg $P_{o/w}$
ванилин	1,21 [27]
п-ДМАБ	1,81 [28]
новокаин	1,92 [29]
стрептоцид белый	-0,79 [30]
основание Шиффа, образованное ванилином и новокаином	(3,03±0,43)*
основание Шиффа, образованное *п*-ДМАБ и новокаином	(3,58±0,42)*
основание Шиффа, образованное ванилином и стрептоцидом белым	(0,04±0,37)*

Примечания: $P_{o/w}$ — константа распределения вещества в системе вода / н-октанол;
* — рассчитано с использованием программного пакета ACD/log P DB (1999, www.acdlabs.com), при заданной температуре 25°С.

добавление низкомолекулярных и высокомолекулярных ПАВ, что сопровождается образованием комплексов желатина-ПАВ [31]. Анионные ПАВ сильнее взаимодействуют с желатиной, чем катионные [31]. В водных растворах связывание анионов ДСН положительно заряженными группами желатины сопровождается конформационными изменениями: разворачиванием цепей, снижением содержания тройных спиральных структур и, соответственно, гидрофобизацией макромолекулы [32,33]. Для макромолекул желатины, адсорбированных на поверхности полистирола, также наблюдалась ассоциация как с мономерами ДСН, так и с мицеллами [34, 35]. Исходя из вышесказанного, в растворы для иммобилизации альдегидов стали добавлять ДСН. Действительно, получаемые из мицеллярных растворов ДСН индикаторные плёнки при взаимодействии с ПАА окрашивались гораздо интенсивнее. Поглощение света окрашенными пленками при прочих равных условиях увеличивалось в 2 раза, если альдегид сорбировали из раствора, содержащего 0,1–0,2 моль/л ДСН [19]. Аналогичное влияние мицеллярных растворов ДСН на цветную реакцию с ПАА наблюдалось другими авторами для *п*-диметиламинокоричного альдегида [4].

Протекание цветных реакций. Индикаторная плёнка, содержащая ванилин и ДСН (ванилин-ИП), при контакте с растворами исследуемых ПАА приобретала лимонно-жёлтую окраску. Плёнка, содержащая *п*-ДМАБ и ДСН (*п*-ДМАБ-ИП), при контакте с раствором новокаина приобретала яркожёлтую окраску. Для изучения индикаторных реакций пленки с иммобилизованными альдегидами погружали в исследуемый раствор амина на 10 с, затем вынимали и выдерживали влажные пленки на воздухе до фотометрирования или визуального наблюдения окраски.

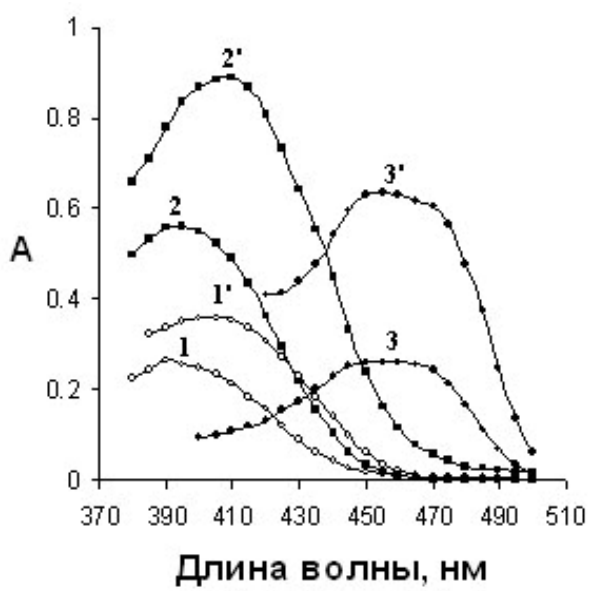


Рис. 1. Спектры поглощения плёнок и водно-спиртовых растворов, содержащих продукты взаимодействия альдегидов с аминами: 1 — раствор $2\cdot10^{-3}$ моль/л ванилина, $2\cdot10^{-3}$ моль/л стрептоцида белого растворимого; кювета 2 см; 1' —ванилин-ИП после контакта с $5\cdot10^{-3}$ моль/л раствором стрептоцида белого растворимого; 2 — раствор $2\cdot10^{-3}$ моль/л ванилина, $2\cdot10^{-3}$ моль/л новокаина; кювета 2 см; 2' —ванилин-ИП после контакта с $1\cdot10^{-2}$ моль/л раствором новокаина; 3 — раствор $2\cdot10^{-3}$ моль/л *п*-ДМАБ, $2\cdot10^{-3}$ моль/л новокаина; кювета 2 см; 3' — *п*-ДМАБ-ИП после контакта с $5\cdot10^{-3}$ моль/л раствором новокаина.
Растворы аминов во всех случаях содержали 2 моль/л HCl.

Максимум поглощения продукта взаимодействия ванилина с новокаином или стрептоцидом белым в пленке смещен на 10 нм по сравнению со спектром поглощения того же продукта в растворе. Размытый максимум в спектре поглощения продукта взаимодействия *п*-ДМАБ с новокаином в растворе и в плёнке наблюдается при одних и тех же значениях длины волны (рис. 1).

Кислотность раствора ПАА по-разному влияет на появление окраски пленок ванилин-ИП и *п*-ДМАБ-ИП. Пленки ванилин-ИП не окрашивались в растворе новокаина при pH 3 и выше, слабо окрашивались при pH 2 и заметно окрашивались лишь в присутствии 2 моль/л HCl. Окраска пленок *п*-ДМАБ-ИП возникала как в кислых, так и в слабокислых растворах новокаина, вплоть до pH 6. Развитие окраски пленки со

временем происходило также по-разному для двух иммобилизованных альдегидов. Окраска пленок ванилин-ИП после контакта с раствором ПАА усиливалась в течение 10–15 мин и далее почти не менялась (рис. 2 б, кривая 1). Окраска пленок *п*-ДМАБ-ИП усиливалась в течение первых минут после контакта с раствором ПАА, затем начинала ослабевать и исчезала, если раствор ПАА имел слабокислую среду — pH 3 и выше (рис. 2 а). После контакта *п*-ДМАБ-ИП с более кислыми растворами ПАА, особенно в присутствии 2 моль/л HCl, наблюдалась специфическая картина изменения окраски во времени, включающая максимум и минимум интенсивности окрашивания (рис. 2 а, кривые 1, 1'). Первоначальная и возникающая впоследствии окраски пленок *п*-ДМАБ-ИП обусловлены образованием одних и тех же продуктов, о чем свидетельствует идентичность спектров поглощения пленок, измеренных через 4 и 60 мин после контакта с раствором новокаина.

Наблюдаемые различия можно объяснить, рассматривая образование оснований Шиффа на поверхности пленки и внутри желатинового слоя. Известно, что под действием разбавленных кислот в водном растворе основания Шиффа подвергаются полному гидролизу [1], и для реакции конденсации ПАА с альдегидами в водных растворах оптимальное значение pH = 4 [1, 16]. Однако в литературе обнаружение и определение ПАА в водных растворах с образованием оснований Шиффа рекомендуется проводить в разных средах: при pH 2 [16], в уксусной кислоте (объемная доля 40%) [36], при pH 1–2 с добавлением органических растворителей, в частности, этанола [16, 37], этанола и метанола [37]; с применением экстракции с н-амиловым спиртом [38], а также в неводных средах [16].

Окрашивание пленки, содержащей иммобилизованный альдегид, непосредственно при контакте с раствором ПАА связано с образованием основания Шиффа на поверхности пленки. На поверхности *п*-ДМАБ-ИП основание Шиффа образуется во всем изученном диапазоне кислотности, хотя затем, по-видимому, гидролизуется. На поверхности ванилин-ИП эффекты образования основания Шиффа выражены гораздо слабее.

Различие между двумя альдегидами объясняются различиями в их строении. Взаимодействие *п*-ДМАБ с новокаином протекает аналогично взаимодействию *п*-диметиламинокоричного альдегида с анилином [4, 39] (схема 1).

Образующаяся хиноидная структура (III) может стабилизироваться крупными анионами, такими как ДСН [4], что приводит к окрашиванию поверхности пленки в растворе ПАА. Об участии анионов ДСН в образовании окрашенного поверхностного продукта свидетельствует тот факт, что пленки с *п*-ДМАБ, не содержащие ДСН, при контакте с раствором новокаина почти не окрашивались (см. начальный участок кривой 1' на рис. 2 а). В условиях смачивания плёнки водным раствором основание Шиффа гидролизуется, равновесия сдвигаются влево, и интенсивность окраски со временем (до 10 мин) уменьшается.

Дальнейшее нарастание интенсивности окраски (рис. 2 а, кривые 1 и 1') наблюдалось наиболее отчетливо, когда раствор ПАА содержал 2 моль/л HCl.

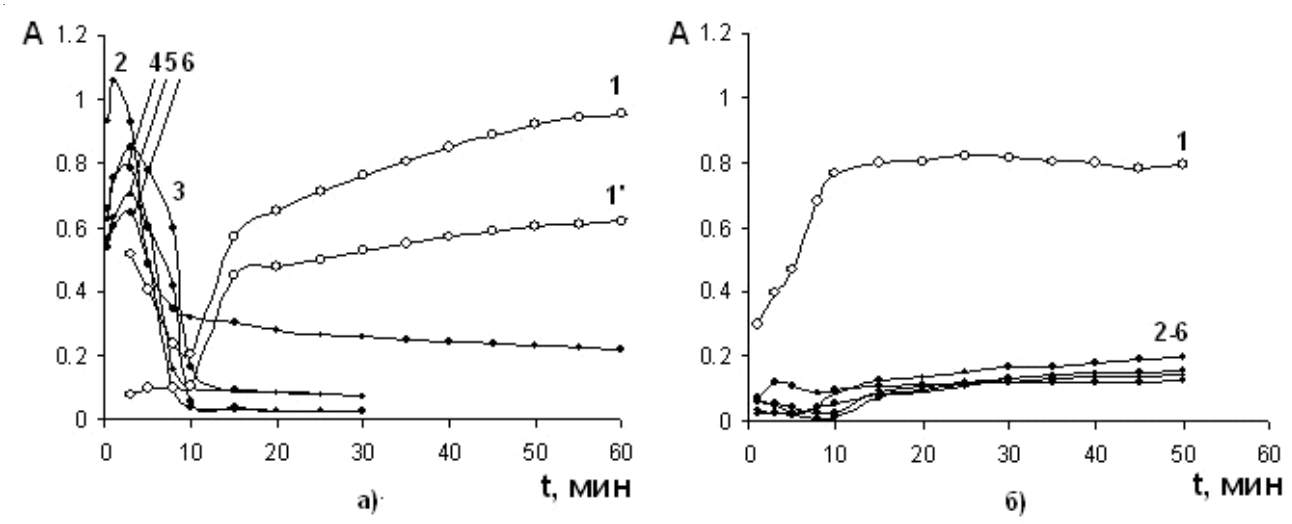


Рис. 2. Изменение поглощения пленок *п*ДМАБ-ИП, 455 нм (а) и ванилин-ИП, 405 нм (б) после контакта с раствором новокаина: 1 — в присутствии 2 моль/л HCl; 1' — то же для пленки, полученной без ДСН; 2 — pH 2; 3 — pH 3; 4 — pH 4; 5 — pH 5; 6 — pH 6.

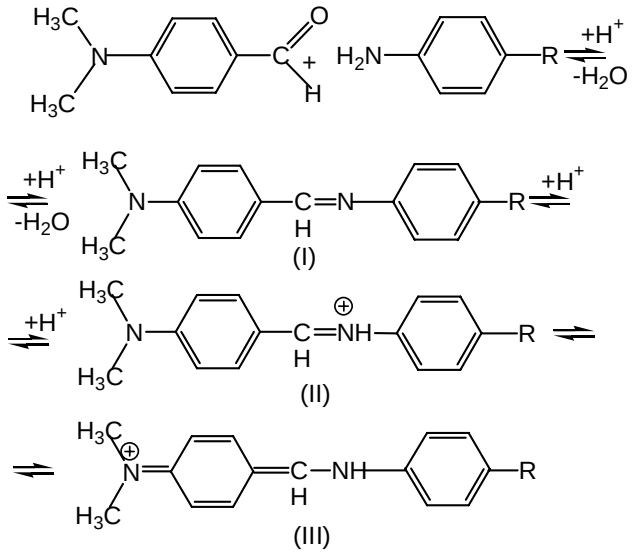
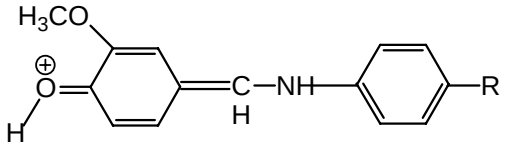


Схема 1 Взаимодействие *п*-ДМАБ с ПАА в кислой среде.

Такой кислотности, достаточно далекой от изоэлектрической точки, соответствует рыхлая структура желатины, образующаяся при разворачивании спиралей и более доступная для внедрения реагентов из раствора. Следовательно, развитие окраски можно объяснить проникновением ПАА внутрь желатинового слоя и образованием основания Шиффа в среде желатинового геля, гидрофобизированной как за счет ассоциации с ДСН, так и за счет конформационных изменений. В такой среде геля основание Шиффа не гидролизуется. По мере приближения pH раствора к изоэлектрической точке желатины структура геля уплотняется, и вероятность образования окрашенных продуктов внутри геля снижается (ср. кривые 1–2 и 3–5 на рис. 2 а).

Аналогичная картина "долговременного" окрашивания пленки наблюдается и в случае иммобилизованного ванилина (рис. 2 б, кривая 1). Однако здесь отсутствует начальный максимум окраски, связанный с образованием продукта на поверхности пленки. Можно предположить, что при взаимодействии ванилина с новокаином также может образоваться продукт со структурой, аналогичной структуре (III) для *п*-ДМАБ (схема 1):



Однако такая структура значительно менее устойчива, чем хиноидная структура с положительным зарядом на атоме азота (III, схема 1) и не может быть причиной стабилизации продуктов, образующихся на поверхности пленки. Следовательно, ванилин образует основание Шиффа в основном с ПАА, проникающим внутрь гидрофобизированного желатинового геля, содержащего клубкообразные макромолекулы желатины при повышенной кислотности раствора.

Взаимодействие ПАА с иммобилизованным *п*-ДМАБ в присутствии индикатора БФС. Смесь красителя БФС и *п*-ДМАБ ранее использовалась как твердофазный реагент в газоанализаторе для автоматического определения анилина в воздухе [40]. Нами изучена возможность использования смеси БФС и *п*-ДМАБ, иммобилизованных в пленку, как реагента на ПАА в нейтральных растворах. Для сорбции индикатора пленки *п*-ДМАБ-ИП погружали на 10 мин в раствор $5\cdot10^{-4}$ моль/л БФС при pH 1 ($HClO_4$), что способствует образованию рыхлой структуры и проникновению БФС внутрь желатинового массива. Получались пленки (*п*-ДМАБ-БФС-ИП) желтого цвета.

Моноанион и дианион БФС в водном растворе имеют максимумы поглощения при 440 нм и 590 нм соответственно. В пленке *п*-ДМАБ-БФС-ИП, содержащей ДСН, максимумы поглощения моноаниона и дианиона БФС несколько смещены по сравнению с водным раствором и наблюдались при длине волны 425 нм и 605 нм (рис. 3, кривые 1, 2). Ранее установлено, что константа ионизации БФС в желатиновом геле смещена в кислую область: $pK_a = 2{,}22\pm0{,}17$ [12] по сравнению с $pK_a = 4{,}10$ в водном растворе [41].

В растворе, содержащем *п*-ДМАБ, новокаин и ДСН, в присутствии БФС, как и без него, при pH 5 образуется продукт, поглощающий при 465 нм (основание Шиффа).

Желтый цвет пленки *п*-ДМАБ-БФС-ИП в водном буферном растворе с pH 6 переходил в синий, а в растворе новокаина с тем же значением pH — в зеленый цвет, обусловленный сочетанием синей окраски дианиона БФС с желтой окраской основания Шиффа. Действительно, в спектре поглощения *п*-ДМАБ-БФС-ИП после контакта с раствором ПАА (рис. 3, кривая 3), наряду с полосой поглощения дианиона БФС с максимумом при 605 нм регистрируется полоса поглощения при 455 нм, относящаяся к основанию Шиффа. Аналогичная полоса поглощения с максимумом при 450–455 нм наблюдается в спектрах поглощения пленок *п*-ДМАБ-ИП, не содержащих БФС (рис. 1, кривая 3').

Пленки *п*-ДМАБ-БФС-ИП выдерживали 1 мин в исследуемом растворе при pH 6, затем вынимали и наблюдали изменение спектров поглощения во времени. Для выяснения роли БФС в протекании реакции иммобилизованного *п*-ДМАБ с новокаином исследовали временные зависимости поглощения

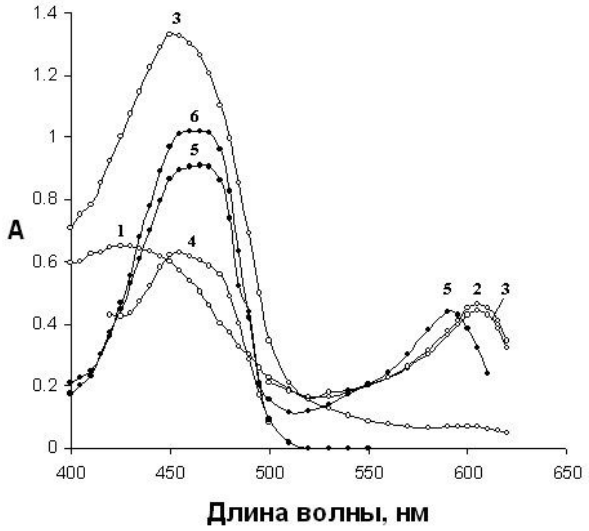


Рис. 3. Спектры поглощения плёнок (1–4) и растворов (5, 6): 1 — *п*-ДМАБ-БФС-ИП (исходная плёнка); 2 — *п*-ДМАБ-БФС-ИП через 30 мин после контакта с уксусно-ацетатным буферным раствором с pH 6; 3 — *п*-ДМАБ-БФС-ИП через 30 мин после контакта с раствором новокаина с pH 6; 4 — *п*-ДМАБ-ИП через 5–10 мин после контакта с раствором новокаина с pH 6; 5 — раствор, содержащий *п*-ДМАБ, БФС, ДСН, новокаин при pH 5; 6 — раствор, содержащий *п*-ДМАБ, ДСН, новокаин при pH 5.

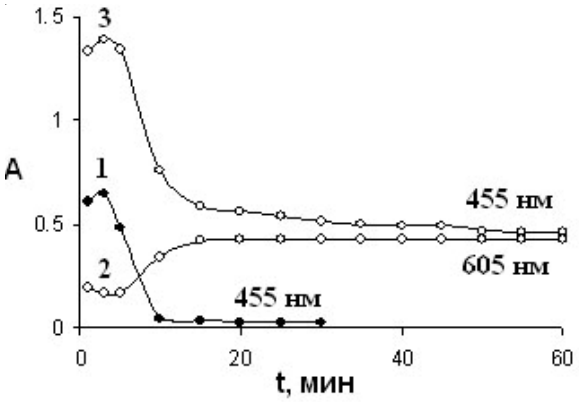


Рис. 4. Зависимость поглощения *п*-ДМАБ-ИП (1) и *п*-ДМАБ-БФС-ИП (2, 3) после контакта с раствором новокаина при pH 6 от времени наблюдения окраски плёнки. (Значения поглощения на зависимости 3 измерены против пленки *п*-ДМАБ-БФС-ИП, обработанной холостым раствором при pH 6.)

пленок при 455 нм и 605 нм — максимумы поглощения основания Шиффа и дианиона БФС соответственно (рис. 4). Скорость изменения окраски, по-видимому, обусловлена скоростью проникновения внешнего раствора внутрь желатинового слоя, содержащего иммобилизованные реагенты. На изменение pH реагирует как поверхностно закрепленный индикатор (при этом частично смываясь), так и БФС внутри желатинового слоя. Превращение "внутреннего" БФС в дианион заканчивается примерно через 15 мин (рис. 4, кривая 2). Примерно через такое же время перестает уменьшаться поглощение при 455 нм, относящееся к основанию Шиффа (рис. 4, кривая 3). Логично предположить, что иммобилизованный БФС стабилизирует продукт взаимодействия *п*-ДМАБ с новокаином при pH 6 внутри желатинового слоя аналогично стабилизации структуры III (схема 1) анионами ДСН, наблюдаемой в нашей работе и в водных растворах *п*-диметиламинокоричного альдегида и анилина [4, 39].

Реакция иммобилизованного *п*-ДМАБ с новокаином в присутствии БФС, интересная с точки зрения понимания специфики реакции в желатиновом слое, оказалась малопригодной для фотометрического определения новокаина, поскольку пленки окрашивались неравномерно. Однако их можно применять для визуально-тестовых определений. Для этого пленку *п*-ДМАБ-БФС-ИП следует погрузить в раствор новокаина при pH 6 на 1 мин, вынуть из раствора и наблюдать окраску пленки через 20–30 мин.

Метрологические характеристики тест-определений с разработанными индикаторными плёнками. Для визуально-тестовых определений с разработанными индикаторными плёнками в соответствии с ранее описанным алгоритмом [42] были определены область ненадёжной реакции (ОНР), относительная ширина ОНР (r) (отношение разности концентраций на верхней и нижней границе ОНР к значению концентрации на нижней границе [43]), предел обнаружения (c_{min}), нижняя граница определяемых содержаний ($c_н$) (табл. 2).

Значение предела обнаружения для обоих альдегидов и 3 изученных аналитов оказалось практически одинаковым и составляет около 0,2 ммоль/л (табл. 2). Ширина ОНР и r оказались минимальными для плёнок ванилин-ИП и *п*-ДМАБ-БФС-ИП (табл. 2), что свидетельствует о большей устойчивости этих индикаторных систем к случайным помехам [44].

Разработанные индикаторные пленки пригодны также для фотометрического определения ПАА, за исключением *п*-ДМАБ-БФС-ИП. Последние нецелесообразно использовать для фотометрических определений, вследствие неоднородности окрашивания таких плёнок после контакта с раствором ПАА, но контрастность изменения окраски пригодна для обнаружения и визуально-тестового определения ПАА. Соответствующие характеристики фотометрического определения ПАА приведены в табл. 3.

Ванилин-ИП были использованы для фотометрического определения новокаина и стрептоцида белого, *п*-ДМАБ-БФС-ИП — для визуально-тестового определения новокаина в фармацевтических препа-

ратах. Полученные результаты сопоставляли с результатами, полученными по фармакопейным методикам [45]. Результаты определения новокаина в растворе для инъекций “Новокаин, 0,5%” путем фотометрирования плёнок удовлетворительно согласуются с результатами, полученными по фармакопейной методике (табл. 4).

Правильность предложенных методик проверяли методом вколотой пробы, вводя известное количество аналита в приготовленный раствор лекарственного препарата. Как видно из табл. 5, фотометрирование индикаторных плёнок или визуально-тестовое определение обеспечивают удовлетворительную правильность результатов определения исследуемых аналитов в фармацевтических препаратах.

Преимущество индикаторных пленок по сравнению с фармакопейными методиками идентификации и определения ПАА состоит в том, что (i) исключено

Таблица 2. Основные метрологические характеристики методов обнаружения и определения аминов с помощью индикаторных плёнок

Характеристики тест-методов	Индикаторная плёнка/аналит				
	Ванилин-ИП/ новокаин	*п*-ДМАБ-ИП/ новокаин	*п*-ДМАБ-БФС-ИП/новокаин	Ванилин-ИП/ стрептоцид белый	Ванилин-ИП/ стрептоцид белый растворимый
ОНР, ммоль/л	0,06–0,24	0,01–0,17	0,05–0,17	0,05–0,17	0,04–0,27
r	3	16	2,4	2,4	5,8
$c_{min,}$ ммоль/л	0,22	0,16	0,15	0,16	0,24
S_c, ммоль/л	0,11	0,06	0,11	0,09	0,11
$c_н$, ммоль/л	0,33	0,18	0,33	0,27	0,33

Таблица 3. Характеристики градуировочных графиков определения аминов с иммобилизованными в плёнках ванилином, п-*ДМАБ*

Индикаторная плёнка	Аналит	Уравнение градуировочного графика, A=a+bc, c, ммоль/л		Коэффициент корреляции, R	Диапазон линейности, ммоль/л
		a	b		
Ванилин-ИП	новокаин	(-0,01±0,03)	(0,115±0,006)	0,995	0,6–10
	стрептоцид белый	(0,013±0,015)	(0,114±0,004)	0,998	0,3–8,6
	стрептоцид белый растворимый	(0,064±0,015)	(0,113±0,003)	0,999	0,2–12
п-ДМАБ-ИП	новокаин	(0,03±0,02)	(0,101±0,002)	0,998	0,3–23

Таблица 4. Результаты определения новокаина фотометрическим и визуально-тестовым методами с применением индикаторных плёнок (n=3, P=0,95)

Аналит	Лекарственный препарат	Фармакопейный метод [45], m, мг (в 1 мл препарата)	Определение с индикаторной плёнкой, m, мг (в 1 мл препарата)	
			Ванилин-ИП (фотометрическое определение)	*п*-ДМАБ-БФС-ИП (визуально-тестовое определение)
Новокаин	Раствор для инъекций “Новокаин, 0,5%”	(4,99±0,14)	(4,7±0,3)	(6,1±1,4)

Таблица 5. Результаты определения новокаина фотометрическим и визуально-тестовыми методами с применением индикаторных плёнок по методу "вколотой пробы" (n=3, P=0,95)

Аналит	Лекарственный препарат	Индикаторная плёнка	Без добавки, m, мг	Введено, m, мг	Найдено, m, мг
Новокаин	Раствор для инъекций "Новокаин, 0,5%"	Ванилин-ИП (фотометрическое определение)	(23,3±1,7)	13,5	(12,3±1,2)
		п-ДМАБ-БФС-ИП (визуально-тестовое определение)	(2,8±0,7)	3,8	(4,3±1,2)

применение токсичных нитрита натрия и β-нафтола; (ii) упрощается методика испытания, поскольку нет необходимости дозировать растворы реагентов; (iii) появляется возможность документирования наблюдений; (iv) использованные пленки легче утилизировать, чем растворы реагентов.

Заключение

Иммобилизованные в желатиновом геле фотопленок альдегиды (ванилин, *п*-диметиламинобензальдегид) могут использоваться как реагенты для визуально-тестового и спектрофотометрического определения ПАА. Устойчивый аналитический эффект возникает за счет образования основания Шиффа в массиве желатинового геля. Окрашивание поверхности пленки нестабильно во времени (*п*-диметиламинобензальдегид) или вообще не появляется при pH выше 2 (ванилин) вследствие гидролиза основания Шиффа. Иммобилизации альдегидов в желатиновую пленку способствует ДСН, который образует комплексы с макромолекулами желатины и повышает ее гидрофобность.

Усиление аналитического эффекта наблюдалось в тех случаях, когда иммобилизацию реагентов в пленку или само испытание проводили в присутствии 2 моль/л HCl. При такой кислотности в среде желатинового геля происходят структурные изменения вследствие разворачивания тройных спиралей макромолекул желатины и перехода их в статистический клубок. Более рыхлая структура статистического клубка и сопутствующее увеличение гидрофобности среды способствует внедрению и солюбилизации в желатиновом слое умеренно гидрофобных реагентов и продуктов индикаторных реакций.

Приведены метрологические характеристики методик с использованием индикаторных плёнок; они практически не зависят от разновидности иммобилизованного альдегида и типа определяемого ПАА. Пленки испытаны на примерах определения новокаина, стрептоцида белого и стрептоцида белого растворимого в фармацевтических препаратах; результаты фотометрического определения препаратов с окрашенными пленками согласуются с результатами, полученными по фармакопейным методикам.

Благодарность. Работа выполнена при поддержке Министерства Науки и Образования Украины (№ государственной регистрации 0103U004212).

Литература

1. *Химическая* энциклопедия / Под ред. Н.С. Зефирова, Т. 5. — М.: Большая Российская энциклопедия, 1998. — 783 с.
2. *Великородный А.А., Моросанова Е.И., Золотов Ю.А.* Тест-определение анилина в растворах на основе реакции азосочетания с аналитическими реагентами, включенными в ксерогели кремниевой кислоты // Журн. аналит. химии. — 2000. — 55, № 10. — С. 1105–1110.
3. *Амелин В.Г., Колодкин И.С.* Целлюлозная бумага с химически иммобилизованным 1-нафтиламином для экспрессного тест-определения нитритов, нитратов и ароматических аминов // Журн. аналит. химии. — 2001. — 56, № 2. — С. 206–212.
4. *Доронин С.Ю., Чернова Р.К., Гусакова Н.Н.* Аналитические возможности реакции первичных ароматических аминов с п-диметиламинокоричным альдегидом в присутствии ионов и мицелл ПАВ // Журн. аналит. химии. — 2005. — 60, № 5. — С. 471–478.
5. *Марченко Д.Ю., Морозкин И.А., Моросанова Е.И., Кузьмин Н.М., Золотов Ю.А.* Индикаторные трубки для определения анилина в растворе // Журн. аналит. химии. — 1997. — 52, № 12. — С. 1292–1295.
6. *Евгеньев М.И., Гармонов С.Ю., Евгеньева И.И., Горюнова С.М., Николаева Н.Г., Левинсон Ф.С.* Тест-методы для визуального, спектрофотометрического и хроматографического определения аминосоединений в воздушных и водных средах // Журн. аналит. химии. — 1998. — 53, № 2. — С. 175–186.
7. *Евгеньев М.И., Гармонов С.Ю., Евгеньева И.И.* Тест-плёнки для определения ароматических аминов и гидразинов в водных средах // Журн. аналит. химии. — 2002. — 57, № 2. — С. 187–191.
8. *Михайлов О.В., Половняк В.К.* Новый метод подготовки образцов для измерения электронных спектров поглощения труднорастворимых соединений // Заводск. лаборатория. — 1989. — 55, № 12. — С. 34–38.
9. *Михайлов О.В.* Реакции замещения и темплатного синтеза в металлгексацианоферрат(II)ных желатин-иммобилизованных матричных системах // Коорд. химия. — 2000. —

26, №10. — С. 750–762.
10. *Михайлов О.В.* Низкотемпературный темплатный синтез в металлгексацианоферрат(II)ных желатин-иммобилизованных матричных системах // Рос. хим. журн. — 2000. — № 3. — С. 70–79.
11. *Birkedal-Hansen H.* Eosin staining of gelatine // Histochemie. — 1973. — 36. — P. 73–87.
12. *Решетняк Е.А., Никитина Н.А., Логинова Л.П., Мчедлов-Петросян Н.О., Светлова Н.В.* Протолитические и комплексообразующие свойства индикаторов в среде желатинового геля // Вестн. ХНУ. Сер. химия. — 2005. —№ 669, Вып. 13. — С. 67–82.
13. *Логинова Л.П., Нестеренко О.Ю., Кудрис И.В.* Идентификация нитроксолина с использованием гексацианоферратов (II) кобальта (II) и меди (II), иммобилизованных в желатиновой матрице // Вестн. ХНУ. Сер. химия. — 2005. — № 669, Вып. 13. — С. 93–99.
14. *Логинова Л.П., Коновалова О.Ю.* Метрологические характеристики обнаружения восстановителей с реагентами, иммобилизованными в желатиновой плёнке // Вестн. ХНУ. Сер. химия. — 2007. — № 770, Вып. 15. — С. 90–98.
15. *Шереметьев С.В., Кузнецов В.В.* Реакции синтеза азокрасителей в отвержденном желатиновом геле и их аналитическое применение при определении нитритов // Журн. аналит. хим. — 2007. — 62, № 4. — С. 357–363.
16. *Коренман И.М.* Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. — М.: Химия, 1975. — 360 с.
17. *Державна* Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”, 1-е вид. — Харків: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
18. *Мелентьева Г.А.* Фармацевтическая химия, Т. 1. — М.: Медицина, 1976. — 480 с.
19. *Логинова Л.П., Нестеренко О.Ю.* Тест-плёнки для обнаружения и полуколичественного определения первичных ароматических аминов // Вестн. ХНУ. Сер. химия. — 2006. — № 731, Вып. 14. — С. 112–119.
20. *Справочник* химика. Основные свойства неорганических и органических соединений / Под ред. Б.П. Никольского и др., Т. 2. — Л.: Химия, 1971. — 1168 с.
21. http://www.chemblink.com
22. *Courts A.* The N-terminal amino acid residues of gelatin. 1. Intact gelatins // Biochem. J. – 1954. – 58, № 1. – P. 70–74.
23. *Измайлова В.Н., Ребиндер П.А.* Структурообразование в белковых системах. — М.: Наука, 1974. — 268 с.
24. *Джеймс Т.Х.* Теория фотографического процесса: Пер. с англ. — Л.: Химия, 1980. — 672 с.
25. *Райхардт К.* Растворители и эффекты среды в органической химии: Пер. с англ. — М.: Мир, 1991. — 763 с.
26. *Nesterenko O.Yu., Loginova L.P.* Absorption spectra of Reichardt betaine indicators, immobilized in gelatine and on photographic film // International conference “Modern physical chemistry for advanced materials (MPC’07)”. — Kharkiv. — 2007. — P. 288–290.
27. *Dunn W.J., Koehler M.G., Grigoras S.* The role of solvent-accessible surface area in determining partition coefficients // J. Med. Chem. — 1987. — 30. — P. 1121–1126.
28. *Leo A.J.* The octanol-water partition coefficient of aromatic solutes: the effect of electronic interactions, alkyl chains, hydrogen bonds, and ortho-substitution // Chem. Soc. Perkin Trans. — 1983. — 2. — P. 825–838.
29. *Hansch C., Leo A.J.* Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology. – New York: Wiley, 1979.
30. *Morishita T., Yamazaki M., Yata N., Kamada A.* Studies on Absorption of Drugs. VIII. Physicochemical Factors affecting the Absorption of Sulfonamides from the Rat Small Intestine // Chem. Pharm. Bull. Jap. — 1973. — 21. — P. 2309–2322.
31. *Измайлова В.Н., Деркач С.Р., Зотова К.В., Данилова Р.Г.* Влияние углеводородных и фторсодержащих поверхностно-активных веществ на свойства желатины в объёме водной фазы и на границе с воздухом // Коллоидный журнал. — 1993. — 55, № 3. — С. 54–90.
32. *Вюстнек Р., Вюстнек Н.П., Хермел Х.* Влияние добавок ионогенных ПАВ на донорно-акцепторное равновесие протонов желатины // Коллоидный журнал. — 1987. — 49, № 2. — С. 244–248.
33. *Деркач С.Р., Измайлова В.Н., Зотова К.В.* Исследование взаимодействия желатины с ПАВ методом потенциометрического титрования // Журн. прикл. химии.— 1993. — 66, Вып. 3. — С. 627–632.
34. *Turner S.F., Clarke S.M., Rennie A.R., Thirtle P.N., Li Z.X., Thomas R.K., Langridge S., Penfold J.* Adsorption of gelatin in combination with sodium dodecyl sulphate or hexadecyl trimethyl ammonium bromide to a polystyrene/water interface // Progr. Colloid Polym. Sci. — 1999. — 112. — P. 206–209.
35. *Turner S.F., Clarke S.M., Rennie A.R., Thirtle P.N., Cooke D.J., Li Z.X., and Thomas R.K.* Adsorption of sodium dodecyl sulfate to a polystyrene/water interface studied by neutron reflection and attenuated total reflection infrared spectroscopy //Langmuir. — 1999. — 15. — P. 1017–1023.
36. *Беляков А.А., Мельникова Л.В., Куренко Л.Т.* Унифицированное стандартное вещество для фотометрического определения ароматических аминов и изоцианатов // Заводск. лаборатория. — 1987. — 53, № 4.— С. 6–8.
37. *Qureshi M., Khan I.A.* Detection and spectrophotometric determination of some aromatic nitrogen compounds with *p*-dimethylaminocinnamaldehyde // Anal. Chim. Acta. — 1976. — 86. — P. 309–311.
38. *Коренман Я.И., Сотникова Н.Г.* Экстракционно-фотометрическое определение микроколичеств аминофенолов в водных средах // Журн. прикл. хим. — 1983. — № 10. — С. 2278–2280.
39. *Доронин С.Ю., Чернова Р.К., Гусакова Н.Н.* *п*-Диметиламинокоричный альдегид как фотометрический реагент на первичные ароматические амины // Журн. аналит. химии.— 2004. — 59, № 4. — С. 377–387.
40. *Стенцель И.И.* Автоматическое определение анилина в воздухе и газовых выбросах // Заводск. лаборатория. — 1985. — 51, № 2.— С. 1–3.
41. *Лурье Ю.Ю.* Справочник по аналитической химии.— М.: Химия, 1967.— 390 с.
42. *Решетняк Е.А., Никитина Н.А., Холин Ю.В., Светлова Н.В., Островская В.М.* О достоверной оценке метрологических характеристик тестового анализа // Вестн. ХНУ. Сер. химия. — 2003. — № 596, Вып. 10. — С. 90–100.
43. *Решетняк Е.А., Никитина Н.А., Логинова Л.П., Островская В.М.* Предел обнаружения в тест-методах анализа с визуальной индикацией. Влияющие факторы // Журн. аналит. химии. — 2005. — 60, № 10.— С. 1102–1109.
44. *Комарь Н.П.* Основы качественного химического анализа, Т. 1. — Харьков: Издательство Харьковского университета, 1955. — 442 с.
45. *Государственная* фармакопея СССР / Под ред. М.Д. Машковского и др. — М.: МЕДГИЗ, 1961. — 912 с.