

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 543.054, 543.5

**СИНТЕЗ ДИЭТИЛ-2-(4-НИТРОБЕНЗИЛИДЕН)МАЛОНАТА И ЕГО
ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ДЕРИВАТИЗИРУЮЩЕГО РЕАГЕНТА
ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ 2-МЕТИЛМЕРКАПТОАЦЕТАТА МЕТОДОМ ВЭЖХ**

Данила Алексеевич Карпеев, Андрей Владимирович Пирогов

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра аналитической химии

Автор, ответственный за переписку: Андрей Владимирович Пирогов,
pigofovav@my.msu.ru

Аннотация. Сформулированы основные требования к эффективному реагенту для предколоночной дериватизации при ВЭЖХ-определении органических веществ, не содержащих хромофоров. В качестве новых реагентов изучены нитрофторстиролы, дихлорстиролы и диэтил-2-(4-нитробензилиден)малонат. Последний был выбран оптимальным. В мягких условиях (20 минут при комнатной температуре) проведена дериватизация 2-метилмеркаптоацетата в качестве тестового анализа. Отмечена полнота протекания реакции с образованием единственного продукта. Предел обнаружения 2-метилмеркаптоацетата снизился в 67 раз (до 15 нг/мл) по сравнению с исходным.

Ключевые слова: ВЭЖХ, дериватирующие реагенты, нитрофторстиролы, диэтил-2-(4-нитробензилиден)малонат, реакция Михаэля

DOI: 10.55959/MSU0579-9384-2-2026-67-1-83-90

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова АААА-А21-121011590089-1 «Развитие высокоинформативных и высокотехнологичных методов химического анализа для защиты экосистем, создания новых материалов и передовых производственных технологий, перехода к экологически чистой и ресурсосберегающей энергетике, развития природоподобных технологий, высокотехнологичного здравоохранения и рационального природопользования». Масс-спектры высокого разрешения зарегистрированы с использованием оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития МГУ.

Для цитирования: Карпеев Д.А., Пирогов А.В. Синтез диэтил-2-(4-нитробензилиден)малоната и его применение в качестве дериватирующего реагента при определении 2-метилмеркаптоацетата методом ВЭЖХ // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2026. Т. 67. № 2. С. 83–90.

ORIGINAL ARTICLE

**DIETHYL-2-(4-NITROBENZYLIDEN)MALONATE SYNTHESIS
AND IT'S APPLICATION FOR 2-METHYLMERCAPTOACETATE
DETECTION BY HPLC METHOD****Danila A. Karpeev, Andrey V. Pirogov**

Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, department of Analytical Chemistry

Corresponding author: Andrey V. Pirogov, Pirogovav@my.msu.ru

Abstract. The basic requirements for an effective reagent in the pre-column derivatisation of organic substances with no chromophores are outlined. The study examined nitrofluorostyrenes, dichlorostyrenes, and diethyl-2-(4-nitrobenzylidene)malonate as potential new reagents. The latter was selected as the optimal reagent. The derivatisation of 2-methylmercaptoacetate as a test analyte was performed under mild conditions (20 minutes at room temperature). Complete reaction with formation of a single product was observed. The detection limit of 2-methylmercaptoacetate decreased 67-fold (to 15 ng/mL) compared to the initial limit.

Keywords: HPLC, derivatising reagents, nitrofluorostyrenes, diethyl-2-(4-nitrobenzylidene)malonate, Michael reaction

Financial Support. The work was carried out within the framework of the state assignment of Lomonosov Moscow State University AAAA-A21-121011590089-1 «Development of highly informative and high-tech methods of chemical analysis for the protection of ecosystems, the creation of new materials and advanced production technologies, the transition to environmentally friendly and resource-saving energy, the development of nature-like technologies, high-tech healthcare, and rational environmental management.» High-resolution mass spectra were recorded using equipment purchased from the funds of the Lomonosov Moscow State University Development Program.

For citation: Karpeev D.A., Pirogov A.V. Diethyl-2-(4-nitrobenzylidene) malonate synthesis and it's application for 2-methylmercaptoacetate detection by HPLC method // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Khimiya. 2026. Т. 67. № 2. S. 83–90.

В настоящее время одним из наиболее распространенных в ВЭЖХ детектором при определении органических соединений является спектрофотометр. При наличии в составе молекулы аналита хорошей хромофорной группы достигаются низкие пределы обнаружения. В случае отсутствия таких групп (например, при определении алифатических соединений, спиртов, аминов, меркаптанов и т.п.) ситуация осложняется, и для прямого определения малых концентраций требуется использование других подходов. Одним из таких удобных и широко применяемых способов является предварительная дериватизация. В литературе предложены несколько хорошо зарекомендовавших себя реагентов – дансил хлорид [1], ФМОК [2], БОК [2] и др. Однако они не

лишены ряда недостатков. Хороший реагент для дериватизации играет ключевую роль в аналитической химии, особенно в процессе подготовки образцов для анализа с помощью таких методов, как газовая или жидкостная хроматография. Мы сформулировали ряд признаков, расположив их в порядке убывания важности, основанной на мнении 10 экспертов в области хроматографии (кандидатов и докторов наук), определявших качество реагентов для дериватизации.

Полнота протекания реакции. Целевое вещество должно на 100% (или не полностью, но воспроизводимо) давать однозначный продукт дериватизации.

Минимизация побочных продуктов. Процесс дериватизации должен приводить к образо-

ванию минимального количества побочных продуктов, которые могут мешать анализу и усложнять интерпретацию результатов анализа.

Скорость реакции. Дериватизация должна проходить быстро при комнатной или умеренной температуре, чтобы сократить время пробоподготовки и снизить возможное нежелательное разложение аналита.

Специфичность. Реагент должен обеспечивать высокую селективность к целевым соединениям, желательна минимизация реакций с другими веществами в образце.

Образование высококачественных дериватов. Получаемые дериваты должны иметь время удерживания, существенно отличающееся от недериватизированных соединений, и иметь хорошие хромофорные группы, что улучшает идентификацию и количественный анализ.

Синергия с вариантами детектирования. Реагент должен хорошо сочетаться с используемыми вариантами анализа, увеличивая чувствительность и селективность.

Хорошая растворимость в воде. Желательно, (но не обязательно), чтобы реагент и образующиеся дериваты имели хорошую растворимость в водных или водно-органических подвижных фазах, что позволяет упрощать пробоподготовку.

Стабильность. Реагент и полученные дериваты должны быть стабильными в течение периода хранения и при условиях анализа, должны отсутствовать разложение или изменения, которые могут повлиять на результаты.

Легкость в использовании. Процесс дериватизации должен быть простым, не требующим сложного оборудования или условий, что упрощает работу аналитиков.

Минимальная токсичность. Идеальный реагент должен иметь низкий уровень токсичности для аналитика и окружающей среды, что важно для соблюдения стандартов безопасности.

Экономичность. Реагент должен быть доступен по цене, что делает его практичным для регулярного использования в лаборатории.

Эти признаки помогают выбрать наилучший реагент для дериватизации в зависимости от специфики анализируемых веществ и требований к параметрам анализа.

Поиск новых классов дериватирующих реагентов – интересная и актуальная задача. На наш взгляд, одним из новых перспективных классов веществ, подходящих в качестве дериватирующих реагентов, могут быть производные заме-

щенных стиролов. В настоящей работе синтезирован и охарактеризован ряд таких соединений, определены их аналитические характеристики.

Экспериментальная часть

Реагенты и материалы. Гидразин гидрат, трибромфторметан, хлорид меди (I) и нитрат железа (III) («ч.д.а.», «Тульский химик», Россия), 1,2-этилендиамин (pure, Tokyo Chemical Industry, Япония), 1,2-дихлорэтан (99%, Panreac, Испания), 4-хлорбензальдегид, 4-фторбензальдегид, 4-бромбензальдегид, 4-метилбензальдегид, 4-метоксикарбонил бензальдегид, 4-трет-бутилбензальдегид, 4-трифторметилбензальдегид, 2,4-дихлорбензальдегид (все 98+%, Acros Organics, США), соляная кислота, *n*-гексан, хлористый метилен, 1,4-диоксан, тетрафторметан («х.ч.», «Компонент реактив», Россия), малоновая кислота (99%, Sigma-Aldrich, США), меркаптопропионовая кислота и гексадекантиол (все 98+%, Sigma-Aldrich, США).

Оборудование. Хроматографические эксперименты проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Хроматрон-1411 («ЛабТех», Россия) с градиентным элюированием и диодноматричным детектором. Использовали УФ-детектирование при длине волны 200–270 нм. Объем вводимой пробы составлял 10 мкл. Скорость потока 1 мл/мин. Для разделения веществ использовали колонку Inspire 5 μm C18 размер 4.6×150 мм (DikmaTech, Китай). Температура колонки 25 °С, подвижная фаза – 70% ацетонитрила и 30% воды.

Измерение pH растворов осуществляли с помощью pH-метра PB11 (Sartorius AG, Германия). Идентификацию веществ проводили по времени удерживания или (в случае масс-спектрометрического детектирования) по масс-спектрам и точным массам.

Спектры поглощения регистрировали на приборе СФ-102 («Интерфотофизика», Россия), а спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре «Флюорат-02» («Люмэкс», Россия). Расчет квантовых выходов флуоресценции проводили относительно родамина 6Ж, взятого в качестве стандарта. Для анализа были приготовлены растворы замещенных стиролов в 1,2-дихлорметане с концентрацией 0,005 моль/л.

Для проведения предварительной оценки чистоты синтезированных соединений использовали тонкослойную хроматографию на пластинах для ТСХ Sorbfill (ЗАО «Сорбполимер», Россия). Элюентом при этом служил дихлорметан.

ЯМР-спектры регистрировали на приборе Bruker 600 МГц. Для подтверждения строения синтезированных соединений применяли газовый хроматограф 5977А с масс-спектрометрическим детектором 7890В (Agilent, США). В работе использовали роторный испаритель BUCHI Vacuum Pump V-700, Vacuum Controller V-850.

Методика синтеза. В виалу объемом 2 мл поместили (Е)-1-хлор-4-(2-фтор-2-нитровинил)бензол и азотный нуклеофил, смесь перемешивали течение 6 ч. После проведения реакции раствор делили с помощью колоночной хроматографии, элюент – хлористый метилен/гексан. Все представленные продукты имеют маслообразную консистенцию.

Результаты и их обсуждение

В качестве дериватирующих агентов для определения аминов и тиолов в перспективе можно использовать такие соединения, как нитрофторстиролы, дихлорстиролы и ароматические диметилмалоновые эфиры.

Одним из основных преимуществ реакций присоединения является высокая селективность. Замещенные стирилы могут реагировать достаточно однозначно, что позволяет получать нужные производные без существенного образования побочных продуктов. Кроме того, такие реакции часто проходят при мягких условиях, что снижает потребность в проведении реакций при высокой температуре, делает процесс более безопасным и экспрессным.

С другой стороны, у этих реакций есть и недостатки. Одним из них может быть низкая скорость реакции, особенно в том случае, когда замещенный стирил имеет стерические затруднения или когда амины и тиолы мало активны. Иногда из-за растворимости реагентов или продуктов реакции ограничен выбор растворителей. Побочные реакции (например, окисление тиолов) могут привести к снижению выходов целевых продуктов. Необходимо также учиты-

вать возможность образования изомеров, что потребует проведения дополнительных этапов очистки полученных соединений и приведет к снижению общего выхода целевого продукта.

Получение и тестирование нитрофторстиролов в качестве дериватирующих агентов

К первой группе потенциально перспективных замещенных стирилов можно отнести нитрофторстиролы, которые находят широкое применение в реакциях синтеза производных пирролов, в качестве реагентов Дильса-Альдера [3] и для синтеза сложных гетероциклических систем [4]. Они имеют две сильные акцепторные группы (фтор- и нитрогруппу) у двойной связи, поэтому достаточно реакционноспособны и легко вступают в качестве акцепторов в реакции Михаэля (рис. 1) [5]. Нитрофторстиролы, в частности, могут быть получены нитрованием соответствующих ароматических альдегидов в 1,4-диоксане [6].

При синтезе в качестве промежуточных соединений использовали фторбромстиролы, полученные двухстадийным процессом из соответствующего гидразона, генерируемого *in situ* взаимодействием альдегида и гидразингидрата [7]. Полученный гидразон подвергали реакции с трибромфторметаном (фреоном) с образованием фторбромстирола. Конечный нитрофторстирол получали взаимодействием фторбромстирола с нитратом железа (III). Были получены фторнитростирола с выходами 67-85% [7]. Они способны вступать в реакции с первичными и вторичными аминами. Отмечена высокая активность нитрофторстиролов в реакции Михаэля с азотными нуклеофилами, что может быть применимо в аналитической химии для получения производных. Однако серьезным недостатком этих реагентов является очень высокая себестоимость синтеза (используемые трибромфторфреоны чрезвычайно дороги).

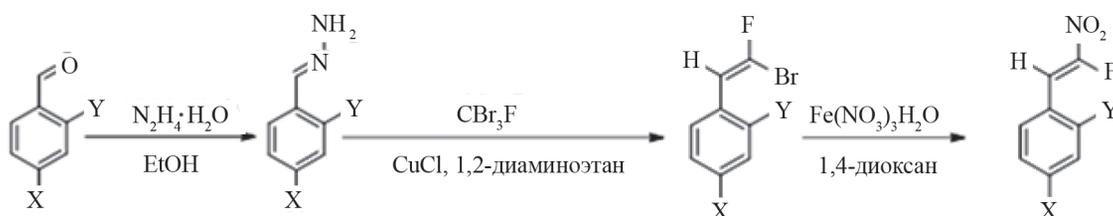


Рис. 1. Схема синтеза нитрофторстиролов

Получение и тестирование дихлорстиролов в качестве дериватизирующих агентов

Нами синтезированы и апробированы в качестве агентов дериватизации различные дихлорстиролы. Они получают из соответствующих альдегидов по методике [8]. На рис. 2 приведена схема синтеза.

Отличительной особенностью подобных соединений является аномально высокая подвижность хлора [9]. Однако реакция дихлорстиролов с N-нуклеофилами (диметиламином, раствором аммиака) при комнатной температуре не привела к быстрому и однозначному получению производных по причине отсутствия мезомерного

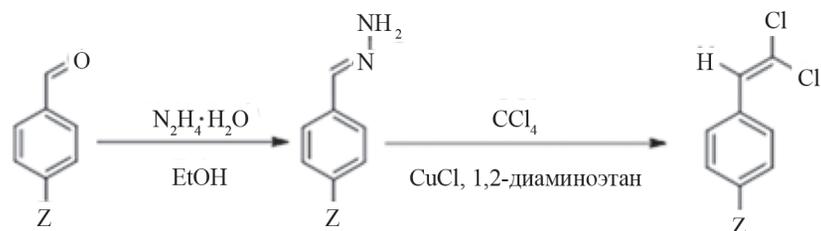


Рис. 2. Схема получения дихлорстиролов

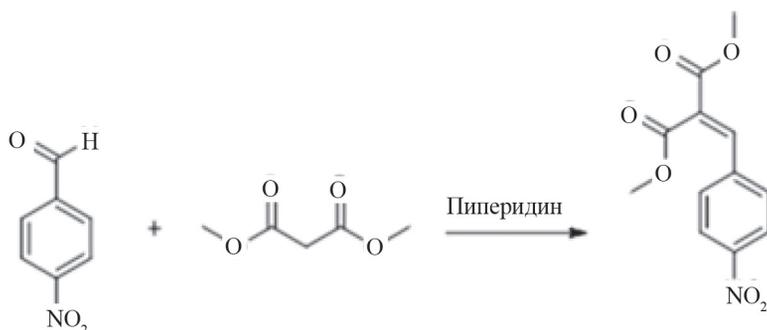


Рис. 3. Схема получения диалкил-2-(4-нитробензилиден)малоната

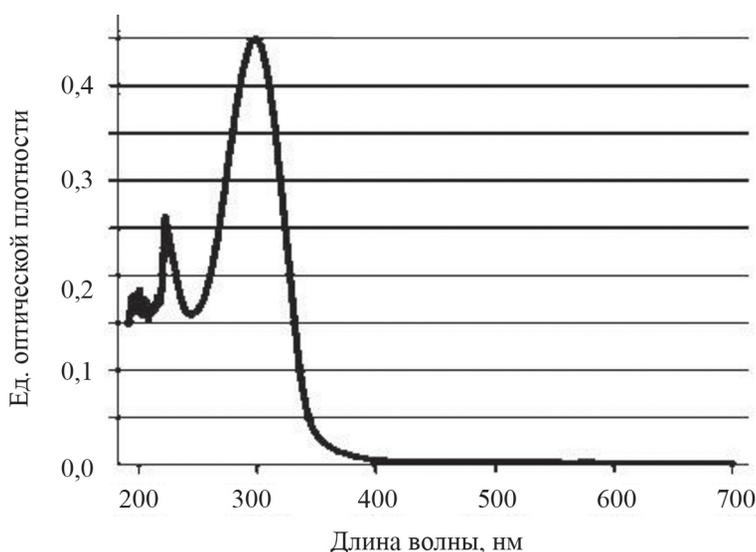


Рис. 4. Спектр поглощения дериватизирующего реагента (0,045 ммоль/л) в 1,2-дихлорэтане

влияния заместителей. Выходы реакции составляли 39–45%. В дальнейшем эти стиролы использовали только для оценки флуоресценции в сравнении с фторнитростиролами и диэтил-2-(4-нитробензилиден)малонатом.

Получение и тестирование диэтил-2-(4-нитробензилиден)малоната в качестве дериватирующего агента

Диэтил-2-(4-нитробензилиден)малонат получен конденсацией диэтилового эфира малоновой кислоты и 4-нитробензальдегида в

пиперидине по реакции Кневенагеля (рис. 3) [10]. Спектр поглощения синтезированного реагента представлен на рис. 4, а спектр флуоресценции – на рис. 5.

Спектральные характеристики стиролов

Получены спектры поглощения и измерены квантовые выходы флуоресценции. Экспериментальные и предсказанные с помощью нейронных сетей и искусственного интеллекта данные представлены в таблице. Следует отметить,

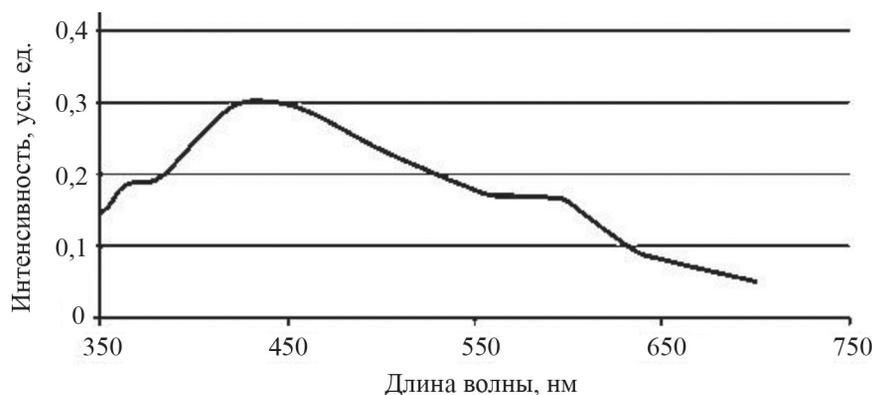


Рис. 5. Спектр флуоресценции диэтил-2-(4-нитробензилиден)малоната в 1,2-дихлорэтане (0,045 ммоль/л)

Экспериментальные и предсказанные программами искусственного интеллекта молярные коэффициенты поглощения растворов фторнитростиролов в 1,2-дихлорэтане и квантовые выходы флуоресценции

Заместитель X	Максимум поглощения в УФ-области спектра (λ , нм)	Молярный коэффициент поглощения. 10^{-3} , л/моль см			Квантовый выход флуоресценции, ($\times 10^5$ %)
		экспериментальное значение	ПО-1 ^a	ПО-2 ^b	
Фтор	278	18	25	9,5	2
Хлор	326	16	26	11	0,009
Бром	236	14	32	10	0,3
Метил	342	14	25	16	4
Трет-бутил	278	17	25	20	0,4
Трифторметил	288	13	25	14	0,7
Метокси	206	20	23	23	6
Нафталин	222	37	25	27	1,3
Без заместителя	320	22	27	25	2,3
2-(4-Нитробензилиден)малонат	298	14	16	18	0,8

^a Программное обеспечение ChemPredictor (<http://chem-predictor.isc-ras.ru/>); ^b Программное обеспечение Deep4Chem 2020 (<https://deep4chem.com/>).

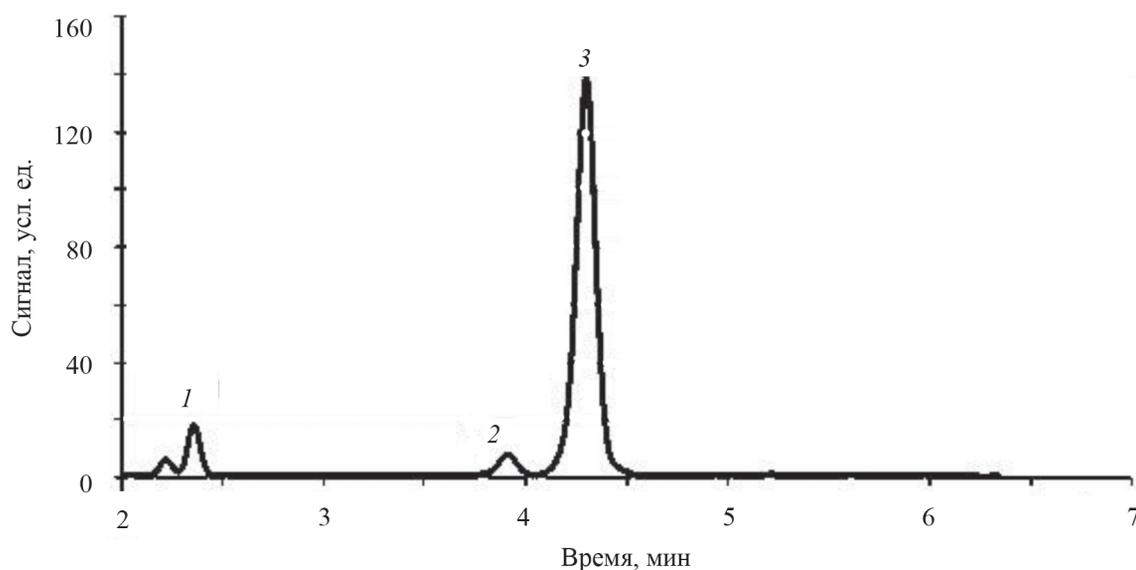


Рис. 6. Хроматограмма раствора диэтил-2-(4-нитробензилиден)малоната с концентрацией 50 мкг/мл в ацетонитриле. Элюент – ацетонитрил - вода (70:30). Детектирование при 280 нм (1 – 4-нитробензальдегид, 2 – примесь не идентифицирована, 3 – диэтил-2-(4-нитробензилиден)малонат

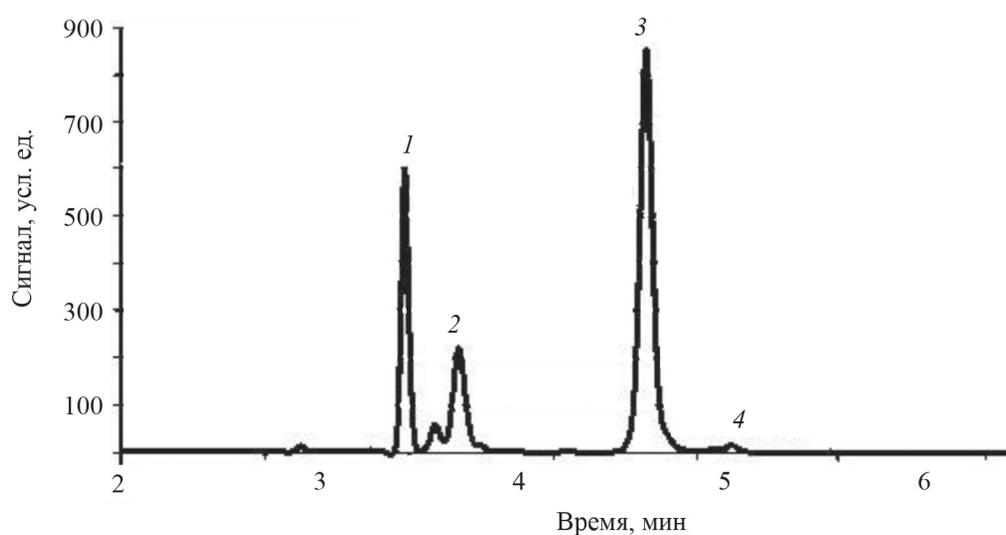


Рис. 7. Хроматограмма реакционной смеси после дериватизации, исходное соотношение диэтил-2-(4-нитробензилиден)малоната и 2-меркаптоацетата равно 1:3; элюент – ацетонитрил : вода (70:30); детектирование при 280 нм (1 – 2-меркаптоацетат, 2 – 4-нитробензальдегид, 3 – продукт реакции, 4 – реагент)

что экспериментальные и расчетные данные по молярным коэффициентам поглощения различаются. Программа искусственного интеллекта Deep4Chem 2020 дает более близкие значения. Вероятно, это связано с алгоритмами расчетов. Программа ChemPredictor основана на нейронных сетях, обученных на выборке по поглощению фталоцианинов. Химические структуры

стиролов и фталоцианинов существенно различаются, что отражается на точности расчетов.

Применение эфира для получения производных при определении тиолов методом ВЭЖХ-УФ

Для тестирования реакционной способности и пригодности в качестве реагента для

дериватизации тиосоединений и их последующего ВЭЖХ-УФ-разделения и детектирования был выбран 2-метилмеркаптоацетат. Он обладает незначительным поглощением в УФ-области спектра и достаточно токсичен (класс опасности 3), его предел обнаружения при прямом СФ-детектировании (210 нм) недостаточно низкий (в настоящей работе он оценен на уровне 1 мкг/мл).

К 1 мл модельного раствора диэтил-2-(4-нитробензилиден)малоната в ацетонитриле с концентрацией 8 мкг/мл (0,03 мкМ) было добавлено 0,1 мкМ 2-метилмеркаптоацетата. Смесь перемешивали в УЗ-ванне при комнатной тем-

пературе в течение 20 минут. После этого был проведен ВЭЖХ анализ реакционной смеси. Хроматограмма исходного раствора диэтил-2-(4-нитробензилиден)малоната представлена на рис. 6, а продукта реакции – на рис. 7. Видно, что реакция дериватизации протекает практически целиком. Предел обнаружения 2-метилмеркаптоацетата после дериватизации составил около 15 нг/мл, т.е. снизился более чем в 65 раз.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что диэтил-2-(4-нитробензилиден)малоната, предложенный в работе реагент, пригоден для проведения реакции дериватизации с тиолами в мягких условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Casola L.L., Matteo G., Prisco D. G., Cervone F. // *Anal. Biochem.* 1974. Vol. 57. N 11. P. 38.
2. Carpino L.A. // *Accounts of Chemical Research.* 1987. Vol. 20. N 11. P. 401.
3. Ponomarev A.S., Larkovich R.V., Aldoshin A.S., Tabolin A.A., Ioffe S.L., Jonathan G., Opatz T., Nenajdenko V.G. // *Beilstein Journal of Organic Chemistry.* 2021. Vol. 17. N 1. P. 283.
4. Rostami H., Shiri L. // *ChemistrySelect.* 2020. Vol. 5. N 36. P. 11197.
5. Jian W., Hao L., Bihshow L., Liansuo Z., Hua G., Wei W. // *Chemistry A European Journal.* 2006. Vol. 12. N 16. P. 4321.
6. Hui-Xuan C., Lin-Jie H., Jin-Biao L., Jiang W., Gui L. // *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements.* 2014. Vol. 189. N 12. P. 1858.
7. Shastin A., Muzalevsky V.M., Balenkova E.S., Nenajdenko V.G. // *Mendeleev Communications.* 2006. T. 16. N 3. P. 179.
8. Nenajdenko V.G., Shastin V.A., Korotchenko V.N., Balenkova E.S. // *Russian Chemical Bulletin.* 2001. Vol. 50. P. 1047.
9. Aldoshin A.S., Tabolin A.A., Ioffe S.L., Nenajdenko V.G. // *Molecules.* 2021. Vol. 26. N 12. P. 3515.
10. Беккер Г., Бергер В., Домшке Г., Фангхенель Э., Фауст Ю., Фишер М., Гентц Ф., Говальд К., Глух Р., Майер Р., Мюллер К., Павелъ Д., Шмидт Г., Шольберг К., Шветлик К., Зейлер Э., Цеппенфельд Г. // *Органикум. Практикум по органической химии.* Вейнгейм, 1992. Т. 2. 160 с.

Информация об авторах

Данила Алексеевич Карпеев – аспирант кафедры аналитической химии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (danilakarpeev.karpeev@yandex.ru);

Андрей Владимирович Пирогов – профессор кафедры аналитической химии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (pirogovav@my.msu.ru).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических стандартов

В данной работе отсутствуют исследования человека и животных.

Статья поступила в редакцию 10.05.2025;
одобрена после рецензирования 16.06.2025;
принята к публикации 25.06.2025.