



І.М. Боровська¹, М.Є. Блажеєвський²

Застосування каталітичної реакції відновлення метиленового синього для кількісного визначення домішок купруму у субстанції аскорбінової кислоти

¹ДЗ «Луганський державний медичний університет»,

²Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: аскорбінова кислота, метиленовий синій, калій гідрогенпероксомоносульфат, каталітичний кінетичний метод, купрум.

Ключевые слова: аскорбиновая кислота, метиленовый синий, калий гидрогенпероксомоносульфат, каталитический кинетический метод, медь.

Key words: ascorbic acid, methylene blue, acid Caro, kinetic method, and copper.

Запропоновано селективну кінетико-спектрофотометричну методику кількісного визначення домішок купруму в субстанції аскорбінової кислоти, що заснована на реакції каталітичного окислення аскорбінової кислоти метиленовим синім. Швидкість індикаторної реакції контролювали спектрофотометрично за світлопоглинанням барвника, використовували диференційний варіант кінетичного методу. Показано можливість вибіркового визначення домішок купруму за наявності йонів феруму в субстанції аскорбінової кислоти. Отримані результати збігаються з даними референтного методу.

Предложена селективная кинетико-спектрофотометрическая методика количественного определения примесей меди в субстанции аскорбиновой кислоты, которая основана на реакции каталитического окисления аскорбиновой кислоты метиленовым синим. Скорость индикаторной реакции контролировали спектрофотометрически по поглощению красителя, использовали дифференциальный вариант кинетического метода. Показана возможность избирательного определения примесей меди в присутствии ионов железа в субстанции аскорбиновой кислоты. Полученные результаты согласуются с данными референтного метода.

A selective kinetic – spectrophotometric method for the quantitative determination of impurities in the copper substance ascorbic acid (AA) based on the catalytic oxidation of AA with methylene blue. The rate of reaction was monitored spectrophotometrically using a differential version of the kinetic method. The possibility of selective determination of impurities of copper in the presence of iron ions in the substance of the AA. The results are compared with those of the reference method.

Фізіологічна роль купруму як мікроелемента добре вивчена. Він відіграє важливу роль у функціонуванні багатьох металовмісних ензимів [3].

Згідно вимог Державної фармакопеї, важкі метали у лікарських засобах вважають допустимою неспецифічною домішкою, вміст яких жорстко регламентується різними ГДК, а кількісне визначення цієї домішки є одним з найпоширеніших випробувань на чистоту у сучасному фармакопейному аналізі [2]. Важкі метали можуть прямо взаємодіяти з лікарськими речовинами або каталітично прискорювати їх розкладання. Обидва процеси можуть призводити до зменшення фармакологічної активності ліків або зростання їх токсичності. До таких домішкових елементів, здатних каталізувати автоокислення багатьох лікарських речовин, належить купрум.

У науковій літературі описано велику кількість високочутливих методик кількісного визначення домішок купруму у різних об'єктах різноманітними методами: спектрофотометрії [5, 11, 12], екстракційно-атомно-абсорбційної спектрофотометрії (ААС) [4], біамперометрії [8], потенціометрії [9], флуориметрії [7, 5], а також кінетичним методом [10].

ДФУ домішки купруму у субстанції «Аскорбінова кислота» (АК) рекомендують знаходити методом ААС після розчинення 2 г субстанції АК в 0,1 моль/л розчині

нітратної кислоти. Однак цей метод вимагає використання коштовного атомно-абсорбційного спектрофотометра з жарівкою з порожнистим мідним катодом і повітряно-ацетиленового полум'я.

Мета роботи

З'ясування можливості застосування доступного кінетичного методу аналізу у спектрофотометричному варіанті для визначення вмісту домішок купруму в субстанції аскорбінової кислоти без попередньої мінералізації зразків проби. Як індикаторну на купрум запропоновано реакцію каталітичного окислення речовини субстанції метиленовим синім у кислому середовищі, швидкість якої реєстрували за зменшенням світлопоглинання забарвленого розчину барвника при 610 нм.

Відновлення метиленового синього наведено на *схемі 1*.

Оскільки необхідна наважка аскорбінової кислоти надто велика для забезпечення оптимальних умов перебігу індикаторної реакції, а при її зменшенні у розчині пропорційно зменшується вміст купруму, що знаходиться на нижній межі визначуваних концентрацій (чутливості) використовуваної методики, запропоновано надлишок АК попередньо окислювати калій гідрогенпероксомоносульфатом, що, як і продукт його відновлення – сульфат, не поглинає світла на робочій ділянці спектра.

Схема 1

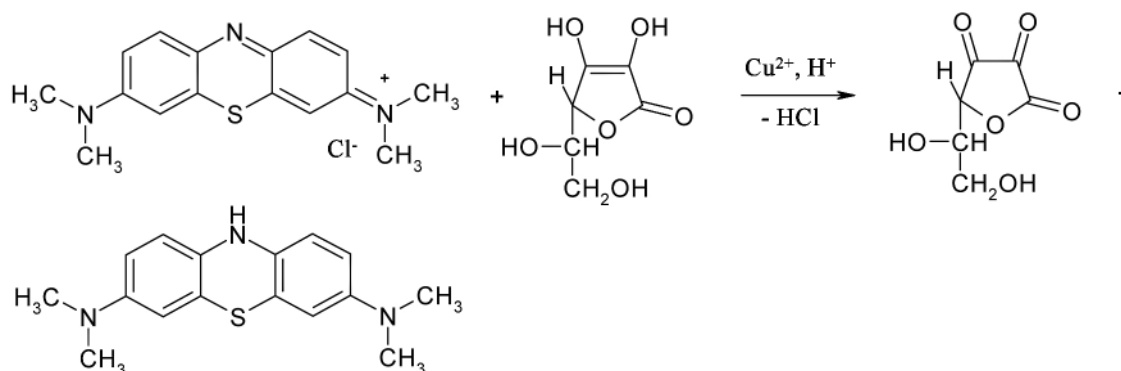
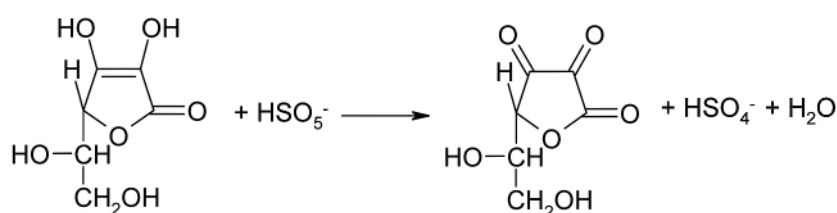


Схема 2



Матеріали і методи дослідження

Реагенти. Використовували реагенти кваліфікації х.ч. або ч.д.а.; розчини виготовляли на отриманій за допомогою кварцового дистильатора двічі дистильованій воді.

Вихідний розчин $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л купрум (II) виготовлено об'ємно-ваговим методом шляхом розчинення 0,2497 г купрум сульфату п'ятиводного (Мерк) у двічі дистильованій воді у мірній колбі об'ємом 1 літр. Отриманий розчин стандартизували методом йодометричного титрування [2]. Робочий розчин 10^{-5} моль/л купрум (II) готували розбавленням вихідного розчину двічі дистильованою водою.

Оксон – $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4 \cdot \text{KHSO}_4$ (активно діюча речовина – калій гідрогенпероксомоносульфат, кваліфікації екстра-чистий (Acros organics), активний кисень $\geq 4,5\%$).

Використовували субстанцію лікарської речовини «Кислота аскорбінова» серії 200512039 виробництва Northeast Gen (Китай).

Розчин АК 0,1 моль/л виготовляли щоденно об'ємно-ваговим методом, шляхом розчинення 1,7610 г наважки субстанції лікарської речовини у 100,0 мл двічі дистильованої води. Вміст аскорбінової кислоти у розчині контролювали йодометрично [2].

Еталонний розчин АК з концентрацією 0,1 моль/л виготовляли щоденно об'ємно-ваговим методом, шляхом розчинення 1,7610 г наважки АК (MERC) у 100,00 мл двічі дистильованої води. Вміст АК у розчині додатково очищеного за допомогою катіонообмінника КУ-2-8 H^+ формі аскорбінової кислоти визначали методом йодометричного титрування [2]. Робочий розчин з концентрацією $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л отримували безпосередньо перед аналізом шляхом точного розбавлення вихідного розчину двічі дистильованою водою.

Розчин 0,1 моль/л калій гідрогенпероксомоносульфату виготовляли щоденно об'ємно-ваговим методом шляхом розчинення 0,3074 г наважки оксону у 20 мл двічі дистильованої води. Розчин 0,01 моль/л саліцилової кислоти виготовляли шляхом розчинення 0,1381 г наважки у 100,0 мл двічі дистильованої води. $\text{pH}=2,20$. pH вимірювали за допомогою pH -метра – мілівольтметра 150 МА з точністю $\pm 0,01$ од. pH .

До 20,0 мл 0,1 моль/л розчину аскорбінової кислоти додавали 10,0 мл 0,1 моль/л розчину калій гідрогенпероксомоносульфату і 10,0 мл 0,01 моль/л розчину саліцилової кислоти. Ретельно перемішували. Кінцева концентрація аскорбінової кислоти – $5 \cdot 10^{-2}$ моль/л.

Розчин $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л метиленового синього виготовляли шляхом розчинення 0,1599 г наважки у 100,0 мл двічі дистильованої води. Розчин з концентрацією $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л метиленового синього отримували щоденно шляхом точного розбавлення вихідного розчину водою.

Температуру $+30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ підтримували за допомогою термостату ТС-80 та термостатованого пристрою.

Оптичну густину розчинів вимірювали на спектрофотометрі UNICO SPECTRO QUEST 2800 (Японія) у кварцовій кюветі з товщиною 10 мм.

Використовували диференціальний варіант кінетичного методу; тангенс кута нахилу лінійних ділянок кінетичних кривих у координатах оптична густина – час характеризував швидкість реакції (tga , хв^{-1}).

Результати та їх обговорення

Оптимальну концентрацію аскорбінової кислоти визначали експериментально. На рис. 1 наведено вплив концентрації аскорбінової кислоти на швидкість знебарвлення метиленового синього.

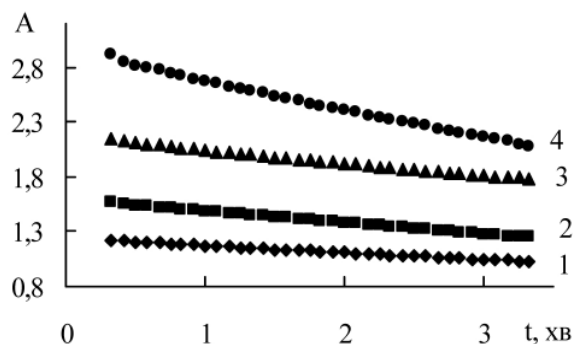


Рис. 1. Вплив концентрації аскорбінової кислоти на швидкість відновлення метиленового синього: 1 – 0,44 мг/л; 2 – 0,66 мг/л; 3 – 0,88 мг/л; 4 – 1,32 мг/л.

Встановлено, що умовна швидкість реакції за оптимальних умов кислотності середовища лінійно залежить від концентрації доданого купруму (II). Це дозволило визначати вміст домішок купруму в субстанції кислоти аскорбінової кінетичним методом у диференціальному варіанті.

За оптимальну обрано концентрацію кислоти аскорбінової $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л (0,88 мг/л), що дозволяла здійснювати достатню кількість вимірювань оптичної густини в часі на лінійній ділянці кінетичної кривої.

На рис. 2 наведено кінетичні криві залежності швидкості знебарвлення метиленового синього у дослідях з випробуваною субстанцією аскорбінової кислоти та додатково з домішкою солі купруму. Як видно, додавання купруму 63,5 нг/мл призводить до збільшення швидкості реакції у 1,2 рази.

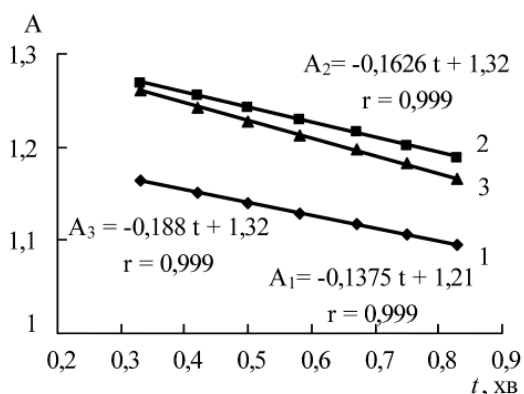


Рис. 2. Кінетична крива знебарвлення метиленового синього в реакції з АК: 1 – АК (очищена), 2 – АК (субст.) з KHSO_5 ; 3 – АК (субст.) з KHSO_5 з домішкою купруму 3,175 нг/мл.

У дослідях зі спеціально очищеним від іонів купруму розчином субстанції АК (MERC) з вмістом домішок купруму, нижчим за межу визначення (чутливості реакції, вказаній у роботі [6]), виміряно швидкість некаталітичної реакції.

За оптимальних умов перебігу індикаторної реакції опрацьовано нову кінетичну методику кількісного визначення домішок купруму в субстанції лікарської речовини кислоти аскорбінової методом домішок.

Методика кількісного визначення домішок купруму в субстанції «кислота аскорбінова»: близько 1,76 г (точна наважка) АК розчиняли у мірній колбі на 100,0 мл у двічі дистильованій воді. До 20,0 мл отриманого розчину аскорбінової кислоти додавали 10,0 мл 0,1 моль/л розчину калій гідрогенпероксомоносульфату і 10,0 мл 0,01 моль/л розчину кислоти саліцилової. Ретельно перемішували і переносили у термостат. Розчини термостатували протягом 15–20 хвилин при $+30^\circ\text{C}$. Кінцева концентрація аскорбінової кислоти – $5 \cdot 10^{-2}$ моль/л.

До 2,0 мл розчину АК $5 \cdot 10^{-2}$ моль/л додавали 2,0 мл $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л розчину метиленового синього і до 20,0 мл доводили двічі дистильованою водою, ретельно перемішували та вимірювали оптичну густину при 610 нм у кварцовій кюветі на 1 см протягом 3 хв з інтервалом кожних 5 с в автоматичному режимі.

Аналогічно здійснювали досліди з додаванням 2 мл $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л стандартного розчину купруму (II). До 2,0 мл еталонного розчину АК (MERC, очищена) $5 \cdot 10^{-2}$ моль/л додавали 2,0 мл $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л розчину метиленового синього, 0,5 мл 0,01 моль/л розчину кислоти саліцилової і до 20,0 мл доводили двічі дистильованою водою, ретельно перемішували та вимірювали оптичну густину при 610 нм на спектрофотометрі у кварцовій кюветі на 1 см протягом 3 хв з інтервалом кожні 5 с в автоматичному режимі

За отриманими результати знаходили тангенс кута нахилу лінійної ділянки кінетичних кривих, $\text{tg}\alpha$, у хв^{-1} .

Кількісний вміст купруму в аскорбінової кислоті розраховували за формулою:

$$C = \left[\frac{C_1}{(\text{tg}\alpha_2 - \text{tg}\alpha_1)} \cdot (\text{tg}\alpha_1 - \text{tg}\alpha_3) \right] \cdot 1/m$$

де C – вміст купруму в субстанції АК, мкг/г;
 C_1 – кінцева концентрація домішки купруму (II), г/л;
 $\text{tg}\alpha_1$ – тангенс кута нахилу кінетичної кривої окислення субстанції;

$\text{tg}\alpha_2$ – тангенс кута нахилу кінетичної кривої окислення субстанції з домішкою купруму(II);

$\text{tg}\alpha_3$ – тангенс кута нахилу кривої некаталітичної реакції у досліді з очищеною від купруму субстанції аскорбінової кислоти;

m – маса наважки субстанції, г.

Методом домішок встановлено, що вміст купруму у субстанції не перевищував припустимого значення (≤ 10 ppm) – 1,22 мкг/г, причому RSD середнього результату $\leq 5,17\%$ ($\delta = +1,6\%$). Правильність отриманих результатів (δ) перевіряли за даними референтної кінетико-спектрофотометричної методики кількісного визначення купруму за швидкістю індикаторної реакції автоокислення кислоти аскорбінової у водних розчинах [1].

Таблиця 1
Результати кількісного визначення вмісту домішок купруму в субстанції аскорбінової кислоти

Назва препарату	Вміст купруму мкг/г	Метрологічні характеристики (n=5; P=0,95)
Кислота аскорбінова	1,13	X = 1,22·мкг/г ΔX = 7,82·10 ⁻⁸ S = 6,29·10 ⁻⁸ S _{x(ср)} = 2,81·10 ⁻⁸ RSD = 5,17% ε = 6,42% σ* = +1,64%
	1,19	
	1,3	
	1,24	
	1,22	

Примітка: вміст знайдений за референтною методикою [1].

До переваг запропонованого каталітичного кінетико-спектрофотометричного методу, що вигідно відрізняють його від класичного методу ААС, варто віднести вищу чутливість, відсутність потреби мінералізації досліджуваного зразка, доступність використовуваної апаратури та реактивів, а також простоту і швидкість здійснення аналізу.

Висновки

Опрацьовано нову кінетико-спектрофотометричну методику кількісного визначення домішок купруму в субстанції лікарської речовини кислоти аскорбінової. Вміст купруму становив 1,22 мг/г, RSD = 5,17% (δ = -1,64%).

Список літератури

1. Боровська І.М. Кінетико-спектрофотометричне визначення домішок купруму у субстанції кислота аскорбінова / І.М. Боровська, М.Є. Блажеєвський, В.С. Шилов // Сучасна фармація і медицина: досвід, шляхи вдосконалення і розвитку: матеріали I Всеукраїнської науково-практичної конференції молодих вчених та студентів. – Луганськ: Вид-во ТОВ «Віртуальна реальність», 2011. – С. 51–52.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІПЕГ, 2001. – Доповнення 1. – 2004. – 520 с.
3. Марри Р. Биохимия человека / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес; пер. с англ. – М.: «Мир», 2004. – 381 с.
4. Ansari R. Improved Extraction Method for the Determination of Iron, Copper, and Nickel in New Varieties of Sunflower Oil by Atomic Absorption Spectroscopy/ R. Ansari, T.G. Kazi, M.K. Jamali, M.B. Arain, S.T. Sherazi, N.Jalbani, H.I. Afridi // J. AOAC Intern. – 2008. – V. 91, №2. – P. 400–407.
5. Chen Z. Catalytic kinetic methods for photometric or fluorometric determination of heavy metal ions / Z. Chen, N. Zhang, L. Zhuo and B. Tang // Microchimica Acta. – 2009. – V. 164, №3–4. – P. 311–336.
6. Khan M.N. Determination of trace amounts of copper (II) by using catalytic redox reaction between methylene blue and ascorbic acid / M. nasiruddin Khan, Anila Sarwar // Analytical sciences. – 2001. – V. 17. – P. 1195–1197.
7. Mayr T. Fluorimetric determination of copper (II) in aqueous solution using lucifer yellow CH as selective metal reagent / Torsten Mayr, Dorota Wencel, Tobias Werner // J Anal Chem. – 2001. – V. 371. – P. 44–48.
8. Mohadesi A. Voltammetric determination of Cu (II) in natural waters and human hair at a meso-2,3-dimercaptosuccinic acid self-assembled gold electrode / Alireza Mohadesi, Mohammad Ali Taher // Talanta. – 2007. – V. 72, №1. – P. 95–100.
9. Munoz R.A. Potentiometric stripping analysis for simultaneous determination of copper and lead in lubricating oils after total digestion in a focused microwave-assisted oven / Rodrigo A.A. Munoz, Cintia S. Silva, Paulo R.M. Correia, Pedro V. Oliveira and Lúcio Angnes // Microchimica Acta. – 2005. – V. 149, №3–4. – P. 199–204.
10. Sekine Y. Flow injection determination of trace amounts of copper based on its catalytic effect on the oxidation of 3, 3',5, 5'-tetramethylbenzidine by cumene hydroperoxide / Yuta Sekine, Isao Shitanda, Masayuki Itagaki, Kunihiro Watanabe, Shigenori Nakano, Takuji Kawashima // MicrochimActa. – 2010. – V. 170. – P. 113–119.
11. Subramanyam S. Development of an extractive spectrophotometric method for the determination of copper(II) in leafy vegetable and pharmaceutical samples using pyridoxal-4-phenyl-3-thiosemicarbazone (PPT) / S. Subramanyam, J.R. Kumar, K.J. Reddy, A.V. Reddy // J. Agric. Food Chem. – 2005. – V. 53, №14. – P. 5492–5498.
12. Vuković J. Simultaneous determination of traces of heavy metals by solid-phase spectrophotometry / J. Vuković, Š. Matsuoka, K. Yoshimura, V. Grdinić, R.J. Grubešić, O. Županić // Talanta. – 2007. – V. 71, №5. – P. 2085–2091.

Відомості про авторів:

Боровська І.М., асистент каф. фармацевтичної хімії та фармакогнозії ДЗ «ЛугДМУ».

Блажеєвський М.Є., д. хім. н., професор, кафедри фізичної і колоїдної хімії НФаУ.

Адреса для листування:

Боровська Ірина Миколаївна. 91021, м. Луганськ, вул. Оборони Луганська, 1, каф. фармацевтичної хімії та фармакогнозії ДЗ «ЛугДМУ».

Тел.: (0642) 63 02 95.

E-mail: inborovskaya@ukr.net

Надійшла в редакцію 7.11.2011 р.