

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2006

Яханбахшт Гасеми*, Шахзад Найеби

ОДНОВРЕМЕННОЕ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ И L-ЦИСТЕИНА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ДВУХ СКОРОСТЕЙ РЕАКЦИЙ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-КИНЕТИЧЕСКОГО МЕТОДА

Отделение химии, Факультет естественных наук, Университет Рази, Керманшах, Иран

* e-mail: jahan.ghasemi@tataa.com

Представлены два аналитических метода, предназначенные для одновременного спектрофотометрического определения аскорбиновой кислоты (Asc) и L-цистеина (Cys) в фармацевтических препаратах: метод двух скоростей реакций (ДСМ) и дифференциально-кинетический метод (ДКМ). Оба метода используют тот факт, что Asc и Cys количественно восстанавливают избыток Fe(III) до Fe(II), а Fe(II) образует в растворе окрашенный комплекс с фенантролином (Phen). Концентрация Fe(II) – Phen комплексов может быть определена по характеристическому поглощению при длине волны $\lambda_{\max} = 510$ нм. Первый метод (ДСМ) основан на определении констант скорости в двух точках, соответствующих преимущественному протеканию одной из двух реакций. Второй метод (ДКМ) использует различие в кинетике реакций окисления Asc и Cys при разных значениях pH. Ход процессов окисления описывается путем подгонки кинетической кривой (построенной по данным кинетики сигнала оптического поглощения продуктов реакции) к соответствующим уравнениям скоростей реакций. Установлено, что реакция Cys – Fe(III) описывается кинетическим уравнением первого порядка, тогда как кинетика взаимодействия Asc – Fe(III) соответствует двум последовательным реакциям. С использованием предложенных методов Asc и Cys могут быть определены с удовлетворительной точностью в интервале концентраций от 0,5 до 5,0 ppm. ДСМ и ДКМ показали хорошие результаты при анализе модельных смесей и готовых фармацевтических препаратов. Абсолютные стандартные ошибки определения Cys и Asc двумя методами (ДСМ, ДКМ) в указанном интервале концентраций были равны 0,121, 0,120 и 0,131, 0,303, а относительные стандартные ошибки составили 5,15, 5,12 % и 5,18, 11,98 %, соответственно.

Аскорбиновая кислота (Asc) и L-цистеин (Cys) являются важными элементами питания и присутствуют в составе многих продуктов питания, а также фармацевтических и косметических препаратов [1, 2]. Эти компоненты часто вводят или добавляют в переработанные продукты питания в виде чистых химических соединений для повышения питательной ценности и сохранения качества этих продуктов [3]. Кроме того, Asc и Cys относятся к числу наиболее важных витаминов, поддерживающих нормальное функционирование человеческого организма и участвующих во многих метаболических процессах. Необходимо отметить, что Asc (витамин С) не синтезируется в организме человека и поступает в него только с пищей. Важными источниками Asc являются свежие фрукты и овощи. Как известно, многие заболевания, такие как цинга и гипопластическая анемия, связаны с дефицитом Asc в организме. Было также установлено, что содержание Asc может быть фактором диагностики заболеваний и оценки качества питания. Следовательно, определение содержания Asc в различных продуктах является важной аналитической задачей.

Для отдельного определения Asc и Cys были разработаны многочисленные методы [4 – 17]. В некоторых случаях содержание Asc и сопутствующих тиолов одновременно определяли с помощью спектрофотометрии в видимой области, капиллярного электрофореза с УФ детектированием и ВЭЖХ с электрохимическим детекти-

рованием [7 – 13]. Анализ доступной литературы показал, что одновременное определение содержания Asc и Cys проводили лишь в нескольких случаях. Из публикаций последних лет можно отметить использование спектрофотометрии в видимой области [18, 19], ВЭЖХ с электрохимическим детектированием [20], циклической вольтамперометрии с модифицированным электродом [21] и радиоактивных изотопов [22].

Методы, основанные на одновременном исследовании кинетики разных процессов, часто позволяют проводить анализ многокомпонентных систем без их предварительного разделения [23, 24]. Такой подход всегда привлекал аналитиков и позволил разработать, в том числе и в последнее время, много селективных и чувствительных методик. В данной статье в продолжение предыдущих публикаций, посвященных одновременному определению разных веществ в образцах сложного состава [19 – 22], мы представляем два точных и селективных метода для быстрого и одновременного определения Asc и Cys в смесях.

Так называемый “двухскоростной” метод (ДСМ) основан на процедуре, предложенной [25] для одновременного определения L-аминокислот в смесях путем анализа кинетики последовательных реакций, катализируемых ферментами. Недавно ДСМ был модифицирован и успешно применен для одновременного определения эпинефрина (адреналина) и норэпинефрина [26, 27]. В этом случае превращения одного из анализи-

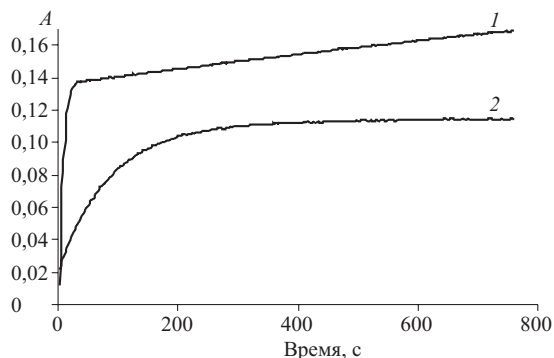


Рис. 1. Кинетика оптического поглощения реакционных смесей Asc (1) и Cys (2) с Fe[Phen]_3^{3+} при оптимальных условиях реакции ($[\text{Fe(III)}] = 3,71 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $T = 25^\circ\text{C}$; $\text{pH } 6,0$; $[\text{Asc}] = [\text{Cys}] = 1,5 \text{ ppm}$).

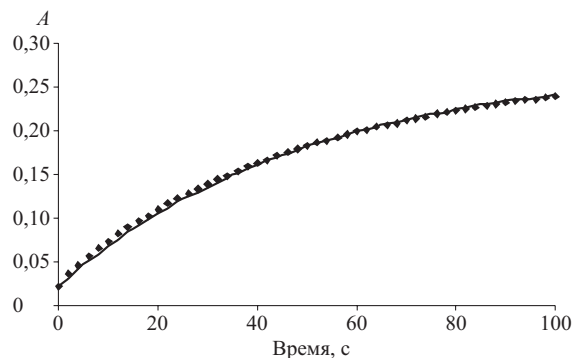


Рис. 2. Экспериментальная кинетика оптического поглощения реакционной смеси Cys с Fe[Phen]_3^{3+} при оптимальных условиях реакции (точки) и ее подгонка к кривой описываемой уравнением (1).

руемых компонентов определяются двумя константами скорости (k_1 и k_2), что приводит к существенному различию скоростей реакций двух определяемых веществ (это основа методов, использующих анализ кинетики). ДСМ удобен с точки зрения обработки данных, так как кинетическую кривую можно разбить на две части, одна из которых содержит вклады от k_1 и k_2 , а другая определяется только меньшим из этих двух параметров [28]. Определение констант скорости в двух точках, соответствующих преимущественному протеканию одной из двух реакций, выявляет различие между определяемыми реагентами. В данном исследовании, ДСМ использует кинетику образования $\text{Fe(II)} - \text{Phen}$ комплексов в реакциях восстановления Fe(III) при его взаимодействии с Asc и Cys.

Дифференциально-кинетический метод (ДКМ) [23, 29 – 33] использует различие в скоростях реакций Asc и Cys с Fe(III) в слабых кислых средах с разными значениями pH. В одном случае Fe(III) реагирует практически только с Asc, а в другом — с обоими компонентами.

Кинетику образования продукта восстановления железа измеряли в течение примерно 100 с путем регист-

рации изменения характеристического поглощения при длине волны $\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$. Эти кинетические данные обрабатывали в рамках ДСМ или ДКМ с помощью уравнений пропорциональных скоростей реакций. Предварительно кинетика восстановления Fe(III) была исследована в отдельных реакциях Asc и Cys с Fe[Phen]_3^{3+} . Эти данные были использованы при определении Asc и Cys посредством ДСМ и ДКМ в модельных смесях и образцах лекарственных средств. Результаты, полученные двумя методами с использованием спектрофотометрических данных, сравнивали с помощью выбранных критериев — абсолютных и относительных стандартных ошибок предсказания концентраций компонентов.

Абсолютная стандартная ошибка предсказания (математического ожидания) является мерой средней ошибки анализа для каждого компонента и определяется при анализе модельных смесей по формуле:

$$RMSEP = \left[\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \hat{x}_i)^2 \right]^{0,5},$$

($RMSEP = \text{root mean square error of prediction}$), где x_i — истинная (внесенная) концентрация компонента в i -м образце; \hat{x}_i — оценка концентрации компонента в i -м образце, полученная данным методом; и n — число образцов. Относительная стандартная ошибка предсказания (в процентах) определялась по формуле:

$$REP (\%) = \frac{RMSEP \times 100}{\bar{x}},$$

($REP = \text{relative error of prediction}$), где \bar{x} — средняя истинная (внесенная) концентрация компонента. Величины абсолютных и относительных стандартных ошибок определения Cys и Asc двумя методами (ДСМ, ДКМ) приведены в табл. 4.

Экспериментальная часть

Реактивы и приготовление образцов. Растворы готовили с использованием химически чистых реагентов и деионизованной воды. Исходные растворы Asc и Cys (3000 ppm) были приготовлены одновременно с доведением до метки водой из точных навесок (0,3 г) каждого

Таблица 1
Линейное соотношение между оптическим поглощением продукта реакции и начальной концентрацией Asc в растворе

Время, с	Наклон кривой, ppm ⁻¹	Постоянный член	Стандартное отклонение регрессии	Коэффициент корреляции
1	0,1123	0,0203	0,0271	0,9829
3	0,1159	0,0132	0,0175	0,9932
5	0,1158	0,0139	0,0153	0,9948
7	0,1160	0,0145	0,0145	0,9954
9	0,1164	0,0148	0,0141	0,9956
15	0,1182	0,0156	0,0136	0,9961
19	0,1195	0,0157	0,0136	0,9962
23	0,1206	0,0164	0,0137	0,9961
27	0,1218	0,0167	0,0139	0,9961
30	0,1231	0,0168	0,0139	0,9962
50	0,1291	0,0180	0,0153	0,9958
80	0,1373	0,0196	0,0175	0,9951
100	0,1423	0,0207	0,0186	0,9949
120	0,1470	0,0216	0,0197	0,9946
150	0,1513	0,0224	0,0206	0,9944

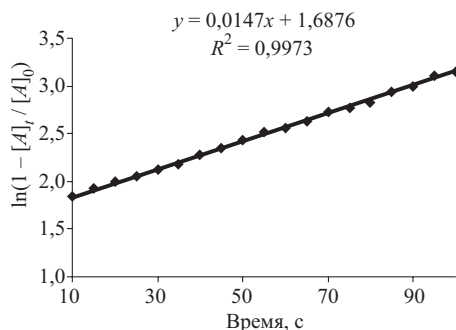


Рис. 3. Линеаризация экспериментальной кинетики изменения концентрации Cys в системе Cys – Fe(III) – Phen (точки) и ее описание с помощью уравнения (4) в рамках модели реакции первого порядка (кривая).

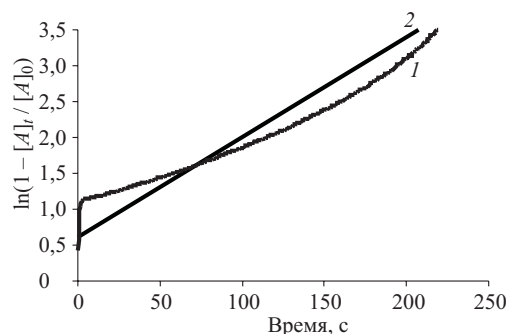


Рис. 4. Отклонение экспериментальной кинетики изменения концентрации Asc в системе Asc – Fe(III) – Phen (кривая 1) от модели реакции первого порядка (кривая 2).

соединения в 100-мл мерной колбе. Исходный раствор Fe(III) (0,02 M) был приготовлен растворением 0,8 г азотнокислого железа(III) в 5 мл соляной кислоты (0,1 M) в мерной колбе объемом 100 мл, после чего объем смеси доводили до метки добавлением деионизованной воды. Раствор фенантролина ($5 \cdot 10^{-3}$ M) готовили в 100 мл мерной колбе путем растворения расчетного количества реагента в 2 мл метанола, после чего объем смеси доводили до метки добавлением деионизованной воды. Буферные растворы (pH 6,0 и 7,0) готовили, смешивая растворы трис(гидроксиметил)аминометана (0,3 M), цитрата натрия (0,1 M), и соляной кислоты (0,1 M).

Для анализа готовых препаратов таблетку витамина С растворяли в деионизованной воде, нерастворимый осадок отделяли фильтрацией, фильтрат переносили в мерную колбу объемом 100 мл и доводили объем раствора до метки, добавляя тот же растворитель.

Приборы. Оптическое поглощение растворов измеряли в 2 см кварцевых кюветках на фотометре Metrohm Model 662. Данные о кинетике поглощения оцифровывались, обрабатывались с помощью лабораторной программы, написанной на языке Quick Basic. Значения pH растворов определяли с помощью прибора Metrohm Model 692 с комбинированным стеклянным и насыщен-

ным каломельным электродами. Прибор был откалиброван по крайней мере по двум буферным растворам (pH 4,00 и 9,00). Температура реакции в водоохлаждаемой ячейке фотометра поддерживалась постоянной на заданном уровне с помощью термостата.

Процедура ДСМ. Фотометр переводили в режим постоянного времени регистрации при фиксированной длине волны детектора (510 нм); температуру термостата ячейки устанавливали равной 25 °С. Расчетные количества исходных растворов Fe(III) и Phen переносили в мерную колбу объемом 10 мл и разбавляли буферным раствором (pH 6,0) до метки (раствор $\text{Fe}[\text{Phen}]_3^{3+}$). Расчетное количество исходного раствора Asc, Cys или их смеси переносили в мерную колбу объемом 5 мл и разбавляли водой до метки. Для каждого измерения кинетики реакции расчетное количество раствора $\text{Fe}[\text{Phen}]_3^{3+}$ переносили в ячейку фотометра, добавляли необходимое количество раствора Asc, Cys или их смеси и измеряли кинетику реакции путем регистрации изменения поглощения во времени при заданных экспериментальных условиях. По этим данным две константы скорости реакции определяли в промежутках времени 12 – 14 и 100 – 120 с и концентрации Asc и Cys рассчитывали с помощью уравнений пропорциональных скоростей реакций.

Таблица 2

Характеристики калибровочных кривых для определения скоростей окисления Asc и Cys с использованием ДСМ

Скорость реакции, с^{-1}	Cys				Asc			
	Наклон кривой, ppm^{-1}	Постоянный член, с^{-1}	Стандартное отклонение	Коэффициент корреляции	Наклон кривой, ppm^{-1}	Постоянный член, с^{-1}	Стандартное отклонение	Коэффициент корреляции
r_1	0,03250	0,02060	0,00945	0,9539	0,12760	0,00460	0,02340	0,9861
r_2	0,00730	0,00030	0,00061	0,9961	0,00080	0,00004	0,00025	0,9807

Таблица 3

Характеристики калибровочных кривых для определения скоростей окисления Asc и Cys с использованием ДСМ

pH	Cys				Asc			
	Наклон кривой, ppm^{-1}	Постоянный член, с^{-1}	Стандартное отклонение	Коэффициент корреляции	Наклон кривой, ppm^{-1}	Постоянный член, с^{-1}	Стандартное отклонение	Коэффициент корреляции
6,0	–	–	–	–	0,0690	0,0770	0,0052	0,9917
7,0	0,0510	-0,0190	0,0099	0,9995	0,0880	0,0710	0,0007	0,9923

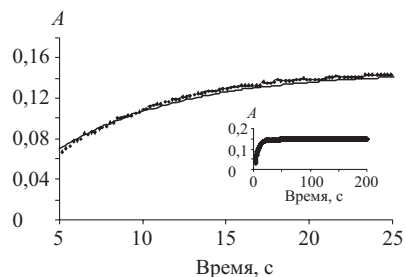


Рис. 5. Начальный участок экспериментальной кинетики оптического поглощения в системе Asc – Fe(III) – Phen (точки) и ее описание с помощью модели последовательных реакций первого порядка (кривая). Вставка показывает форму кинетической кривой в большем масштабе времени.

Параметры экспериментальных кинетических кривых определяли путем подгонки этих кривых к соответствующим уравнениям скоростей реакций образования окрашенного комплекса [18] в двухстадийном процессе для Asc и в простой реакции первого порядка для Cys. Подгонку проводили методом наименьших квадратов с помощью программы SOLVER из пакета MICROSOFT EXCEL.

Процедура ДКМ. В этом случае для каждого образца необходимо провести два измерения кинетики. Оба измерения проводят, как описано выше для ДСМ, с использованием буферного раствора с pH 6,0 в первой записи и pH 7,0 во второй записи. Кинетику оптического поглощения A при 510 нм записывали в течение первых 100 сек. В первом случае зависимость поглощения от концентрации реагента (Asc) описывается следующим линейным уравнением [29, 30]:

$$A_1 = a_1 + b_1[\text{Asc}]. \quad (1)$$

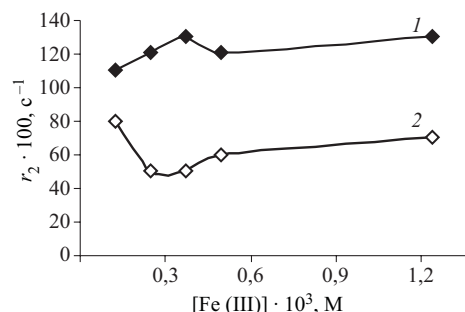
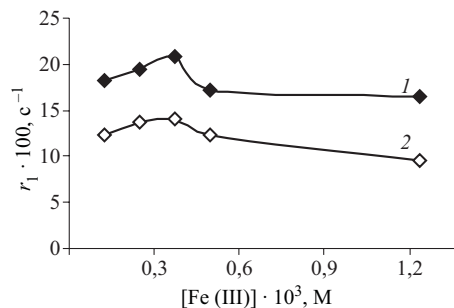


Рис. 6. Зависимости скоростей r_1 и r_2 , определенных в рамках ДСМ, при окислении Asc (1) и Cys (2) от концентрации Fe(III) в растворе при $T = 25^\circ\text{C}$, pH 6,0, $[\text{Asc}] = [\text{Cys}] = 3 \text{ ppm}$.

Во втором случае реакция восстановления Fe(III) протекает с участием обоих реагентов (Asc и Cys) и поглощение описывается уравнением

$$A_2 = a_2 + b_2[\text{Asc}] + b_2[\text{Cys}]. \quad (2)$$

Результаты и их обсуждение

Кинетика взаимодействия Asc и Cys с Fe(III). Asc и Cys количественно восстанавливают Fe(III) в слабо-

Т а б л и ц а 4

Результаты одновременного определения Cys и Asc в модельных растворах с использованием ДСМ и ДКМ

Внесено (ppm)		ДСМ				ДКМ			
		Найдено (ppm)		Относительная ошибка (%)		Найдено (ppm)		Относительная ошибка (%)	
Cys	Asc	Cys	Asc	Cys	Asc	Cys	Asc	Cys	Asc
0,50	0,50	0,50	0,50	0,00	0,00	0,55	0,47	0,00	20,00
1,00	1,00	1,05	1,10	5,00	10,00	1,09	0,98	9,00	-2,00
2,00	2,00	2,15	2,11	7,50	5,50	2,04	2,21	2,00	10,50
2,50	2,50	2,30	2,75	-8,00	10,00	2,50	2,65	0,00	6,00
3,00	3,00	2,96	3,12	-1,33	4,00	3,01	2,84	0,33	-5,33
3,50	3,50	3,62	3,30	3,43	-5,71	3,63	3,74	3,71	6,86
4,00	4,00	4,21	3,83	5,25	-4,25	4,21	4,50	5,25	12,50
4,50	4,50	4,70	4,49	4,44	-0,22	4,62	4,40	2,67	-2,22
1,00	0,50	0,95	0,47	-5,00	-6,00	1,14	0,46	14,00	-8,00
1,50	1,00	1,47	0,96	-2,00	-4,00	1,46	0,89	-2,67	-11,00
2,50	1,00	2,39	1,05	-4,40	5,00	2,42	1,10	-3,20	10,00
1,50	2,00	1,42	2,15	-5,33	7,50	1,45	1,82	-3,33	-9,00
0,50	3,00	0,50	3,06	0,00	2,00	0,50	3,16	0,00	5,33
4,00	3,50	3,87	3,47	-3,25	-0,857	3,69	3,45	-7,75	-1,43
2,00	4,00	1,87	4,25	-6,50	6,25	1,90	3,82	-5,00	-4,50
3,50	4,50	3,39	4,61	-3,14	2,44	3,42	4,71	-2,28	4,67
RMSEP				0,121	0,131			0,120	0,303
REP%				5,150	5,180			5,120	11,980

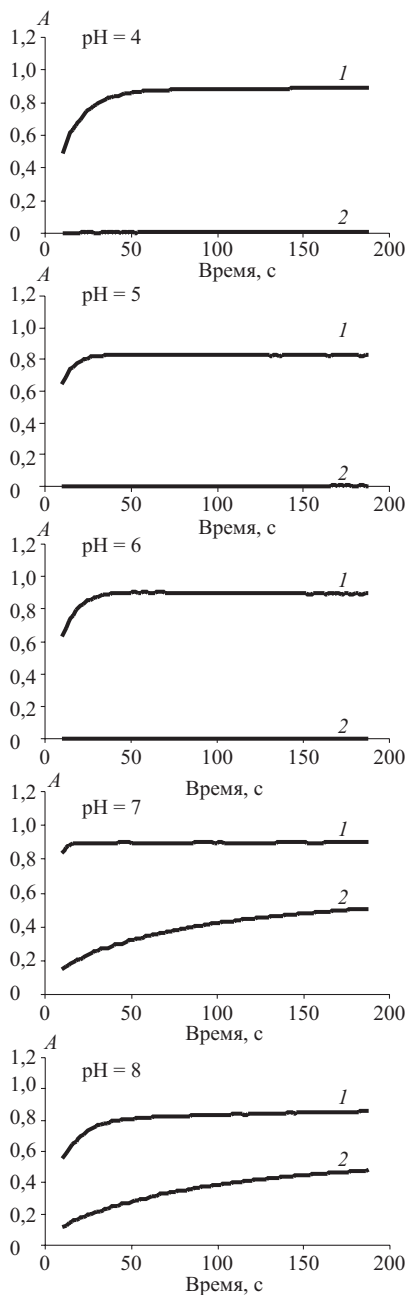


Рис. 7. Влияние pH (*a*) на кинетику оптического поглощения реакционных смесей Asc (1) и Cys (2) с Fe[Phen]₃³⁺ в рамках ДКМ ([Fe(III)] = 3,71 · 10⁻⁴ М; T = 25°C, [Asc] = [Cys] = 3 ppm).

кислой среде с образованием красного комплекса Fe(II) – Phen, обладающего характеристической полосой поглощения при λ_{max} = 510 нм. Типичные кривые зависимости оптического поглощения смеси от времени реакции Fe(III) с Asc и Cys представлены на рис. 1 (кривые 1 и 2, соответственно). Как видно из этих данных, кривая 1 очевидно состоит двух частей, соответствующих быстрой (начальной) и медленной (конечной) стадиям процесса. Действительно, кривая 2 может быть удовлетворительно описана одним уравнением кинетики первого порядка (рис. 2), тогда как кинетика реакции с участием Asc существенно отклоняется от простого уравнения реакции первого порядка.

Экспоненциальная и линеаризованная формы уравнения реакции первого (псевдопервого) порядка могут быть записаны следующим образом:

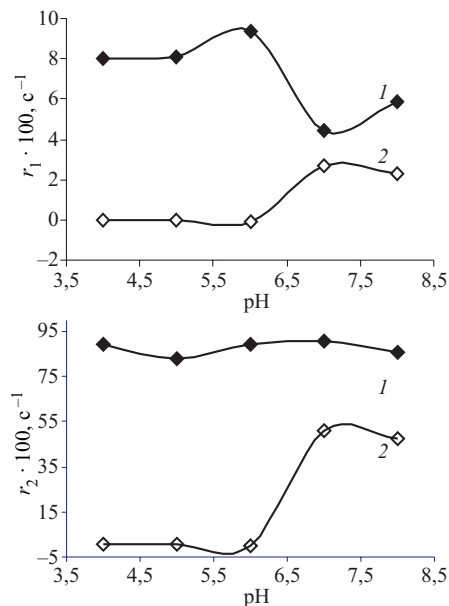


Рис. 8. Влияние pH на скорости r_1 и r_2 , определенные для реакции Asc (1) и Cys (2) с Fe[Phen]₃³⁺ в рамках ДКМ. ([Fe(III)] = 3,71 · 10⁻⁴ М; T = 25°C, [Asc] = [Cys] = 3 ppm).

$$[A]_t = [A]_0 (1 - e^{-kt}), \quad (3)$$

$$\ln(1 - [A]_t/[A]_0) = -kt, \quad (4)$$

где $[A]_t$ и $[A]_0$ — текущая и начальная концентрации реагента A, соответственно; t — время реакции и k — постоянный коэффициент. Таким образом, зависимость $\ln(1 - [A]_t/[A]_0)$ от времени должна быть линейной. Кинетика оптического поглощения, наблюдаемая для системы Cys – Fe(III) – Phen, демонстрирует такое поведение (см. рис. 3). Константа скорости окисления Cys, определенная по наклону графика на рис. 3, равна $k = 0,019104 \text{ с}^{-1}$. В то же время аналогичная логарифмическая кривая, построенная для окисления Asc (рис. 4, кривая 1), существенно отклоняется от простого линейного закона 2, соответствующего реакции первого порядка.

Для проверки соответствия кинетики окисления Asc реакции первого порядка была измерена серия кинетических зависимостей для различных начальных концентраций Asc и построены соответствующие кривые поглощения A как функции $[A]_0$. Результаты этих экспериментов (табл. 1) показали, что в течение всего времени реакции сохраняется линейное соотношение между поглощением и начальной концентрацией, что указывает на первый порядок реакции.

Для проверки предположения, что Asc окисляется в ходе двух последовательных реакций, кинетика оптического поглощения была описана путем подгонки к уравнениям такого процесса [27]:

$$[R]_t = [A]_0 \left[(m+n) + \frac{mk_1 - (m+n)k_2}{k_2 - k_1} e^{-k_1 t} + \frac{nk_1}{k_2 - k_1} e^{-k_2 t} \right] \quad (5)$$

где $[R]_t$ — текущая концентрация продукта R (окрашенного комплекса); m, n — параметры, учитывающие сте-

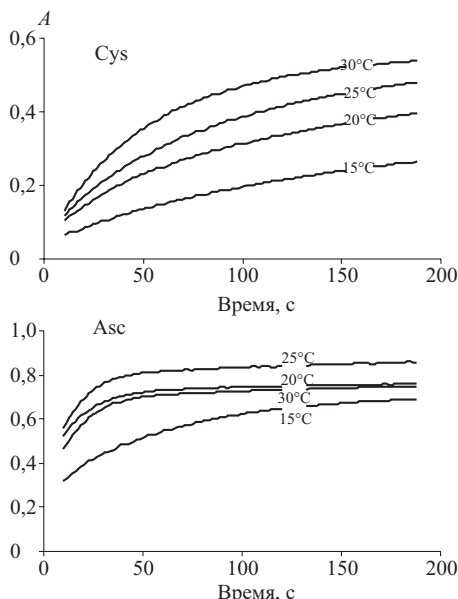


Рис. 9. Влияние температуры (A) на кинетику оптического поглощения реакционных смесей Cys и Asc с $\text{Fe}[\text{Phen}]_3^{3+}$ в рамках ДСМ (рН 6,0) ($[\text{Fe}(\text{III})] = 3,71 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{Asc}] = [\text{Cys}] = 3 \text{ ppm}$).

хиометрию последовательных реакций; и k_1, k_2 — константы скорости реакций псевдопервого порядка (предполагается, что $\text{Fe}[\text{Phen}]_3^{3+}$ присутствует в избытке). Как видно из данных представленных на рис. 5, экспериментальная кинетическая кривая для Asc очень хорошо описывается уравнением (5) с коэффициентами, определенными путем подгонки: $k_1 = 0,1376 \text{ c}^{-1}$; $k_2 = 0,0003 \text{ c}^{-1}$; $m = 1$; $n = 1$.

Влияние экспериментальных параметров. Параметры Asc(Cys) – Fe(III) – Phen систем были оптимизированы путем вариации каждой переменной при фиксированных значениях всех остальных. В случае ДСМ оптимальные значения параметров соответствовали максимальному различию констант скорости реакций с участием Asc и Cys при нулевом (или почти нулевом) порядке реакции по рассматриваемой переменной. При анализе экспериментальных условий параметрами оптимизации служили скорости реакций окисления Asc и Cys определенные в интервалах времени реакции $t = 12 - 14$ и $100 - 120 \text{ c}$ (r_1 и r_2 , соответственно). Это важное условие для одновременного определения ком-

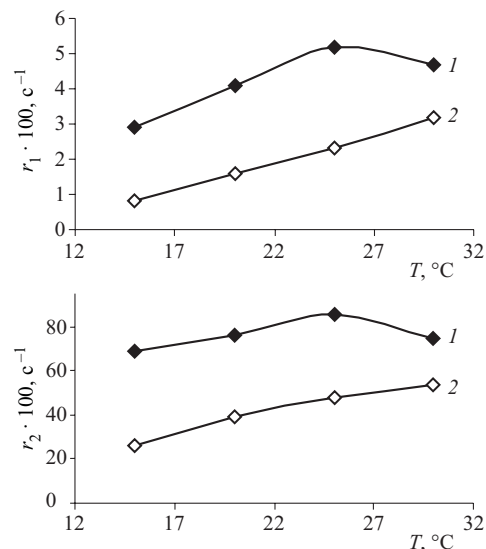


Рис. 10. Влияние температуры на скорости r_1 и r_2 определенные для реакции Asc (1) и Cys (2) с $\text{Fe}[\text{Phen}]_3^{3+}$ в рамках ДСМ (рН 6,0 и 7,0) ($[\text{Fe}(\text{III})] = 3,71 \cdot 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{Asc}] = [\text{Cys}] = 3 \text{ ppm}$).

понентов на основе измерений кинетики последовательных реакций, так как поведение одного из компонентов описывается не одной константой скорости реакции, а двумя такими параметрами.

Влияние концентрации Fe(III) на скорости окисления Asc и Cys исследовали в интервале от $1,24 \cdot 10^{-5}$ до $1,24 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Как видно из экспериментальных данных, представленных на рис. 6, величина r_1 для Asc и Cys, изменяется почти одинаковым образом, тогда как поведение r_2 в этих двух случаях различно. Наибольшее различие между r_1 и r_2 наблюдалось при $[\text{Fe}(\text{III})] = 3,7 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Это значение и было выбрано в качестве оптимальной концентрации при анализе Asc и Cys двумя рассматриваемыми методами (ДСМ и ДКМ).

Влияние рН среды на взаимодействие Fe(III) с Asc и Cys исследовали в интервале рН 4,0 – 8,0 (значения в области 8,0 были неустойчивы, так как железо(III) присутствовало в форме гидроокиси). Как видно из экспериментальных данных, представленных на рис. 7, только аскорбиновая кислота (Asc) взаимодействовала с Fe(III) в течение первых 100 с после смешивания реагентов при рН < 7,0 (сигнал от Cys оставался постоянным), тогда как при рН 7,0 и 8,0 в реакции принимали участие как Asc, так и Cys. Поэтому оптимальными значениями рН среды для первого и второго измерения кинетики в ДКМ были выбраны рН 6,0 и 7,0, соответственно. В условиях ДСМ изменение рН среды в интервале рН 4,0 – 8,0 также существенно влияет на поведение Asc и Cys. Как видно из экспериментальных данных, представленных на рис. 8, наибольшее различие между r_1 и r_2 наблюдалось при значении рН 6,0, которое и было использовано при измерениях.

Влияние температуры на скорости окисления Asc и Cys исследовали в интервале от 15 до 30°C (рис. 9). Было установлено, что повышение температуры в этом интервале приводит к увеличению как r_1 , так и r_2 . Для Asc r_1 и r_2 были максимальны при $T = 25^\circ\text{C}$. Эта температура и была выбрана в качестве оптимальной, так как при этом различия r_1 и r_2 также велики. При температу-

Таблица 5

Влияние восстанавливающих соединений и некоторых витаминов на результаты анализа растворов, содержащих 2 ppm Asc и 4 ppm Cys

Добавка	Допустимая концентрация* (ppm) при определении	
	Cys	Asc
Сахароза, глюкоза, фруктоза	> 2000	> 2000
Витамин В ₁	800	1000
Витамин В ₀	150	100
Витамин В ₂	100	75
Витамин В ₆	35	20
Хлористый аммоний	10	100
Ацетилцистеин	–	3

Результаты одновременного определения Cys и Asc в реальных образцах с использованием ДСМ и ДКМ

Препарат	Содержание, мг (согласно сертификату производителя)		Добавлено, мг		Найдено, мг			
	Cys	Asc	Cys	Asc	ДСМ		ДКМ	
					Cys	Asc	Cys	Asc
Витамин С *	–	250	–	–	–	255	–	258
	–	250	300	–	310	261	307	258
Сыворотка **	25	–	–	–	26	–	26	–
	25	–	330	–	359	–	360	–
	25	–	300	300	328	302	327	304

* Osvesh Co. (Tehran, Iran);

** Darou Pakhsh Co. (Tehran, Iran).

рах выше 25°C скорость реакции Fe(III) с Asc уменьшается (рис. 10).

Определение Asc и Cys в смесях с помощью ДСМ.

На основании измерений кинетики оптического поглощения и определения значений r_1 и r_2 концентрации Asc и Cys вычисляли с помощью уравнений пропорциональных скоростей реакций. Каждое соотношение для одной из скоростей дополняли линейными калибровочными уравнениями для двух определяемых веществ при той же скорости реакции.

Калибровочная кривая для каждого из двух веществ была построена по экспериментальным данным для серии из 10 стандартных растворов с концентрациями от 0,5 до 5,0 ppm, измеренных при вышеуказанных оптимальных условиях. Коэффициенты линейных калибровочных уравнений были определены с использованием скоростей реакций, измеренных в интервалах времени $t = 12 - 14$ и $100 - 120$ с, путем регрессии по отношению к начальным концентрациям. Характеристики калибровочных кривых для ДСМ приведены в табл. 2. На основании этих параметров одновременное определение содержания Asc и Cys [ppm] в смесях производится с помощью следующих уравнений:

$$r_1 = 0,0325[\text{Cys}] + 0,1276 [\text{Asc}] + 0,0252, \quad (6)$$

$$r_2 = 0,0073[\text{Cys}] + 0,0003. \quad (7)$$

Следует отметить, что, по данным экспериментальной статистики (см. табл. 1), вклад Asc в постоянный член уравнения для r_2 равен нулю. Это означает, что сначала можно определить содержание Cys непосредственно по результатам измерения r_2 , а затем определить содержание Asc по данным для r_1 .

Определение Asc и Cys в смесях с помощью ДКМ.

Калибровочные кривые для Asc и Cys строили на основании результатов измерений для серии стандартных растворов при оптимальных условиях. Характеристики этих калибровочных кривых для ДКМ приведены в табл. 3. Как видно из этих данных, ДКМ можно использовать для раздельного определения Asc и Cys в интервалах их концентраций 0,5 – 5,0 и 0,5 – 6,0 ppm, соответственно. Результаты отдельных измерений показывают, что Asc и Cys не оказывают взаимного влияния (нет синергетического эффекта). На основании данных табл. 3 одновременное определение содержания Asc и

Cys [ppm] в смесях производится с помощью следующих уравнений:

$$A_1 = 0,0766 + 0,0691[\text{Asc}], \quad (8)$$

$$A_2 = 0,0522 + 0,0877[\text{Asc}] + 0,0513[\text{Cys}], \quad (9)$$

где A_1 и A_2 — значения оптического поглощения после 100 с реакции в первом и втором измерении, соответственно.

На основании измерений кинетики оптического поглощения и определения значений r_1 и r_2 концентрации вычисляли с помощью уравнений пропорциональных скоростей реакций. Каждое соотношение для одной из скоростей дополняли линейными калибровочными уравнениями для двух определяемых веществ при той же скорости реакции.

Для проверки разработанных методов процедуры ДСМ и ДКМ были использованы для анализа серии модельных растворов с известным содержанием Asc и Cys. Как видно из данных представленных в табл. 4, абсолютные стандартные ошибки (*RMSEP*) определения Cys и Asc двумя методами (ДСМ, ДКМ) в указанном интервале концентраций были равны 0,121, 0,120 и 0,131, 0,303, а относительные стандартные ошибки (*REP*) составили 5,15, 5,12 % и 5,18, 11,98 %, соответственно. Важный вывод из этих результатов состоит в том, что в сравнении ни один из двух методов не имеет существенных преимуществ перед другим. Таким образом, ДСМ и ДКМ обладают примерно одинаковой способностью предсказывать концентрации двух компонентов в неизвестных смесях.

Влияние добавок. Было исследовано влияние ряда возможных сопутствующих соединений на результаты определения Cys и Asc с помощью ДСМ и ДКМ. Для этого в раствор, содержащий 2,0 ppm Asc и 4,0 ppm Cys, вводили различные количества каждой добавки, начиная с 2000 ppm. Допустимым пределом считали такое количество примеси, при котором ошибка в определении концентраций Cys и Asc не превышала ± 5 %. Данные о допустимых пределах содержания различных примесей приведены в табл. 5.

Анализ реальных образцов. Для оценки применимости ДСМ и ДКМ на практике эти методы были использованы для анализа промышленных и модифицированных образцов витамина С в таблетках (Osvesh Co.,

Tehran, Iran) и образцов сыворотки (Darou Pakhsh Co., Tehran, Iran). Образцы готовили и исследовали, как описано в экспериментальной части. Результаты анализов в сравнении с данными производителей представлены в табл. 6. Как видно из этих данных, разработанные методы обеспечивают определение Cys и Asc в сложных матрицах с высокой точностью.

Предлагаемые методы в сравнении с другими известными подходами проще в реализации и обеспечивают быстрое определение Cys и Asc в реальных и модифицированных растворах с высокой селективностью и точностью. ДСМ и ДКМ характеризуются примерно одинаковой точностью (*RMSEP* и *REP*). Результаты данного исследования показали, что взаимодействие в системе Cys – Fe(III) – Phen соответствует простой реакции первого порядка, а в системе Asc – Fe(III) – Phen протекают две последовательных реакции первого порядка. Анализ кинетики оптического поглощения в рамках ДСМ и ДКМ (путем подгонки кривых по методу наименьших квадратов с помощью программы SOLVER из пакета MICROSOFT EXCEL) позволил определить порядки и эффективные константы скоростей этих реакций.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. F. Mallette, C. O. Clagett, A. T. Philips, and R. L. McCarl, *Introductory Biochemistry*, Williams & Wilkins Co., Baltimore (MD).
2. J. C. B. Fernandes, G. O. Neto, L. T. Kubota, *Anal. Chim. Acta.*, **366**, 11 (1998).
3. Y.-H. Peggy Hsieh and Yuch Ping Hsieh, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 1569 – 1573 (2000).
4. L. A. Pachla, D. L. Reynolds, and P. T. Kissinger, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 1 (1985).
5. S. P. Arya, M. Mahjan, and P. Jain, *Anal. Sci.*, **14**, 889 (1998).
6. S. P. Arya, M. Mahjan, and P. Jain, *Anal. Chim. Acta.*, **417**, 1 (2000).
7. N. Teshima, T. Nobuta, and T. Sakai, *Anal. Chim. Acta.*, **438**, 21 – 29 (2001).
8. S. Wang and D. Du, *Sensors*, **2**, 41 – 49 (2002).
9. J. Gao, H. Yang, X. Liu, et al., *Talanta*, **55**, 99 – 107 (2001).
10. E. Tütem and R. Apak, *Anal. Chim. Acta*, **255**, 121 – 125 (1991).
11. A. Cardoso, M. Silva, and D. Perez-Bendito, *Talanta*, **36**, 963 – 965 (1989).
12. M. Tabata and H. Morita, *Talanta*, **44**, 151 – 157 (1997).
13. H. Takagi, N. Awano, Sh. Kobayashi, et al., *FEMS Microb. Lett.*, **179**, 453 (1999).
14. R. Wang, Z. Liu, R. Cai, and X. Li, *Anal. Sci.*, **18**, 977 (2002).
15. J. Lykkesfeldt, *Anal. Biol. Chem.*, **282**, 89 (2000).
16. H. M. Sorouraddin, A. Hibara, M. A. Proskurnin, and T. Kitamori, *Anal. Sci.*, **16**, 1033 (2000).
17. M. Rutkowski, K. Grzegorzczuk, and J. Greger, *Z. Naturforsch.*, **57c**, 1062 (2002).
18. N. Teshima, T. Nobuta, and T. Sakai, *Anal. Chim. Acta*, **438**, 21 (2001).
19. J. Ghasemi, H. R. Seraji, M. Noroozi, et al., *Anal. Lett.*, **37**, 747 (2004).
20. S. F. Wang and D. Du, *Sens. Actuat. B. Chem.*, **97**, 373 (2004).
21. H. Iwase, I. Ono, *J. Chromatogr. A*, **654**, 215 (1993).
22. R. Sarwin, G. Laskawy, and W. Grosch, *Cer. Chem.*, **70**, 553 (1993).
23. D. Perez-Bendito and M. Silva, *Kinetic Methods in Analytical Chemistry*, Ellis Horwood, Chichester (1986).
24. H. A. Mottola, *Kinetic Aspect of Analytical Chemistry*, Wiley, New York (1988).
25. Y. S. Hsieh and S. R. Crouch, *Anal. Chim. Acta.*, **296**, 333 (1994).
26. X. Wu and R. Cai, *Anal. Chim. Acta.*, **464**, 153 (2002).
27. X. Wu and R. Cai, *Anal. Chim. Acta.*, **448**, 257 (2001).
28. M. Gui and S. C. Rutan, *Anal. Chem.*, **66**, 1513 (1994).
29. A. Afkhami and A. R. Zarei, *Talanta*, **53**, 815 – 820 (2001).
30. A. Afkhami, T. Madrakian, and A. R. Zarei, *Anal. Sci.*, **17**, 1199 (2001).
31. L. Ballesteros and D. Pérez-Bendito, *Anal. Chim. Acta*, **182**, 213 (1986).
32. A. Papanastasiou-Diamandi, P. A. Siskos, and T. P. Hadjiioannou, *Anal. Chim. Acta*, **157**, 125 (1984).
33. H. Bundgaard, *Int. J. Pharm.*, **5**, 257 (1980).

Поступила 25.11.04

APPLICATION AND COMPARISON OF TWO-RATE AND DIFFERENTIAL KINETIC METHODS IN SIMULTANEOUS SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF ASCORBIC ACID AND L-CYSTEINE IN PHARMACEUTICAL SAMPLES

J. Ghasemi and S. Nayebi

Chemistry Department, Faculty of Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran

Two methods for the simultaneous determination of ascorbic acid (Asc) and L-cysteine (Cys) from kinetic spectrophotometric data are applied and compared. The first is the two-rate method (TRM), and the second, the differential kinetic method (DKM). Present in an excess amount, iron(III) is quantitatively reduced by Asc or Cys to iron(II) that, in turn, interacts with phenanthroline (Phen) to form a colored product, iron(II) – Phen complex possessing a maximum absorbance at $\lambda_{\max} = 510$ nm. The first method is based on the measurement of reaction rates at two points in the course of successive reactions, and the second method is based on the difference in kinetics of the Asc and Cys oxidation reactions at different pH values. Both oxidation reactions have been studied by fitting the kinetic curves (absorbance versus time) with suitable reaction rate equations. It is established that the Cys + Fe(III) reaction obeys a simple first order kinetics, while the Asc + Fe(III) is a successive two-step process. Under conditions studied, both Asc and Cys are determined in the 0,5 – 5,0 ppm range with satisfactory accuracy. The two methods under consideration have been successfully used for the analysis of model and real samples. The RMSEP values for the determination of Cys and AA by the two kinetic methods (TRM, DKM) are 0,121, 0,120 and 0,131, 0,303 and the corresponding REP values are 5,15, 5,12 % and 5,18, 11,98 %, respectively.