

УДК 543.42.062:547.466

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ И АМИНОКИСЛОТ ПРИ СОВМЕСТНОМ ПРИСУТСТВИИ

Н.Я.Мокшина, Р.В.Савушкин, В.Ф.Селеменов, В.Ю.Хохлов
Воронежский государственный университет, химический факультет
394006, Воронеж, Университетская пл., 1,
vlad@chem.vsu.ru

Поступила в редакцию 26 ноября 2004 г.

Аскорбиновая кислота совместно с ароматическими аминокислотами входит в состав фармацевтических препаратов, пищевых добавок, продуктов питания. Поэтому контроль качества препаратов, содержащих аскорбиновую кислоту, представляет актуальную аналитическую задачу. Разработана методика раздельного определения аскорбиновой кислоты и ароматических аминокислот в смесях с применением метода Фирордта.

Мокшина Надежда Яковлевна – к.х.н., асс. кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета. Ученый секретарь комиссии по истории и методологии аналитической химии Научного Совета по аналитической химии РАН.

Область научных интересов – экстракция биологически активных веществ и спектральные методы их определения.

Автор 95 публикаций.

Селеменов Владимир Федорович – д.х.н., профессор, зав.кафедрой аналитической химии Воронежского государственного университета.

Область научных интересов – процессы разделения и концентрирования биологически активных веществ.

Автор более 600 публикаций.

Хохлов Владимир Юрьевич – к.х.н., доцент кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета. Член комиссии по истории и методологии аналитической химии Научного Совета по аналитической химии РАН.

Область научных интересов – сорбция биологически активных веществ, хроматографические методы разделения аминокислот.

Автор более 100 публикаций.

Савушкин Роман Валерьевич – соискатель кафедры аналитической химии ВГУ.

Аскорбиновая кислота легко образует комплексы с аминокислотами типа аммонийных солей. Многие из этих соединений обладают ценными биологическими свойствами и применяются как лечебные препараты [1]. Чувствительные физико-химические методы, в том числе спектральные, целесообразно применять при анализе готовых лекарственных форм, когда содержание определяемого компонента не выше 1%. При этом ошибка определения удовлетворяет необходимым требованиям и не превышает ошибку классических титриметрических методов.

Известно несколько спектрофотометрических методик определения аскорбиновой кислоты в водных растворах и фармпрепаратах [2,3]. Для определения ароматических аминокислот при совместном присутствии в растворе применяется метод Фирордта [4, 5]. Методика позволяет определять аминокислоты в двух- и трехкомпонентных смесях в лабораторных и производственных условиях.

Цель исследования – разработка точной и экспрессной методики селективного определения аскорбиновой кислоты и ароматических аминокислот при их совместном присутствии в растворах. Методика основана на соблюдении закона светопоглощения Бугера-Ламберта-Бера и принципа аддитивности оптических плотностей, не предусматривает применения вспомогательных реагентов.

Экспериментальная часть

Применяли L-аскорбиновую кислоту, фенилаланин, тирозин и триптофан квалификации ч.д.а. Спектры поглощения регистрировали на приборе Specord M40 в кварцевых кюветках ($l=1$ см). Предварительно установлены характеристические длины волн индивидуальных аминокислот и аскорбиновой кислоты. Они составляют 257, 275, 279 и 265 нм для фенилаланина, тирозина, триптофана и аскорбиновой кислоты соответственно.

Модельные растворы готовили растворением точных навесок аскорбиновой кислоты и аминокислот в бидистилляте. Водные растворы L-аскорбиновой кислоты бесцветны и не поглощают в видимой области спектра, но при нейтральных значениях pH в спектре поглощения наблюдается сильный сигнал при 265 нм. Поэтому эксперимент проводили при $\text{pH} \approx 7$ (контроль по универсальному иону ЭВ-74).

Результаты и их обсуждение

Установлено, что спектры поглощения индивидуальных аминокислот и аскорбиновой кислоты перекрываются (см. рисунок).

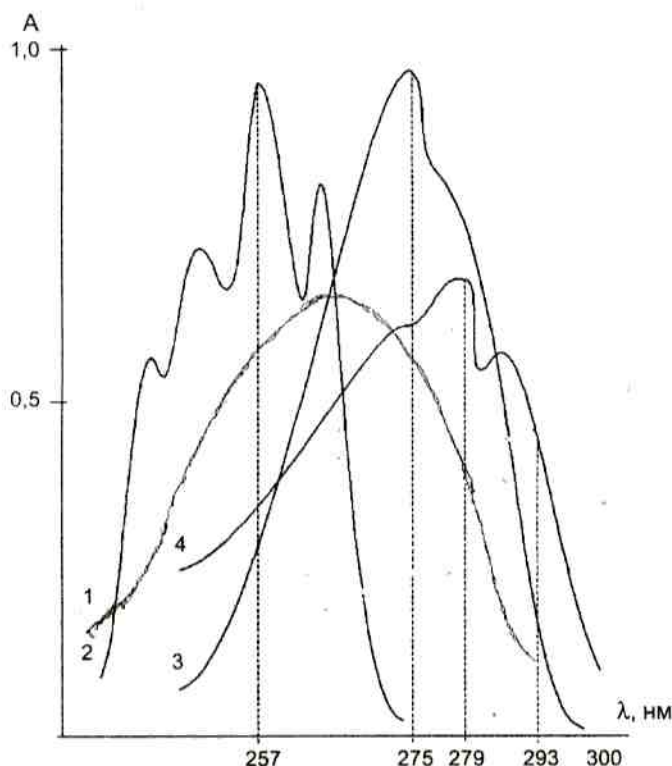


Рис. Спектры поглощения аскорбиновой кислоты (1), фенилаланина (2), тирозина (3), триптофана (4)

Это делает невозможным их раздельное определение по поглощению в УФ-области с применением градуировочного графика. При соблюдении основного закона светопоглощения для обоих

компонентов и принципа аддитивности для их смеси для определения индивидуальных веществ применим метод Фирордта.

Молярные коэффициенты светопоглощения компонентов находили по градуировочным графикам, построенным для определения каждой аминокислоты при собственной длине волны и длине волны аскорбиновой кислоты. В таблице приведены значения ϵ для аскорбиновой кислоты и ароматических аминокислот при выбранных длинах волн.

Таблица

Молярные коэффициенты светопоглощения аскорбиновой кислоты (1), триптофана (2), тирозина (3) и фенилаланина (4) при выбранных длинах волн.

λ , нм	ϵ_1	ϵ_2	ϵ_3	ϵ_4
257	9582,70	-	-	168,90
265	11992,94	3673,46	731,80	75,42
275	5463,51	-	1325,80	-
279	7930,91	5121,70	-	-

Метод Фирордта применим, если при двух длинах волн наблюдается значительное различие в интенсивности поглощения обоих компонентов [6].

Концентрацию индивидуальных компонентов смеси рассчитывали по формулам [6,7]:

$$C_1 = \alpha_1 \cdot A_1 - \beta_1 \cdot A_2; \quad C_2 = \alpha_2 \cdot A_2 - \beta_2 \cdot A_1.$$

Предварительно вычисляли коэффициенты α и β :

$$\alpha_1 = \frac{\epsilon_2^{\lambda_2}}{\Delta}; \quad \alpha_2 = \frac{\epsilon_1^{\lambda_1}}{\Delta}; \quad \beta_1 = \frac{\epsilon_2^{\lambda_1}}{\Delta}; \quad \beta_2 = \frac{\epsilon_1^{\lambda_2}}{\Delta};$$

$$\Delta = \epsilon_1^{\lambda_1} \cdot \epsilon_2^{\lambda_2} - \epsilon_2^{\lambda_1} \cdot \epsilon_1^{\lambda_2}.$$

где $\epsilon_1^{\lambda_1}$ и $\epsilon_2^{\lambda_1}$ - молярные коэффициенты поглощения одного и второго компонентов при длине волны λ_1 ; $\epsilon_1^{\lambda_2}$ и $\epsilon_2^{\lambda_2}$ - молярные коэффициенты поглощения одного и второго компонентов при длине волны λ_2 ; A_1 и A_2 - оптические плотности смесей соответственно при длинах волн λ_1 и λ_2 .

В соответствии с найденными коэффициентами молярные концентрации аскорбиновой кислоты и аминокислот в анализируемых смесях рассчитывали по формулам: система аскорбиновая кислота (1) - триптофан (2)

$$C_1 = 1,586 \cdot 10^{-4} \cdot A_1 - 1,138 \cdot 10^{-4} \cdot A_2,$$

$$C_2 = 3,714 \cdot 10^{-4} \cdot A_2 - 2,456 \cdot 10^{-4} \cdot A_1;$$

система аскорбиновая кислота (1) - тирозин (2)

$$C_1 = 1,113 \cdot 10^{-4} \cdot A_1 - 0,614 \cdot 10^{-4} \cdot A_2,$$

$$C_2 = 10,076 \cdot 10^{-4} \cdot A_2 - 4,590 \cdot 10^{-4} \cdot A_1;$$

система аскорбиновая кислота (1)–фенилаланин(2)

$$C_1 = 1,550 \cdot 10^{-4} \cdot A_1 - 1,042 \cdot 10^{-4} \cdot A_2,$$

$$C_2 = 1,974 \cdot 10^{-2} \cdot A_2 - 1,609 \cdot 10^{-2} \cdot A_1.$$

Для расчета концентраций компонентов в трехкомпонентной смеси методом Фирордта находили определители и составляли соответствующие уравнения:

1. Система аскорбиновая кислота – тирозин – фенилаланин:

$$\Delta_1 = \begin{vmatrix} \epsilon_{\text{ф}}^{257} & \epsilon_{\text{аск}}^{257} & \epsilon_{\text{тир}}^{257} \\ \epsilon_{\text{ф}}^{265} & \epsilon_{\text{аск}}^{265} & \epsilon_{\text{тир}}^{265} \\ \epsilon_{\text{ф}}^{275} & \epsilon_{\text{аск}}^{275} & \epsilon_{\text{тир}}^{275} \end{vmatrix} \quad \Delta_{\text{фен}} = \begin{vmatrix} \epsilon_{\text{ф}}^{257} & \epsilon_{\text{аск}}^{257} & \epsilon_{\text{тир}}^{257} \\ \epsilon_{\text{ф}}^{265} & \epsilon_{\text{аск}}^{265} & \epsilon_{\text{тир}}^{265} \\ \epsilon_{\text{ф}}^{275} & \epsilon_{\text{аск}}^{275} & \epsilon_{\text{тир}}^{275} \end{vmatrix}$$

$$\Delta_{\text{аск}} = \begin{vmatrix} \epsilon_{\text{ф}}^{257} & A^{257} & \epsilon_{\text{тир}}^{257} \\ \epsilon_{\text{ф}}^{265} & A^{265} & \epsilon_{\text{тир}}^{265} \\ \epsilon_{\text{ф}}^{275} & A^{275} & \epsilon_{\text{тир}}^{275} \end{vmatrix} \quad \Delta_{\text{тир}} = \begin{vmatrix} \epsilon_{\text{ф}}^{257} & \epsilon_{\text{аск}}^{257} & A^{257} \\ \epsilon_{\text{ф}}^{265} & \epsilon_{\text{аск}}^{265} & A^{265} \\ \epsilon_{\text{ф}}^{275} & \epsilon_{\text{аск}}^{275} & A^{275} \end{vmatrix}$$

$$C_{\text{фен}} = 0,0092 A^{257} - 0,0076 A^{265} + 0,0004 A^{275},$$

$$C_{\text{аск}} = -0,00006 A^{257} + 0,0002 A^{265} - 0,00006 A^{275},$$

$$C_{\text{тир}} = 0,0001 A^{257} - 0,0005 A^{265} + 0,001 A^{275};$$

2. Система фенилаланин – аскорбиновая кислота – триптофан

$$\Delta_1 = \begin{vmatrix} \epsilon_{\text{ф}}^{257} & \epsilon_{\text{аск}}^{257} & \epsilon_{\text{тр}}^{257} \\ \epsilon_{\text{ф}}^{265} & \epsilon_{\text{аск}}^{265} & \epsilon_{\text{тр}}^{265} \\ \epsilon_{\text{ф}}^{279} & \epsilon_{\text{аск}}^{279} & \epsilon_{\text{тр}}^{279} \end{vmatrix} \quad \Delta_{\text{фен}} = \begin{vmatrix} \epsilon_{\text{ф}}^{257} & \epsilon_{\text{аск}}^{257} & \epsilon_{\text{тр}}^{257} \\ \epsilon_{\text{ф}}^{265} & \epsilon_{\text{аск}}^{265} & \epsilon_{\text{тр}}^{265} \\ \epsilon_{\text{ф}}^{279} & \epsilon_{\text{аск}}^{279} & \epsilon_{\text{тр}}^{279} \end{vmatrix}$$

- Надточий М.А. Получение аскорбиновой кислоты из диацетон-2-кето-б-гулоновой кислоты / М.А. Надточий, Т.А. Мелентьева // Хим.-фарм. журн. 2001. Т.35, №9. С.49-50.
- Витамины / Под ред. М.И.Смирнова. М.: Медицина, 1974. 547 с.
- Запорожец О.А. Определение аскорбиновой кислоты методом молекулярной спектроскопии / О.А.Запорожец, Е.А. Крушинская // Журн. аналит. химии. 2002. Т.57, №4. С.343-354.
- Селеменов В.Ф. Спектрофотометрическое определение фенилаланина и тирозина / В.Ф. Селеменов, В.Ю. Хохлов, Н.Я. Коренман и др. // Журн. аналит. химии. 1994. Т.49, №4. С.446-447.

$$\Delta_{\text{аск}} = \begin{vmatrix} \epsilon_{\text{ф}}^{257} & A^{257} & \epsilon_{\text{тр}}^{257} \\ \epsilon_{\text{ф}}^{265} & A^{265} & \epsilon_{\text{тр}}^{265} \\ \epsilon_{\text{ф}}^{279} & A^{279} & \epsilon_{\text{тр}}^{279} \end{vmatrix} \quad \Delta_{\text{тр}} = \begin{vmatrix} \epsilon_{\text{ф}}^{257} & \epsilon_{\text{аск}}^{257} & A^{257} \\ \epsilon_{\text{ф}}^{265} & \epsilon_{\text{аск}}^{265} & A^{265} \\ \epsilon_{\text{ф}}^{279} & \epsilon_{\text{аск}}^{279} & A^{279} \end{vmatrix}$$

$$C_{\text{фен}} = 0,0102 A^{257} - 0,0098 A^{265} + 0,0025 A^{279},$$

$$C_{\text{аск}} = -0,0001 A^{257} + 0,0003 A^{265} - 0,0001 A^{279},$$

$$C_{\text{тир}} = 0,0002 A^{257} - 0,0004 A^{265} + 0,0004 A^{279};$$

3. Система аскорбиновая кислота – тирозин – триптофан

$$\Delta_3 = \begin{vmatrix} \epsilon_{\text{аск}}^{265} & \epsilon_{\text{тир}}^{265} & \epsilon_{\text{тр}}^{265} \\ \epsilon_{\text{аск}}^{275} & \epsilon_{\text{тир}}^{275} & \epsilon_{\text{тр}}^{275} \\ \epsilon_{\text{аск}}^{279} & \epsilon_{\text{тир}}^{279} & \epsilon_{\text{тр}}^{279} \end{vmatrix} \quad \Delta_{\text{аск}} = \begin{vmatrix} A^{265} & \epsilon_{\text{тир}}^{265} & \epsilon_{\text{тр}}^{265} \\ A^{275} & \epsilon_{\text{тир}}^{275} & \epsilon_{\text{тр}}^{275} \\ A^{279} & \epsilon_{\text{тир}}^{279} & \epsilon_{\text{тр}}^{279} \end{vmatrix}$$

$$\Delta_{\text{тир}} = \begin{vmatrix} \epsilon_{\text{аск}}^{265} & \epsilon_{\text{тир}}^{265} & \epsilon_{\text{тр}}^{265} \\ \epsilon_{\text{аск}}^{275} & \epsilon_{\text{тир}}^{275} & \epsilon_{\text{тр}}^{275} \\ \epsilon_{\text{аск}}^{279} & \epsilon_{\text{тир}}^{279} & \epsilon_{\text{тр}}^{279} \end{vmatrix} \quad \Delta_{\text{тр}} = \begin{vmatrix} \epsilon_{\text{аск}}^{265} & \epsilon_{\text{тир}}^{265} & A^{265} \\ \epsilon_{\text{аск}}^{275} & \epsilon_{\text{тир}}^{275} & A^{275} \\ \epsilon_{\text{аск}}^{279} & \epsilon_{\text{тир}}^{279} & A^{279} \end{vmatrix}$$

$$C_{\text{аск}} = 0,0006 A^{265} + 0,0002 A^{275} - 0,0006 A^{279},$$

$$C_{\text{тир}} = 0,0053 A^{265} + 0,0158 A^{275} - 0,0188 A^{279},$$

$$C_{\text{тр}} = -0,002 A^{265} - 0,0039 A^{275} + 0,0058 A^{279};$$

Минимальная определяемая концентрация аскорбиновой кислоты $1,14 \cdot 10^{-5}$ М. Погрешность определения аминокислот в смеси с аскорбиновой кислотой методом Фирордта не превышает 6 %, аскорбиновой кислоты – 8 %. Предложенная методика отдельного определения компонентов применима в лабораторных и производственных условиях.

ЛИТЕРАТУРА

- Надточий М.А. Получение аскорбиновой кислоты из диацетон-2-кето-б-гулоновой кислоты / М.А. Надточий, Т.А. Мелентьева // Хим.-фарм. журн. 2001. Т.35, №9. С.49-50.
- Витамины / Под ред. М.И.Смирнова. М.: Медицина, 1974. 547 с.
- Запорожец О.А. Определение аскорбиновой кислоты методом молекулярной спектроскопии / О.А.Запорожец, Е.А. Крушинская // Журн. аналит. химии. 2002. Т.57, №4. С.343-354.
- Селеменов В.Ф. Спектрофотометрическое определение фенилаланина и тирозина / В.Ф. Селеменов, В.Ю. Хохлов, Н.Я. Коренман и др. // Журн. аналит. химии. 1994. Т.49, №4. С.446-447.
- Казначеев А.В. Спектрофотометрическое определение ароматических и гетероциклических аминокислот в их смесях / А.В.Казначеев, Н.Я.Мокшина, В.Ф.Селеменов и др. // Журн. аналит. химии. 2000. Т.55, №4. С.375-377.
- Беликов В.Г. Фармацевтическая химия. I. Общая фармацевтическая химия. М.: Высш. шк., 1993. 432 с.
- Берштейн И.Я. Спектрофотометрический анализ в органической химии / И.Я. Берштейн, Ю.Л. Каминский. Л.: Химия, 1981. 198 с.

* * * * *

DETERMINATION OF ASCORBIC ACID AND AMINO ACIDS BY METHOD OF UV-SPECTROSCOPY
N.Ya.Mokshina, R.V.Savushkin, V.F.Selemenev, V.Yu.Khokhlov

Ascorbic acid and aromatic amino acids are components of the medicines, the alimentary components, products of power supply. Therefore, quality control of substances, containing of ascorbic acid is very important analytical problem. Method of separate determination of ascorbic acid and aromatic amino acids was suggested.