

Simultaneous Kinetic Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid and Cysteine with an Optical Probe by Mean Centering of Ratio Kinetic Profiles Method

A.B. Vishnikin^{††}, Yu.V. Miekh[†], Ya.R. Bazel[‡], M.E.A. Al-Shwaiyat[§], G.O. Petrushina[¶]

[†] Department of Analytical Chemistry, Chemical Faculty, Oles Honchar Dnipro National University, Gagarin Ave., 72, Dnipro, 49010, Ukraine; *e-mail: vishnikin@hotmail.com

[‡] Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, P.J. Šafarik University, Košice, 01454, Slovak Republic;

[§] Department of Basic and Applied Science, Zarka University College, Al-Balqa Applied University, Zarka St. 30, Al-Salt, 19117, Jordan;

[¶] Dnipro State Agrarian and Economic University, Sergii Yefremov str., 25, Dnipro, 49600, Ukraine

Received: September 15, 2019; Accepted: October 15, 2019

DOI: 10.17721/moca.2019.163-170

A procedure for simultaneous kinetic analysis of a binary mixture of ascorbic acid (Asc) and cysteine (Cys) was developed using the method of mean centering of ratio kinetic profiles. The method is based on the difference in the rate of reactions of Asc and Cys with the complex of iron(III) with o-phenanthroline at pH 7.05. The use of an optical probe simplifies the carrying out of kinetic measurements, allows to obtain highly reproducible ($S_r = 0.01-0.02$) results, and significantly reduces the time of analysis. The method of mean centering of ratio kinetic profiles is superior to the H-Point standard addition method, since it does not require such a long measurement time and there is no restriction on the constancy of absorbance of one of the components. Asc and Cys can be determined in the concentration range from 1 to 10 mg/L. The method was successfully used to determine Asc and Cys in dietary supplements.

Keywords: spectrophotometry, optical probe, method of mean centering of ratio kinetic profiles, ascorbic acid, cysteine

Одночасне кінетичне спектрофотометричне визначення аскорбінової кислоти та цистеїну з оптичним зондом методом усередненого центрування відношення кінетичних профілів

A.B. Вишнікін^{††}, Ю.В. Мєх[†], Я.Р. Базель[‡], М.Е.А. Аль-Швейят[§], Г.О. Петрушина[¶]

[†] Кафедра аналітичної хімії, Хімічний факультет, Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, просп. Гагаріна, 72, Дніпро, 49010, Україна; *e-mail: vishnikin@hotmail.com

[‡] Кафедра аналітичної хімії, Факультет науки, Університет П.Й. Шафарика, Кошице, 01454, Словацька Республіка

[§] Коледж Університету Зарка, Прикладний університет Аль-Балька, вул. Зарка, 30, Аль-Солт, 19117, Йорданія

[¶] Дніпровський державний аграрно-економічний університет, вул. Сергія Єфремова, 25, Дніпро, 49600, Україна

Надійшла: 15 вересня 2019 р; Прийнята: 15 жовтня 2019 р

DOI: 10.17721/moca.2019.163-170

Розроблено методіку одночасного кінетичного аналізу бінарної суміші аскорбінової кислоти (Asc) і цистеїну (Cys) з використанням методу усередненого центрування відношення кінетичних профілів. Методика ґрунтується на різниці швидкостей реакцій Asc і Cys з комплексом феруму(III) з о-фенантроліном при рН 7.05. Використання оптичного зонду спрощує виконання кінетичних вимірювань, дозволяє отримати високопрецизійні ($S_r = 0.01-0.02$) результати, значно зменшується час аналізу. Метод усередненого центрування переважає метод багатократних стандартних добавок H-Point, оскільки не потребує такої кількості довготривалих вимірювань, в ньому відсутні обмеження щодо незмінності світлопоглинання одного з компонентів. Asc і Cys можуть бути визначені у діапазоні концентрацій від 1 до 10 мг/л. Метод успішно використано для визначення Asc та Cys в біологічно активних добавках.

Ключові слова: спектрофотометрія, оптичний зонд, метод усередненого центрування відношення кінетичних профілів, аскорбінова кислота, цистеїн

В останні два десятиліття класичні графічні методи одночасного кінетичного визначення компонентів у суміші поступилися своїм місцем новим розрахунковим методам [1], які можуть бути застосовані до набагато більшої кількості систем, простіші в освоєнні і застосуванні, мають мінімальну кількість обмежень. Прогресу в цій області сприяє розвиток наукової апаратури і математичних методів обробки експериментальних даних. З використанням сучасних спектрофотометрів, які здатні збирати, зберігати у зручній формі і обробляти великі масиви даних, автоматизація вимірювань та хімічних реакцій з використанням автоматизованих проточних систем, оптичного зонду, інших пристроїв дозволяє значно покращити можливості існуючих аналітичних методів. Приклади використання сучасних кінетичних методів є поодинокими. Нами нещодавно започатковані дослідження в області використання оптичного зонду [2-4] та автоматизації кінетичних методів аналізу з використанням методу послідовного інжекційного аналізу з зовнішнім реактором [4-6]. У порівнянні з вимірюванням в кюветках, зонд дозволяє їх значно прискорити і підвищити продуктивність аналізу, проводячи вимірювання в динамічному режимі безпосередньо в розчині аналіту, здійснювати дуже швидкий і точний моніторинг стану системи. Оптичний зонд був успішно застосований для утримання органічної фази та онлайн-детектування світлопоглинання при мікроекстракційно-спектрофотометричному визначенні [7, 8].

Одночасне кінетичне визначення базується на різниці в константах швидкостей реакцій. Для диференційних кінетичних методів вона повинна бути достатньо великою для успішної обробки даних. Для багатьох кінетичних методів вводяться умови, які складно виконати для реальних систем. Наприклад, підкорятися рівнянню кінетики першого чи псевдо першого порядку, дані про загальну початкову концентрацію компонентів або значення констант швидкості. Сучасні підходи набагато є менш чутливими до різних видів обмежень і менш трудомісткими.

Метод багатократних стандартних добавок (H-Point) - один з найбільш популярних сучасних підходів до диференційного кінетичного аналізу [9, 10]. Проте, застосування цього методу обмежується системами, в яких різниця швидкості реакції для компонентів є достатньо високою. Більше того, в ньому повинні бути знайдені умови, в яких можна знехтувати зміною світлопоглинання для «швидкого» компоненту в вибраному інтервалі часу. Це значно зменшує кількість доступних систем.

В останні роки для багатоконпонентних кінетичних визначень часто використовуються хемометричні розрахункові методи, такі як регресія на головних компонентах (PCR) [11], метод

парціальних найменших квадратів (PLS) [1, 12] та штучні нейронні мережі (ANN) [13], які замінили методи, які ґрунтуються на фільтрі Кальмана [14] та класичному методі найменших квадратів. Ці методи не потребують знання порядків реакцій або констант швидкості, але алгоритми розрахунку є доволі складними і практичне втілення потребує великої кількості дослідів та приготування стандартних розчинів. У цьому сенсі вигідними є методи, які ґрунтуються на відношенні спектрів поглинання або кінетичних профілів, в тому числі метод усередненого центрування відношення кінетичних профілів (Mean centering) (УЦВКП) [15-18] та Ratio difference [19] для аналізу бінарних та трикомпонентних сумішей. Методи даної групи ґрунтуються на використанні відношення спектрів поглинання або кінетичних профілів двох речовин. Вони застосовуються для аналізу навіть у системах, де константи швидкості є досить близькими. Після побудови градувальних графіків для визначення аналітів необхідні одиничні вимірювання. Таким чином, ці підходи є набагато більш швидкими та менш трудомісткими, ніж інші диференціальні кінетичні методи.

L-цистеїн (Cys) є амінокислотою, яка стабілізує структуру білка і сприяє утворенню колагену; таким чином, він є незамінним для шкіри, волосся, текстури нігтів і еластичності. Цистеїн та його солі широко використовуються як добавки (E 920) у харчових і сільськогосподарських продуктах. Аскорбінова кислота (Asc) є добре відомим антиоксидантом. Дія цистеїну розширюється і посилюється при включенні аскорбінової кислоти та інших вітамінів в склад біологічно активних добавок та інших препаратів.

Запропоновано декілька методів для одночасного визначення Asc і Cys, включаючи спектрофотометрію [10], FIA та SIA зі спектрофотометричним [20] або люмінесцентним [21, 22] закінченням, капілярний електрофорез [23], іонно-парну обернено-фазову ВЕРХ [24], а також електрохімічні методи [25]. Система Asc і Cys стала модельною для оцінки різних підходів до одночасного кінетичного визначення [4, 10, 21, 26-28]. У вищевказаних дослідженнях для одночасного визначення Asc і Cys майже виключно використовували комплекс феруму(III) з о-фенантроліном.

У роботі була розроблена проста, відносно швидка і надійна спектрофотометрична методика для одночасного кінетичного визначення Asc і Cys з використанням комплексу Fe(III) з о-фенантроліном. Показані переваги використання оптичного зонду та методу усередненого центрування відношення кінетичних профілів. Методика була успішно апробована для визначення Asc і Cys в харчових добавках.

Теоретичні основи методу усередненого центрування відношення кінетичних профілів. Кінетичний варіант методу УЦВКП – це спектрофотометричний метод, за допомогою якого можна аналізувати як бінарні, так і потрійні суміші без попереднього розділення. У цьому методі розраховується співвідношення кінетичних кривих, після чого константа, яка утворюється внаслідок операції ділення і в якій міститься інформація щодо другої речовини, видаляється шляхом середнього центрування кінетичних профілів отриманого співвідношення [15, 16].

Розглянемо два аналіти X та Y , які реагують з загальним реагентом R , відповідно до наступних реакцій:



Продукт реакції P можна контролювати, вимірюючи його оптичну густину при фіксованій довжині хвилі в залежності від часу реакції. Якщо вважати, що світлопоглинання є пропорційним концентрації продукту, що утворюється, тоді, якщо закон Бера справедливий для кожної сполуки, і впливу на кінетику реакції для обох аналітів немає, отримуємо формулу, яка є наслідком закону адитивності:

$$A_T = A_{P_x} + A_{P_y} \quad (3)$$

де A_{P_x} та A_{P_y} – світлопоглинання продуктів реакції аналіту X і Y , відповідно. Рівняння (3) можна переписати як:

$$A_{T(i)} = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^{N_s} E_j C_{j,i} = \sum_{i=1}^N (E_1 C_1^0 f^X(t) + E_2 C_2^0 f^Y(t)) \quad (4)$$

де N – кількість точок кінетичної кривої, N_s – кількість речовин, E_j – молярний коефіцієнт світлопоглинання речовини j при заданій довжині хвилі, $C_{j,i}$ – концентрація речовини j при часі i , C_j^0 – початкова або загальна концентрація речовини j , $f^j(t)$ – це функція, пов'язана з кінетичним профілем, яка описується рівнянням $1 - \exp(-kt)$, для реакції першого порядку.

Для бінарних сумішей X та Y , якщо рівняння (4) ділиться на $E_2 f^Y(t)$, що відповідає кінетичному профілю стандартного розчину Y у бінарній суміші, профіль співвідношення отримується у формі рівняння (5) (для можливості операції ділення нульові значення $E_2 f^Y(t)$ не повинні використовуватися в дільнику):

$$D = \sum_{i=1}^N \frac{A_{T(i)}}{E_2 f^Y(t)} = \sum_{i=1}^N \left(\frac{E_1 C_1^0 f^X(t)}{E_2 f^Y(t)} + C_2^0 \right) \quad (5)$$

Якщо з рівнянням (5) виконати операцію усередненого центрування (MC), оскільки результат цього перетворення для константи дорівнює нулю, буде отримано рівняння (6):

$$MC(D) = MC \left[\frac{E_1 f^X(t)}{E_2 f^Y(t)} C_1^0 \right] \quad (6)$$

Рівняння (6) є математичною основою багатокомпонентного аналізу, яке дозволяє визначати концентрацію сполуки X без вкладу іншої сполуки бінарної системи (Y в цьому рівнянні). Як видно з рівняння (6), є наявним лінійний зв'язок між амплітудою $MC(D)$ та концентрацією X у розчині.

Градувальний графік для визначення X можна побудувати як залежність амплітуди $MC(D)$ від концентрації X , використовуючи стандартні розчини X або стандартні подвійні суміші. Градувальні графіки для визначення Y можуть бути побудовані таким же чином, як це описано для X .

Експериментальна частина

Реагенти та апаратура. У дослідженнях використані реагенти кваліфікації не нижче «х.ч.», а робочі розчини готували на дистильованій воді. При приготуванні 0.01 М водного розчину $Fe(NO_3)_3$ використовували $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ з додаванням 0.1 М HCl . Вихідні розчини (0.01 М) аскорбінової кислоти та цистеїну готували шляхом розчинення, відповідно, аскорбінової кислоти та моногідрату цистеїну гідрохлориду в метанолі. Розчини зберігали в холодильнику для запобігання окиснення киснем. Розчини Asc і Cys залишались стабільними протягом, відповідно, двох і чотирьох днів. 0.4 М буферний розчин трис-етаноламіну готували розчиненням 4 мл вихідного препарату з густиною 1.112 г/мл у воді в мірній колбі місткістю 250 мл. Доводили рН цього розчину до 7.05 1 М HCl . 0.4 % розчин о-фенантроліну готували шляхом розчинення 0.4 г препарату у воді в колбі на 100 мл з додаванням 1.5 мл 0.1 М HCl .

Для реєстрації та зберігання спектрів поглинання та даних кінетичних вимірювань використовували спектрофотометр Specord S 600 (Analytik Jena AG, Jena, Німеччина) з двопрхідним оптичним зондом з довжиною оптичного шляху 10 мм [3]. Збір даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення WinASPECT. Всі розрахунки проводили в Microsoft Excel для Windows. Для вимірювання рН використовували рН-метр Orion 720A (Orion, Німеччина).

Спектрофотометричний кінетичний аналіз суміші Asc та Cys з використанням оптичного зонду. У мірну колбу місткістю 25 мл додавали 3 мл буферного розчину трис-етаноламіну з рН 7.05, 1.24 мл 0.4 % розчину фенантроліну, 1.25 мл 0.01 М розчину $Fe(III)$, розчин розводили до мітки дистильованою водою. Окремо готували розчини Asc і Cys (10 мл). Загальний об'єм реакційної суміші у всіх експериментах становив 35 мл. Вимірювали і регулювали сигнал порівняння для розчину реагенту шляхом варіювання часу інтегрування. Розчин реагенту переносили в хімічний стакан для

вимірювань; оптичний зонд занурювали в розчин реагенту і перевіряли наявність бульбашок повітря в оптичній частині зонда. Потім магнітну мішалку встановлювали на 180 об/хв і розчин зразка переносили в розчин реагенту. Вимірювання поглинання розчину розпочинали негайно після додавання досліджуваного розчину в стакан, що містив розчин реагенту. Кінетичні профілі світлопоглинання розчину реєстрували при 510 нм в діапазоні часу 0-180 с, з інтервалом 10 с. Після кожного експерименту оптичний зонд промивали і видаляли залишки дистильованої води фільтрувальним папером.

Аналіз біологічно активних добавок. П'ять таблеток зважували на аналітичних терезах (0.0001 г) і подрібнювали до порошку. Кількість порошку, яка була еквівалентна одній таблетці, зважували, розчиняли шляхом легкого нагрівання в 0.01 М НСІ, переносили в мірну колбу місткістю 50 мл і доводили дистильованою водою до позначки. Потім розчин фільтрували для відділення нерозчинної матриці зразка. Аліквоту розчину розводили у 25 мл колбі і аналізували, як описано вище.

Результати та їх обговорення

Застосування методу усередненого центрування відношення кінетичних профілів для одночасного кінетичного спектрофотометричного визначення Asc та Cys. Оптимізація умов визначення (рН, концентрація реагентів), які використовувалися в роботі, проведена раніше [10]. Кінетичні профілі світлопоглинання для стандартних розчинів Asc з різними концентраціями реєстрували при 510 нм в інтервалі часу від 10 до 180 с з інтервалом 10 с (рис. 1а). Кінетичні профілі світлопоглинання Asc ділили на кінетичний профіль розчину Cys з концентрацією

3 мг/л і отримували таким чином співвідношення профілів Asc та Cys (рис. 1б). Далі розраховували середнє центрування профілів співвідношення для різних концентрацій Asc (рис. 1с). Концентрацію Asc отримували шляхом вимірювання амплітуди при 10 та 180 с. Розраховували рівняння градувальних графіків для Asc як залежність амплітуди при 10 чи 180 с від концентрації Asc (Табл. 1).

Градувальний графік для визначення Cys будували з використанням серії розчинів, де його концентрація варіювалась від 1 до 9 мг/л. Як дільник використовували кінетичний профіль 2 мг/л розчину Asc (Рис. 1d-f). Таку ж процедуру використовували для прогнозування концентрації Cys у синтетичних бінарних сумішах та реальних зразках, за винятком того, що замість стандартного розчину Cys використовували кінетичні профілі суміші, де варіювали концентрацію Cys від 2 до 8 мг/л, а концентрація Asc була постійною (2 мг/л). Далі кінетичні профілі сумішей ділили на кінетичний профіль розчину Asc з концентрацією 1 або у другій серії 6 мг/л (Табл. 1).

Коефіцієнт кореляції залишається незмінним при вимірюванні амплітуди при 10 або 180 с (табл. 1), тобто точність розрахунків концентрації аналіту мало залежить від часу, при якому будувалася градувальна залежність. Цей висновок був отриманий як при розрахунку рівнянь для Asc (рядки 5 та 6) так і для Cys (рядки 7 та 8 при використанні як дільника кінетичного профілю для 1 мг/л Asc і рядки 9 та 10 при використанні як дільника профілю для 6 мг/л Asc). Зміна концентрації дільників в лінійному діапазоні градувального графіку для Asc з 1 до 6 мг/л не мала істотного впливу на аналітичні параметри, як це вже неодноразово було показано в попередніх роботах [15, 16] (Табл. 1, рядки 7-10).

Таблиця 1. Параметри градувальних залежностей для визначення аскорбінової кислоти та цистеїну у суміші методом усередненого центрування відношення кінетичних профілів.

№	Метод вимірювання аналітичного сигналу	Рівняння градувального графіку, R ² (n=7, P=0.95)
1	A _{Asc} при 10 с	Y=(-0.011±0.009)+(0.090±0.002)·C _{Asc} , R ² =0.9966
2	A _{Asc} при 180 с	Y=(-0.011±0.009)+(0.094±0.002)·C _{Asc} , R ² =0.9968
3	A _{Cys} при 10 с, C _{Asc} =2 мг/л	Y=(0.1637±0.0016)+(0.0017±0.0003)·C _{Cys} , R ² =0.8370
4	A _{Cys} при 180 с, C _{Asc} =2 мг/л	Y=(0.163±0.003)+(0.0213±0.0005)·C _{Cys} , R ² =0.9968
5	a _{Asc} при 10 с, C _{Cys} =1 мг/л	Y=(-1.33±1.13)+(11.1±0.3)·C _{Asc} , R ² =0.9966
6	a _{Asc} при 180 с, C _{Cys} =1 мг/л	Y=(0.28±0.23) - (2.33±0.06)·C _{Asc} , R ² =0.9967
7	a _{Asc} при 10 с, C _{Asc} =1 мг/л	Y=(0.037±0.012) - (0.119±0.002)·C _{Cys} , R ² =0.9979
8	a _{Cys} при 180 с, C _{Asc} =1 мг/л	Y=(-0.037±0.009) + (0.0967±0.0016)·C _{Cys} , R ² =0.9983
9	a _{Cys} при 10 с, C _{Asc} =6 мг/л	Y=(0.007±0.002)-(0.0195±0.0004)·C _{Cys} , R ² =0.9979
10	a _{Cys} при 180 с, C _{Asc} =6 мг/л	Y=(-0.0058±0.0014)+(0.0159±0.0002)·C _{Cys} , R ² =0.9983
11	a _{Cys} при 180 с, C _{Asc} =2 мг/л	Y=(-0.012±0.006)+(0.0514±0.0009)·C _{Cys} , R ² =0.9986

Примітки. A_{Asc} та A_{Cys} –оптична густина, відповідно, аскорбінової кислоти та цистеїну; a_{Asc} та a_{Cys} –амплітуда, відповідно, аскорбінової кислоти та цистеїну.

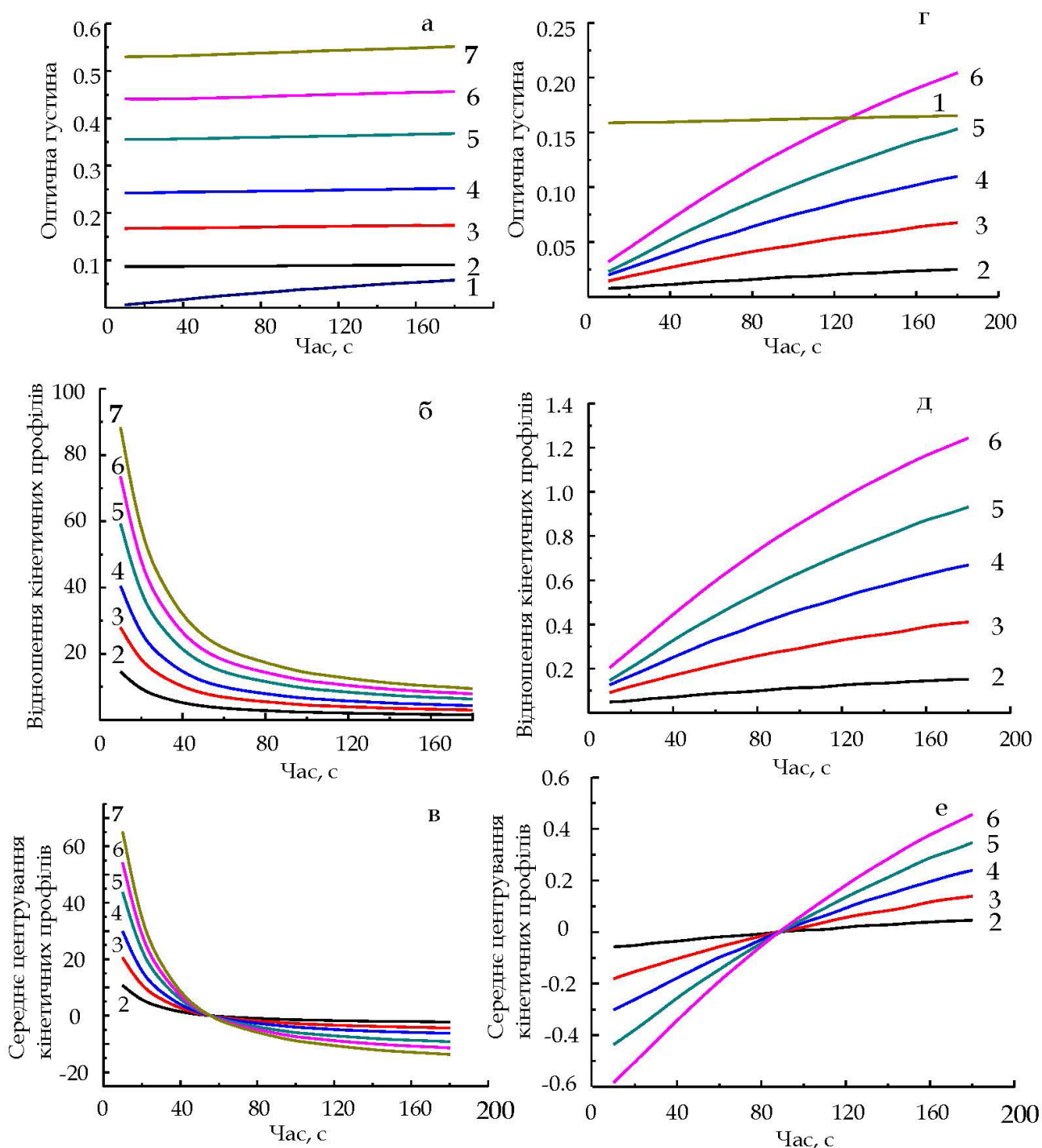


Рис. 1. Кінетичні профілі світлопоглинання стандартних розчинів Cys та ASC (a,d), співвідношення кінетичних профілів (b, e), усереднене центрування співвідношення кінетичних профілів (c, f). $C(\text{Cys}) = 3$ мг/л (1), $C(\text{Asc}) = 1$ (2), 2 (3), 3 (4), 4 (5) 5 (6) та 6 (7) мг/л (a, b, c). $C(\text{Asc})=2$ мг/л (1), $C(\text{Cys}) = 1$ (2), 3 (3), 5 (4), 7 (5) та 9 (6) мг/л (d, e, f). $C(\text{Fe(III)}) = 0.357$ ммоль/л, $C(\text{фенантролін}) = 0.0142\%$, $\text{pH} = 7.05$, $\lambda = 510$ нм, $l = 1$ см.

Для вимірювань з оптичним зондом характерною є характерною висока збіжність. Коефіцієнт кореляції для залежностей амплітуди від концентрації Asc або Cys коливався у вузькому діапазоні (від 0.996 до 0.998). Він був близьким і для вихідних залежностей оптичної густини (Табл. 1, рядки 1-4), яка вимірювалася при фіксованому часі, від концентрації Asc або Cys, і для залежностей

амплітуди від концентрації аналіту. Це каже про те, що при математичних перетвореннях похибка вимірювання концентрації аналіту не зростала. Також важливо, що похибка вимірювання була одного порядку і для визначення однієї речовини, і для визначення компонентів бінарної суміші. Тобто вирізнення сигналів окремих речовин із суміші відбувалося без втрати точності. При

вимірюваннях методом послідовного інжекційного аналізу з зовнішнім реактором [4] ситуація була протилежною. Математичні перетворення призводили до суттєвого погіршення відносного стандартного відхилення і коефіцієнту кореляції. Ми пояснюємо це тим, що для автоматизованої системи програма, якою керувалася проточна система, не дозволяла точно синхронізувати часи, при яких вимірювалися світлопоглинання. Така «несинхронність» кінетичних кривих і могла бути причиною погіршення прецизійності результатів.

Цікаво, що для одного з градувальних графіків, побудованого для 10 с для Cys, коефіцієнт кореляції складав лише 0.837. Для 10 с вплив концентрації Cys на сумарну оптичну густину суміші був дуже малим. Тому сумарна оптична густина сильно коливалася, що і позначилося на якості градувальної кривої. Тим не менше, залежність амплітуди для Cys від концентрації цієї речовини характеризувалася високим коефіцієнтом кореляції. Це пояснюється тим, що для отримання значень амплітуди в розрахунках в будь-якому разі ділили профіль однієї речовини на профіль іншої при усіх значеннях часу і таким чином враховували інформацію для тих часів, при яких внесок цистеїну вже був значимим і не вносив такої похибки у сумарну оптичну густину.

Як вже було вказано, для отримання градувальних залежностей можна використовувати як стандартні розчини однієї речовини, так і суміші з відомими концентраціями обох компонентів. З табл. 1 видно, що якість отриманих градувальних залежностей не залежить від того, використовувалися розчини однієї речовини, чи суміші.

Аналітичні характеристики запропонованого методу. Використання оптичного зонда дозволило істотно скоротити час, необхідний для аналізу. Задовільні результати щодо прецизійності та правильності були отримані з використанням інтервалів часу від 10 до 180 с порівняно з 0 до 10 хв в [15] і від 1 до 11 хв в [10]. Вимірювання на спектрофотометрі, обладнаному оптичним зондом, дозволяє досягти дуже високої прецизійності. Однією з вимог до застосування кінетичних методів для одночасного визначення є відсутність впливу кожного з аналітів на кінетику взаємодії з реагентом іншого компонента. Ця вимога була справедливою для використаної системи при кожному дослідженому рН, оскільки світлопоглинання для суміші Asc і Cys в кожному мить було сумою світлопоглинань компонентів. Похибка у адитивності світлопоглинань Asc і Cys в сумішах з використанням оптичного зонда становила 1% або менше.

Кількісний аналіз можна здійснити двома способами. Амплітуда для функції середнього центрування співвідношення кінетичних профілів, яка вимірювалася при 10 або 180 с,

використовувалась як аналітичний сигнал у спектрофотометричному методі з оптичним зондом. Концентрацію аналіту можна оцінити, використовуючи як градувальний графік залежності амплітуди від концентрації одного з аналітів, так і метод порівняння. Використання останнього методу є відносно кращим, оскільки нахил градувальної кривої залежить від температури, що використовується для кінетичних вимірювань. Це вимагає більш суворих процедур для стандартизації та контролю температури розчинів.

У запропонованому способі спостерігається лінійна залежність амплітуди функції середнього центрування від концентрації Asc та Cys в діапазоні концентрацій від 1 до 10 мг/л (Табл. 1).

Для оцінки прецизійності та правильності методу було проаналізовано декілька сумішей з заданими концентраційними співвідношеннями Asc і Cys (Табл. 2). У порівнянні з методом [4], який ґрунтується на відновленні 18-молібдодифосфорного гетерополікомплексу структури Доусона, запропонований підхід використовує більш доступний реагент, стійкість розчину реагенту є вищою, що обумовлює кращу прецизійність ($S_r=0.01-0.02$) визначення.

Таблиця 2. Результати визначення Asc та Cys в бінарних сумішах.

Введено	Знайдено	$C_{\text{знайдено}}/C_{\text{введено}}, \%$
Asc (мг/л)		
2.00	2.04	102.0
2.00	1.99	99.5
2.00	1.98	99.0
2.00	1.99	99.7
Cys (мг/л)		
2.00	2.05	102.5
4.00	3.98	99.6
6.00	6.05	100.7
8.00	8.06	100.7

Дослідження селективності та застосування у реальних об'єктах. Вплив інтерферуючих речовин на реакцію між о-фенантроліном феруму(III) і Asc або Cys при рН 5-7 досліджували у попередніх роботах [10, 20, 27]. Було показано відсутність впливу на реакцію вітамінів групи B₁, амінокислот (за винятком тих, що містять тіольну групу), відновлюючих цукрів, саліцилової кислоти та її похідних, кофеїну, помірних концентрацій оксикислот і звичайних наповнювачів (хлорид натрію, ЕДТА, магнію стеарат, лактоза, тальк і крохмаль) при співвідношеннях [інтерферент]/[Asc або Cys] набагато вищих, ніж ті, що є типовими для лікарських препаратів або біологічно-активних добавок.

Запропонований спосіб був апробований для визначення Asc і Cys в біологічно активних добавках (табл.3). Результати аналізу БАД добре узгоджуються з значеннями, заявленими

виробником, у всіх випадках, що підтверджує правильність розробленої методики. Треба відмітити і отриману досить високу повторюваність результатів визначення.

Таблиця 3. Результати визначення вмісту Asc і Cys гідрохлориду в біологічно активних добавках запропонованим кінетичним методом ($n=5$, $P=95\%$, у дужках наведене відносне стандартне відхилення, виражене у відсотках).

Об'єкт аналізу	Вміст		Знайдено методом УЦВКП	
	Asc, мг	Cys, мг	Asc, мг (S_p , %)	Cys, мг (S_p , %)
NOW Health Group, Inc., Now Foods, USA, L-Cysteine (a)	60	500	61.2±1.8 (2.3%)	496±7 (1.2%)
GNC Holdings, Inc., USA, GNC Hair, Skin & Nails Formula (б)	120	200	118.9±2.1 (1.4%)	201 ± 5 (2.1%)

Примітки. (a) 1 таблетка містить 60 мг Asc, 500 мг цистеїну гідрохлориду та 10 мг піридоксину гідрохлориду. Допоміжні речовини: целюлоза, лимонна кислота, кремнезем, стеарат магнію; (б) 1 таблетка містить 120 мг Asc в вигляді аскорбату кальцію, 200 мг цистеїну гідрохлориду, 5 мг вітаміну А, 0.2 мг вітаміну D, 0.03 мг вітаміну Е, 1.5 мг тіаміну, 1.7 мг рибофлавіну, 20 мг ніацину, 200 мкг фолієвої кислоти, 3 мг біотину, 13.5 мг пантотенової кислоти, 200 мг кальцію, 100 мг фосфору, 15 мг цинку, 50 мг метіоніну, 100 мг метилсульфоніл-метану, 100 мг желатину, 10 мг ліпоевої кислоти, 10 мг диметиламіноетанолу, 10 мг екстракту зеленого чаю, 1 мг бору, 1.5 мг пантетину, 500 мкг лютемаксу, 100 мкг зеексантину. Допоміжні речовини: целюлоза, стеаринова кислота, стеарат магнію, оксид титану, натуральні ванільфлавор, рослинні ацетогліцериди, хлорофіллін і сукралоза.

Висновки

Таким чином, деякі різновиди спектрофотометричного аналізу суттєво виграють від використання оптичного зонду, особливо кінетичні методи аналізу. При використанні оптичного зонду всі стадії кінетичного аналізу проводяться в одній і тій же реакційній ємності, включаючи змішування, хімічну реакцію і вимірювання світлопоглинання, що значно спрощує і підвищує точність і надійність аналітичної процедури [7, 8]. З використанням зонду вдається дуже точно відтворити кінетичні криві. Це обумовлено особливостями вимірювання оптичної густини. По-перше, виключається стадія перенесення реакційної суміші в кювету для вимірювання. Без зонду така операція займає досить багато часу і призводить до значної несинхронності за часом кінетичних кривих, які отримують при паралельних чи послідовних вимірюваннях. Це є одним із головних джерел погіршення точності вимірювання аналітичних сигналів при математичній обробці кінетичних кривих. По-друге, самі вимірювання можна починати майже одразу після перемішування розчину, тобто через декілька секунд після початку хімічної реакції. Це дозволяє використовувати більш швидкі реакції і початкові ділянки зміни оптичної густини, де сигнал змінюється набагато сильніше, ніж пізніше. В свою чергу це дозволяє скоротити час аналізу, підвищити його продуктивність. Ці корисні особливості вимірювань оптичним зондом дають можливість отримати високу точність оцінки концентрації речовин кінетичним методом у подвійних і навіть у потрійних сумішах.

Метод УЦВКП має суттєві переваги у порівнянні з методом багатократних стандартних добавок H-Point. Для визначення цим методом потрібно набагато менше часу. Це само по собі важливо, але для дослідженої системи важливу роль відіграють і інші фактори. І цистеїн, і аскорбінова кислота здатні доволі швидко окиснюватися киснем, розчиненим у воді. Тому, коли визначення займає багато часу, похибка за рахунок окиснення стає доволі великою. Результат методу H-Point обчислюється в результаті екстраполяції двох прямих ліній, в той час як процедура методу УЦВКП є інтерполяційною. Тобто в останньому випадку можна покращити точність визначення, застосувавши метод, де готують два розчини, які обмежують зверху і знизу концентрацію, яку визначають. Накопичити велику кількість паралельних визначень при використанні запропонованого методу не так вже й важко, в той час як для методу H-Point довоготривалість процедури заважає цьому. Метод УЦВКП є набагато більш універсальним. В ньому не потрібно, щоб оптична густина «швидкого» компоненту в вибраному інтервалі часу була постійною, а різниця у константах швидкостей реакцій може бути не такою великою, як для методу H-Point.

Література

- Bahram M., Afkhami A. Recent applications of kinetic methods in multi-component analysis. *J. Iran. Chem. Soc.* **2008**, 5(3), 352-366.
- Tóth J., Bazel Ya. Development of a new kinetic spectrophotometric method for the determination of chromium with an optical probe. *Appl. Spectr.* **2019**, 73(5), 492-502.
- Riabukhina T.S., Janegova D., Bazel Ya.R. Indirect spectrophotometric determination of Cr(VI) with optical probe. *Methods Objects Chem. Anal.* **2018**, 13(1), 44-50.
- Vishnikin A., Miekh Yu., Denisenko T., Bazel Ya., Andruch V. Using of sequential injection analysis with lab-at-valve and optical probe for simultaneous spectrophotometric determination of ascorbic acid and cysteine by mean centering of ratio kinetic profiles. *Talanta* **2018**, 188, 99-106.
- Al-Shwaiyat M.E.A., Miekh Yu.V., Denisenko T.A., Vishnikin A.B., Bazel Ya.R. Simultaneous kinetic determination of ascorbic acid and analgine in pharmaceutical preparations by H-point standard addition method. *Bull. Dnipropetrovsk Univ. Ser. Chem.* **2017**, 25(2), 93-102.
- Al-Shwaiyat M.K.E.A., Miekh Y.V., Denisenko T.A., Vishnikin A.B., Andruch V., Bazel Ya.R. Simultaneous determination of rutin and ascorbic acid in a sequential injection lab-at-valve system. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2018**, 149, 179-184.
- Zaruba S., Vishnikin, A., Škrálíková, J., Diuzheva, A., Ozimaničová, I., Andruch, V. A two-in-one device for online monitoring of direct immersion single-drop microextraction: An optical probe as both microdrop holder and measuring cell. *RSC Advances* **2017**, 7, 29421-29427.
- Zaruba S., Vishnikin A.B., Šandrejová J., Andruch V. Using an optical probe as the microdrop holder in head-space single drop microextraction: Determination of sulfite in food samples. *Anal. Chem.* **2016**, 88, 10296-10300.
- Bosch-Reig F., Campins-Falcó P., Sevillano-Cabeza A., Herráez-Hernández R., Molins-Lagua C. Development of the H-point standard-additions method for ultra-violet-visible spectroscopic kinetic analysis of two-component systems. *Anal. Chem.* **1991**, 63, 2424-2429.
- Ghasemi J., Seifi S., Sharifi M., Ghorbani R., Amini A. Simultaneous kinetic spectrophotometric determination of ascorbic acid and L-cysteine by H-point standard addition method. *Microchim. Acta* **2004**, 148, 259-265.
- Crouch S.R., Coello J., MasPOCH S., Porcel M. Evaluation of classical and three-way multivariate calibration procedures in kinetic-spectrophotometric analysis. *Anal. Chim. Acta* **2000**, 424, 115-126.
- Hernández O., Martín E., Jiménez F., Jiménez A.I., Arias J.J. Use of partial least-squares regression for multicomponent determinations based on kinetic spectrofluorimetric data. Simultaneous determination of canrenone and spironolactone in urine. *Analyst* **2000**, 125, 1159-1165.
- Blanco M., Coello J., Iturriaga H., MasPOCH S., Redon M. Artificial neural networks for multicomponent kinetic determinations. *Anal. Chem.* **1995**, 67, 4477-4483.
- Wentzell P.D., Karayannis M.I., Crouch S.R. Simultaneous kinetic determinations with the Kalman filter. *Anal. Chim. Acta* **1989**, 224, 263-274.
- Afkhami A., Bahram M. Mean centering of ratio kinetic profiles as a novel spectrophotometric method for the simultaneous kinetic analysis of binary mixtures. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 526, 211-218.
- Afkhami A., Madrakian T., Bahram, M. Simultaneous spectrophotometric determination of iodate and bromate in water samples by the method of mean centering of ratio kinetic profiles. *J. Hazard. Mater.* **2005**, 123, 250-255.
- Afkhami A., Bahram M. A novel spectrophotometric method for the simultaneous kinetic analysis of ternary mixtures by mean centering of ratio kinetic profiles. *Talanta* **2006**, 68, 1148-1155.
- Osman E.E.A. Analytical investigation of different mathematical approaches utilizing manipulation of ratio spectra. *Spectrochim. Acta A* **2018**, 188, 469-477.
- Lotfy H.M., Hagazy M.A-M. Comparative study of novel spectrophotometric methods manipulating ratio spectra: An application on pharmaceutical ternary mixture of omeprazole, tinidazole and clarithromycin. *Spectrochim. Acta A* **2012**, 96, 259-270.
- Teshima N., Nobuta T., Sakai T. Simultaneous flow injection determination of ascorbic acid and cysteine using double flow cell. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 438, 21-29.
- Rezaei B., Ensafi A.A., Noroozi S. Flow-injection determination of ascorbic acid and cysteine simultaneously with spectrofluorimetric detection. *Anal. Sci.* **2005**, 21, 1067-1071.
- Li B., Wang D., Xu C., Zhang Z. Flow-injection simultaneous chemiluminescence determination of ascorbic acid and L-cysteine with partial least squares calibration. *Microchim. Acta* **2005**, 149, 205-212.
- Yao X., Wang Y., Chen G. Simultaneous determination of amino thiols, ascorbic acid and uric acid in biological samples by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Biomed. Chromatogr.* **2007**, 21, 520-526.
- Khan M.I., Iqbal Z. Simultaneous determination of ascorbic acid, amino thiols, and methionine in biological matrices using ion-pairing RP-HPLC coupled with electrochemical detector. *J. Chromatogr. B* **2011**, 879, 2567-2575.
- Lee P.T., Lowinsohn D., Compton R.G. Simultaneous detection of homocysteine and cysteine in the presence of ascorbic acid and glutathione using a nanocarbon modified electrode. *Electroanalysis* **2014**, 26, 1488-1496.
- Ghasemi J., Seraji H.R., Noroozi M., Hashemi M., Jabbari A. Differential kinetic spectrophotometric determinations of ascorbic acid and L-cysteine by partial least squares method. *Anal. Lett.* **2004**, 37, 725-737.
- Martinović A., Kukoč-Modun L., Radić N. Kinetic spectrophotometric determination of thiols and ascorbic acid. *Anal. Lett.* **2007**, 40, 805-815.
- Ghasemi J., Nayebi S. Application and comparison of two-rate and differential kinetic methods in simultaneous spectrophotometric determination of ascorbic acid and L-cysteine in pharmaceutical samples. *Pharm. Chem. J.* **2006**, 40, 44-51.