

УДК 543.426:[546.661+577.182.54

С.В. Бельтюкова, д-р хим. наук, проф., Одес. нац. акад. пищевых технологий,  
Е.О. Витюкова, химик,  
А.В. Егорова, канд. хим. наук, доц.,  
Физ.-хим. ин-т им. А.В. Богатского НАН Украины,  
г. Одесса

## ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В ВОДАХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕДПРИЯТИЙ

С.В. Бельтюкова, К.О. Витюкова, А.В. Егорова. Люмінесцентне визначення пероксиду водню у водах фармацевтичних підприємств. Розроблено методику люмінесцентного визначення пероксиду водню у водах фармацевтичних підприємств, в основі якої лежить сенсibilізована люмінесценція іонів Eu(III) у різнолігандному комплексі з окситетрацикліном та пероксидом водню з межею визначення 0,017 мкг/мл ( $5 \cdot 10^{-7}$  моль/л).

S.V. Beltyukova, E. O. Vityukova, A.V. Yegorova. Luminescence determination of hydrogen peroxide in the waters of pharmaceutical enterprises. The luminescence method for the determination of hydrogen peroxide in the waters of pharmaceutical enterprises which is based on the sensibilised luminescence of Eu(III) ions in ternary complex with oxytetracycline and hydrogen peroxide is developed (the limit of detection is 0,017  $\mu\text{g/ml}$  ( $5 \cdot 10^{-7}$  mol/l)).

Пероксид водорода находит широкое применение в пищевой и фармацевтической отраслях промышленности для дезинфекции воды и оборудования [1]. В связи с этим возникает необходимость контроля содержания этого препарата в последней порции промывной воды. Известные методы определения пероксида водорода основаны, в основном, на его окислительной способности. Так, например, спектрофотометрический метод предусматривает восстановление пероксидом водорода иодида калия до свободного иода и позволяет определять  $1,5 \cdot 10^{-6}$  моль/л пероксида [2]. Предложены также хемилюминесцентный и энзимно-хемилюминесцентный методы с пределами обнаружения  $1,4 \cdot 10^{-9}$  и  $8,0 \cdot 10^{-8}$  моль/л [3...5]. Несколько уступают им по чувствительности люминесцентный и энзимно-спектрофотометрический методы [6, 7], имеющие пределы обнаружения  $1 \cdot 10^{-6}$  и  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л. Метод ВЭЖХ [8] с электрохимическим детектированием позволяет обнаруживать  $7 \cdot 10^{-7}$  моль/л пероксида водорода. Однако, известные методы в основном длительны, требуют использования дорогостоящих реагентов и сложного оборудования.

Для определения пероксида водорода предлагается методика, основанная на сенсibilізованной люмінесценції іонів Eu(III) в різнолігандному комплексі з окситетрацикліном і пероксидом водню.

Все использованные в работе реактивы квалификации не ниже ч.д.а. Применялись стандартные растворы хлоридов европия и неодима (0,1 моль/л), которые готовились растворением соответствующих оксидов высокой чистоты. Стандартный раствор окситетрациклина ( $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л) приготовлен растворением точной навески субстанции препарата в 75 %-м метаноле, а стандартный раствор пероксида водорода ( $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л) — из 3 %-го водного раствора, стандартизованного титриметрическим определением его точной концентрации. Значение pH растворов устанавливалось с помощью 40 %-го водного раствора уротропина.

Спектры люмінесценції іонів европія (III) реєстрували в області 560...650 нм з  $\lambda_{\text{макс}}=612, 590$  і  $580$  нм (переходи  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_2$ ,  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_1$  і  ${}^5D_0 \rightarrow {}^7F_0$ , відповідно). Реєстрацію сигналу здійснювали з допомогою спектрометра ІСП-51 (люмінесценцію возбуждали світлом ртутно-кварцевої лампи СВД-120А со світлофільтром УФС-2, виділяючим випромінювання з  $\lambda_{\text{макс}}=365$  нм), СДЛ-2 (ЛОМО), Aminco-Bowman Series 2 (SLM — Aminco, Rochester, NY) і спектрофлуориметра СМ2203 "SOLAR" (Беларусь) з ксеноновою лампою 150-W.

Известно, что антибиотики тетрациклинового ряда образуют с ионами Eu(III) комплексные соединения, в которых за счет внутримолекулярного переноса энергии возбуждения от молекул органического лиганда на ион Eu(III) наблюдается интенсивная люминесценция последнего [9].

Так, окситетрацилин (ОхТС) в водно-спиртовом растворе в УФ-области спектра имеет полосу поглощения с максимумами при 275,8 и 353,5 нм и молярными коэффициентами поглощения  $1,34 \cdot 10^4$  и  $1,24 \cdot 10^4$ , что делает возможным эффективное поглощение световой энергии и передачу ее иону лантанида.

Триплетный уровень окситетрацилина, рассчитанный нами из спектров фосфоресценции его комплексов с гадолинием при 77 К, составляет  $19160 \text{ см}^{-1}$ , что превышает энергию уровня  $^5D_0$  возбужденного состояния ионов Eu(III)  $17300 \text{ см}^{-1}$  и определяет возможность ее передачи на энергетический уровень европия.

Условия комплексообразования. Комплексообразование ионов Eu(III) с окситетрацилином наблюдается в интервале значений pH 3,0...11,0 с максимумом люминесценции при pH=6,0...8,0. Возможно, в щелочной среде (pH>8,5) наблюдается разрушение комплекса с образованием гидроксида европия, а в сильно кислой среде (pH<4,0) степень образования комплекса очень мала.

Методом ограниченного логарифмирования установлено соотношение компонентов в комплексе Eu:ОхТС=1:1. Поскольку комплекс Eu–ОхТС является координационно-ненасыщенным, он способен к присоединению второго лиганда, в частности, пероксида водорода. При этом происходит возрастание интенсивности люминесценции  $I_{\text{люм}}$  Eu(III) в 16...17 раз в результате образования разнолигандного комплекса Eu–ОхТС–H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

В присутствии пероксида водорода оптическая плотность раствора также незначительно возрастает (в 1,2 раза). Спектр же поглощения окситетрацилина в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> остается неизменным, что указывает на отсутствие окисления реагента пероксидом водорода.

Образование разнолигандного комплекса подтверждено с использованием ионов Nd(III) (рис. 1). Как видно при образовании двойного комплекса Nd–ОхТС наблюдается расщепление полосы поглощения сверхчувствительного перехода (СЧП) неодима  $^4I_{9/2} \rightarrow ^2,4G_{7/2,5/2}$  (575,2 нм) на два максимума — 575,2 (полоса неодима) и 582,5 нм (полоса комплекса). При введении в систему пероксида водорода наблюдается возрастание интенсивности, а также сдвиг второго максимума полосы поглощения (полоса комплекса) в область больших длин волн на 3,1 нм, положение этого максимума при увеличении концентрации пероксида водорода не изменяется. Все это может служить косвенным подтверждением образования разнолигандного комплекса в системе Nd-ОхТС-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. В табл. 1 приведены значения  $\lambda_{\text{макс}}$  и  $P$  (силы осцилляторов) для NdCl<sub>3</sub> и комплексов Nd-ОхТС, Nd-ОхТС-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, рассчитанные из спектров поглощения, представленных на рисунке 1.

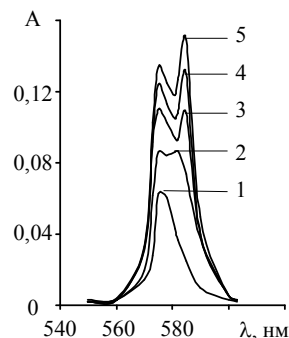


Рис. 1. Спектры поглощения: 1- NdCl<sub>3</sub>, 2- Nd-ОхТС, 3-5- Nd-ОхТС-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $C_{\text{Nd}} = 5 \cdot 10^{-3}$  моль/л;  $C_{\text{ОхТС}} = 1 \cdot 10^{-3}$  моль/л;  $C_{\text{H}_2\text{O}_2}$ , моль/л: 3-  $5 \cdot 10^{-4}$ , 4-  $1 \cdot 10^{-3}$ , 5-  $5 \cdot 10^{-3}$ )

Таблица 1

Значения максимумов поглощения и сил осцилляторов

№ п/п		$\lambda_{\text{макс}}$ , нм		$\Delta\lambda$ , нм		$P \cdot 10^6$
1.	NdCl <sub>3</sub>	575,2	-	-	-	9,8
2.	Nd-ОхТС	575,2	582,5	-	-	18,89
3.	Nd-ОхТС-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *	575,2	585,6	-	3,1	29,47

\*  $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 5 \cdot 10^{-3}$  моль/л

Как видно, при образовании двойного комплекса сила осцилляторов возрастает в 1,9 раза по сравнению с раствором NdCl<sub>3</sub>, а в разнолигандном комплексе сила осцилляторов возрастает в 1,56 раза по сравнению с двойным комплексом.

Сравнительная оценка  $I_{\text{люм}}$   $\text{Eu(III)}$  в комплексах с различными тетрациклинами: тетрациклином (ТС), докситетрациклином (ДТС), окситетрациклином (ОхТС), метациклином (МтС), хлортетрациклином (СхТС), меклоциклином (МеС), демеклоциклином (ДмС) и ролитетрациклином (РТС) в присутствии пероксида водорода (рис. 2) показывает, что наибольшее увеличение  $I_{\text{люм}}$  наблюдается в случае комплекса с окситетрациклином.

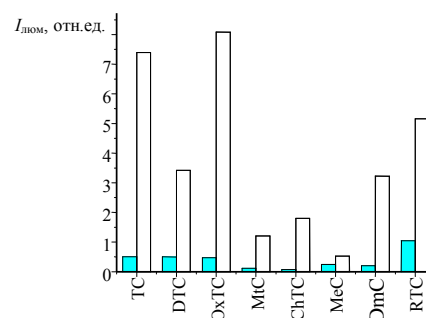


Рис. 2. Влияние пероксида водорода на  $I_{\text{люм}}$  комплексов европия (III) с тетрациклинами (Т) ( $C_{\text{Eu}} = 1 \cdot 10^{-3}$  моль/л,  $C_{\text{T}} = 1 \cdot 10^{-4}$  моль/л,  $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 5 \cdot 10^{-4}$  моль/л): ■ —  $\text{Eu-T}$ ; □ —  $\text{Eu-T-H}_2\text{O}_2$

При образовании разнолигандного комплекса  $\text{Eu-OxTC-H}_2\text{O}_2$  происходит изменение спектров возбуждения (рис. 3, а) и спектров люминесценции ионов  $\text{Eu(III)}$  (рис. 3, б). Как видно спектры возбуждения разнолигандного комплекса  $\text{Eu-OxTC-H}_2\text{O}_2$  имеют более высокую интенсивность и расщеплены (в области 350...420 нм) на две полосы с максимумами 362...363 нм и 407...414 нм.

В спектрах люминесценции разнолигандного комплекса  $\text{Eu-OxTC-H}_2\text{O}_2$  наблюдается расщепление полос переходов  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$  и  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$  (612 нм и 590 нм соответственно), а также увеличение интенсивностей полос переходов  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_2$ ,  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_1$  и  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_0$  (612 нм, 590 нм и 570 нм, соответственно), что также служит косвенным подтверждением вхождения  $\text{H}_2\text{O}_2$  во внутреннюю сферу комплекса  $\text{Eu-OxTC}$  и координации к центральному иону. Следует отметить аномальное увеличение интенсивности полосы запрещенного перехода  ${}^5\text{D}_0 \rightarrow {}^7\text{F}_0$ , что свидетельствует о значительном искажении координационного полиэдра  $\text{Eu}^{3+}$  при вхождении молекул  $\text{H}_2\text{O}_2$  во внутреннюю сферу комплекса и указывает на низкую симметрию центров люминесценции [10, 11].

Из кривых затухания люминесценции комплексов  $\text{Eu-OxTC}$  и  $\text{Eu-OxTC-H}_2\text{O}_2$  рассчитаны их времена жизни  $\tau$  — 60 мкс и 87 мкс, соответственно, свидетельствующие об уменьшении безызлучательной дезактивации энергии возбуждения в разнолигандном комплексе, что приводит к увеличению сенсibilизированной люминесценции ионов  $\text{Eu(III)}$ .

С целью оптимизации аналитического сигнала изучено влияние кислотности среды, поверхностно-активных веществ, а также концентрации всех компонентов системы  $\text{Eu-OxTC-H}_2\text{O}_2$ .

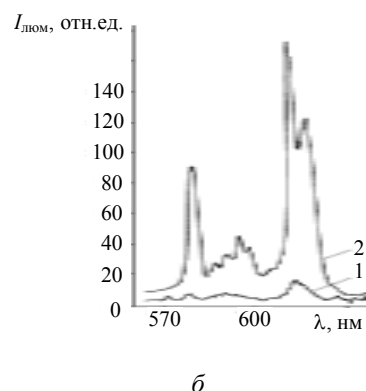
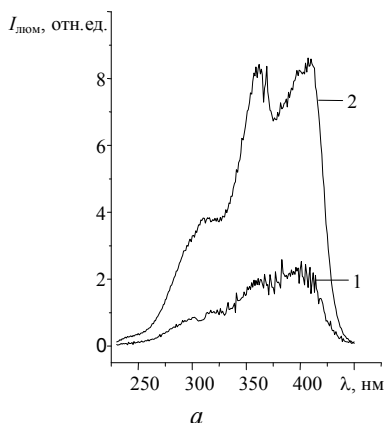


Рис. 3 Спектры возбуждения (а) и люминесценции (б) комплексов  $\text{Eu-OxTC}$  (1) и  $\text{Eu-OxTC-H}_2\text{O}_2$  (2) ( $C_{\text{Eu}} = 1 \cdot 10^{-3}$  моль/л,  $C_{\text{OxTC}} = C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 1 \cdot 10^{-4}$  моль/л)

Максимальная  $I_{\text{люм}}$  в системе  $\text{Eu-OxTC-H}_2\text{O}_2$  наблюдается при pH 5,8...7,2, как и в случае двойных комплексов, а также при концентрации  $\text{Eu(III)}$   $1 \cdot 10^{-3}$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$   $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л.

Соотношение компонентов в комплексе  $\text{Eu:OxTC:H}_2\text{O}_2$ , установленное в оптимальных условиях методом ограниченного логарифмирования, составляет 1:1:2. Вероятно, пероксид водо-

рода входит во внутреннюю сферу комплекса в виде аниона  $\text{HOO}^-$  и присоединяется непосредственно к центральному атому металла.

Исследование влияния ПАВ различной природы на люминесценцию разнолигандного комплекса  $\text{Eu-OxTC-H}_2\text{O}_2$  показало, что такие ПАВ как децилпиридиний, тетрадецилпиридиний, октадецилпиридиний и цетилпиридиний хлориды, лаурилсульфат и цетилсульфат натрия, Тритон X-100, Бридж-35 и Твин-80, существенно не влияют на интенсивность люминесценции ионов европия в рассматриваемом комплексе.

При оптимальных условиях комплексообразования  $I_{\text{люм}}$  достигает максимума через 1...2 мин после сливания растворов и остается постоянной в течение 1 ч.

Интенсивность люминесценции европия (III) в комплексе с окситетрациклином и пероксидом водорода прямо пропорциональна содержанию  $\text{H}_2\text{O}_2$  в растворе в интервале концентраций  $1 \cdot 10^{-6} \dots 1 \cdot 10^{-4}$  моль/л.

Люминесцентные свойства разнолигандного комплекса  $\text{Eu-OxTC-H}_2\text{O}_2$  использованы при разработке методики определения пероксида водорода в промывных водах, получаемых при очистке оборудования водоподготовки на фармацевтических предприятиях. Методика разработана на модельных растворах.

**Ход анализа.** На анализ отбирали 10 мл анализируемой воды, добавляли 0,1 мл 0,1 моль/л раствора хлорида европия, 0,1 мл  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л раствора OxTC, 0,2 мл 40 %-го раствора уротропина, перемешивали и через 5 мин измеряли интенсивность люминесценции ионов европия при  $\lambda_{\text{эмис}} = 612$  нм и  $\lambda_{\text{возб}} = 365$  нм.

Концентрацию пероксида водорода в образцах смывных вод определяли по калибровочному графику. Люминесцентное определение пероксида водорода в воде возможно в интервале концентраций 0,03...3,4 мкг/мл с пределом обнаружения 0,017 мкг/мл.

#### Калибровочный график.

Раствор пероксида водорода (раствор А) с концентрацией 10 мкг/мл готовили разбавлением стандартного титрованного раствора пероксида водорода 1 мг/мл дистиллированной водой.

В ряд мерных пробирок вносили 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 1,0; 2,0 и 3,0 мл раствора А и доводили объем раствора в каждой пробирке дистиллированной водой до 10 мл, получали серию растворов пероксида водорода с концентрацией 0,05...3,0 мкг/мл.

В каждую пробирку добавляли 0,1 мл 0,1 моль/л раствора хлорида европия, 0,1 мл  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л раствора OxTC, 0,2 мл 40 %-го раствора уротропина. Перемешивали и через 5 мин измеряли интенсивность люминесценции ионов европия при  $\lambda_{\text{эмис}} = 612$  нм и  $\lambda_{\text{возб}} = 365$  нм.

На основании полученных данных строили калибровочный график (рис. 4).

Правильность определения пероксида водорода в воде проверена методом "введено-найдено". При  $n=5$ ,  $P=0,95$  величина относительного стандартного отклонения  $s_r$  составляет 0,026...0,038. Результаты проверки и их статистическая обработка приведены в табл. 2.

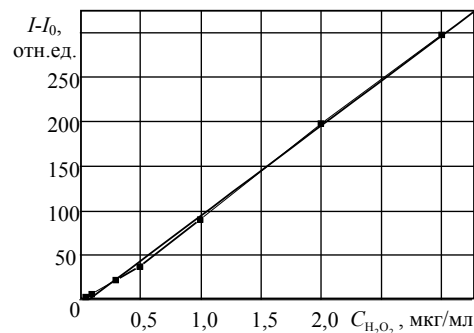


Рис. 4. Калибровочный график для определения пероксида водорода в воде ( $C_{\text{Eu}} = 1 \cdot 10^{-3}$  моль/л,  $C_{\text{OxTC}} = 1 \cdot 10^{-4}$  моль/л,  $\text{pH} = 6,8$ )

Таблица 2

Определение пероксида водорода в модельных растворах методом "введено-найдено" ( $n=5$ ;  $P=0,95$ )

№ пробы	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	$s_r$
1	0,05	$0,053 \pm 0,002$	0,038
2	0,1	$0,096 \pm 0,004$	0,035
3	0,5	$0,570 \pm 0,022$	0,032
4	2,0	$2,19 \pm 0,07$	0,026

Правильность определения пероксида водорода также подтверждена удовлетворительным совпадением результатов, полученных предлагаемым люминесцентным и известным спектрофотометрическим методом [2] (табл. 3).

Таблица 3

Определение пероксида водорода в смывных водах ( $n=5$ ,  $P=0,95$ )

№ пробы	Люминесцентный метод		Спектрофотометрический метод	
	Концентрация $H_2O_2$	$s_r$	Концентрация $H_2O_2$	$s_r$
1.	$0,22 \pm 0,009$	0,034	$0,19 \pm 0,006$	0,025
2.	$0,98 \pm 0,027$	0,022	$1,04 \pm 0,019$	0,015

Спектрофотометрическое определение пероксида водорода в водах фармпредприятий возможно в более узком диапазоне концентраций 0,1...2,0 мкг/мл и с более высоким пределом обнаружения 0,05 мкг/мл.

Предлагаемый люминесцентный метод по чувствительности сопоставим с известными методами и позволяет использовать его для определения следовых количеств пероксида водорода в воде.

### Литература

1. Методичні рекомендації щодо виконання санітарно-гігієнічних вимог до проведення мікробіологічного контролю у виробництві нестерильних лікарських засобів. — Харків.: Форт, 2002. — С. 63 — 80.
2. Ovenston T.C.J. The spectrophotometric determination of small amounts of hydrogen peroxide in aqueous solutions / Ovenston T.C.J., Rees W.T. // *Analyst*. — 1950. — Vol. 75, № 889. — P. 204 — 208.
3. Diaz N.A. Hydrogen peroxide assay by using enhanced chemiluminescence of the luminal —  $H_2O_2$  — horse radish peroxidase system: Comparative studies / Diaz N.A., Sanchez G., Garcia J.A.G. // *Anal. Chim. Acta*. — 1996. — Vol. 327. — P. 161 — 165.
4. Lin Jin-Ming. Hydrogen peroxide chemiluminescent flow-through sensor based on the oxidation with periodate immobilized on ion-exchange resin / Lin Jin-Ming, Sato Koichi, Yamada Masaaki // *Microchim. J.* — 2001. — Vol. 69. — P. 73 — 80.
5. Kaczmarek M. Chemiluminescence as the energy transfer effect in the system Eu(III) — Thenoil-trifluoroacetone —  $H_2O_2$  — NaOH / Kaczmarek M., Staninski K., Elbanowski M. // *J. Photochem. Photobiol. A*. — 2003. — Vol. 154. — P. 273 — 277.
6. Huang Y., Cai R. Determination of hydrogen peroxide using  $\beta$ -CD-hemin as a mimetic enzyme of peroxidase / Huang Y., Cai R., Mao L. and others // *Analyt. Sci.* — 1999. — Vol. 15. — P. 889 — 894
7. Lei W. Original Paper detection of hydrogen peroxide in river water via a microplate luminescence assay with time-resolved (“gated”) detection / Lei W., Durkop A. and others // *Microchim. Acta*. — 2003. — Vol. 143. — P. 269 — 274.
8. Takahashi A. Determination of hydrogen peroxide by high-performance liquid chromatography with cation-exchange resin gel column and electrochemical detection / Takahashi A., Hashimoto K., Kumazawa S., Nakayama T. // *Analyt. Sci.* — 1999. — Vol. 15. — P. 481 — 483.
9. Hirschy L.M. Lanthanide — sensitized luminescence for the detection of tetracyclines / Hirschy L.M., Dose E.V., Winefordner J.D. // *Anal. Chim. Acta*. — 1983. — Vol.147. — P.311 — 316.
10. Гайдук М.И. Спектры люминесценции европия / Гайдук М.И., Золин В.Ф., Гайгерова Л.С. — М.: Наука, 1974. — 41 с.
11. Калиновская И.В. Комплексные соединения европия с хинальдиновой кислотой и  $\beta$ -дикетонатами / Калиновская И.В., Карасев В.Е., Лифар Л.И // *Журн. неорг. химии*. — 1996. — Т. 41, № 5. — С. 766 — 769.

Поступила в редакцию 4 мая 2006 г.