

ELECTROD ION-SELECTIV PENTRU VITAMINA B₆

dr. T. Goina, Şt. Hobai

Încercări de confecţionare a unor electrozi sensibili la vitamine întîlnim după anul 1970. Este de remarcant activitatea grupului Ishibashi Nobuhiko ş.a. (1, 2) ale căror rezultate par a fi potrivite pentru confecţionarea unui electrod sensibil la vitamina B₆ şi apoi testarea acestuia în amestecuri. Datele referitoare la selectivitatea acestui electrod, existente în lucrările citate, se rezumă la câţiva cationi: NH₄⁺; Na⁺; K⁺ şi tiamina⁺.

Ne-am propus să completăm tabloul caracteristicilor acestui electrod pentru a delimita mai clar sfera sa de aplicaţii în domeniul controlului medicamentului.

Principiul de funcţionare. Un electrod membrană ion-selectiv (EMIS) conţine o membrană fixată în corpul electrodului, sensibilă la o anumită specie de ioni *i*, în contact cu o soluţie apoasă a ionilor *i* aflată în corpul electrodului, numită soluţie internă cu concentraţie constantă, iar cu suprafaţa opusă intrînd în contact cu soluţia apoasă externă, a ionilor *i*, de concentraţie variabilă.

Este cunoscut faptul că diferenţa de potenţial (d.d.p.) între cele două suprafeţe ale membranei variază cu schimbarea concentraţiei ionilor *i* în una din soluţiile apoase. Pentru măsurarea acestei variaţii a d.d.p., potenţialele de pe cele 2 suprafeţe ale membranei sînt preluate cu cîte un electrod saturat de calomel (ESC) cufundaţi în soluţiile internă respectiv externă. ESC sînt puşi în legătură cu un milivoltmetru. S-a realizat astfel o instalaţie cuprinzînd un EMIS şi un electrod de referinţă cufundaţi în soluţia externă (test), formînd astfel o celulă electrochimică legată la un potenţiometrul (fig. nr. 1).

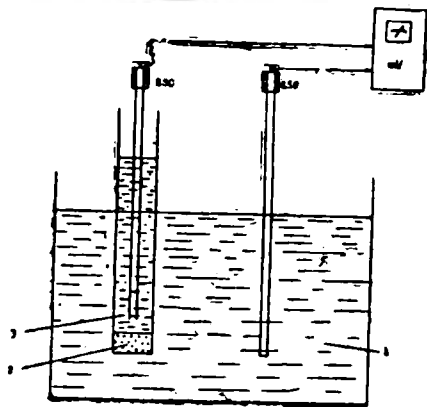


Fig. nr. 1: 1 = soluţia test; 2 = membrana;
3 = soluţia internă

Relația cantitativă dintre f.e.m. a celulei (E) și concentrația ionilor i din soluția test este dată de legea lui Nernst:

$$E = E^{\circ} \pm \frac{RT}{ZF} \ln a_i = E^{\circ} \pm \frac{2,303 RT}{ZF} \log a_i$$

unde R — constanta gazelor; T — temperatura absolută a celulei electrolitice; Z — sarcina ionilor i; F — nr. lui Faraday; semnele (\pm) — semnul ionilor i iar a_i activitatea ionilor i în soluția test.

În cazul în care această soluție mai conține și alți ioni de același semn: j, k ... relația devine:

$$E = E^{\circ} \pm \frac{RT}{ZF} \ln (a_i + K_{ij} \cdot a_j + K_{ik} \cdot a_k + \dots)$$

unde K_{ij} e coeficientul de selectivitate al electrodului în raport cu ioni j și se determină experimental.

Electrodul ion-selectiv pentru piridoxină este un electrod cu membrană lichidă. Aceasta este o soluție în nitrobenzen a asociației ionice dintre dipicrilamină (DPA) și cationul de piridoxină. Coeficienții de selectivitate ai electrodului în raport cu alți cationi sînt determinați de coeficienții de repartitie ai acestor ioni între faza apoasă și membrană (extractant). S-a dovedit însă că nu natura componentei pereche a ionilor de piridoxină este determinantă pentru selectivitatea electrodului (3), prezența acesteia asigurînd doar o anumită conductibilitate electrică a membranei. Un electrod întrucîtva asemănător se poate obține folosind în locul DPA, tetrafenilborat de sodiu. S-a demonstrat că natura solventului membranei determină selectivitatea acesteia, mai exact coeficienții de repartitie ai ionilor i, j, k ... între apă și solventul membranei (5).

Partea experimentală. Celula electrolitică-montaj

În ce privește forma celulei electrolitice, propunem cea din fig. nr. 2 care permite măsurarea concentrației vit. B_6 în flux continuu.

Lanțul electrolitic corespunzător poate fi schematizat astfel:

+ ESC KCl sat./agar-LiCl conc./sol. test/membrana sol. internă/agar-LiCl c/KCl sat./ESC.—

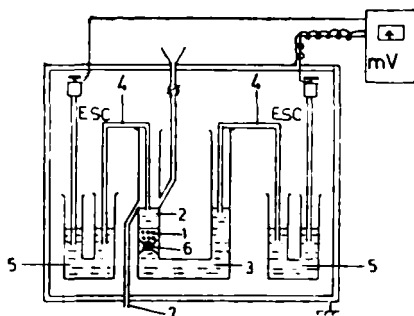


Fig. nr. 2: 1 = membrana; 2 = soluția test; 3 = soluția internă a electrodului; 4 = punți de agar LiCl conc.; 5 = soluție KCl; 6 = dop de vată; 7 = preaplin

în care lanțul-ESC/KCl-sat/agar-LiCl c/sol. internă//membrana, reprezintă electrodul ion-selectiv propriu-zis.

În această celulă electrolitică soluția test este introdusă prin pilnie permițându-i-se o continuă evacuare prin preaplin.

Valorile f.e.m. ale celulei electrolitice vor fi reproductibile pentru aceeași concentrație în vitamina B₆ a soluției test numai după atingerea echilibrului electrochimic în celulă. Acesta este condiționat de către echilibrul termodinamic și deci de cel termic. Pentru aceasta este necesară termostatarea celulei electrolitice și a soluțiilor standard și probe. Într-o cameră ale cărei variații de temperatură sînt mici în cursul zilei ($\pm 1^\circ\text{C}$), măsurile de termostatare nu sînt necesare.

Pentru citirea sau înregistrarea în bune condiții a f.e.m. este necesară închiderea celulei electrolitice într-o caje Faraday împămîntată. Aceasta poate fi din tablă de fier. Borna milivoltmetrului care corespunde rezistenței mari de intrare a acestuia se leagă de ESC printr-un conductor ecranat.

Aparatul de măsură. Avînd în vedere rezistența interioară mare a celulei electrolitice determinată de rezistența electrică a membranei ($\sim 1\text{ M}\Omega$) potențiometrele potrivite pentru măsurători ale f.e.m. vor fi doar cele cu rezistența de intrare mare cum sînt cele din seriile: MV-Clamann Grahnert, Radiometer, Beckman etc.

Dependența de pH.

Electrodul răspunde apreciabil la ionii de hidrogen. Prezența acestor ioni în concentrații variabile provoacă modificarea valorii f.e.m. a celulei pentru aceeași concentrație în vitamină ceea ce face imposibilă determinarea vitaminei.

Pentru compensarea influenței pe care o exercită variația pH-ului, am căutat un tampon potrivit pentru soluțiile de vitamină B₆ al căror pH variază cu concentrația în vitamină, datorită bazicității relativ mici a piridoxinei. În acest sens nu s-a dovedit potrivit tartratul acid de potasiu datorită interferenței ionilor de K⁺ la concentrația relativ ridicată a tamponului (0,034 m). $K_{\text{vit. B}_6}, K^+ = 2,5 \cdot 10^{-2}$ (1).

Mai bun s-a dovedit a fi tamponul acetat Walpole (4). Acesta asigură un pH care menține întreaga cantitate de piridoxină din soluție în forma protonată, forma la care este sensibil electrodul. $K_{\text{vit. B}_6}, \text{Na}^+ = 10^{-4}$ (1).

Modul de lucru

1. *Materiale necesare:* Milivoltmetru electronic (MV—11), caje Faraday, termostat, celulă electrolitică (cuprinzînd: corpul celulei, doi electrozi saturați de calomel, 2 punți de agar-LiCl c.), conductori electrici.

Substanțe: Dipicrilamină, nitrobenzen, clorhidrat de piridoxină crist., acetat de sodiu crist., acid acetic glacial.

2. *Prepararea membranei:* Se dizolvă 10 mg DPA în 50 ml nitrobenzen care se introduc într-un vas Erlenmeyer de 200 ml. Se adaugă 50 ml sol. apoasă de clorhidrat de piridoxină obținută prin dizolvarea a 20 mg substanță în 100 ml soluție. Se agită amestecul timp de 1 oră după care se separă fazele. Se adaugă fazei neapoase din nou 50 ml sol. de vitamină B₆ și se continuă agitarea încă 15 minute. Se procedează la o nouă separare a fazelor după care soluția nitrobenzenică se depozitează la întuneric. Aceasta va servi ca membrană în celula electrolitică. Se păstrează o lună.

3. *Prepararea soluției tampon:* 1000 ml soluție tampon se obține prin dizolvarea în cca. 800 ml apă distilată a 8,0 ml acid acetic și a 8,1 g acetat de sodiu cristalizat, iar apoi aducerea la semn într-un balon cotat cu apă distilată. Se păstrează o lună.

4. *Prepararea soluțiilor standard.*

Dintr-o soluție stoc de clorhidrat de piridoxină 1,00 g% al cărei factor a fost stabilit prin determinarea spectrofotometrică (6) se pipetează exact 5 ml într-un balon cotat de 500 ml. Se adaugă 125 ml soluție tampon și se aduce la semn cu apă distilată. Se obține astfel o soluție standard de clorhidrat de piridoxină, de concentrație 10 mg% cu un pH=4,30. Asemănător se prepară câteva soluții standard avind concentrații cuprinse în intervalul de 1—100 mg%. Se conservă 1 lună în recipiente de sticlă brună.

5. *Instalarea celulei electrolitice.*

Se introduc în corpul celulei electrolitice câțiva mililitri din lichidul senzitiv la vitamină (membrană). Ca soluție internă se folosește soluția standard 10 mg%. Se fixează celula în stativ, alături de ea se fixează cele 2 tuburi în formă de U, conținând soluția de KCl sat. Se introduc în aceste tuburi câte un electrod saturat de calomel și punțile de agar — LiCl conc. Stativul cu celula electrolitică se introduce în caja Faraday. Electrozii de calomel se leagă la pH-metrul MV—11.

6. *Trasarea curbei de calibrare.*

După o spălare a membranei executată prin turnarea în pilnia celulei electrolitice a 20—25 ml apă distilată, se introduce în celulă prima soluție, termostată la temperatura celulei, de preferință soluția cea mai diluată. Aceasta se face prin turnarea în pilnie a 20—25 ml sol. standard pe parcursul a 3 minute. La capătul acestei durate se măsoară f.e.m. Operația se repetă apoi pentru celelalte soluții standard în ordinea crescândă a concentrațiilor.

Se reprezintă grafic, pe hirtie milimetrică, valorile f.e.m. (tabelul nr. 1) în raport cu logaritmul concentrației soluțiilor de vit. B₆.

Tabelul nr. 1
Membrana I

Timpul (ore)	Concentr. mg%	4	10	40	100	
0,0		24,0	43,0	76,0	101,0	
1,5		23,0	42,0	75,0	100,0	
3,0		22,0	41,0	74,0	99,5	
7,0		22,5	42,0	75,0	100,5	f.e.m.
9,0		22,0	41,5	75,0	100,0	(mV)
11,5		22,0	42,0	75,5	100,0	
18,0		21,0	41,0	75,5	99,0	
Membrana II						
0,0		28,0	48,0	82,0	106,0	
1,0		26,0	46,0	80,0	104,0	f.e.m.
6,0		19,0	39,0	73,0	97,0	(mV)
21,0		18,0	38,0	72,0	96,0	

Observații: Între momentul instalării electrodului și operațiile necesare construirii curbei de calibrare este necesar să se scurgă cca. 3 ore. Recalibrarea se face la un interval de 24 ore.

În timpul nopții punțile de agar-LiCl c se păstrează într-o soluție conc. de LiCl.

Curba de calibrare obținută va servi la determinarea concentrației cunoscute a soluției de vitamină B₆.

7. Selectivitatea.

Folosind electrodul descris, noi am studiat influența pe care o exercită asupra f.e.m. a celulei, prezența în soluțiile de vit. B₆ a unor substanțe de interes farmaceutic.

Vitamina B₁. În fig. nr. 3 am reprezentat curba de calibrare folosind soluțiile standard și curba obținută utilizând soluții în care concentrația vit. B₆ a fost menținută constantă iar concentrația vit. B₁ e variabilă. Se constată o influență apreciabilă asupra electrodului acestei vitamine, ea constituind un interferent serios. Am folosit pentru prepararea soluțiilor fiole cu soluții de vit. B₁ injectabile a căror concentrație am determinat-o prin metoda spectrofotometrică (6). Coeficientul de selectivitate menționat în literatura citată (1) este $K = 0,1$.

Vitamina B₂. În fig. nr. 4 am reprezentat curba de calibrare corespunzătoare soluțiilor standard, apoi curba obținută pentru soluții de vit. B₆ în cantități variabile conținând și vit. B₂ la concentrație constantă,

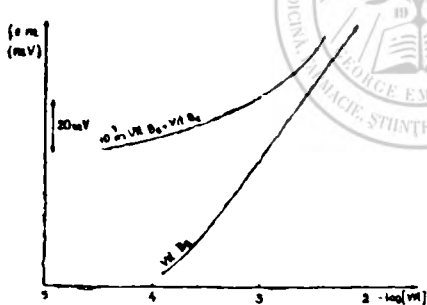


Fig. nr. 3

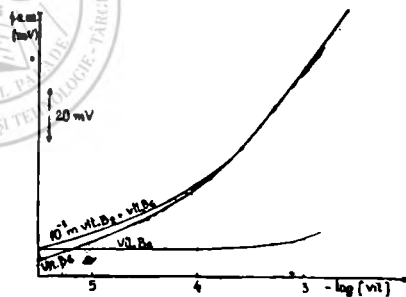


Fig. nr. 4

10^{-3} m și curba corespunzătoare soluțiilor conținând numai vitamina B₂ în concentrații variabile. Din grafic rezultă o bună selectivitate a electrodului în raport cu vit. B₂ ceea ce înseamnă că pot fi dozate soluții de vitamină B₆ ce conțin vitamina B₂ în exces, fără erori. Pentru prepararea soluțiilor am utilizat riboflavină pură.

Vitamina PP (nicotinamida).

În fig. nr. 5 am reprezentat curba de calibrare corespunzătoare soluțiilor standard și curba corespunzând soluțiilor de vit. PP în concentrații variabile conținând și vit. B₆ la concentrație constantă — 10^{-3} m. După

cum rezultă se pot doza soluții cu vit. B₆ alături de care se găsesc și cantități pînă la echivalente de vit. PP. Pentru prepararea soluțiilor am utilizat nicotinamida pură.

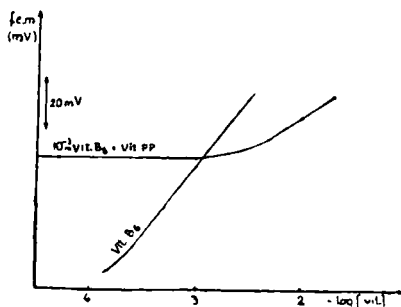


Fig. nr. 5

Cisteina. Prin măsurarea f.e.m. a celulei electrolitice conținând soluție standard 1 mg⁰/₀ și apoi soluție conținând 1 mg⁰/₀ vitamină B₆ în amestec cu cisteină 10⁻² m, $\Delta E = 1$ mV. Aceasta dovedește posibilitatea dozării vit. B₆ în prezența unui exces mare de cisteină.

Glucosa. Idem cu cisteina.

Sosit la redacție: 11 decembrie 1976.

Bibliografie

1. Nobuhiko Ishibashi, Kenyu Kina, Nobuko Maekawa: Chemistry Letters (1973), 119; 2. Kenyu Kina, Nobuko Maekawa, Nobuhiko, Ishibashi: Bull. Chem. Soc. of Japan (1973), 46, 2772; 3. Luca C., Semenescu Gh.: Rev. de chimie (1975), 11, 26, 946; 4. Luca C.: ph-ul și aplicațiile lui. Ed. tehnică, București, 1973; 5. Helen J. James, Gary P. Cormack, Henry Freiser: Analyt. Chemistry (1972), 44, 853; 6. Baloescu C., Sterescu M.: Metode spectrofotometrice de absorbție aplicate la controlul medicamentelor. Ed. medicală, București, 1975.

Disciplina de tehnică farmaceutică (cond.: conf. dr. L. Ádám doctor-farmacist)
și Disciplina de microbiologie (cond.: prof. dr. I. László doctor în medicină)
ale I.M.F. din Tîrgu-Mureș

CONTRIBUȚII LA STUDIUL COLIRELOR VÍSCOASE CU ANTIBIOTICE

dr. L. Ádám, M. Giurgiu, dr. L. Domokos, Lenke Lórincci

Colirele viscoase prezintă în multe cazuri acțiune terapeutică mai avantajoasă decât soluțiile oftalmice obișnuite (1, 3, 4, 7, 9).

Acțiunea favorabilă a agenților de viscozitate adăugați la colire se poate explica pe de o parte prin reducerea tensiunii de interfață, care