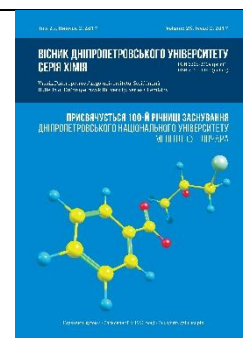




Вісник Дніпропетровського університету. Серія Хімія  
Bulletin of Dnipropetrovsk University. Series Chemistry

p-ISSN 2306-871X, e-ISSN 2313-4984

journal homepage: <http://chemistry.dnu.dp.ua>



UDC 547.724

## SIMULTANEOUS KINETIC DETERMINATION OF ASCORBIC ACID AND ANALGINE IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS BY H-POINT STANDARD ADDITION METHOD

Mohammed E. A. Al-Shwaiyat,<sup>1</sup> Yuliia V. Miekh,<sup>2</sup> Tatyana A. Denisenko\*,<sup>2</sup> Andriy B. Vishnikin,<sup>2</sup>  
Yaroslav R. Bazel<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Zarka University College, Al-Balqa Applied University, Zarka St. 30, Al-Salt, 19117 Jordan

<sup>2</sup>Oles Honchar Dnipro National University, 72 Gagarin Ave., Dnipro, 49010, Ukraine

<sup>3</sup>Pavol Jozef Šafárik University, Šrobárova, 2, Košice, 04154, Slovak Republic

Received 26 November 2017; revised 05 December 2017; accepted 18 December 2017

### Abstract

A new approach for the simultaneous kinetic determination of ascorbic acid and analgin by the H-point standard addition method (HPSAM) based on the difference in oxidation rates of reducing agents in the reaction with 18-molybdodiphosphoric heteropoly complex (18-MPC) has been proposed. The main prerequisites of the H-point method are better satisfied at pH 3.5, at which ascorbic acid reacts with 18-MPC much faster than analgin. The time interval from 60 to 750 s was chosen as optimal. Under the selected conditions, the increase in absorbance for the reaction of analgin with 18-MPC is greatest, while the absorbance of ascorbic acid remains constant within the error margin. The measurement of light absorption was automated using a combination of a spectrophotometer SF-26 with an oscilloscope VM8020. Ascorbic acid and analgin can be determined in the concentration range  $3.5 \cdot 10^{-6}$  –  $1.5 \cdot 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> and  $2.5 \cdot 10^{-6}$  –  $4.0 \cdot 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, respectively. The proposed method has been applied for the simultaneous kinetic determination of analgin and ascorbic acid in model solutions and pharmaceutical preparations.

**Keywords:** simultaneous determination; ascorbic acid; analgin; 18-molybdo-2-phosphate heteropoly complex; pharmaceutical preparations; spectrophotometric; H-point standart addition method (HPSAM)

## ОДНОЧАСНЕ КІНЕТИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ АСКОРБІНОВОЇ КИСЛОТИ ТА АНАЛЬГІНУ У ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ СТАНДАРТНИХ ДОБАВОК H-POINT

Мохамед І. А. Аль-Швейят,<sup>1</sup> Юлія В. Мех,<sup>2</sup> Тетяна О. Денисенко\*,<sup>2</sup> Андрій Б. Вишнікін,<sup>2</sup>  
Ярослав Р. Базель<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Університетський коледж м. Зарка, Прикладний Університет Аль-Балка, Зарка, вул. Аль-Салт, 30, 19117, Йорданія

<sup>2</sup>Дніпровський національний університет імені Олесе Гончара, пр. Гагаріна, 72, Дніпро, 49010, Україна

<sup>3</sup>Університет П.Й. Шафарика, 01454 Кошице, Словацька республіка

### Анотація

Запропоновано новий підхід для одночасного кінетичного визначення аскорбінової кислоти та анальгін методом стандартних добавок H-point, який ґрунтується на різниці у швидкостях окислення відновників у реакції з 18-молібдодифосфорним гетерополікомплексом (18-МФК). Головні передумови методу H-point найкраще виконуються при рН 3.5, при якому аскорбінова кислота реагує з 18-МФК набагато швидше за анальгін. Як оптимальний обрано інтервал часу від 60 до 750 с. В обраних умовах зростання світлопоглинання для реакції анальгін з 18-МФК є найбільшим, в той час як оптична густина для аскорбінової кислоти залишається постійною у межах похибки. Вимірювання світлопоглинання автоматизовано з використанням комбінації спектрофотометра СФ-26 з осцилографом ВМ8020. Аскорбінова кислота та анальгін можуть бути визначені в інтервалі концентрацій  $3.5 \cdot 10^{-6}$  –  $1.5 \cdot 10^{-5}$  моль/л та  $2.5 \cdot 10^{-6}$  –  $4.0 \cdot 10^{-5}$  моль/л, відповідно. Запропонований метод апробований для одночасного кінетичного визначення анальгін та аскорбінової кислоти в модельних розчинах та фармацевтичних препаратах.

**Ключові слова:** одночасне визначення; аскорбінова кислота; анальгін; 18-молібдодифосфорний гетерополікомплекс; фармацевтичні препарати; спектрофотометрія; метод стандартних добавок H-point

\*Corresponding author: e-mail address: [denisenko\\_tatyana@i.ua](mailto:denisenko_tatyana@i.ua)

© 2017 Oles Honchar Dnipro National University

doi: 10.15421/081713

## ОДНОВРЕМЕННОЕ КИНЕТИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ И АНАЛЬГИНА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ МЕТОДОМ МНОГОКРАТНЫХ ДОБАВОК N-POINT

Мохаммед И. А. Аль-Швейят,<sup>1</sup> Юлия В. Мех,<sup>2</sup> Татьяна А. Денисенко\*,<sup>2</sup> Андрей Б. Вишник,<sup>2</sup>  
Ярослав Р. Базель<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Университетский колледж г. Зарка, Прикладной Университет Аль-Балка, Зарка, ул. Аль-Салт, 30,  
19117, Иордания

<sup>2</sup>Днепропетровский национальный университет имени Олеса Гончара, пр. Гагарина, 72, Днепро, 49010,  
Украина

<sup>3</sup>Университет П.Й. Шафарика, 01454 Кошице, Словацкая республика

### Аннотация

Предложен новый подход для одновременного кинетического определения аскорбиновой кислоты и аналгина методом стандартных добавок N-point, основанный на разнице в скоростях окисления восстановителей в реакции с 18-молибдодифосфорным гетерополикомплексом (18-МФК). Главные предпосылки метода N-point лучше выполняются при pH 3.5, при котором аскорбиновая кислота реагирует с 18-МФК гораздо быстрее, чем аналгин. В качестве оптимального выбрали интервал времени от 60 до 750 с. В выбранных условиях рост светопоглощения для реакции аналгина с 18-МФК является наибольшим, в то время как оптическая плотность для аскорбиновой кислоты остается постоянной в пределах погрешности. Измерение светопоглощения автоматизировано с использованием комбинации спектрофотометра СФ-26 с осциллографом ВМ8020. Аскорбиновая кислота и аналгин могут быть определены в интервале концентраций  $3.5 \cdot 10^{-6}$  –  $1.5 \cdot 10^{-5}$  моль/л и  $2.5 \cdot 10^{-6}$  –  $4.0 \cdot 10^{-5}$  моль/л, соответственно. Предложенный метод апробирован для одновременного кинетического определения аналгина и аскорбиновой кислоты в модельных растворах и фармацевтических препаратах.

**Ключевые слова:** одновременное определение; аскорбиновая кислота; аналгин; 18-молибдодифосфорный гетерополикомплекс; спектрофотометрия; метод стандартных добавок N-point.

### Введение

Важнейшей частью фармацевтического анализа является контроль содержания активных компонентов лекарственных веществ. Необходимость контроля обусловлена тем, что при несоблюдении норм не только снижается фармакологическое действие фармацевтических препаратов, но и возникает опасность для здоровья человека. Анальгин (АН) (рис. 1) и аскорбиновая кислота (АК) (рис. 2) [1] нашли широкое применение в медицинской практике, и являются неотъемлемой составной частью многих комбинированных фармацевтических препаратов. АН выступает как анальгетик, компонент, обладающий жаропонижающими и противовоспалительными свойствами, в то время как АК играет важную роль в регуляции углеводного обмена, свертываемости крови, регенерации тканей, способствует повышению сопротивляемости организма при заболеваниях. Необходимо отметить, что избыточное количество АН способно вызывать гипотермию и коллаптоидное состояние, агранулоцитоз, а также анафилактический шок, а дефицит АК в организме приводит к таким заболеваниям как цинга и гипопластическая анемия.

Ранее были предложены многочисленные методы определения АН или АК, среди которых особое место занимают спектрофотометрические (СФ) методики,

которые основываются на высокой реакционной способности АК и АН. В качестве аналитических реагентов для определения этих восстановителей чаще всего используют хлорамин, 2,6-дихлориндофенол, реактив Фолина-Чокальтеу и др.

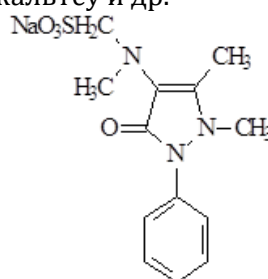


Fig. 1. Structural formula of analgin  
Рис. 1. Структурная формула аналгина

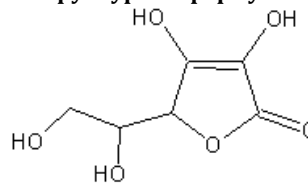


Fig. 2. Structural formula of ascorbic acid  
Рис. 2. Структурная формула аскорбиновой кислоты

Наибольший интерес представляют методики, в которых в качестве аналитических реагентов используют гетерополикомплексы (ГПК) структуры Доусона. Благодаря своей высокой реакционной способности реактив Фолина-Чокальтеу (ФЧ), который представляет собой смесь разнолигандных молибдо-

вольфрамовых  $\text{Na}_6\text{P}_2\text{Mo}_n\text{W}^{18-n}\text{O}_{62}$  ( $n = 4 - 5$ ) [2] уже больше ста лет используется для определения различного рода восстановителей [3–5]. Реактив ФЧ представляет собой водный раствор, полученный путём синтеза, который имеет переменный состав, зависящий от условий проведения синтеза. Этот ГПК можно использовать в узком диапазоне pH – в среде 20 % натрий карбоната (pH 11.2). СФ методики с реактивом ФЧ характеризуются достаточно высокой экспрессностью и воспроизводимостью полученных результатов, но обладают низкой селективностью. Существует необходимость использовать высокие концентрации реагента, который содержит ядовитые соединения молибдена(VI) и вольфрама(VI). Градуировочные графики для определения некоторых восстановителей имеют нелинейный характер [6]. Преодолеть указанные выше недостатки можно с помощью 18-молибдодифосфата (18-МФК) [7–9], который обладает наибольшим среди всех изученных ГПК окислительно-восстановительным потенциалом, что позволяет использовать его в широком диапазоне pH [10–12] и повысить селективность СФ методик.

Предложены СФ методики с 18-МФК для определения таких восстановителей, как АК, фенольные соединения, катехоламины, тиамин, цистеин, эпинефрин и других, а также восстановителей нитрит-ионов [13–18]. Ранее нами была предложена методика для совместного определения АК и рутина с помощью 18-МФК, основанная на их различиях в реакционной способности от pH раствора [19; 20]. В отличие от указанной системы, АК и АН обладают близкими окислительно-восстановительными потенциалами, поэтому их индивидуальное определение при совместном присутствии с помощью традиционных спектрофотометрических подходов является затруднительным. Одним из лучших способов решения данной проблемы является использование дифференциальных кинетических методов, преимущество которых заключается в отсутствии необходимости предварительного разделения компонентов.

Одним из современных вариантов дифференциальных кинетических методов является метод многократных добавок (H-point standard addition method, HPSAM), впервые предложенный в 1988 году Bosch-Reig

с сотр. [21; 22]. H-point метод позволяет не только определить вещество в присутствии фонового интерферента, но и концентрацию самого интерферента, если известны его характеристики, а также учесть пропорциональную и постоянную погрешность [23; 24]. При условии, что один из восстановителей вступает в реакцию намного быстрее другого, H-point метод позволяет точно и просто определить концентрации обоих компонентов. При этом нет необходимости иметь данные по константам скорости реакции, сумме концентраций исходных компонентов или оптической плотности в момент окончания реакции, что является существенным ограничением большинства предшествующих дифференциальных кинетических методов анализа.

Цель работы заключалась в разработке экспрессной, высокочувствительной кинетической спектрофотометрической методики одновременного определения аналгина и аскорбиновой кислоты, основанной на использовании разности в скоростях их реакций с 18-молибдодифосфорным гетерополикомплексом и расчетном методе многократных добавок H-point.

## Экспериментальная часть

### Реагенты и аппаратура

Все используемые реагенты соответствовали классу «х.ч.». В качестве реагента использовали 18-МФК  $(\text{NH}_4)_6\text{P}_2\text{Mo}_{18}\text{O}_{62} \cdot 14\text{H}_2\text{O}$ , который был синтезирован в соответствии с методикой [25]. Исходный раствор аммонийной соли 18-МФК с концентрацией 0.01 моль/л готовили растворением 0.7855 г полученной соли в бидистиллированной воде. После полного растворения доводили объем до метки в колбе на 25 мл.

Учитывая быстрое окисление АК в результате контакта с воздухом, исходный и рабочий растворы готовили непосредственно перед использованием. Исходный раствор АК концентрацией 0.01 моль/л готовили путем растворения точной навески сухого вещества 0.044 г в колбе емкостью 25 мл в этиловом спирте 96%, что повышает устойчивость раствора до одного дня при условии его хранения в холодильнике. При этом рекомендуется рабочий раствор готовить в свежeproкипяченной дистиллированной воде и использовать однократно, непосредственно

перед экспериментом. Для приготовления раствора метамизола натрия использовали его активную форму, содержащуюся в медицинском препарате «Анальгин-Дарница, 500 мг». Для этого растирали в ступке 5 таблеток до порошкообразного состояния, взвешивали навеску порошка, равную по массе одной таблетке (0.5184 г), растворяли в 100 мл дистиллированной воды, доводили до метки. Для удаления вспомогательных компонентов (крахмал, тальк, кальция стеарат) фильтровали полученный раствор через воронку Бюхнера. Затем, путем разбавления готовили  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л рабочий раствор. Универсальные буферные растворы готовили в соответствии с рекомендациями [26].

В качестве объектов анализа использовали модельные системы и лекарственный препарат «Антигриппин-Анви».

Измерения оптической плотности были автоматизированы при помощи осциллографа ВМ8020 в комбинации с спектрофотометром СФ-26 (ЛОМО, Россия). рН измеряли на рН-метре марки рН-150 МИ со стеклянным индикаторным электродом марки ЭС-10601 и хлоридсеребряным электродом сравнения марки ЭСР-10101.

#### *Построение градуировочных зависимостей*

Для построения градуировочного графика для каждого из восстановителей в мерные колбы емкостью 25 мл отбирали объем АК и АН с концентрацией  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л таким образом, чтобы получить растворы АК и АН в диапазоне концентраций  $8 \cdot 10^{-6}$  –  $16 \cdot 10^{-5}$  моль/л и  $8 \cdot 10^{-6}$  –  $4 \cdot 10^{-4}$  моль/л, соответственно. Добавлением 2 мл универсального буферного раствора с рН 3.57 создавали необходимую кислотность среды. Доводили объем бидистиллированной водой до метки, перемешивали. Полученную смесь переносили в мерный стакан на 100 мл, и при интенсивном перемешивании с помощью мешалки добавляли 3.5 мл 18-МФК с концентрацией  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л ( $\Sigma V = 28.5$  мл). Аналитический сигнал регистрировали на спектрофотометре СФ-26, который был подсоединён к персональному компьютеру посредством осциллографа. Светопоглощение измеряли при длине волны 910 нм (изобестическая точка в спектре смеси одно- и двухэлектронных гетерополисиней) в кювете на 1 см. Раствором сравнения служила бидистиллированная вода.

#### *Методика дифференциального кинетического определения АК и АН методом многократных стандартных добавок N-point*

Для одновременного кинетического определения АК и АН в фармацевтических препаратах и модельных растворах с различным содержанием аналитов использовали метод многократных стандартных добавок N-point. При этом в качестве добавок выступали известные концентрации АН как медленного участника реакции. В мерные колбы емкостью 25 мл отбирали аликвоту того или иного образца с добавлением 2 мл универсального буферного раствора с рН 3.57. После этого вносили различные добавки  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л раствора АН. Доводили объем бидистиллированной водой до метки, перемешивали. Полученную смесь переносили в мерный стакан на 100 мл, добавляли 3.5 мл 18-МФК с концентрацией  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л ( $C_{18-МФК} = 1.23 \cdot 10^{-3}$  моль/л,  $\Sigma V = 28.5$  мл) при постоянном перемешивании раствора на магнитной мешалке. В стеклянную кювету на 1 см отбирали 5 мл смеси для последующей регистрации сигнала светопоглощения на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 910 нм. В качестве раствора сравнения использовалась бидистиллированная вода. По результатам определения построили графики зависимости оптической плотности от концентрации добавки АН в фотометрируемом растворе для 60 и 750 с при двух длинах волн. Концентрацию АН определяли по точке пересечения двух прямых – N-Point точке – экстраполяцией на ось абсцисс или расчетным способом, исходя из параметров уравнений двух градуировочных прямых, рассчитанных по методу наименьших квадратов. Оптическую плотность АК рассчитывали исходя из значения светопоглощения, полученного путем экстраполяции на ось ординат N-Point точки или расчетным методом. Для последующего определения концентрации АК использовали градуировочный график, построенный для длины волны 910 нм.

#### *Одновременное определение АК и АН в лекарственных препаратах*

Для одновременного кинетического определения АК и АН в лекарственных препаратах раствор образца готовили следующим образом. 10 таблеток взвешивали на аналитических весах с точностью до 0.0002 мг, затем измельчали до порошкообразного состояния. Отбирали

количество образца, которое соответствует одной таблетке, растворяли в воде и доводили до метки в мерной колбе на 100 мл. Пропускали полученную суспензию через воронку Бюхнера для отделения от нерастворимых компонентов. Затем, анализируемую смесь разбавляли таким образом, чтобы полученная концентрация АК и АН соответствовала примерно середине градуировочной зависимости для каждого из веществ. Дальнейший анализ образцов проводили по вышеуказанной методике.

## Результаты и их обсуждение

### *Теоретические основы метода многократных стандартных добавок N-point*

Метод многократных добавок NPSAM применим для случая одновременного кинетического определения двух веществ даже тогда, когда в результате реакций с используемым реагентом образуется одно и то же вещество, как в предлагаемой методике. При реакции и аналгина, и аскорбиновой кислоты с 18-МФК в избытке реагента образуется двухэлектронная гетерополисинь, имеющая максимум поглощения при 820 нм. Кинетический вариант метода NPSAM используется, когда один компонент реагирует намного быстрее, чем другой. Этот подход основан на предположении, что только компонент X реагирует во времени, в то время как аналитический сигнал для компонента Y является постоянным. В этом варианте метода выбирается временная пара  $t_1$  и  $t_2$ , для которой в данный временной интервал можно пренебречь изменением светопоглощения компонента Y.

В анализируемую смесь вносят  $n$  добавок медленного компонента X и измеряют светопоглощение для времен  $t_1$  и  $t_2$ . Получают две зависимости оптической плотности от концентрации добавки, которые описываются следующими уравнениями:

$$\begin{aligned} A_{t1} &= b_0 + b + M_{t1}C_i \\ A_{t2} &= A_0 + A' + M_{t2}C_i \end{aligned}$$

где  $A_{t1}$  и  $A_{t2}$  – аналитический сигнал смеси при  $t_1$  и  $t_2$ , соответственно.  $b_0$  и  $A_0$  ( $b_0 \neq A_0$ ) – оптическая плотность компонента X в анализируемой смеси при  $t_1$  и  $t_2$ ,  $b$  и  $A'$  – оптическая плотность компонента Y при  $t_1$  и  $t_2$ , соответственно.  $M_{t1}$  и  $M_{t2}$  – наклоны стандартных градуировочных зависимостей метода многократных добавок для  $t_1$  и  $t_2$ , соответственно, а  $C_i$  – добавка концентрации компонента X. По результатам измерений

строятся две градуировочные прямые, которые пересекаются в точке называемой Н-точка с координатами  $(-C_H, A_H) = (-C_X, A_Y)$ , следовательно

$$C_H = \frac{[(A' - b) + (A_0 - b_0)]}{(M_{t1} - M_{t2})}$$

Так как предполагается, что Y остается постоянным значением во времени, то  $A' = b$ ,

$$C_H = \frac{(A_0 - b_0)}{(M_{t1} - M_{t2})}$$

В заключение можно сказать, что если Y известно и аналитический сигнал соответствующий Y,  $b$  (при  $t_1$ ) и  $A'$  (при  $t_2$ ) не изменяется при добавке концентрации компонента X, то

$$A_H = b$$

и аналогичным образом

$$A_H = A'$$

Поэтому общее уравнение для светопоглощения в Н-точке может быть упрощено до

$$A_H = b = A_Y = A'$$

Следовательно, значение  $A_H$  связано только с сигналом компонента Y при выбранной временной паре, а  $C_H$  не зависит от концентрации Y. Для оценки концентрации Y от значения ординаты в Н-точке ( $A_H$ ) необходима градуировочная зависимость индивидуального компонента (стандарта) или единичное значение светопоглощения. В предложенной методике в качестве компонента X выступал аналгин, а аскорбиновая кислота, как компонент, имеющий постоянный аналитический сигнал во времени, отвечала компоненту Y.

### *Оптимизация условий определения*

При разработке методики одновременного определения АК и АН методом N-point были найдены условия, при которых выполняются все его предпосылки. Этот метод основан на использовании разности в скорости образования гетерополисини (ГПС) в реакции взаимодействия определяемых веществ с 18-МФК. Продуктом реакции обоих веществ с 18-МФК в избытке реагента является одна и та же восстановленная форма – двухэлектронная ГПС формулы  $\text{PMo}_2^{\text{VI}}\text{Mo}_{16}^{\text{VI}}\text{O}_{62}^{8-}$ . Поэтому спектры поглощения продуктов взаимодействия восстановителей с 18-МФК идентичны (рис. 3).

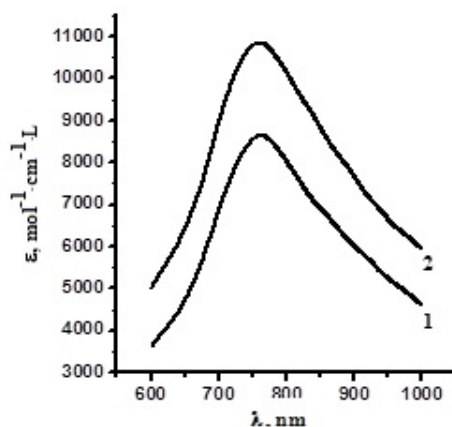


Fig. 3. Spectra of heteropoly blue obtained by reduction 18-MDC Asc (1) and An (2).

$C_{Asc}=1.6 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ ,  $C_{An}=1.6 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ ,  
 $C_{18\text{-MDC}}=1.6 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ ,  $\ell=1 \text{ cm}$ , time of formation of heteropoly blue 20 min (An), 1 hour (Asc), pH 2

Рис. 3. Спектры гетерополисиней, полученных при восстановлении 18-МФК АК (1) и АН (2).

$C_{AK}=1.6 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}$ ,  $C_{AH}=1.6 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}$ ,  
 $C_{18\text{-МФК}}=1.6 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}$ ,  $\ell=1 \text{ см}$ , время образования ГПС 20 мин (АН), 1 час (АК), pH 2

Одним из условий выполнения предпосылок метода Н-point для одновременного кинетического определения является выбор подходящего значения pH, при котором наблюдается полное и быстрое восстановление одного из компонентов. Влияние pH среды на скорость взаимодействия ГПК с восстановителями изучали в интервале pH от 1 до 5. Как видно из экспериментальных данных, представленных на рис. 4, скорость образования ГПС при реакции 18-МФК с АК на первых стадиях реакции замедляется уже при  $\text{pH} < 3$ , а при  $\text{pH} < 2$  образование ГПС становится особенно медленным. Кроме кислотности среды на скорость образования ГПС также влияет концентрация реагента. Увеличение концентрации восстановителей при неизменном содержании ГПК может привести к смещению точки пересечения Н-point, что обуславливается недостаточным избытком реагента в реакционной смеси. Это находится в соответствии с необходимостью выполнения одного из условий метода Н-point – проведение определения в условиях обеспечения псевдопервого порядка реакции.

Было установлено, что при оптимальном значении кислотности среды (pH 3.5) предпосылки метода Н-point наиболее полно выполняются при создании избытка реагента соответствующего диапазону концентраций 18-МФК  $9 \cdot 10^{-4}$  –  $1.2 \cdot 10^{-3}$  моль/л. В указанных условиях реакция с АК заканчивается за время

менее 30 с, а скорость реакции АН с 18-МФК намного меньше. Также, что важно, выполняется правило аддитивности оптических плотностей (рис. 5). При pH 2 уже АН реагирует с 18-МФК намного быстрее, чем АК, но, как оказалось, все же недостаточно быстро и найти условия, при которых вклад светопоглощения АН оставался бы постоянным на всем промежутке времени оказалось невозможным, так как полное его восстановление может занимать более суток.

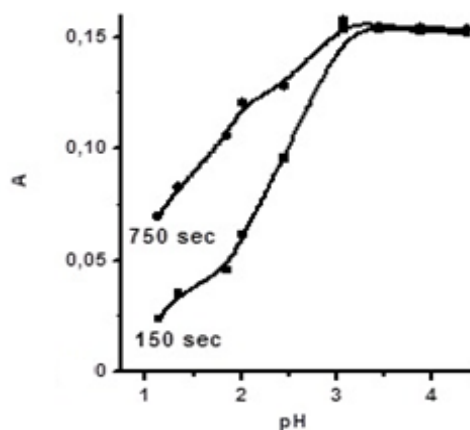


Fig. 4. Kinetic dependence of absorption from pH for Asc.  $C_{18\text{-MDC}}=9.09 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ ,  $C_{Asc}=1.45 \cdot 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ ,  $\lambda=910 \text{ nm}$ ,  $\ell=1 \text{ cm}$

Рис. 4. Кинетическая зависимость оптической плотности светопоглощения от pH для АК.  
 $C_{18\text{-МФК}}=9.09 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}$ ,  $C_{AK}=1.45 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$ ,  
 $\lambda=910 \text{ нм}$ ,  $\ell=1 \text{ см}$

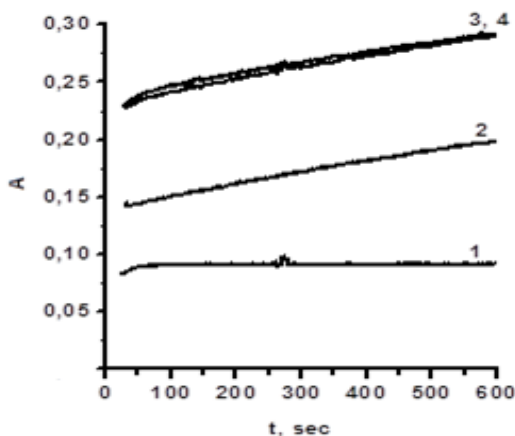


Fig. 5. Kinetic curves of the reduction of 18-MDC Asc (1) and An (2), a mixture of Asc and An (3), the calculated absorption of the mixture of reducing agents (4).  $C_{18\text{-MDC}}=9.09 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ ,  $C_{Asc}=1.09 \cdot 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ ,  $C_{An}=2.90 \cdot 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ ,  $\lambda=910 \text{ nm}$ ,  $\ell=1 \text{ cm}$ , pH 3.53

Рис. 5. Кинетические кривые восстановления 18-МФК АК (1) и АН (2), смеси АК и АН (3), рассчитанное светопоглощение смеси восстановителей (4).

$C_{18\text{-МФК}}=9.09 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}$ ,  $C_{AK}=1.09 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$ ,  
 $C_{AH}=2.90 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$ .  $\lambda=910 \text{ нм}$ ,  $\ell=1 \text{ см}$ , pH 3.53

Учитывая кислотность среды, а также соотношение концентраций восстановителей и 18-МФК, было установлено, что оптическую плотность светопоглощения ГПС нужно измерять при длине волны 910 нм, которая соответствует изобестической точке в спектрах смеси 1е и 2е синей (рис. 6).

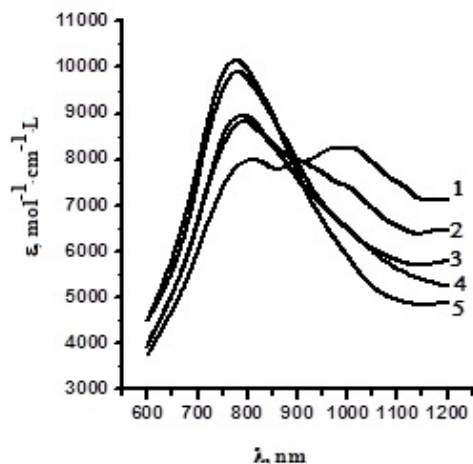


Fig. 6. Dependence of  $\epsilon$  from  $\lambda$  for reduction of HPC Asc.  $C_{18\text{-MDC}}=1 \cdot 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ ,  $C_{\text{Asc}}=1-0.2, 2-0.5, 3-1, 4-2, 5-5 \cdot 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ ,  $\ell=1 \text{ cm}$ , pH (universal buf. solution) 3.0,  $t=20 \text{ min}$

Рис. 6. Зависимость  $\epsilon$  от  $\lambda$  восстановления ГПК АК.  $C_{18\text{-МФК}}=1 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}$ ,  $C_{\text{АК}}=1-0.2, 2-0.5, 3-1, 4-2, 5-5 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}$ ,  $\ell=1 \text{ см}$ , pH (унив. буф. р-р) 3.0,  $t=20 \text{ мин}$

При выборе подходящего времени для построения кривых Н-point метода придерживались следующих ограничений. При выбранных значениях времени градуировочные зависимости должны сохранять линейность, при этом аналитические сигналы смеси, состоящей из аналитов и возможных мешающих компонентов должны быть равны сумме индивидуальных сигналов двух соединений. С целью достижения максимально возможной точности определения разность наклонов двух прямых, полученных при временах восстановления  $t_1$  и  $t_2$  должна быть как можно больше [27]. Учитывая это, нами были протестированы следующие временные пары – 750-60, 750-100, 750-150, 750-180, 660-60, 600-60 сек. Для этих пар были построены градуировочные зависимости для определения АН, концентрация которого в модельных смесях определялась по пересечению с осью Y (рис. 7).

В качестве оптимальной была выбрана временная пара 60 – 750 сек, для которой была получена максимальная разница в наклонах зависимостей светопоглощения от концентрации добавки АН при указанных

временах. Примеры кривых, полученных при одновременном определении аналитов методом многократных добавок Н-point, изображены на рис. 8. Показана возможность одновременного определения АК и АН с удовлетворительной точностью в интервале концентраций  $3.5 \cdot 10^{-6} - 1.5 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$  и  $2.5 \cdot 10^{-6} - 4 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$ , соответственно.

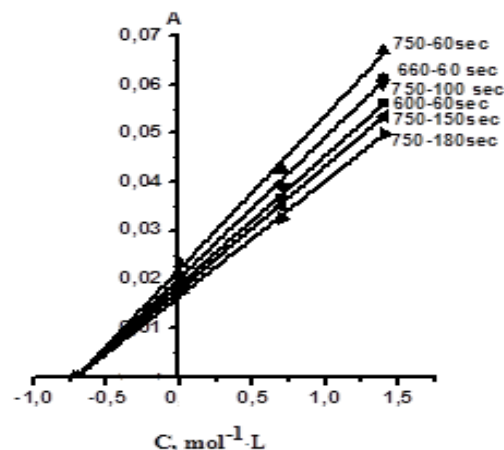


Fig. 7. Curves of the H-Point method, constructed for different time intervals for model mixtures containing Asc and An.  $C_{18\text{-MDC}}=1.23 \cdot 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ ,  $C_{\text{Asc}}=0.7 \cdot 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ ,  $C_{\text{An}}=0.7 \cdot 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ ,  $\ell=1 \text{ cm}$ , pH 3.36,  $\lambda=910 \text{ nm}$

Рис. 7. Кривые метода Н-Point, построенные для разных временных интервалов для модельных смесей, содержащих АК и АН.  $C_{18\text{-МФК}}=1.23 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}$ ,  $C_{\text{АК}}=0.7 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$ ,  $C_{\text{АН}}=0.7 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$ ,  $\ell=1 \text{ см}$ , pH 3.36,  $\lambda=910 \text{ нм}$

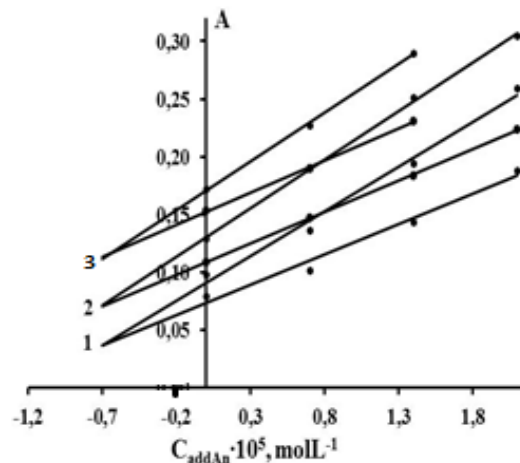


Fig. 8. The calibration dependences of the H-point standard addition method.  $C_{18\text{-MDC}}=1.23 \cdot 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ ,  $C_{\text{Asc}}: 1 - 3.5 \cdot 10^{-6}, 2 - 0.7 \cdot 10^{-5}, 3 - 1.05 \cdot 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ ,  $C_{\text{add.An}}=0.7 \cdot 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ ,  $\ell=1 \text{ cm}$ , pH 3.36,  $\lambda=910 \text{ nm}$ ,  $t_1$  and  $t_2$  60 and 750 sec

Рис. 8. Градуировочные зависимости метода многократных добавок Н-point.  $C_{18\text{-МФК}}=1.23 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}$ ,  $C_{\text{АК}}: 1 - 3.5 \cdot 10^{-6}, 2 - 0.7 \cdot 10^{-5}, 3 - 1.05 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$ ,  $C_{\text{доб.АН}}=0.7 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$ ,  $\ell=1 \text{ см}$ , pH 3.36,  $\lambda=910 \text{ нм}$ ,  $t_1$  и  $t_2$  60 и 750 сек.

Была оценена воспроизводимость стандартное отклонение составило от 2 до 3%. одновременного определения аналитов Коэффициенты корреляции уравнений Н-point методом (табл. 1). Метод регрессии кривых метода Н-Point были выше, характеризуется удовлетворительной чем 0.998 во всех случаях. воспроизводимостью. Относительное

Table 1

## Results of the kinetic determination of Asc and An by the H-point method

Таблица 1

## Результаты кинетического определения АК и АН методом Н-point

Regression equation*	R <sup>2</sup>	C <sub>added</sub> ·10 <sup>-5</sup> , molL <sup>-1</sup>		C <sub>found</sub> ·10 <sup>-5</sup> , molL <sup>-1</sup>	
		Asc	An	Asc	An
A <sub>60</sub> = 0.0544·C + 0.1087	0.9998	1.05	0.70	1.01	0.67
A <sub>750</sub> = 0.0840·C + 0.1303	0.9991	1.05	0.70		
A <sub>60</sub> = 0.0504·C + 0.1066	0.9995	1.05	0.70	1.04	0.72
A <sub>750</sub> = 0.0940·C + 0.1113	0.9988	1.05	0.70		
A <sub>60</sub> = 0.0560·C + 0.1166	0.9994	1.05	0.70	1.07	0.71
A <sub>750</sub> = 0.0740·C + 0.1153	0.9996	1.05	0.70		
A <sub>60</sub> = 0.0594·C + 0.1099	0.9990	1.05	0.70	1.06	0.69
A <sub>750</sub> = 0.0860·C + 0.1355	0.9996	1.05	0.70		
A <sub>60</sub> = 0.0574·C + 0.1007	0.9995	1.05	0.70	1.04	0.67
A <sub>750</sub> = 0.0820·C + 0.1310	0.9994	1.05	0.70		
Average				1.04	0.69
SD				0.023	0.020
RSD (%)				2.20	3.30

\*C(18-MDC)=1.23·10<sup>-3</sup> molL<sup>-1</sup>, ℓ=1 cm, pH (universal buf. solution) 3.36, λ=910 nm, time pairs 60 and 750 sec

Использование предложенной методики для определения АК и АН

В оптимальных условиях метода, описанных выше, был проанализирован ряд модельных смесей (табл. 2) с различными концентрациями АН и АК, а также образцы лекарственного препарата «Антигриппин-Анви», одна таблетка которого содержит

250 мг метамизола натрия (анальгина) и 300 мг аскорбиновой кислоты. Хорошее соответствие между полученными результатами и известным содержанием компонентов подтверждает, что метод многократных добавок Н-point может быть успешно применен для одновременного определения АК и АН.

Table 2

## Results of the determination of Asc and An in model mixtures and the pharmaceutical preparation "Antigrippin-Anvi"

Таблица 2

## Результаты определения АК и АН в модельных смесях и фармацевтическом препарате «Антигриппин-Анви»

Model mixtures						
Sample	Content·10 <sup>-5</sup> , molL <sup>-1</sup>		Found·10 <sup>-5</sup> , molL <sup>-1</sup>		Found, %	
	Asc	An	Asc	An	Asc	An
1	0.50	0.70	0.48	0.72	96	102
2	0.80	1.00	0.77	1.03	96	103
3	1.20	0.35	1.21	0.34	100	97
3	0.90	0.70	0.92	0.67	102	96
«Antigrippin-Anvi»						
Sample	Content, mg		Found, mg		Found, %	
	Asc	An	Asc	An	Asc	An
1	300	250	303	248	101	99

## Выводы

Предложен новый подход к одновременному кинетическому определению аскорбиновой кислоты и аналгина методом многократных добавок Н-point, который основывается на разности в скоростях окисления двух восстановителей 18-молибдодифосфатом.

Методика одновременного определения аналгина и аскорбиновой кислоты при

совместном присутствии 18-молибдодифосфатом с использованием СФ и Н-point методов проста в исполнении, характеризуется высокой экспрессностью, чувствительностью и воспроизводимостью полученных результатов. Использование данной методики позволяет совместно определять аскорбиновую кислоту и аналгин в интервале концентраций 3.5·10<sup>-6</sup> – 1.5·10<sup>-5</sup> моль/л и 2.5·10<sup>-6</sup> – 4.0·10<sup>-5</sup> моль/л,



соответственно. При этом концентрация реагента составляет  $9.0 \cdot 10^{-4}$  –  $1.2 \cdot 10^{-3}$  моль/л, а время реакции 60 с и 750 с при pH 3.5. Методика была успешно апробирована при определении двух восстановителей в модельных смесях и фармацевтических препаратах. Результаты, полученные с использованием 18-молибдодифосфата предложенной методикой, хорошо согласуются с заявленным содержанием анальгина и аскорбиновой кислоты в модельных смесях и фармпрепаратах.

### Библиографические ссылки

- [1] Erk N. Simultaneous determination of analgine and paracetamol in tables by spectrophotometric methods / N. Erk, F. Onur // *Pharmaceutical analysis*. – 1996. – Vol. 30, N 6. – P. 1201–1210.
- [2] Stepwise injection photometric determination of ascorbic acid in drugs / A. V. Bulatov, U. M. Strashnova, A. B. Vishnikin [et al.] // *J. Anal. Chem.* – 2011. – Vol. 66, N 3. – P. 275–279.
- [3] Follin O. Phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents / O. Follin, W. Dennis // *J. Biol. Chem.* – 1912. – Vol. 12, N 2. – P. 239–243.
- [4] Folin O. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins / O. Folin, V. Ciocalteu // *J. Biol. Chem.* – 1927. – Vol. 73, N 2. – P. 245–251.
- [5] Box J. D. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters // *Water Res.* – 1983. – Vol. 17. – P. 511–525.
- [6] Singleton V. L. Analysis of total phenols and other oxidations substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent / V. L. Singleton, R. Orthofer, R. M. Lamuela-Raventos // *Methods in enzymology*. – 1999. – Vol. 299. – P. 152–178.
- [7] Денисенко Т. О. Спектрофотометричне визначення поліфенолів з використанням гетерополікомплексів структури Доусона: дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук / Тетяна Олександрівна Денисенко. – Національна академія наук України Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського, Одеса, 2016. – 162 с.
- [8] Поуп М. С. Гетерополи- и изополиоксометаллаты / М. С. Поуп. – Новосибирск: Наука, 1990. – 227 с.
- [9] Determination of ascorbic acid with Wells-Dawson type molybdophosphate in sequential injection system / A. B. Vishnikin, H. Sklenařova, P. Solich [et al.] // *Anal. Lett.* – 2011. – Vol. 44, N 1–3. – P. 514–527.
- [10] Sequential injection spectrophotometric determination of analgine in pharmaceutical formulations using 18-molybdo-2-phosphate heteropolyanion as chromogenic reagent / M. K. E. A. Al-Shwaiyat, A. B. Vishnikin, L. P. Tsiganok [et al.] // *Вісник ДНУ*. – 2013. – Вип. 19. – С. 7–18.
- [11] Петрушина Г. А. Спектрофотометрическое определение аскорбиновой кислоты с использованием гетерополикомплекса структуры Доусона / Г. А. Петрушина, А. Б. Вишникин, Л. П. Цыганок // *Вісник ДНУ*. – 2008. – Т. 16, N 3/1. – С. 85–87.
- [12] Stepwise injection spectrophotometric determination of cysteine in biologically active supplements and foders / A. V. Bulatov, A. V. Petrova, A. B. Vishnikin [et al.] // *Microchemical Journal*. – 2013. – N 110. – P. 369–373.
- [13] Stepwise injection spectrophotometric determination of epinephrine / A. V. Bulatov, A. V. Petrova, A. B. Vishnikin [et al.] // *Talanta*. – 2012. – Vol. 96. – P. 62–67.
- [14] Highly sensitive sequential injection determination of p-aminophenol in paracetamol formulations with 18-molybdodiphosphate heteropoly anion based on elimination of Schlieren effect / A. B. Vishnikin, M. K. E. A. Al-Shwaiyat, G. A. Petrushina [et al.] // *Talanta*. – 2012. – N 96. – P. 230–235.
- [15] Одновременное определение аскорбиновой кислоты и нитрит-ионов в мясных изделиях / Г. А. Петрушина, Л. П. Цыганок, А. Б. Вишникин [и др.] // *Методы и объекты хим. анализа*. – 2012. – Т. 7, N 1. – С. 45–51.
- [16] Simultaneous determination of two active components of pharmaceutical preparations by sequential injection method using heteropoly complexes / M. K. A. Al-Shwaiyat, T. A. Denisenko, A. B. Vishnikin [et al.] // *Вісник ДНУ*. – 2014. – Т. 22, N 1. – С. 23–29.
- [17] Денисенко Т. А. Спектрофотометрическое определение рутина и аскорбиновой кислоты при совместном присутствии с использованием 18-молибдодифосфорного гетерополикомплекса / Т. А. Денисенко, А. Б. Вишникин, Л. П. Цыганок // *Вісник ОНУ*. – 2015 – Т. 20, Вип. 1/53 – С. 49–56.
- [18] Bosch-Reig F. H-point standard additions method. Fundamentals and application to analytical spectroscopy / F. Bosch-Reig, P. Campíns Falcó // *Analyst*. – 1988. – Vol. 113, N 7. – P. 1011–1016.
- [19] Development of the H-point standard-additions method for ultraviolet-visible spectroscopic kinetic analysis of two-component systems / F. Bosch-Reig, P. Campíns-Falco, A. Sevillano-Cabeza [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 1991. – Vol. 63, N 21. – P. 2424–2429.
- [20] Campíns-Falcó P. Evaluation and elimination of the “blank bias error” using the H-point standard addition method: Application to spectrophotometric determinations using absorbent blank / P. Campíns-Falcó, F. Bosch-Reig, J. Verdú-Andrés // *Anal. Chem. Acta*. – 1992. – Vol. 270, N 1. – P. 253–265.
- [21] Campíns Falcó P. Spectrophotometric analysis of mixtures of two components with extensively or completely overlapping spectra by the H-point standard additions method / P. Campíns Falcó, F. Bosch-Reig, A. Molina Benet // *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. – 1990. – Vol. 338, N 1. – P. 16–21.
- [22] Petrushina G. A. Spectrophotometric determination of paminophenol in the presence of paracetamol by using 18-molybdodiphosphate / G. A. Petrushina, L. P. Tsiganok, A. B. Vishnikin // *Bull. Dnipropetrovsk Univ. Ser. Chem.* – 2011. – Vol. 19, N 3/1, – P. 160–164.
- [23] Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии / Ю. Ю. Лурье – Москва: Химия, 1971. – 456 с.
- [24] Campíns-Falco P. H-point standard addition method for resolution of binary mixtures with simultaneous addition of both analytes / P. Campíns-Falco, J. Verdú-Andres, F. Bosch-Reig // *Anal. Chim. Acta*. – 1995. – Vol. 315. – P. 267–278.

### References

- [1] Erk, N., Onur, F. (1996). Simultaneous determination of analgine and paracetamol in tables by

- spectrophotometric methods. *Pharmaceutical analysis*, 30 (6), 1201-1210.  
<https://doi.org/10.1080/00032719708004049>
- [2] Bulatov, A. V., Strashnova, U. M., Vishnikin, A. B., Alekseeva, G. M., Sineva, T. D., Moskvina, A. L., Moskvina, L. N. (2011). Stepwise injection photometric determination of ascorbic acid in drugs. *J. Anal. Chem.*, 66(3), 275-279.  
<https://link.springer.com/article/10.1134/S106193481103004X>
- [3] Follin, O., Dennis, W. (1912). Phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J. Biol. Chem.*, 12(2), 239–243.  
<http://www.jbc.org/content/12/2/239.citation>
- [4] Folin, O., Ciocalteu, V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J. Biol. Chem.*, 73(2), 245–251.  
<http://www.jbc.org/content/73/2/245.citation>
- [5] Box, J. D. (1983). Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Res.*, 17, 511–525.  
[https://doi.org/10.1016/0043-1354\(84\)90135-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(84)90135-0)
- [6] Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidations substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152–178.  
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- [7] Denisenko, T. A. (2016). [Spectrophotometric identification of polarities in heterostructures with Dawson structures] (Unpublished doctoral dissertation). Physico-Chemical Institute of the National Academy of Sciences of Ukraine, Odessa, Ukraine (in Russian).  
[http://pci.nas.gov.ua/Disertations/Disser\\_000005/Disser.20160224\\_01.pdf](http://pci.nas.gov.ua/Disertations/Disser_000005/Disser.20160224_01.pdf)
- [8] Pop, M. S. (1990). [Heteropoly- and isopolyoxometallates]. Novosibirsk: Nauka (in Russian).
- [9] Vishnikin, A. B., Sklenařova H., Solich P., Petrushina, G. A., Tsiganok L. P. (2011). Determination of ascorbic acid with Wells-Dawson type molybdophosphate in sequential injection system. *Anal. Lett.*, 44(1-3), 514–527.  
<https://doi.org/10.1080/00032719.2010.500789>
- [10] Al-Shwaiyat, M. K. E. A., Vishnikin, A. B., Tsiganok, L. P., Kabashnaya, E. V., Khmelovskaya, S. A., Andruch, V., Bazel, Ya. R., Sklenarova, H., Solich, P. (2013). Sequential injection spectrophotometric determination of analgin in pharmaceutical formulations using 18-molybdo-2-phosphate heteropolyanion as chromogenic reagent. *Bull. Dnipropetrovsk Univ. Ser. Chem.*, 21(19), 7–18.  
<https://doi.org/10.15421/081301>
- [11] Petrushina, G. A., Vishnikin, A. B., Tsyganok, L. P. (2008). [Spectrophotometric determination of ascorbic acid by using heteropoly complex with Dawson structure]. *Bull. Dnipropetrovsk Univ. Ser. Chem.*, 16(3/1), 85–87 (in Russian).  
<https://scholar.google.com.ua/citations?user=6R1sKXIAAAA&hl=uk>
- [12] Bulatov, A. V., Petrova, A. V., Vishnikin, A. B., Moskvina, L. N. (2013). Stepwise injection spectrophotometric determination of cysteine in biologically active supplements and feeders. *Microchemical Journal*, 110, 369–373.  
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.04.020>
- [13] Bulatov, A. V., Petrova, A. V., Vishnikin, A. B., Moskvina, A. L., Moskvina, L. N. (2012). Stepwise injection spectrophotometric determination of epinephrine. *Talanta*, 96, 62–67.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.03.059>
- [14] Vishnikin, A. B., Al-Shwaiyat, M. K. E. A., Petrushina, G. A., Tsiganok, L. P., Andruch, V., Bazel, Ya. R., Sklenarova, H., Solich, P. (2012). Highly sensitive sequential injection determination of p-aminophenol in paracetamol formulations with 18-molybdodiphosphate heteropoly anion based on elimination of Schlieren effect. *Talanta*, 96, 230–235.  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.02.049>
- [15] Petrushina, G. A., Tsyganok, L. P., Vishnikin, A. B. (2012). [Simultaneous determination of ascorbic acid and nitrite ions in meat products]. *Metody i obyekty khim. analiza*, 7(1), 45–51 (in Russian).  
<http://www.moca.net.ua/12/1/Abs/abs6.html>
- [16] Al-Shwaiyat, M. K. E. A., Denisenko, T. A., Zaruba, S. V., Vishnikin, A. B., Tsiganok, L. P., Andruch, V., Bazel, Y. R. (2014). Simultaneous determination of two active components of pharmaceutical preparations by sequential injection method using heteropoly complexes. *Bull. Dnipropetrovsk Univ. Ser. Chem.*, 22(1), 23–29. <https://doi.org/10.15421/081408>
- [17] Denisenko, T. A., Vishnikin, A. B., Tsyganok, L. P. (2015). [Spectrophotometric determination of rutin and ascorbic acid in a co-presence using 18-molybdodiphosphoric heteropoly complex]. *Visnyk ONU*, 20(1/53), 49–56 (in Russian).  
[https://doi.org/10.18524/2304-0947.2015.1\(53\).44552](https://doi.org/10.18524/2304-0947.2015.1(53).44552)
- [18] Bosch-Reig, F., Campíns Falcó, P. (1988). H-point standard additions method. Fundamentals and application to analytical spectroscopy. *Analyst*, 113(7), 1011–1016. <https://doi.org/10.1039/AN9881301011>
- [19] Bosch-Reig, F., Campíns-Falco, P., Sevillano-Cabeza A., Herraez-Hernandez, R., Molins-Legua, C. (1991). Development of the H-point standard-additions method for ultraviolet-visible spectroscopic kinetic analysis of two-component systems. *Analytical Chemistry*, 63(21), 2424–2429. <https://doi.org/10.1021/ac00021a008>
- [20] Campíns-Falcó, P., Bosch-Reig, F., Verdú-Andrés J. (1992). Evaluation and elimination of the “blank bias error” using the H-point standard addition method: Application to spectrophotometric determinations using absorbent blank. *Anal. Chem. Acta.*, 270(1), 253–265. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(92\)80115-N](https://doi.org/10.1016/0003-2670(92)80115-N)
- [21] Campíns Falcó, P., Bosch-Reig, F., Molina Benet, A. (1990). Spectrophotometric analysis of mixtures of two components with extensively or completely overlapping spectra by the H-point standard additions method. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 338(1), 16–21. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00322777>
- [22] Petrushina, G. A., Tsiganok, L. P., Vishnikin, A. B. (2011). Spectrophotometric determination of p-aminophenol in the presence of paracetamol by using 18-molybdodiphosphate. *Bull. Dnipropetrovsk Univ. Ser. Chem.*, 19(3/1), 160–164.  
<https://doi.org/10.15421/081614>
- [23] Lurye, Y. Y. (1990). [Handbook of Analytical Chemistry]. Moscow: Khimiya (in Russian).
- [24] Campíns-Falco, P., Verdu-Andres, J., Bosch-Reig, F. (1995). H-point standard addition method for resolution of binary mixtures with simultaneous addition of both analytes. *Anal. Chim. Acta.*, 315, 267–278. [https://doi.org/10.1016/0003-2670\(95\)00315-Q](https://doi.org/10.1016/0003-2670(95)00315-Q)