

Katedra i Zakład Chemii Ogólnej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie  
Kierownik: doc. dr hab. Stanisław Biliński

Jerzy ISKIERKO

### Bromometryczne oznaczanie soli sodowej kwasu 2-etylortęciobenzenokarboksyłowego-1 (mertiolatu)

Бромометрическое определение натриевой соли этилртутнотиосалициловой  
кислоты (мертиолат)

Bromometric Determination of Sodium Salt of Ethylmercurythiosalicyl Acid  
(Merthiolate)

Mertiolat znany również pod nazwą Merthiolate, Tiomersal lub Tiomersalum, występuje pod postacią kremowego krystalicznego proszku dobrze rozpuszczającego się w wodzie i etanolu. Mertiolat działa silnie bakterio- i grzybobójczo. Ma własności aseptyczne, nie wykazujące przy tym działania drażniącego na tkanki (8). Posiada on zastosowanie jako środek konserwujący do różnych organopreparatów jak np. gamma globuliny, oraz różnych szczepionek. Badano jego przydatność do konserwowania surowic leczniczych (4). Konserwujące działanie mertiolatu jest około stukrotnie silniejsze niż działanie fenolu. Do konserwacji szczepionki przeciw krztuścowi (*Vaccinum pertusis*) używany jest mertiolat w stężeniu 0,005%, a fenol w stężeniu 0,3—0,5% (9). Mertiolat działa bakteriobójczo jeszcze w rozcieńczeniu 1:20.000 (4). Stosowany jest również jako aseptyk skóry, błon śluzowych i ran.

Literatura podaje szereg metod ilościowego oznaczania mertiolatu. Autorzy czescy opracowali metodę spektrofotometryczną oraz kolorymetryczną przy użyciu 1—10 fenantroliny i  $K_4Fe(CN)_6$  w buforze cytrynianowym. Metodę tę zastosowali do oznaczeń mertiolatu w materiale biologicznym (10, 11). Inną metodę spektrofotometryczną oznaczania mertiolatu opracował Neurath. Kompleksował on tiomersal ditizonem (6). Gronau i współpracownicy podali metodę oznaczania mertiolatu w roztworach acetonowych i alkoholowych w podczerwieni (5). Becker i Ehinger do ilościowego oznaczania mertiolatu stosowali metodę chromatografii bibułowej (1), a Birner i Garnal wprowadzili do analizy mertiolatu w wodnych roztworach i w szczepionkach oznaczenia polarograficzne (2). Farmakopea angielska z 1963 r. podaje metodę miareczkową oznaczania mertiolatu w roztworach wodnych za pomocą mianowanego 0,1n roztworu tiocjanianu amonu (12). Inne metody miareczkowania uwolnionej z mertiolatu rtęci po uprzedniej mineralizacji mertiolatu podaje Farmakopea Polska IV. Do miareczkowania stosuje się 0,1n  $NH_4CNS$  wobec siarczanu żelazowo-amonowego lub odmiareczkowanie użytego w nadmiarze dwusodowego wersenianu 0,05 M roztworem  $ZnSO_4$  lub

Tab. 1. Badanie wpływu czasu na ilościowe bromowanie mertiolatu  
Influence of time on the quantitative bromination of merthiolate

Czas bromowania wyrażony w minutach (minuty)	ml 0,01 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ na zmiareczkowanie ślepej próby	ml 0,01 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ na zmiareczkowanie mertiolatu	mg mertiolatu oznaczone w próbie	Wynik rzeczywisty mg mertiolatu
3	20,0	16,20	1,919	2,00
3	20,0	16,15	1,944	2,00
3	20,0	16,25	1,893	2,00
3	20,0	16,20	1,919	2,00
3	20,0	16,20	1,919	2,00
4	20,0	16,10	1,969	2,00
4	20,0	16,10	1,969	2,00
4	20,0	16,05	1,994	2,00
4	20,0	16,05	1,994	2,00
5	20,0	16,00	2,020	2,00
5	20,0	16,05	1,994	2,00
5	20,0	16,00	2,020	2,00
5	20,0	16,00	2,020	2,00
5	20,0	16,05	1,994	2,00
7	20,0	16,00	2,020	2,00
7	20,0	16,00	2,020	2,00
7	20,0	16,05	1,994	2,00
7	20,0	16,05	1,994	2,00
7	20,0	16,00	2,020	2,00
10	20,0	16,00	2,020	2,00
10	20,0	16,00	2,020	2,00
10	20,0	16,00	2,020	2,00
10	20,0	16,05	1,994	2,00
12	20,0	16,00	2,020	2,00
12	20,0	16,00	2,020	2,00
12	20,0	16,00	2,020	2,00
15	20,0	16,00	2,020	2,00
15	20,0	16,00	2,020	2,00
15	20,0	16,00	2,020	2,00
15	20,0	16,00	2,020	2,00
20	20,0	16,00	2,020	2,00
20	20,0	15,90	2,070	2,00
20	20,0	16,00	2,020	2,00

c. d. tab. 1

Czas bromowania wyrażony w minutach (minuty)	ml 0,01 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ na zmiareczkowanie ślepej próby	ml 0,01 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ na zmiareczkowanie mertiolatu	mg mertiolatu oznaczone w próbie	Wynik rzeczywisty mg mertiolatu
25	20,0	15,90	2,070	2,00
25	20,0	15,90	2,070	2,00
25	20,0	16,00	2,020	2,00
30	20,0	16,05	2,045	2,00
30	20,0	15,90	2,070	2,00
45	20,0	15,90	2,070	2,00
45	20,0	15,90	2,070	2,00
45	20,0	16,00	2,020	2,00
60	20,0	16,00	2,020	2,00
60	20,0	15,80	2,121	2,00
60	20,0	15,90	2,070	2,00
60	20,0	15,80	2,121	2,00

0,05 M  $\text{MgSO}_4$ , wobec czerwieni eriochromowej (13). W piśmiennictwie są również podane metody mikrobiologiczne ilościowego oznaczania mertiolatu. Są one oparte na badaniu wpływu ściśle określonych stężeń mertiolatu na wzrost hodowli pewnych szczepów bakterii jak np. *Staphylococcus aureus* (7) lub *Escherichia coli* (3).

W przedstawionej pracy podjęto próbę ilościowego bromometrycznego oznaczenia mertiolatu, tj. metodę, która byłaby szybsza i prostsza w zastosowaniu oraz nadawałaby się do seryjnych oznaczeń zarówno w roztworach wodnych, jak i w materiale biologicznym zawierającym białko. Przebadano wpływ czasu, światła oraz różnego stężenia kwasu solnego i siarkowego na proces ilościowego bromowania.

### Część doświadczalna

W pracy posługiwano się bromianem potasu oraz mertiolatem cz. d. a. firmy Merck, tiosiarczanem sodu cz. d. a. produkcji Zakładów Azotowych im. Dzierżyńskiego w Tarnowie oraz jodkiem i bromkiem potasu cz. d. a. Fabryki Odczynników Chemicznych w Gliwicach. Dwuchromian potasu cz. d. a. pochodził również z Fabryki Odczynników Chemicznych w Gliwicach. Do oznaczeń przygotowano 0,01 n roztwór bromianu potasu w bromku potasowym. W tym celu odważono ściśle 0,2783 g  $\text{KBrO}_3$  i 5,9508 g  $\text{KBr}$ , a następnie w kolbie miarowej rozcieńczano wodą destylowaną do 1 litra. 0,01n roztwór tiosiarczanu sodu przechowywano w kolbach miarowych ze szlifem zabezpieczając przed pochłonięciem  $\text{CO}_2$  z powietrza. Nor-

Tab. 2. Porównanie wyników bromowania mertiolatu na świetle i w ciemności w tym samym czasie

Comparison of the results of merthiolate bromination in light and darkness during the same time

Czas bromowania (minuty)	mg mertiolatu analiza wykonana bez dostępu światła	mg mertiolatu analiza wykonana na świetle	Wynik rzeczywisty mg mertiolatu
3	1,919	1,893	2,00
3	1,944	1,893	2,00
3	1,893	1,869,	2,00
3	1,919	1,919	2,00
4	1,969	1,944	2,00
4	1,969	1,919	2,00
4	1,994	1,919	2,00
7	2,020	1,944	2,00
7	2,020	1,944	2,00
7	1,994	1,919	2,00
10	2,020	1,944	2,00
10	2,020	1,944	2,00
10	2,020	1,944	2,00
10	1,994	1,944	2,00
15	2,020	1,969	2,00
15	2,020	1,969	2,00
15	2,020	1,969	2,00
20	2,020	1,994	2,00
20	2,020	1,969	2,00
20	2,070	1,994	2,00
25	2,070	1,994	2,00
25	2,070	2,020	2,00
25	2,020	2,020	2,00
30	2,045	2,020	2,00
30	2,070	2,020	2,00

małność roztworu tiosiarczanu nastawiano na dwuchromian potasu. Natomiast normalność bromianu potasu określano za pomocą 0,01n roztworu tiosiarczanu sodu. Przygotowano wzorcowy 0,1% wodny roztwór mertiolatu zawierający 1 mg tego związku w 1 ml.

Do surowicy krwi ludzkiej nie zawierającej środka konserwującego dodawano określoną ilość ściśle 0,1% roztworu mertiolatu, zakwaszono 0,66 n  $H_2SO_4$  i dodawano 10% wolframianu sodowego (stosunek objętościowy składników 1:1:1). Do

Tab. 3. Wpływ różnej ilości kwasu solnego na bromowanie mertiolatu  
Effect of the different quantity of muriatic acid on the bromination  
of merthiolate

ml 20% kwasu solnego	ml 0,01 n Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> do ślepej próby	ml 0,01 n roztw. Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> na oznacz. mertiolatu	mg mer- tiolatu oznaczone w próbie	Wynik rzeczywisty mg mertiolatu	Stężenie kwasu w roztworze
5	20,00	16,00	2,020	2,00	1,04 n
5	20,00	15,90	2,030	2,00	
5	20,00	16,00	2,020	2,00	
5	20,00	16,10	1,96	2,00	
5	20,00	16,00	2,020	2,00	
5	20,00	16,00	2,020	2,00	
4	20,00	16,00	2,020	2,00	0,84 n
4	20,00	16,00	2,020	2,00	
4	20,00	16,00	2,020	2,00	
4	20,00	16,10	1,960	2,00	
4	20,00	16,10	2,020	2,00	
3	20,00	16,00	2,020	2,00	0,7 n
3	20,00	16,00	2,020	2,00	
3	20,00	16,00	2,020	2,00	
3	20,00	16,05	1,995	2,00	
3	20,00	16,05	1,995	2,00	
2	20,00	16,10	1,969	2,00	0,47 n
2	20,00	16,10	1,969	2,00	
2	20,00	16,10	1,969	2,00	
2	20,00	16,15	1,944	2,00	
1	20,00	16,20	1,919	2,00	0,25 n
1	20,00	16,20	1,919	2,00	
1	20,00	16,20	1,919	2,00	
1	20,00	16,25	1,894	2,00	
1	20,00	16,20	1,919	2,00	
1	20,00	16,25	1,894	2,00	

wytrącania białka stosowano również 5% kwas trójchlorooctowy. Mieszaninę pozostawiano na 15 min. w chłodni w temp. 1°C i uzyskany po odwirowaniu osadu (5000 obrotów/min.) przesącz stanowił wzorcowy roztwór mertiolatu w surowicy.

### Sposób wykonania analizy

Do kolbek pojemności 100 ml z doszlifowanymi korkami wprowadzano po 2 ml odmierzanego mikropipetą 0,1% wodnego roztworu mertiolatu (1 ml odpowiada ściśle 1 mg substancji) lub 4—8 ml wzorcowego roztworu mertiolatu w surowicy (1 ml odpowiada ściśle 0,125 mg substancji). Roztwory zakwaszano odpowiednią

Tab. 4. Wpływ stężenia kwasu siarkowego na bromowanie mertiolatu  
Effect of the sulphuric acid concentration on the bromination of merthiolate

ml 20% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ml 0,01 n roztw. Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> na ślepą próbę	ml 0,01 n roztw. Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> na zmiarecz- kowanie mertiolatu	mg mer- tiolatu oznaczone w próbce	Wyniki rzeczywiste mg mertiolatu	Stężenie kwasu w roztworze
5	20,00	16,00	2,02	2,00	0,76 n
5	20,00	16,00	2,02	2,00	
5	20,00	16,00	2,02	2,00	
5	20,00	16,00	2,02	2,00	
5	20,00	16,00	2,02	2,00	
5	20,00	16,00	2,02	2,00	
4	20,00	16,00	2,02	2,00	0,60 n
4	20,00	16,00	2,02	2,00	
4	20,00	16,00	2,02	2,00	
4	20,00	16,00	2,02	2,00	
4	20,00	16,00	2,02	2,00	
4	20,00	16,00	2,02	2,00	
3	20,00	16,00	2,02	2,00	0,50 n
3	20,00	16,00	2,02	2,00	
3	20,00	16,00	2,02	2,00	
3	20,00	16,00	2,02	2,00	
3	20,00	16,00	2,02	2,00	
3	20,00	16,00	2,02	2,00	
2	20,00	16,00	2,02	2,00	0,34 n
2	20,00	16,00	2,02	2,00	
2	20,00	16,00	2,02	2,00	
2	20,00	16,00	2,02	2,00	
2	20,00	16,00	2,02	2,00	
2	20,00	16,00	2,02	2,00	
1	20,00	16,00	2,02	2,00	0,17 n
1	20,00	16,00	2,02	2,00	
1	20,00	16,00	2,02	2,00	
1	20,00	16,00	2,02	2,00	
1	20,00	16,00	2,02	2,00	
1	20,00	16,00	2,02	2,00	

ilością 20% HCl lub H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i po dodaniu 0,01n KBrO<sub>3</sub> (odpowiednio 20 lub 10 ml) pozostawiono na określony czas. Następnie dolewano 2 ml 50% KJ i wydzielony jod odmiareczkowany 0,01n Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> do odbarwienia roztworu dodając pod koniec reakcji 1 ml 2% rozpuszczalnej skrobi. Równolegle, dla każdej serii pomiarów

wykonywano oznaczenia kontrolne (ślepe próby) stwierdzając, że ilość dodanego roztworu  $\text{KBrO}_3 + \text{KBr}$  odpowiadała dokładnie zużytej ilości  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Ilość mł ściśle 0,01 n  $\text{KBrO}_3$  jako reszta na zbromowanie mertiolatu mnożono przez przelicznik 0,510 uzyskując całkowite stężenie tego związku w analizie.

Z danych doświadczalnych wynika, że na zbromowanie 1 mg mertiolatu (c. cz. 404,84) zużywa się 2 ml 0,01n  $\text{KBrO}_3 + \text{KBr}$ . Obliczenie gramorównoważnika:

$$\begin{aligned}
 1000 \text{ ml } 1 \text{ n } \text{KBrO}_3 & \text{ — } 80 \text{ g Br} \\
 2 \text{ ml } 1 \text{ n } \text{KBrO}_3 & \text{ — } 1,6 \text{ mg Br} \\
 1 \text{ mg mertiolatu} & \text{ — } 1,6 \text{ mg Br} \\
 404,84 \text{ mg mertiolatu} & \text{ — } 647,7 \text{ mg Br} : 80 = \text{ok. 8 atomów Br} \\
 \text{stad } 1000 \text{ ml } 1 \text{ n } \text{KBrO}_3 & \text{ — } 404,84 : 8 = 50,605 \text{ g mertiolatu} \\
 1 \text{ ml } 0,1 \text{ n } \text{KBrO}_3 & \text{ — } 0,00051 \text{ g mertiolatu.}
 \end{aligned}$$

Tab. 5. Miareczkowanie mertiolatu zawartego w różnej ilości взяtej do analizy surowicy

Titration of merthiolate present in the different quantity of serum used in the analysis

ml surowicy z mertio- latem	ml 0,01 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ na miarecz- kowanie mertiolatu z surowicy	ml suro- wicy bez mertiolatu (ślepa próba)	ml 0,01 n $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ na zmiarcz- kowanie ślepej próby	mg mertiolatu w surowicy	Wynik rzeczywisty (mg mer- tiolatu)
4	9,00	4	10,00	0,505	0,500
4	9,00	4	10,00	0,505	
4	8,80	4	9,80	0,505	
5	8,75	5	10,00	0,625	0,625
5	8,75	5	10,00	0,625	
5	8,70	5	10,00	0,656	
5	8,80	5	10,00	0,606	
5	8,75	5	10,00	0,625	
5	8,70	5	10,00	0,656	
5	8,75	5	10,00	0,625	
5	8,75	5	10,00	0,625	
6	8,50	6	10,00	0,757	0,750
6	8,50	6	10,00	0,757	
7	8,25	7	10,00	0,883	0,875
7	8,25	7	10,00	0,883	
7	8,20	7	10,00	0,909	
8	8,05	8	10,00	0,985	1,00
8	8,00	8	10,00	1,010	
8	8,05	8	10,00	0,985	

Wyniki pomiarów uzyskanych przy różnych parametrach oznaczeń ilustrują tab. 1—5. W celu ustalenia optymalnego czasu bromowania mertiolatu wykonano szereg prób bromowania w czasie od 3—60 min. Po określonym stoperem czasie proces bromowania mertiolatu przerywano dodając do analizy 2 ml 50% jodku potasu. Wyniki ilościowego bromowania mertiolatu w różnym czasie zestawiono w tab. 1. Następna seria prób dotyczyła wpływu światła na proces bromowania mertiolatu.

Uzyskane wyniki zestawiono w tab. 2. Wyniki wpływu stężenia kwasu siarkowego i solnego na proces ilościowego bromowania mertiolatu przedstawiono w tab. 3 i 4. Wyniki analiz ilościowego oznaczania mertiolatu w surowicy podaje tab. 5.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

Na podstawie przeprowadzonych analiz zestawionych w tab. 1 można wyciągnąć wnioski o czasie, w którym zachodzi całkowite ilościowe zbromowanie mertiolatu. Bez dostępu światła proces ten zachodzi w ciągu 5 min. od chwili dodania roztworu bromianu. Dłuższy czas bromowania nie wpływa na podwyższenie wyników, natomiast przeprowadzenie pomiaru po 3—4 min. prowadzi do zaniżonych wyników, a więc dowodzi nie całkowitego przebiegu reakcji. Na świetle reakcja bromowania przebiega oporniej i — jak wynika z tab. 2 — wymaga okresu 20—25 min., a więc czasu 4 lub 5-krotnie dłuższego. Prawdopodobnie światło w omówionym przypadku jest inhibitorem reakcji bromowania mertiolatu.

Przeprowadzone próby zestawione w tab. 3 wykazały, że do procesu ilościowego zbromowania mertiolatu należy użyć kwasu solnego w takiej ilości, aby jego stężenie w roztworze było nie mniejsze niż 0,7—0,8 n. Nie dotyczy to kwasu siarkowego, którego stężenie może być znacznie niższe, bo ok. 0,15 n (tab. 4). Fakt ten nasuwa przypuszczenie, że jony siarczanowe mogą mieć wpływ katalityczny na proces bromowania mertiolatu.

W pracy wykazano możliwość ilościowego oznaczania mertiolatu w surowicy krwi. Jak wynika bowiem z uzyskanych wyników, mertiolat nie wiąże się trwale z białkami surowicy i po ich wytrąceniu jest ilościowo odzyskiwany w odbiałczonych przesączach. Opracowana w skali mikro ilościowa bromometryczna metoda oznaczania mertiolatu daje dobre rezultaty. Błąd oznaczeń waha się w granicach  $\pm 0,03$ —0,3%, przy zawartości mertiolatu w analizie od 2—5 mg. Metoda jest prostsza i szybsza w wykonaniu od stosowanych ogólnie metod optycznych, polarograficznych czy biologicznych, nie wymaga mineralizacji substancji i nadaje się do seryjnych oznaczeń zarówno w roztworach wodnych, jak i materiale biologicznym zawierającym białko.



## PIŚMIENNICTWO

1. Becker A., Ehinger F.: *Z. Anal. Chem.* **187**, 110—114, 1962.
2. Birner J., Garnal J. R.: *J. Pharm. Sci.* **53**, 1264—1265, 1964.
3. Carter D. V., Sykes G.: *England Analyst.* **83**, 536—539, 1958.
4. Goldstein W.: *J. Am. Assoc. Proct. Pharm. Washington* 498—500, 1953.
5. Gronau F. A., Broadlich D. E., Hamilton J. E.: *J. Pharm. Sci.* **51**, 242—244, 1962.
6. Neurath A. R.: *Česka Farm.* **10**, 75—78, 1961.
7. Poulhal-Haumonte J., Leroy M.: *Ann. Pharm. Franc.* **20**, 885—893, 1962.
8. Rolski S.: *Chemia Środków Leczniczych. PZWL, Warszawa*, 1968.
9. Ślopek S.: *Mikrobiologia Lekarska, PZWL, Warszawa* 1968.
10. Viška J., Okač A.: *Česka Farm.* **15**, 356—359, 1966.
11. Viška J., Okač A.: *Česka Farm.* **16**, 29—33, 1967.
12. *British Pharmacopea London*, 1963.
13. *Farmakopea Polska IV. PZWL, Warszawa*, 1965.

Otrzymano 15 VI 1969.

## РЕЗЮМЕ

В настоящей работе использовали бромометрический метод для количественного определения мертиолата. Этот метод прост в применении и не требует сложной аппаратуры.

## SUMMARY

In the present paper bromometric method is used for quantitative determination of merthiolate. The method is very simple in usage and it does not require any complicated apparatus.

