

Bis(2,4-diaminophenyl)phosphonate-KIO₃에 의한 환원성의약품(Ascorbic Acid, Potassium Antimonyl Tartrate, Isonicotinic Acid Hydrazide)의 분광광도정량

서정현·감상규

부산대학교 약학대학

(Received December 8, 1989)

Spectrophotometric Determination of Reducing Drugs (Ascorbic Acid, Potassium Antimonyl Tartrate, Isonicotinic Acid Hydrazide) with Bis(2,4-diaminophenyl)phosphonate-KIO₃

Jung-Hyun Suh and Sang-Kyu Kam

College of Pharmacy, Pusan National University, Kumjong-Gu, Pusan, 609-735, Korea

Abstract— Aqueous solution of bis(2,4-diaminophenyl)phosphonate(APP) was very stable, especially below pH 2.0 and the red-color compound formed by the reaction of APP and IO₃⁻ was stable at room temperature.

A simple and rapid spectrophotometric method for the determination of ascorbic acid, potassium antimonyl tartrate (PAT), and isonicotinic acid hydrazide (INAH) was established by the reaction of IO₃⁻ and these reducing drugs, and the absorbance measurements were made at 500 nm. In the reaction of IO₃⁻ and each of the reducing drugs, the conditions of pH were suitable below 2.5 for ascorbic acid, below 2.0 for PAT, and below 1.5 for INAH. Beer's law did hold in the range of 17.6~1549.9 µg for ascorbic acid, 33.4~2871.8 µg for PAT, and 6.9~548.6 µg for INAH. Many common ingredients present in pharmaceutical dosage forms did not interfere. The average recoveries for ascorbic acid and INAH in pharmaceutical formulations were 99.8-100.3 ± 0.2~0.4%, 99.8 ± 0.3%, respectively.

Keywords □ Reducing drugs, UV/Vis spectrophotometric determination, bis(2,4-diaminophenyl) phosphonate, iodation.

환원성시료의 정량법으로는 일반적으로 산화성 물질과의 반응시, 종말점에서 전위비약을 이용하는 전위차법 및 지시약에 의한 visual method 등의 산화 환원적정법,^{1~17)} polarography 법,^{18,19)} GC 법,²⁰⁾ HPLC 법^{21~25)} 등과 환원성시료를 자외부에서 직접 흡광도를 측정하거나, 발색시약과 반응하여 생성되는 정색화합물의 흡광도를 측정하는 분광광도법 등이 있다.

분광광도법에 의한 ascorbic acid의 정량으로는 pH 6의 완충용액을 자외부에서 직접 흡광도를 측정²⁶⁾하거나, 산성용액 중에서 diazotized 4-meth-

oxy-2-nitroaniline과 반응시킨 후 NaOH를 가하여 생성되는 정색화합물,²⁷⁾ pH 6.6의 인산완충용액 중에서 dimethoxydiquinone과 반응시켜 생성되는 정색화합물,²⁸⁾ 황산 산성용액 중에서 ammonium molybdate와 반응시켜 생성되는 molybdenum blue,²⁹⁾ pH 3 완충용액 중에서 chloroform 및 ferricinium trichloroacetate를 가하여 생성되는 ferrocene,^{30,31)} Fe(III)와 1, 10-phenanthroline complex와 반응시켜 생성되는 ferroin(Fe(II)-1, 10-phenanthroline complex)³²⁾ 등의 흡광도를 각각 가시부에서 측정하는 방법 등이 보고되어 있으

며, potassium antimonyl tartrate(이하 PAT 라 약함)의 정량으로는 염산 산성용액을 자외부에서 직접 흡광도를 측정³³⁾하거나, 중성 또는 약산성에서 과량의 phosphomolybdic acid를 가하여 생성되는 환원형의 molybdenum blue의 흡광도를 측정하는 방법³⁴⁾이 보고되어 있고, isonicotinic acid hydrazide(이하 INAH 라 약함)의 정량으로는 diclone(2, 3-dichloro-1, 4-naphthoquinone)과 반응시켜 생성되는 정색화합물,³⁵⁾ 초산 산성용액 중에서 vanadophosphoric acid와 반응시켜 생성되는 호박색 착화합물³⁶⁾ 등의 흡광도를 측정하는 방법 등이 보고되어 있다.

종래의 분광광도법을 살펴보면 ascorbic acid의 경우, 자외부에서 직접 흡광도를 측정하는 방법²⁶⁾은 공존물질의 영향이 비교적 크며, diazotized 4-methoxy-2-nitroaniline²⁷⁾에 의해 생성된 정색화합물은 불안정하여 곧 탈색이 되고, dimethoxydi-quinone에 의한 방법²⁸⁾은 시약의 조제가 복잡하고 생성되는 정색화합물이 암소에서만 안정하며, ammonium molybdate에 의한 방법²⁹⁾은 반응이 느리고, ferricinium trichloroacetate에 의한 방법^{30,31)}은 chloroform층을 분리, 여과하는 조작이 필요하다. PAT의 경우, phosphomolybdic acid에 의한 방법³⁴⁾은 100°C의 고온에서 반응을 시켜야 한다는 점이 있으며, 한편 INAH의 경우 vanadophosphoric acid에 의한 방법³⁶⁾은 생성되는 정색화합물이 불안정한 단점 등이 있다. 이에 저자는 상온에서 조작이 보다 신속, 간편하며 안정된 정색화합물을 형성하고 공존물질의 영향이 비교적 적은 분석법으로서, 산화제인 IO₃⁻와 발색시약인 bis(2, 4-diaminophenyl)phosphonate(이하 APP 라 약함)를 사용하여 환원성의약품의 정량에 시도하여 보았다. APP는 Mori 등^{37,38)}이 합성하여 산화성물질과 반응하여 적색의 정색화합물을 형성함으로 Cr(VI) 및 Cu(II)의 정량에 적용하였고, Suh 등^{39,40)}은 IO₃⁻ 및 잔류염소의 정량에 적용하였다. APP는 diphenyl phosphonate를 nitration시켜 생성되는 bis(2, 4-dinitrophenyl)phosphonate를 환원시킴으로서 합성하였고, 이것을 UV, IR, NMR 및 elemental analysis 등으로 확인하였다. 발색시약으로 사용되고 있고 APP 유사화합물인 2, 4-diaminophenol⁴¹⁾은 공기산화를

쉽게 받으므로 불안정하나, APP 수용액은 pH 2.0 이하에서는 특히 안정하며, IO₃⁻와 반응하여 쉽게 정색화합물을 형성하고, 이는 상당한 시간이 경과하여도 안정하고 또한 IO₃⁻와 환원성의약품과의 반응이 정량적으로 진행되므로, 환원성의약품에 일정과량의 IO₃⁻를 가하여 반응시킨 후 남아있는 IO₃⁻에 일정과량의 APP를 가하여 생성되는 정색화합물의 흡광도와, 일정과량의 IO₃⁻와 APP가 반응하여 생성되는 정색화합물의 흡광도와의 차이를 이용하여 환원성의약품인 ascorbic acid, PAT 및 INAH 등의 정량법을 확립하였다. 반응시 pH, 온도, 반응시간, 정색화합물의 안정성, 공존물질에 의한 영향 등의 정량조건에 대하여 검토하고 제제 중에 응용하여 좋은 결과를 얻었으므로 그 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

시약-APP 수용액(1.82×10⁻³M)은 합성한 APP 200 mg을 물에 용해하고 1M-HCl 5 ml을 가하고 전량을 250 ml로 하여 사용하였으며, IO₃⁻용액(10⁻³M, Junsei Chem. Co., Japan), ascorbic acid 용액(176.13 μg/ml, Junsei Chem. Co., Japan), PAT 용액(333.93 μg/ml, Haya-shi Pure Chem. Co., Japan) 및 INAH 용액(137.14 μg/ml, Aldrich Chem Co., USA)은 모두 시약특급 KIO₃ 및 상기시약을 각각 물에 용해하여 사용하였고, 원충용액은 Wako Chem. Co (Japan) 및 Junsei Chem. Co. (Japan) 등의 시약특급 및 1급시약을 상법에 따라 혼화하고 pH Meter로 측정하여 사용하였다. 기타시약은 시판품 특급 혹은 1급시약을 사용하였다.

장치-용접은 Thomas Hoover Capillary Melting Point Apparatus로 pH는 Metrohm 620을 사용하여 측정하였으며, UV 스펙트럼은 Cecil 599, IR 스펙트럼은 Shimadzu IR 400, NMR 스펙트럼은 Varian FT-80, 원소분석은 Perkin-Elmer 240C을 사용하여 측정하였다.

APP의 합성-Diphenyl phosphonate 20 ml를 빙초산 150 ml에 용해하고 진한 질산 85 ml를 가하였다. 약 5분 후 반응액은 적갈색이 되고 발열하기 때문에 주의하면서 60°C 이하에서 약 2시간 동안

반응시켰다. 반응액을 水中에 부어 황색의 결정을 석출시켰다. 이것을 $H_2O : acetone = 1 : 1$ 로 2회 재결정하여 담황색의 엽상결정을 얻었다(수득량 : 22.5g, 수득률 : 52%). 용점은 $93 \sim 96^\circ C$ 였다.

이 화합물의 원소분석 결과는 다음과 같다.

분석치 C : 35.95%, H : 1.85%, N : 12.46%, P : 6.85%

HP(O){OC₆H₃(NO₂)₂}₂의 계산치

C : 34.80%, H : 1.69%, N : 13.53%, P : 7.46%

IR(KBr)cm⁻¹ : 850(CN), 1520, 1345(NO₂), 2000~1667(substitution group : 2, 4-position)

¹H-NMR(80 MHz, CDCl₃) : δ 7.20(1H×2, d, J=8 Hz, 6, 6'-H), 8.20(1H×2, dd, J=2 Hz, 8 Hz, 5, 5'-H), 8.60(1H×2, d, J=2 Hz, 3, 3'-H)

UV(MeOH) : * $\lambda_{max} = 255$ nm (log $\epsilon = 4.31$), 293 nm (log $\epsilon = 4.16$) (* : 2, 4-dinitrophenol의 λ_{max} 와 거의 유사하다.)

따라서 이 화합물은 bis(2, 4-dinitrophenyl) phosphonate로 추정된다.

Bis(2, 4-nitrophenyl) phosphonate 10g을 빙초산 80ml에 용해하고 여기에 SnCl₂ 100g을 진한 염산 100ml에 녹인 용액을 서서히 가하였다. 반응액의 온도는 상승하여 $80 \sim 90^\circ C$ 에 도달하였다. 약 30분 지나서 용액의 황색이 소실되었다. 냉각 후 진한 염산 200ml를 가한 후 정치하니 약 4시간 후에 백색의 침상결정이 석출되었다. 이 결정을 소량의 물로 세척하고 에탄올로 수회 충분히 세척하였다. 수득량 6.25g을 얻었다. (수득률 : 58.8%) 이 화합물의 원소분석 결과는 다음과 같다.

분석치 C : 34.20%, H : 4.51%, N : 12.09%, P : 6.45%, Cl : 32.50%

HP(O){OC₆H₃(NH₂)₂}₂·4HCl의 계산치

C : 32.73%, H : 4.31%, N : 12.73%, P : 7.02%, Cl : 32.28%

IR(KBr)cm⁻¹ : 3000~2800(NH₃⁺), 2000~1667(substitution group : 2, 4-position)

¹H-NMR(80 MHz, D₂O) : δ 7.00*(1H×2, d, J=8 Hz, 6, 6'-H), 7.12*(1H×2, d, J=8 Hz, 5, 5'-H) (* : changeable) 7.28(1H×2, s, 3, 3'-H)

UV(H₂O) : * $\lambda_{max} = 235$ nm (log $\epsilon = 4.09$), 288 nm (log $\epsilon = 3.76$) (* : 2, 4-diaminophenol의 λ_{max}

와 거의 유사하다.)

따라서 이 화합물은 bis(2, 4-diaminophenyl) phosphonate(APP)로 추정된다.

정량법—Ascorbic acid 17.6~1549.9 μ g, PAT 33.4~2871.8 μ g, INAH 6.9~548.6 μ g 함유하는 용액을 25ml 용량 flask에 취하고, 여기에 1 N-H₂SO₄ 3ml, IO₃⁻ 3ml를 가하고 혼화하여 10분 후 APP 3ml를 가하고 물로 표선까지 채워 15분 동안 방치한 후 생성되는 적색의 정색화합물을 500nm에서 흡광도를 측정하였다. 따로 시료용액 대신 물을 가하여 얻어진 흡광도로부터, 시료용액을 가하여 얻어진 흡광도를 減하여 작성한 검량선으로부터 ascorbic acid, PAT 및 INAH를 정량하였다.

실험결과 및 고찰

APP 수용액의 안정성—APP 50mg에 Table I의 여러 가지 pH 완충용액 5ml 및 물을 가하고 각각 전량을 50ml로 하여 시간의 변화에 따른 흡광도의 변화를 500nm에서 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. Fig. 1에서 알 수 있는 바와 같이 발색시약으로 사용되고 있는 APP 유사화합물인 2, 4-diaminophenol은 공기산화물을 받아 등색을 나타내며, 약 2시간 후에는 흡광도가 0.2에 도달하는데 비하여, APP 수용액은 안정함을 알 수 있었다. 이것은 APP의 bis form 때문인 것으로 사료되며, 특히 pH 2.0 이하에서는 공기산화물을 받지 않고 매우 안정함을 알 수 있었다.

IO₃⁻와 APP의 반응시 pH 변화에 따른 흡수곡선—IO₃⁻와 APP의 반응시 pH 변화에 따른 흡수곡선을 검토하기 위하여 여러 가지 pH 완충용액 5ml, IO₃⁻ 1ml, APP 1ml를 25ml 용량 flask

Table I—Compositions of various buffer solutions.

pH	Components
0.5 - 2.0	KCl + HCl
2.5	C ₆ H ₄ (COOH)COOK + HCl
3.0 - 5.0	1 M AcOH + 1 M AcONa
5.5 - 7.0	0.2 M KH ₂ PO ₄ + 0.2 M Na ₂ HPO ₄
8.0 - 11.0	1 M NH ₄ OH + 1 M NH ₄ Cl

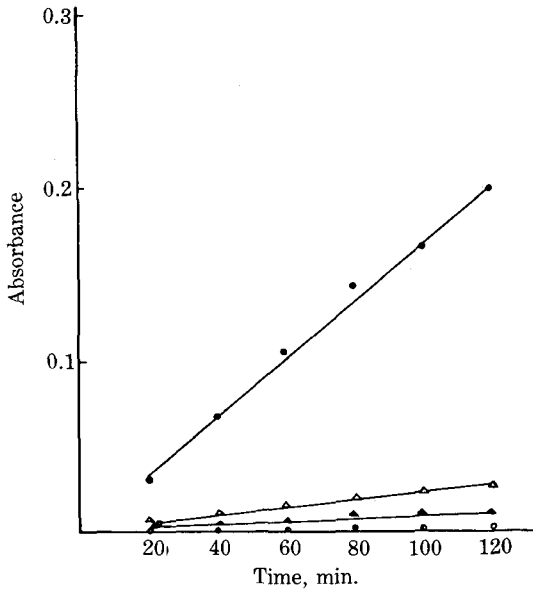


Fig. 1—Stabilities of 0.1 w/v% APP aqueous solutions as a function of time

Key: ○—○, pH=2; ▲—▲, pH=3; △—△, only water solution (pH=4.15); ●—●, 0.1 w/v% 2,4-diaminophenol aqueous solution only (pH=4.10).

에 취하고 표선까지 물로 채운 다음 15분 후에 생성된 정색화합물의 흡수곡선은 Fig. 2와 같다. Fig. 2에서 알 수 있는 바와 같이 정색화합물은 pH가 증가함에 따라 적색에서 황색으로 변하며, 극대흡수는 blue shift를 보였다. APP의 pH 변화에 따른 흡수곡선(Fig. 3)과 비교해 볼 때 pH 7 이상에서는 APP 산화생성물의 흡수곡선과 APP의 흡수곡선이 동일한 극대파장, 흡광도를 보임으로 이 때의 정색화합물은 IO₃⁻에 의한 APP의 산화생성물이 아니고, APP 자체의 pH 변화에 따른 발색일 것으로 사료된다.

정색화합물의 생성시간 및 안정성의 검토—IO₃⁻와 APP가 반응하여 정색화합물이 완전히 생성되는데 필요한 시간 및 정색화합물의 안정성을 검토하기 위하여 pH 1 완충용액 5 ml, IO₃⁻ 1 ml, APP 1 ml를 25 ml 용량 flask에 취하고 표선까지 물로 채운 다음 시간의 변화에 따라서 500 nm에서 흡광도를 측정된 결과는 Fig. 4와 같다. Fig. 4에서 알 수 있는 바와 같이 정색화합물이 완전히 생성하는데 필요한 시간은 10분 이상이며 2시간이 경과하여도 흡광도에는 변화가 없었다. 따라서 IO₃⁻는 APP와

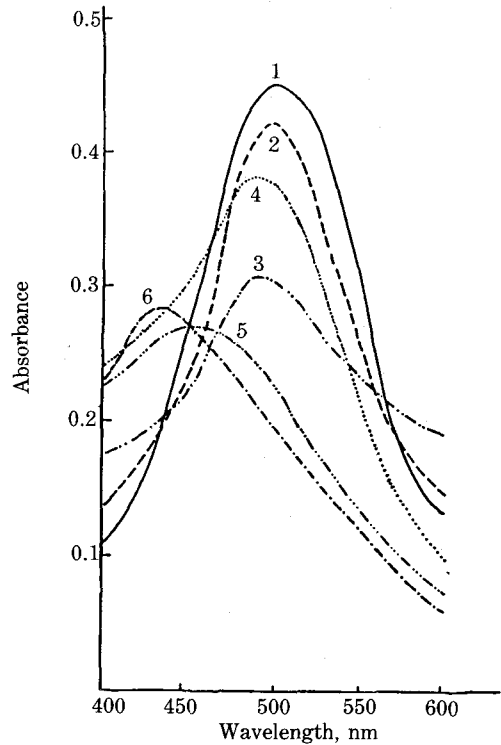


Fig. 2—Absorption spectra of color compound formed by the reaction of IO₃⁻ ($4 \times 10^{-5}M$) and APP ($7.28 \times 10^{-5}M$) at various pH values.

Curves of No. 1, 2, 3, 4, 5, and 6 were obtained from pH 1 (λ_{max} , Abs: 500 nm, 0.450), pH 3 (λ_{max} , Abs: 493 nm, 0.421), pH 5 (λ_{max} , Abs: 485 nm, 0.305), pH 7 (λ_{max} , Abs: 485 nm, 0.380), pH 9 (λ_{max} , Abs: 450 nm, 0.270), and pH 11 (λ_{max} , Abs: 435 nm, 0.283), respectively.

반응하여 쉽게 정색화합물을 형성하며, 이는 시간이 경과하여도 매우 안정함을 알 수 있다.

APP의 첨가량—환원성의약품과 반응한 후 남은 IO₃⁻와 APP와의 반응시 정색화합물을 완전히 생성시키는데 필요한 APP의 첨가량을 검토하기 위하여 pH 1 완충용액 5 ml, IO₃⁻ 1 ml에 대하여 APP의 농도를 변화시켜 전량을 25 ml로 하여 15분 후 500 nm에서 흡광도를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. Fig. 5에서 알 수 있는 바와 같이 APP는 IO₃⁻의 동농도 이상에서는 흡광도가 일정하였다. 따라서 APP는 IO₃⁻의 동농도 이상을 가해야 한다.

IO₃⁻ 농도—본 반응에서 환원성의약품과 정량적으로 반응하는 일정과량의 IO₃⁻의 농도를 구하기

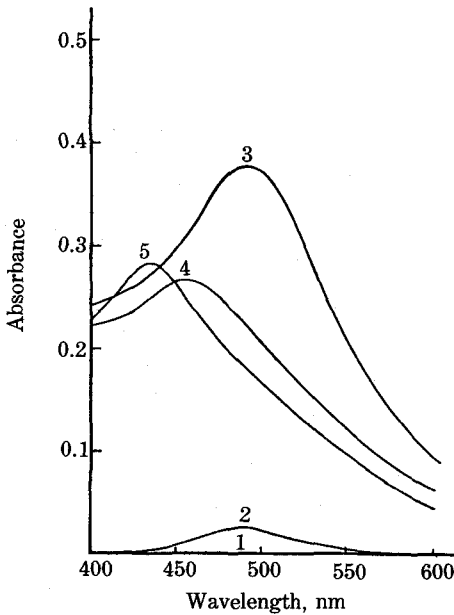


Fig. 3—Absorption spectra of APP solutions ($7.28 \times 10^{-5}M$) at various pH values.

Curves of No. 1, 2, 3, 4, and 5 were obtained from pH 2, pH 5 (λ_{max} , Abs: 485 nm, 0.028), pH 7 (λ_{max} , Abs: 485 nm, 0.377), pH 9 (λ_{max} , Abs: 450 nm, 0.273), and pH 11 (λ_{max} , Abs: 435 nm, 0.280), respectively.

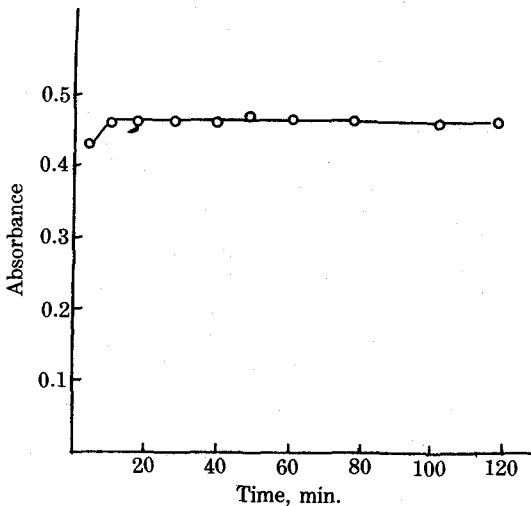


Fig. 4—Effect of standing time on the absorbance of color compound formed by the reaction of IO_3^- ($4 \times 10^{-5}M$) and APP ($7.28 \times 10^{-5}M$) at 500 nm and pH 1.0. The maximum color intensity was obtained after 10 min. and was unchanged after 2 hrs. at room temperature.

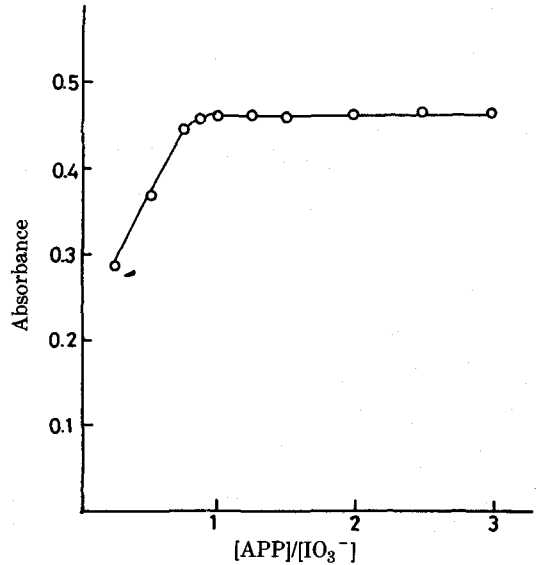


Fig. 5—Effect of APP concentration on the absorbance of color compound formed by the reaction of IO_3^- ($4 \times 10^{-5}M$) and APP at 500 nm and pH 1.0. The maximum absorbance was obtained at the same concentration of IO_3^- and APP.

위하여 pH 1 완충용액 5ml, APP 3ml 및 IO_3^- 일정량을 25ml 용량 flask 에 취하고 표선까지 물로 채운 다음 15분 후 생성된 정색화합물의 흡광도를 500 nm 에서 측정 한 결과는 Fig. 6과 같다. Fig. 6에서 알 수 있는 바와 같이 IO_3^- 의 농도가 $3.43 \times 10^{-6}M \sim 1.2 \times 10^{-4}M$ 범위내에서는 Beer 의 법칙이 성립됨을 알 수 있었다. 따라서 본 반응에 사용한 IO_3^- 의 농도는 $1.2 \times 10^{-4}M$ 로 하였다.

pH 의 영향— IO_3^- 와 ascorbic acid, PAT 및 INAH 와의 반응에 미치는 pH 의 영향을 검토하기 위하여 ascorbic acid 792.6 μg , PAT 1502.7 μg 및 INAH 308.6 μg 함유하는 용액을 각각 25ml 용량 flask 에 취하고 여기에 여러 가지 pH 완충용액 5ml, IO_3^- 3ml 및 APP 3ml 를 가하여 정량법에 따라 흡광도를 측정 한 결과는 Table II와 같다. Table II에서 알 수 있는 바와 같이 ascorbic acid 는 pH 2.5 이하, PAT 는 pH 2.0 이하, INAH 는 pH 1.5 이하에서 흡광도가 일정하였고, pH 가 증가함에 따라서 흡광도가 감소하였다. 이것은 pH 가 증가함에 따라 IO_3^- 와 ascorbic acid, PAT 및 INAH 와의 반응완결에 많은 시간이 소요되며, APP 자체의 안정성도 감소하기 때문인 것으

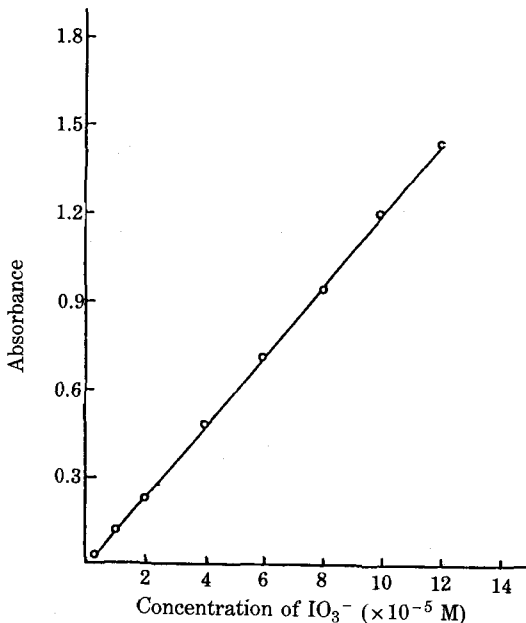


Fig. 6—Calibration curve of IO_3^- at 500 nm and pH 1.0. Beer's law did hold in the range of $3.43 \times 10^{-6}\text{M}$ – $1.2 \times 10^{-4}\text{M}$ of IO_3^- .

로 사료된다. 따라서 IO_3^- 와 ascorbic acid, PAT 및 INAH와의 반응 pH 조건은 각각 2.5 이하, 2.0 이하, 1.5 이하임을 알 수 있다.

산의 종류와 농도의 영향—산의 종류와 농도가 IO_3^- 와 ascorbic acid, PAT 및 INAH와의 반응에 미치는 영향을 검토하기 위하여 ascorbic acid 792.6 μg , PAT 1502.7 μg 및 INAH 308.6 μg 함유하는 용액을 각각 25 ml 용량 flask에 취하고, 여기에 여러 가지 농도의 산 일정량, IO_3^- 3 ml 및 APP 3 ml를 가하여 정량법에 따라서 흡광도를 측정하는 결과는 Table III과 같다. Table III에서 알 수 있는 바와 같이 강산인 HCl과 H_2SO_4 에서는 ascorbic acid 및 PAT의 경우 1.0 N 이하에서, INAH의 경우 0.05–1.0 N에서 흡광도가 일정하였고, H_3PO_4 에서는 ascorbic acid의 경우 0.01 N 이상, PAT의 경우 0.03 N 이상, INAH의 경우 0.3 N 이상에서 흡광도가 일정하였다. 따라서 IO_3^- 와 ascorbic acid, PAT 및 INAH와의 반응 시 산의 농도조건은 HCl과 H_2SO_4 에서는 각각 1.0 N 이하, 1.0 N 이하, 0.05–1.0 N였으며 H_3PO_4 에서는 각각 0.01 N 이상, 0.03 N 이상, 0.3 N 이상이었다.

Table II—Effect of pH on the reaction of IO_3^- and each of reducing drugs (ascorbic acid, PAT, and INAH).

pH	Buffer added	*Absorbance (500 nm)		
		Ascorbic acid	PAT	INAH
0.5	HCl+KCl	0.710	0.712	0.716
1.0	HCl+KCl	0.712	0.713	0.715
1.5	HCl+KCl	0.711	0.711	0.714
1.8	HCl+KCl	0.712	0.710	0.552
2.0	HCl+KCl	0.710	0.711	0.352
2.5	$\text{C}_6\text{H}_4(\text{COOH})\text{COOK}+\text{HCl}$	0.709	0.454	0.290
3.0	1 M AcOH+1 M AcONa	0.658	0.308	0.278
3.5	1 M AcOH+1 M AcONa	0.626	0.264	0.250
4.0	1 M AcOH+1 M AcONa	0.593	0.136	0.138
5.0	1 M AcOH+1 M AcONa	0.454	0.086	0.100
5.5	0.2 M KH_2PO_4 +0.2 M Na_2HPO_4	0.388	0.050	0.017
6.0	0.2 M KH_2PO_4 +0.2 M Na_2HPO_4	0.199	0.006	0.002

*Absorbance was obtained by the subtraction of the absorbance of color compound formed by the reaction of IO_3^- ($1.2 \times 10^{-4}\text{M}$), each of reducing drugs (ascorbic acid, PAT, and INAH), and APP ($2.18 \times 10^{-4}\text{M}$) from that of color compound formed by the reaction of IO_3^- ($1.2 \times 10^{-4}\text{M}$) and APP ($2.18 \times 10^{-4}\text{M}$) (blank).

반응시간— IO_3^- 와 ascorbic acid, PAT 및 INAH와의 반응시간을 검토하기 위하여 ascorbic acid 792.6 μg , PAT 1502.7 μg 및 INAH 308.6 μg 함유하는 용액을 각각 25 ml 용량 flask에 취하고, 여기에 1N- H_2SO_4 3 ml, IO_3^- 3 ml 및 APP 3 ml를 가하여 정량법에 따라서 흡광도를 측정하는 결과는 Table IV와 같다. Table IV에서 알 수 있는 바와 같이 IO_3^- 와 ascorbic acid, PAT 및 INAH와의 반응은 5분이면 충분함을 알 수 있다.

온도의 영향— IO_3^- 와 ascorbic acid, PAT 및 INAH와의 반응에 미치는 온도의 영향을 검토하기 위하여 ascorbic acid 792.6 μg , PAT 1502.7 μg 및 INAH 308.6 μg 함유하는 용액을 각각 25 ml 용량 flask에 취하고, 여기에 1N- H_2SO_4 3 ml, IO_3^- 3 ml를 가하여 일정온도에서 10분간 방치한 후 정량법에 따라서 흡광도를 측정하는 결과는 Table V와 같다. Table V에서 알 수 있는 바와 같이 온도가 증가하더라도 흡광도는 변하지 않았고, 60°C

Table III—Effect of some kinds of acids and their concentrations on the reaction of IO_3^- and each of reducing drugs (ascorbic acid, PAT, and INAH).

Acid	Concentration (N)	*Absorbance (500 nm)		
		Ascorbic acid	PAT	INAH
Hydrochloric acid	0.01	0.708	0.712	0.360
	0.03	0.710	0.710	0.658
	0.05	0.711	0.711	0.715
	0.1	0.709	0.709	0.713
	0.3	0.712	0.712	0.713
	0.5	0.710	0.709	0.714
	1.0	0.712	0.710	0.713
	2.0	0.558	0.538	0.488
Sulfuric acid	0.01	0.712	0.713	0.360
	0.03	0.710	0.712	0.642
	0.05	0.711	0.709	0.713
	0.1	0.709	0.712	0.716
	0.3	0.712	0.712	0.714
	0.5	0.710	0.709	0.713
	1.0	0.711	0.710	0.712
	2.0	0.549	0.539	0.472
Phosphoric acid	0.01	0.714	0.680	0.289
	0.03	0.713	0.709	0.424
	0.05	0.710	0.712	0.519
	0.1	0.709	0.710	0.620
	0.3	0.712	0.712	0.712
	0.5	0.713	0.709	0.710
	1.0	0.710	0.712	0.712
	3.0	0.710	0.712	0.713

*Absorbance was obtained by the subtraction of the absorbance of color compound formed by the reaction of IO_3^- ($1.2 \times 10^{-4}\text{M}$), each of reducing drugs (ascorbic acid, PAT and INAH), and APP ($2.18 \times 10^{-4}\text{M}$) from that of color compound formed by the reaction of IO_3^- ($1.2 \times 10^{-4}\text{M}$) and APP ($2.18 \times 10^{-4}\text{M}$) (blank).

이상에서는 오히려 흡광도가 감소하였다. 이것은 온도가 너무 높아 APP 산화생성체인 정색화합물이 불안정하기 때문이라 사료된다. 따라서 본 정량법은 상온에서 반응이 용이하게 일어남을 알 수 있다.

반응비— IO_3^- 와 ascorbic acid, PAT 및 INAH

Table IV—Effect of standing time on the reaction of IO_3^- and each of reducing drugs (ascorbic acid, PAT, and INAH).

Time (min)	*Absorbance (500 nm)		
	Ascorbic acid	PAT	INAH
5	0.712	0.712	0.709
10	0.713	0.710	0.710
20	0.712	0.713	0.712
30	0.710	0.712	0.713
40	0.712	0.714	0.712
50	0.710	0.712	0.710
60	0.713	0.713	0.715

*Absorbance was obtained by the subtraction of the absorbance of color compound formed by the reaction of IO_3^- ($1.2 \times 10^{-4}\text{M}$), each of reducing drugs (ascorbic acid, PAT, and INAH), and APP ($2.18 \times 10^{-4}\text{M}$) from that of color compound formed by the reaction of IO_3^- ($1.2 \times 10^{-4}\text{M}$) and APP ($2.18 \times 10^{-4}\text{M}$) (blank).

Table V—Effect of temperature on the reaction of IO_3^- and each of reducing drugs (ascorbic acid, PAT, and INAH).

Time (°C)	*Absorbance (500 nm)		
	Ascorbic acid	PAT	INAH
5	0.712	0.712	0.713
20	0.713	0.714	0.712
30	0.713	0.713	0.713
40	0.713	0.712	0.712
45	0.713	0.714	0.711
50	0.712	0.713	0.712
60	0.703	0.699	0.704

*Absorbance was obtained by the subtraction of the absorbance of color compound formed by the reaction of IO_3^- ($1.2 \times 10^{-4}\text{M}$), each of reducing drugs (ascorbic acid, PAT and INAH), and APP ($2.18 \times 10^{-4}\text{M}$) from that of color compound formed by the reaction of IO_3^- ($1.2 \times 10^{-4}\text{M}$) and APP ($2.18 \times 10^{-4}\text{M}$) (blank).

와의 반응비를 검토하기 위하여 10^{-3}M IO_3^- 1.5 ml에 대하여 정량법에 따라 ascorbic acid, PAT 및 INAH의 농도를 변화시켜 가며 흡광도를 측정 한 결과는 Fig. 7과 같다. Fig. 7에서 알 수 있는 바와 같이 IO_3^- 는 ascorbic acid 및 PAT와는 1:3으로 반응하고, INAH와는 2:3으로 반응함을 알 수 있었다. ^{3,5,8,13,14,16,17)}

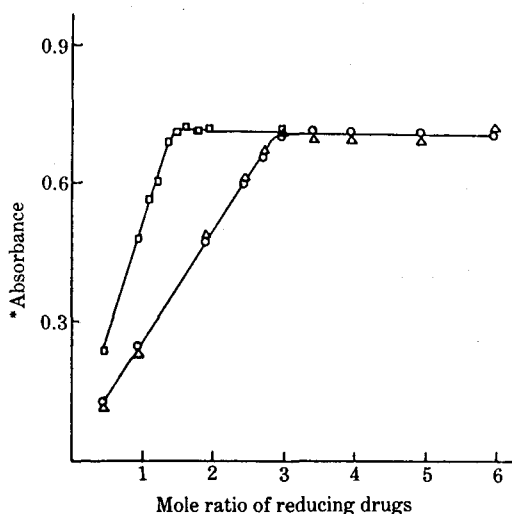
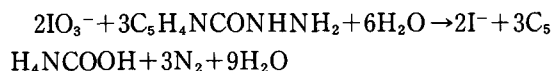
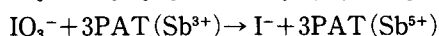
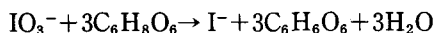


Fig. 7—Mole ratio method for the reaction of IO_3^- ($6 \times 10^{-5}\text{M}$) and each of reducing drugs (ascorbic acid, PAT, and INAH). *Absorbance was obtained by the subtraction of the absorbance of color compound formed by the reaction of IO_3^- ($6 \times 10^{-5}\text{M}$), each of reducing drugs (ascorbic acid, PAT, and INAH), and APP ($2.18 \times 10^{-4}\text{M}$) from that of color compound formed by the reaction of IO_3^- ($6 \times 10^{-5}\text{M}$) and APP ($2.18 \times 10^{-4}\text{M}$) (blank) at 500 nm.

Key: ○—○, [Ascorbic acid]/ $[\text{IO}_3^-]$; △—△, [PAT]/ $[\text{IO}_3^-]$; □—□, [INAH]/ $[\text{IO}_3^-]$.

따라서 IO_3^- 와 ascorbic acid, PAT 및 INAH와의 화학반응식은 다음과 같은 것으로 사료된다.



검량선의 작성—정량법에 따라서 공시험에서 얻어진 흡광도로부터 시료용액을 가하여 얻은 흡광도를減하여 작성한 검량선은 Fig. 8과 같다. Ascorbic acid, PAT 및 INAH의 정량범위는 각각 17.6~1549.9 μg , 33.4~2871.8 μg , 6.9~548.6 μg 이었고, 상관계수는 각각 0.999, 0.999, 0.998이었다. 따라서 미량에서 비교적 넓은 농도범위까지 정량이 가능하였다.

공존물질의 영향—Ascorbic acid, PAT 및 INAH의 정량에 미치는 공존물질의 영향을 검토하기 위하여 792.6 μg 의 ascorbic acid에 organic

Table VI—Effect of foreign substances on the determination of ascorbic acid.

Substances added,	μg	Ascorbic acid, μg		Recovery, %
		Added	*Found	
Citric acid	20,000	792.6	794.2	100.2±0.1
Maleic acid	20,000	792.6	794.2	100.2±0.2
Succinic acid	20,000	792.6	791.8	99.9±0.2
Tartaric acid	20,000	792.6	791.8	99.9±0.1
Glutaric acid	20,000	792.6	792.6	100.0±0.2
Lactic acid	20,000	792.6	793.4	100.1±0.2
Malonic acid	15,000	792.6	791.8	99.9±0.1
	20,000	792.6	804.5	101.5±0.2
Oxalic acid	20,000	792.6	791.8	99.9±0.1
Thiamine HCl	10,000	792.6	792.6	100.0±0.2
	20,000	792.6	798.9	100.8±0.1
Riboflavin	50	792.6	788.6	99.5±0.2
	100	792.6	770.4	97.2±0.3
Nicotinamide	10,000	792.6	791.8	99.9±0.2
	20,000	792.6	796.6	100.5±0.3
Pyridoxine HCl	20,000	792.6	792.6	100.0±0.2
Biotin	10,000	792.6	791.0	99.8±0.2
L-Aspartic acid	20,000	792.6	792.6	100.0±0.2
L-Glutamine	20,000	792.6	791.8	99.9±0.2
L-Histidine	20,000	792.6	793.4	100.1±0.3
L-Phenylalanine	20,000	792.6	791.8	99.9±0.2
L-Valine	20,000	792.6	793.4	100.1±0.2
L-Leucine	10,000	792.6	794.2	100.2±0.2
	20,000	792.6	798.9	100.8±0.1
DL-Methionine	10	792.6	795.8	100.4±0.2
	50	792.6	831.4	104.9±0.4
	100	792.6	887.7	112.0±0.6
Starch	50,000	792.6	791.8	99.9±0.2
Lactose	50,000	792.6	791.8	99.9±0.1

*Mean value of three determinations

acids, vitamins, amino acids 및 부형제로 사용되는 starch, lactose 일정량씩을, 1502.7 μg 의 PAT에 무기염류 및 starch, lactose 일정량씩을, 그리고 308.6 μg 의 INAH에 환원당, 제제 중에 포함될 수 있는 pyridoxine·HCl 및 starch, lactose 일정량씩을 첨가하여 정량법에 따라서 흡광도를 측정하여 ascorbic acid, PAT 및 INAH를 계산한 결과는 Table VI~VIII과 같다. Table VI에서 알 수 있는 바와 같이 ascorbic acid 정량에서

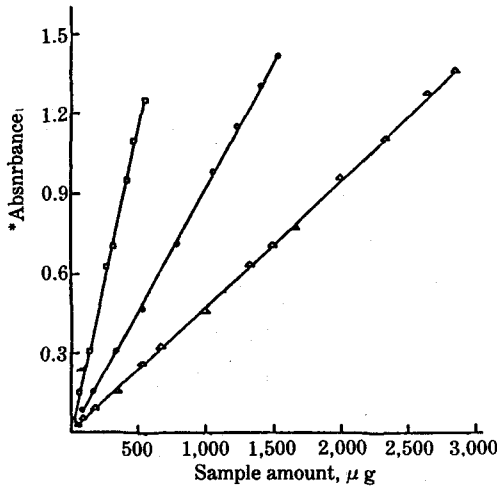


Fig. 8—Calibration curves of ascorbic acid, PAT, and INAH.

*Absorbance was obtained by the subtraction of the absorbance of color compound formed by the reaction of IO_3^- ($1.2 \times 10^{-4}\text{M}$), each of reducing drugs (ascorbic acid, PAT and INAH), and APP ($2.18 \times 10^{-4}\text{M}$) from that of color compound formed by the reaction of IO_3^- ($1.2 \times 10^{-4}\text{M}$) and APP ($2.18 \times 10^{-4}\text{M}$) (blank) at 500 nm.

Key: ○—○, Ascorbic acid; △—△, PAT; □—□, INAH.

는 organic acids, amino acids, vitamins 및 부형제가 다량으로 공존하여도 영향을 미치지 않으나 amino acids 중 methionine은 구조 중의 S가 IO_3^- 에 의해 산화되므로 흡광도를 감소시키는 것으로 사료되고,¹²⁾ vitamins 중 riboflavin은 구조 중에 강력한 황색을 나타내는 isoalloxazine ring system 때문에 흡광도를 증가시키는 것으로 사료된다.³¹⁾ Table VII에서 알 수 있는 바와 같이, PAT의 정량에서는 대부분의 무기염류 및 starch, lactose 등이 공존하여도 영향을 미치지 않으나 산화성시료인 Cu^{2+} , Cr^{6+} , V^{5+} 등은 소량 공존하여도 흡광도를 크게 증가시켰다. Table VIII에서 알 수 있는 바와 같이, INAH의 정량에서는 환원당,^{4,7,9-11,28)} pyridoxine·HCl 및 starch, lactose 등은 다량 공존하여도 아무런 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

표준시료에 의한 회수시험—본 정량법을 시판되고 있는 제제에 응용하기 위하여, ascorbic acid 500

Table VII—Effect of foreign substance on the determination of PAT.

Ion	Substances added, μg	PAT, μg		Recovery, %
		Added	*Found	
NH_4^+	NH_4Cl 50,000	1502.7	1507.2	100.3±0.2
Na^+	NaCl 50,000	1502.7	1501.2	99.9±0.1
K^+	KCl 50,000	1502.7	1504.2	100.1±0.2
Ca^{2+}	CaCl_2 50,000	1502.7	1505.7	100.2±0.2
Mg^{2+}	MgCl_2 50,000	1502.7	1504.2	100.1±0.1
Ba^{2+}	BaCl_2 50,000	1502.7	1501.2	99.9±0.2
Zn^{2+}	ZnCl_2 50,000	1502.7	1501.2	99.9±0.3
Mn^{2+}	MnSO_4 50,000	1502.7	1504.2	100.1±0.2
Co^{2+}	CoCl_2 2,500	1502.7	1502.7	100.0±0.2
	5,000	1502.7	1442.6	96.0±0.4
	10,000	1502.7	1390.0	92.5±0.6
Cu^{2+}	CuSO_4 127.1	1502.7	1499.7	99.8±0.3
	254.2	1502.7	1465.1	97.5±0.5
	508.4	1502.7	1433.6	95.4±0.6
Cr^{6+}	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0.52	1502.7	1499.7	99.8±0.2
	1.04	1502.7	1477.2	98.3±0.4
	2.6	1502.7	1417.0	94.3±0.3
V^{5+}	NaVO_3 2.6	1502.7	1501.2	99.9±0.2
	5.2	1502.7	1453.1	96.7±0.3
	Starch 50,000	1502.7	1501.2	99.9±0.2
	Lactose 50,000	1502.7	1501.2	99.9±0.1

*Mean value of three determinations

Table VIII—Effect of foreign substances on the determination of INAH.

Substances added, μg	INAH, μg		Recovery, %
	Added	*Found	
Pyridoxine HCl 20,000	308.6	308.6	100.0±0.1
D-Maltose 50,000	308.6	308.3	99.9±0.1
D-Glucose 50,000	308.6	308.6	100.0±0.1
D-Fructose 50,000	308.6	308.9	100.1±0.2
D-Galactose 50,000	308.6	308.6	100.0±0.1
D-Mannose 50,000	308.6	308.3	99.9±0.2
Starch 50,000	308.6	308.3	99.9±0.2
Lactose 50,000	308.6	308.6	100.0±0.1

*Mean value of three determinations

Table IX—Determinations of ascorbic acid and INAH in pharmaceutical formulations found in the market.

Product name	Compositions (Ratio)	Ascorbic acid or INAH, μg		Recovery, %
		Added	*Found	
Vitamin C granules	Riboflavin : Pyridoxine HCl : Ascorbic acid (1 : 2.5 : 500)	500	499.0	99.8 \pm 0.2
Multivitamin tablet	Pyridoxine HCl : Riboflavin : Calcium pantothenate : Thiamine nitrate : Nicotinamide : Ascorbic acid (1 : 1.25 : 2 : 2.5 : 10 : 50)	500	501.5	100.3 \pm 0.4
INAH and V-B ₆ tablet	Pyridoxine HCl : INAH (1:20)	100	99.8	99.8 \pm 0.3

*Mean value of five determinations

μg , INAH 100 μg 을 함유하는 시판제제와 동일한 조성의 표준시료를 조제하여 정량법에 따라 흡광도를 측정하여 ascorbic acid 및 INAH 를 계산한 결과는 Table IX와 같다. 본 정량법에 의한 ascorbic acid 및 INAH 제제에서의 recovery 는 각각 99.8~100.3 \pm 0.2~0.4%, 99.8 \pm 0.3%였다.

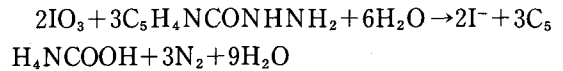
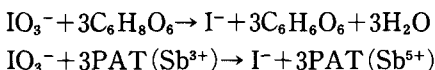
결 론

1. 발색시약인 APP는 산화제인 IO₃⁻와 반응하여 쉽게 정색화합물을 형성하며, 이는 상당한 시간이 경과하여도 안정하고, 또한 IO₃⁻와 환원성의약품은 정량적으로 반응하므로, 환원성의약품에 일정과량의 IO₃⁻를 가하여 반응시킨 후 남아있는 IO₃⁻에 일정과량의 APP를 가하여 생성되는 적색의 정색화합물을 500 nm 에서 흡광도를 측정함으로써 환원성의약품인 ascorbic acid, PAT 및 INAH의 정량법을 확립하였다.

2. APP는 발색시약으로서, 유사화합물인 2,4-diaminophenol에 비하여 보다 안정하며, 특히 pH 2.0 이하에서는 매우 안정하였다.

3. IO₃⁻와 ascorbic acid, PAT 및 INAH와의 반응 pH 조건은 각각 2.5 이하, 2.0 이하, 1.5 이하였다.

4. IO₃⁻는 ascorbic acid 및 PAT와 1 : 3으로 반응하고 INAH와는 2 : 3으로 반응하므로 IO₃⁻와 ascorbic acid, PAT 및 INAH와의 화학반응식은 다음과 같은 것으로 사료된다.



5. Ascorbic acid, PAT 및 INAH의 정량범위는 각각 17.6~1549.9 μg , 33.4~2871.8 μg , 6.9~548.6 μg 으로, 미량에서 비교적 넓은 농도범위까지 정량이 가능하였다.

6. 시료 중에 함유된 공존물질의 영향을 거의 받지 않았고, 그 정량조작이 신속, 간편하였으며, ascorbic acid 및 INAH 제제 중에 응용하였더니 recovery는 각각 99.8~100.3 \pm 0.2~0.4%, 99.8 \pm 0.3%였다.

문 헌

- 1) Murty, N.K. and Rao, K.R.: Determination of ascorbic acid with potassium iodate, iodine, potassium bromate and iodine monochloride using naphthol blue black, amaranth and brilliant ponceau 5R as indicators, *J. Indian Chem. Soc.* **53**, 532 (1976).
- 2) Gawargious, Y.A., Boulos, L.S. and Besada, A.: Micro and submicroscale iodimetric determination of antimony (III) in antibilharzial compounds by use of amplification reactions, *Analyst* **101**, 458 (1976)
- 3) Nair, C.G.R. and Kumari, R.L.: Interhalogens as oxidimetric titrants: Part VI-Oxidimetric determinations with bromine monochloride, *Indian J. Chem.* **14A**, 115 (1976).
- 4) Gowda, H.S. and Ahmed, S.A.: Diethazine hydrochloride as a new redox indicator in cerimetric titration of Fe(II), U(IV), Mo(V), hydroquinone and ascorbic acid, *ibid.* **15A**, 907 (1977).

- 5) Malhortra, K.C. and Sud, R.G.: Solution chemistry in fused monochloroacetic acid: Part VII-Redox reactions and estimation of thioureas, hydrazines and ascorbic acid in fused monochloroacetic acid, *ibid.* **15A**, 973 (1977).
- 6) Rao, G.G. and Wiswanath, S.G.: Some triphenylmethane dyes as redox indicators in the titration of antimony (III) with cerium (IV) sulfate, *Talanta* **24**, 323 (1977).
- 7) Gowda, H.S. and Ahmed, S.A.: N-substituted phenothiazines as redox indicators in bromatometry, *ibid.* **26**, 233 (1979).
- 8) Yathirajan, H.S., Mahadevappa, D.S. and Rangaswamy: Dichloramine-B as redox titrant in non-aqueous or partially aqueous media, *ibid.* **27**, 52 (1980).
- 9) Gowda, H.S., Mohan, B.M. and Ahmed, S.A.: N-substituted phenothiazines as redox indicators in titrations with chloramine-T and chloramine-B, *ibid.* **27**, 1084 (1980).
- 10) Yathirajan, H.S., Rangaswamy and Mahadevappa, D.S.: A rapid method for the estimation of isoniazid with dichloramine-T and dichloramine-B, *J. Indian Chem. Soc.* **58**, 619 (1981).
- 11) Gowda, H.S. and Gurusurthy, S.: Redox indicators in titrations with chloramine-T, *Anal. Chim. Acta* **131**, 315 (1981).
- 12) Gowda, N.M.M., Trieff, N.M. and Ramanujam, V.M.S.: Synthesis and analytical applications of sodium N-bromo-p-nitrobenzenesulfonamide, *ibid.* **147**, 429 (1983).
- 13) Radhamma, M.P. and Indrasenan, P.: Titrimetric determinations using dichlorohydantoin and dibromohydantoin in aqueous acetic acid medium, *Indian J. Chem.* **23A**, 794 (1984).
- 14) Radhakrishnan, K. and Indrasenan, P.: Titrimetric determination using bromohydantoin as a new oxidimetric titrant in aqueous medium, *J. Indian Chem. Soc.* **62**, 84 (1985).
- 15) Gawargious, Y.A., Hassouna, M.E.M., Hassan, H.N.A. and Habib, I.H.: Micro and submicro determination of antimony (III) in antibilharzial compounds by oxidation with N-bromosuccinimide, *Pharmazie* **41**, 59 (1986).
- 16) Devi, G.S. and Indrasenan, P.: Use of visual indicators for direct titrations with dibromamine-T, *J. Indian Chem. Soc.* **63**, 533 (1986).
- 17) Mohanadas, C. and Indrasenan, P.: N-bromosaccharin as an oxidimetric titrant: Direct potentiometric and visual titrations of some typical reductants in aqueous acetic acid medium, *Indian J. Chem.* **26A**, 55 (1987).
- 18) Lindquist, J. and Farroha, S.M.: Application of differential pulse polarography to the assay of vitamins, *Analyst* **100**, 377 (1975).
- 19) Gawargious, Y.A., Tadros, N.B., Ibrahim, L.F. and Besada, A.: Polarographic determination of antibilharzial organic antimony compounds, *ibid.* **112**, 549 (1987).
- 20) Timbrell, J.A., Wright, J.M. and Smith, C.M.: Determination of hydrazine metabolites of isoniazid in human urine by gas chromatography. *J. Chromatogra.* **138**, 165 (1977).
- 21) Williams, R.C., Baker, D.R. and Schmit, J.A.: Analysis of water soluble vitamins by high-speed ion exchange chromatography, *J. Chromatog. Sci.* **11**, 618 (1973).
- 22) Sood, S.P., Sartori, L.E., Wittmer, D.P. and Haney, W.G.: High pressure liquid chromatographic determination of ascorbic acid in selected foods and multivitamin products, *Anal. Chem.* **48**, 796 (1976).
- 23) Stewart, J.T., Honigberg, I.L., Brant, J.P., Murray, W.A., Webb, J.L. and Smith, J.B.: Liquid chromatography in pharmaceutical analysis V: Determination of an isoniazid-pyridoxine hydrochloride mixture, *J. Pharm. Sci.* **65**, 1536 (1976).
- 24) Saxena, S.J., Stewart, J.T., Honigberg, I.L., Washington, J.G. and Keene, G.R.: Liquid chromatography in pharmaceutical analysis VIII: Determination of isoniazid and acetyl derivative in plasma and urine samples, *ibid.* **66**, 813 (1977).
- 25) Blanc, M. and Cotonat, J.: High performance liquid chromatographic determination of isoniazid levels in plasma, *Rev. Med. Toulouse* **17**, 307 (1981).
- 26) Lau, O.W., Luk, S.F. and Wong, K.S.: Determination of ascorbic acid in pharmaceuticals using direct ultraviolet spectrophotometry, *Analyst* **112**, 1023 (1987).
- 27) Schmall, M., Pifer, C.W. and Wollish, E.G.: Determination of ascorbic acid by a new colorimetric reac-

- tion, *Anal. Chem.* **25**, 1486 (1953).
- 28) Eldwy, M.A., Tawfik, A.S. and Elshabouri, S.R.: Rapid, sensitive spectrophotometric method for the determination of ascorbic acid, *ibid.* **47**, 461 (1975).
- 29) Elnaey, E.S. and Soliman, R.: A sensitive colorimetric method for estimation of ascorbic acid, *Talanta* **26**, 1164 (1979).
- 30) Aly, M.M.: Spectrophotometric and titrimetric methods for the determination of vitamin C based on its reaction with the ferricinium cation, *Anal. Chim. Acta* **106**, 379 (1979).
- 31) Aly, M.M., Hassan, M.K. and Souliman, R.M.: Simple and rapid spectrophotometric and titrimetric methods for the determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **30**, 435 (1980).
- 32) Besada, A.: A facile and sensitive spectrophotometric determination of ascorbic acid, *Talanta* **34**, 731 (1987).
- 33) Besada, A., Tadros, N.B., Gawargious, Y.A. and Ibrahim, L.F.: Ultraviolet spectrophotometric determination of antimony (III) antibilharzial compounds, *Anal. Lett.* **21**, 447 (1988).
- 34) Besada, A., Gawargious, Y.A., Tadros, N.B. and Ibrahim, L.F.: A facile spectrophotometric method for the determination of antimony (III) antibilharzial compounds based on the formation of molybdenum blue, *Pharmazie* **42**, 482 (1987).
- 35) Abou-Off, A.A., Taha, A.M. and Saidhom, M.B.: Spectrophotometric analysis of primary aliphatic amines with diclone, *J. Pharm. Sci.* **62**, 1700 (1973).
- 36) Nayak, A.N., Yathirajan, H.S. and Manjappa, S.: Spectrophotometric determination of isoniazid, *Curr. Sci.* **50**, 812 (1981).
- 37) Mori, H., Fujimura, Y. and Takegami, Y.: Spectrophotometric determination of chromium (VI) with bis(2,4-diaminophenyl)phosphonate, *Bunseki Kagaku* **30**, 652 (1981).
- 38) Mori, H., Fujimura, Y. and Takegami, Y.: Spectrophotometric determination of copper (II) with bis(2,4-diaminophenyl)phosphonate, *ibid.* **31**, 261 (1982).
- 39) Suh, J.H. and Kam, S.K.: Spectrophotometric determination of iodate ion by bis(2,4-diaminophenyl)phosphonate, *Bulletin of Pharmaceutical Sciences* **17**(2), 21 (1983).
- 40) Suh, J.H.: Spectrophotometric determination of residual chlorine by bis(2,4-diaminophenyl)phosphonate, *ibid.* **17**(2), 29 (1983).
- 41) Kreingol'd, S.U., Antonov, V.N. and Saburova, V.I.: *Zh. Anal. Khim.*, 640(1973); CA 79, 26798.