

НЕОРГАНІЧНА, АНАЛІТИЧНА ТА ФІЗИЧНА ХІМІЯ

Є. Є. Костенко, О. М. Бутенко, Н. М. Грегірчак, О. В. Максименко
Національний університет харчових технологій, м. Київ

УДК 543.422. 546.815

ДОСЛІДЖЕННЯ КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ ЙОНІВ МЕРКУРІЮ (II) З ЛІКАРСЬКИМИ ПРЕПАРАТАМИ

Відомо, що солі меркурію (II) та його комплексні сполуки з амінокислотами входять до складу окремих фармацевтичних препаратів (наприклад «Меркурід», «Витурид» тощо), які широко використовуються для лікування онкологічних захворювань [1]. Тому створення нових лікарських форм, що містять меркурій (II), а також добавок при розробці харчових продуктів лікувально-профілактичної дії для онкологічних хворих є актуальним.

З цією метою нами було досліджено комплексоутворення меркурію (II) з анальгіном, стрептоцидом та стрептоміцином метал-індикаторним методом [2]. Така інформація відсутня в літературі.

Експериментальна частина

Реагенти. Вихідний 0.1 М розчин $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ готували розчиненням наважки $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}$ кваліфікації х.ч. в 0.1 М HNO_3 . Стандартизацію проводили меркуриметричним методом [3].

0.1 М розчини анальгіну, стрептоциду, стрептоміцину (R) готували розчиненням точних наважок фармацевтичних препаратів у воді.

В роботі використовували водний розчин сульфоназо III (СФАЗ) ч.д.а. фірми Merk. Водний 0.01 М розчин HNO_3 (осч.) готували розведенням концентрованого розчину. Робочі розчини готували розведенням вихідних перед проведенням експерименту.

Методика проведення експерименту. У мірну пробірку вносили $0.5 \text{ см}^3 \cdot 10^{-3}$ М розчину Hg (II), додавали $1 \text{ см}^3 \cdot 10^{-2}$ М розчину HNO_3 , $2 \text{ см}^3 \cdot 10^{-3}$ М розчину сульфоназо III, доводили водою до 10 см^3 , перемішували, знімали спектр світлопоглинання або вимірювали оптичну густину розчину при $l = 0.5 \text{ см}$, $\lambda = 640 \text{ нм}$ відносно води через 20 хв. після змішування розчинів.

У другу мірну пробірку вносили $0.5 \text{ см}^3 \cdot 10^{-3}$ М розчину Hg (II), додавали $1 \text{ см}^3 \cdot 10^{-2}$ М розчину HNO_3 , $X \text{ см}^3 \cdot 0.1$ М розчину досліджуваного препарату, перемішували, додавали $2 \text{ см}^3 \cdot 10^{-3}$ М розчину сульфоназо III, водою доводили до 10 см^3 , перемішували, знімали спектр світлопоглинання або вимірювали оптичну густину при $l = 0.5 \text{ см}$, $\lambda = 640 \text{ нм}$ відносно води, через 20 хв. після змішування розчинів.

Апаратура. Спектри світлопоглинання розчинів знімали, користуючись спектрофотометром Specord UV VIS. Світлопоглинання розчинів вимірювали на КФК-3 при оптимальній довжині хвилі ($\lambda_{\text{опт}}$) відносно контрольної проби (H_2O). Кислотність розчинів контролювали йономіром И-160 зі скляним електродом.

Результати та їх обговорення

Схема дослідження комплексоутворення в системі Hg (II) – лікарський препарат метал-індикаторним методом [2].

Як метал-індикаторну систему використовували комплексну сполуку Hg (II) зі СФАЗ. Основні характеристики та умови утворення комплексу Hg (II) зі СФАЗ наступні: $\lambda_{\text{опт}} = 640 \text{ нм}$; рН 2.5 – 4.0, $\varepsilon = 48000$ [4]. Для повного зв'язування металу в комплекс необхідний чотирикратний надлишок СФАЗ, що враховували у подальших дослідженнях.

До забарвленого комплексу $\text{Hg}(\text{II})\text{-СФАЗ}$ додавали препарат в діапазоні концентрацій $(0.1 \dots 6.0) \cdot 10^{-3}$ моль/дм³. При цьому спостерігалось послаблення первинного забарвлення розчину внаслідок утворення безбарвних комплексів Hg (II) з досліджуваними препаратами.

Як критерій оцінки відносної стійкості цього комплексу використовували концентрацію ліганду, необхідну для знебарвлювання первинного забарвлення розчину індикаторного комплексу наполовину, тобто для створення у системі відповідної концентрації не зв'язаних у комплекс йонів металу ($[\text{Hg}^{2+}]_{\text{вільн.}} = n \cdot 10^{-m}$ моль/дм³). Останню величину знаходили, вивчаючи рівновагу в системі порівняння: $\text{Hg}(\text{II}) - \text{СФАЗ} - \text{CH}_3\text{COO}^-$.

На основі одержаних даних будували графік залежності оптичної густини від концентрацій препаратів (рис. 1).

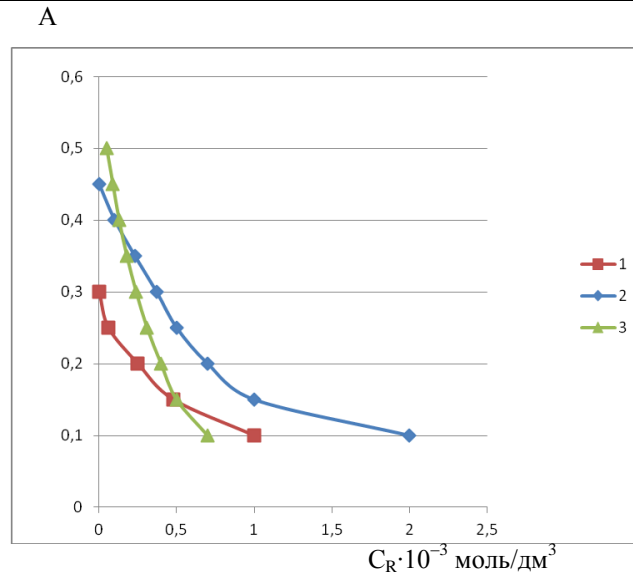
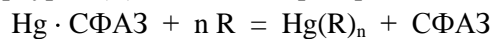


Рис. 1. Залежності оптичної густини комплексу Hg(II) зі СФАЗ від $C_{\text{стрептоциду}}$ (1), $C_{\text{стрептомицину}}$ (2), $C_{\text{анальгін}} (3)$ ($C_{\text{Hg}} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³, $C_{\text{СФАЗ}} = 2 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³, $0,01 \text{ M HNO}_3$, $\lambda_{\text{опт}} = 640 \text{ нм}$, $l = 0,5 \text{ см}$, контрольна проба – H_2O).

Потім графічною інтерполяцією знаходили концентрацію препарату, яка необхідна для створення в системі рівноважної концентрації йонів ртуті, не зв'язаних у комплекс.

Кількісні характеристики складу та стійкості комплексу ртуті (II) з анальгіном, стрептоцидом та стрептомицином отримували наступним чином.

Процес взаємодії комплексу ртуті (II) та СФАЗ з препаратами описується рівнянням:



Константа рівноваги цієї реакції: $K_p = [\text{Hg}(\text{R})_n] \cdot [\text{СФАЗ}] / [\text{Hg}(\text{СФАЗ})] \cdot [\text{R}]^n$

Після логарифмування та математичних перетворень має вигляд:

$$\lg [\text{Hg}(\text{R})_n] \cdot [\text{СФАЗ}] / [\text{Hg}(\text{СФАЗ})] - n \lg [\text{R}] + \text{const} = 0,$$

де n – кількість координуваних молекул ліганду.

Вказані величини знаходили за наступною схемою. Концентрацію $[\text{Hg}(\text{СФАЗ})]$ встановлювали фотометрично за градувальним графіком, що дає можливість розрахувати концентрації комплексів ртуті з досліджуваними лігандами у вигляді різниці $[\text{Hg}(\text{R})_n] = C_{\text{Hg}} - [\text{Hg}(\text{СФАЗ})]$ та рівноважною концентрацією індикатора: $[\text{СФАЗ}] = C_{\text{СФАЗ}} - [\text{Hg}(\text{СФАЗ})]$. Потім будували графік залежності $\lg [\text{Hg}(\text{R})_n] \cdot [\text{СФАЗ}] / [\text{Hg}(\text{СФАЗ})] - f(\lg [\text{R}])$ та за тангенсом кута нахилу знаходили співвідношення компонентів у досліджуваних комплексах (рис. 2).

$$-\lg [\text{Hg}(\text{R})_n] \cdot [\text{СФАЗ}] / [\text{Hg}(\text{СФАЗ})]$$

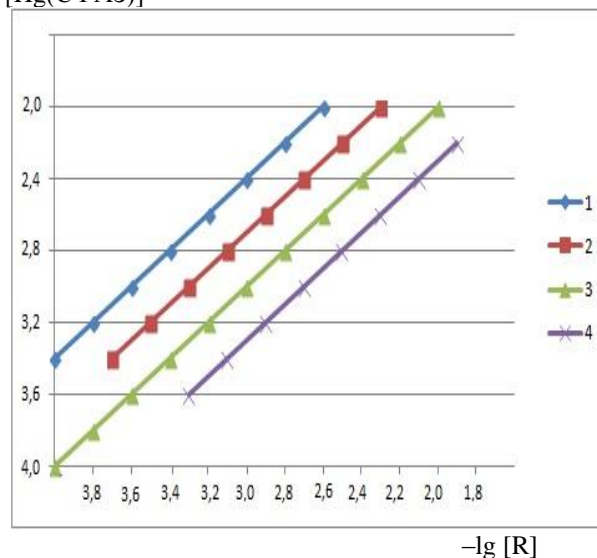


Рис. 2. Встановлення складу комплексів Hg-СФАЗ-R (CH_3COO^-) методом зсуву рівноваги: 1 – Hg-СФАЗ-стрептоцид, 2 – Hg-СФАЗ-стрептомицин, 3 – Hg-СФАЗ-анальгін, 4 – Hg-СФАЗ- CH_3COO^- . ($C_{\text{Hg}} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³, $C_{\text{СФАЗ}} = 2 \cdot 10^{-4}$ моль/дм³, $0,01 \text{ M HNO}_3$, $\lambda_{\text{опт}} = 640 \text{ нм}$, $l = 0,5 \text{ см}$, контрольна проба – H_2O).

Видно, що tg кута нахилу α для всіх прямих практично дорівнює 1, тобто співвідношення компонентів в комплексах $\text{M} : \text{R} = 1 : 1$. Далі були визначені константи рівноваги реакцій утворення комплексів $\text{Hg}(\text{II})$ з препаратами наступним чином.

$$K_p = \beta = [\text{Hg}(\text{R})] / [\text{Hg}^{2+}] \cdot [\text{R}]$$

Для знаходження концентрації вільних йонів ртуті спочатку вивчали зсув рівноваги в системі порівняння. Як конкуруючий ліганд використовували ацетат-йони, оскільки в літературі є надійні дані про константу стійкості комплексу ртуті з ацетат-йонами [5].

Авторами метал-індикаторного методу [2] показано, що концентрація вільних йонів ртуті при однакових значеннях оптичної густини для досліджуваних систем та систем порівняння (в даному випадку в системах Hg -СФАЗ- R та Hg -СФАЗ- CH_3COO^-) буде однакою.

Концентрацію вільних йонів Hg^{2+} знаходили, вивчаючи зсув рівноваги в системі $\text{Hg}(\text{СФАЗ}) - \text{CH}_3\text{COO}^-$ (рис. 2, пряма 4). Видно, що в системі порівняння $\text{tg } \alpha \approx 1$ для прямої 4. Тобто співвідношення компонентів у комплексі $\text{M} : \text{An}^- = 1 : 1$. Отже склад сполуки в даних умовах $\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})^+$. З рівняння константи нестійкості цього комплексу розраховували концентрацію вільних йонів $\text{Hg}(\text{II})$:

$$[\text{Hg}^{2+}]_{\text{вільн}} = K_n \cdot [\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO}^-)] / [\text{CH}_3\text{COO}^-],$$

$$[\text{Hg}^{2+}]_{\text{вільн}} = 2,8 \cdot 10^{-6} \cdot [\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})] / [\text{CH}_3\text{COO}^-],$$

де $[\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})] = C_{\text{Hg}} - [\text{Hg}(\text{СФАЗ})]$. Концентрацію йонів $[\text{CH}_3\text{COO}^-]$ розраховували за формулою: $[\text{CH}_3\text{COO}^-] = K_a \cdot [\text{CH}_3\text{COOH}]_p / [\text{H}^+] \cdot (C_{\text{CH}_3\text{COO}} - [\text{Hg}(\text{CH}_3\text{COO})])$, де K_a – константа дисоціації CH_3COOH . На підставі отриманих даних будували графік залежності $A = f([\text{Hg}^{2+}])$ (рис. 3) та графічною інтерполяцією визначали концентрацію вільних йонів $\text{Hg}(\text{II})$ для системи Hg -СФАЗ- R .

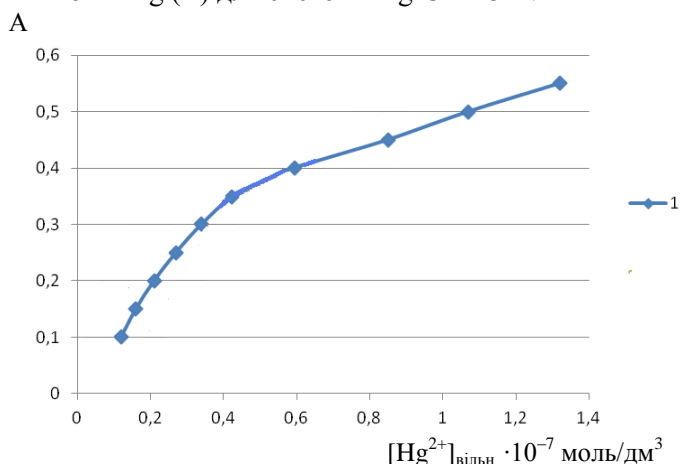


Рис. 3. Залежності $A = f([\text{Hg}^{2+}]_{\text{вільн}})$ ($C_{\text{Hg}} = 5 \cdot 10^{-5} \text{ моль/дм}^3$, $C_{\text{СФАЗ}} = 2 \cdot 10^{-4} \text{ моль/дм}^3$, $0,01 \text{ M HNO}_3$, $\lambda_{\text{онт}} = 640 \text{ нм}$, $l = 0,5 \text{ см}$, контрольна проба – H_2O).

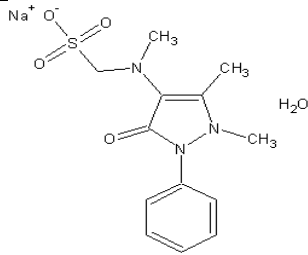
Рівноважні концентрації препаратів визначали у вигляді різниці: $[\text{R}]_{\text{рівн}} = C_{\text{R}} - [\text{Hg}(\text{R})_n]$ та аналогічно $[\text{Hg}(\text{R})_n] = C_{\text{Hg}} - [\text{Hg}(\text{СФАЗ})]$. Концентрацію $[\text{Hg}(\text{СФАЗ})]$ знаходили фотометрично. Результати обробляли методом математичної статистики. Результати представлені в табл. 1.

Таблиця 1

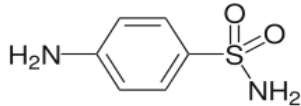
Результати встановлення стійкості комплексів $\text{Hg}(\text{II})$ з анальгіном, стрептоцидом і стрептоміцином ($\text{Hg} : \text{R} = 1 : 1$)

Досліджуваний комплекс	Концентрація препарату, що необхідна для створення в системі $[\text{Hg}^{2+}]_{\text{вільн}} = n \cdot 10^{-m}, \text{ M}$	$[\text{Hg}^{2+}]_{\text{вільн}} = n \cdot 10^{-m}, \text{ M}$	Умовна константа рівноваги, K_p
Hg -стрептоміцин	$1,50 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-8}$	$(1,30 \pm 0,2) \cdot 10^5$
Hg -стрептоцид	$1,48 \cdot 10^{-3}$	$4,8 \cdot 10^{-8}$	$(1,31 \pm 0,3) \cdot 10^5$
Hg -анальгін	$1,52 \cdot 10^{-3}$	$4,6 \cdot 10^{-8}$	$(1,33 \pm 0,1) \cdot 10^5$

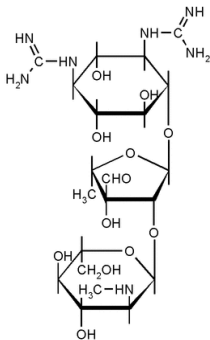
Таким чином, ртуті утворює з досліджуваними препаратами комплексні сполуки практично однакової стійкості.



Структурна формула анальгіну



Структурна формула стрептоциду



Структурна формула стрептоміцину

Оскільки стрептоцид і стрептоміцин є ефективними антибіотиками, можна було очікувати, що їх комплекси з ртуттю повинні мати більш високу бактерицидну активність щодо патогенних мікроорганізмів, ніж вихідні препарати. З цією метою комплексні сполуки ртуттю з досліджуваними антибіотиками були виділені та апробовані для визначення їх бактерицидної активності відносно штамів *Enterococcus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

Дію сполук на культури *Enterococcus*, *M. luteus*, *S. aureus*, *E. coli* вивчали визначенням зони затримки росту мікроорганізмів дифузійним методом з використанням металевих циліндрів. Висів проводили на м'ясо-пептонному агарі та глюкозо-картопляному агарі.

Для визначення діаметрів зон затримки росту мікроорганізмів використовували препарати з певною концентрацією діючої речовини. На поверхні поживного середовища в чашках Петрі розставляли металічні циліндри (з зовнішнім діаметром 8 мм, внутрішнім діаметром 6 мм і висотою 10 мм) з алюмінію або нержавіючої сталі. В кожен циліндр вносили по 0.2 мл препарату. Через дві доби вирощування в термостаті при 30°C вимірювали діаметри зон затримки росту бактерій за допомогою лінійки. Через 3 - 5 діб вирощування в термостаті при 26 - 28°C вимірювали діаметри зон затримки росту грибів.

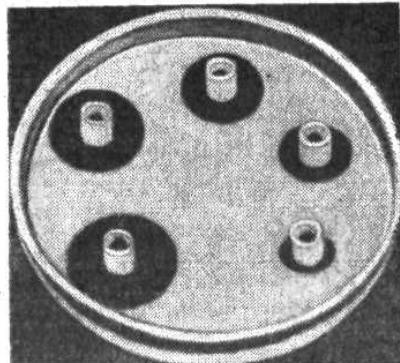


Рис.4. Визначення біологічної активності антибіотиків дифузійним методом з використанням металевих циліндрів

Бактеріальна активність стрептоциду, стрептоміцину та їх комплексів з ртуттю

Речовина	Досліджувані культури мікроорганізмів			
	<i>Enterococcus</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
	Середнє значення радіусів зон затримки росту, см			
Контроль ("Стрептоцид-Дарниця")	1.6 ± 0.2	2.7 ± 0.2	1.8 ± 0.3	1.9 ± 0.3
Контроль ("Стрептоміцин-Артеріум")	1.4 ± 0.4	1.6 ± 0.4	2.6 ± 0.5	2.0 ± 0.4
Hg-стрептоцид	0.65 ± 0.05	1.9 ± 0.2	3.5 ± 0.2	1.6 ± 0.3
Hg-стрептоміцин	1.46 ± 0.16	1.15 ± 0.05	1.15 ± 0.05	1.45 ± 0.05

З наведених даних видно, що комплексна сполука ртуттю зі стрептоцидом має вищу бактерицидну активність до *S. aureus*, ніж стрептоцид. Тобто може бути апробована не тільки як новий онкологічний препарат, але і як новий бактерицидний засіб.

Досліджені комплексні сполуки ртуттю (II) с анальгіном, стрептоцидом та стрептоміцином були виділені та внесені до йогуртів з метою дослідження органолептичних та фізико-хімічних показників останніх. Встановлено, що внесення 1 г двічі перекристалізованих зі спирту комплексних препаратів практично не впливає на органолептичні показники досліджуваних харчових продуктів.

Висновки

Метал-індикаторним методом вивчено комплексоутворення ртуттю (II) з анальгіном, стрептоцидом та стрептоміцином. Встановлено, що співвідношення компонентів у комплексах 1 : 1. Обчислені умовні константи рівноваги реакцій комплексоутворення. Досліджена бактерицидна активність комплексів ртуттю (II) зі стрептоцидом і стрептоміцином. Встановлено, що комплексна сполука ртуттю зі стрептоцидом має вищу бактерицидну активність відносно *Staphylococcus aureus*, ніж стрептоцид. Комплексна сполука ртуттю з анальгіном може бути запропонована як знеболіючий хімеотерапевтичний препарат. Виділені комплексні сполуки були апробовані як добавки до харчових продуктів лікувально-профілактичної дії для онкологічних хворих.

РЕЗЮМЕ

Метал-індикаторним методом досліджено комплексоутворення йонів Hg (II) з анальгіном (R_1), стрептоцидом (R_2) і стрептоміцином (R_3) з метою створення нових металокомплексних бактерицидних лікарських форм і розробки нових знеболіючих хімеотерапевтичних препаратів і добавок для харчових продуктів лікувально-профілактичної дії для онкологічних хворих. Встановлено, що співвідношення компонентів у комплексах Hg : R ($C_2O_4^{2-}$) = 1 : 1. Розраховані умовні константи рівноваги реакцій комплексоутворення ($K_{Hg(R_1)} = 1.33 \cdot 10^5$, $K_{Hg(R_2)} = 1.31 \cdot 10^5$, $K_{Hg(R_3)} = 1.30 \cdot 10^5$). Досліджені бактерицидна та фунгіцидна активності стрептоциду, стрептоміцину та їх металокомплексів відносно патогенних мікроорганізмів *Enterococcus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

РЕЗЮМЕ

Металл-індикаторним методом изучено комплексообразование ионов Hg (II) с анальгином (R_1), стрептоцидом (R_2) и стрептомицином (R_3) с целью создания новых металлокомплексных бактерицидных лекарственных форм и разработки новых обезболивающих химиотерапевтических препаратов и добавок для пищевых продуктов лечебно-профилактического действия для онкологических больных. Установлено, что соотношение компонентов в комплексах Hg : R ($C_2O_4^{2-}$) = 1 : 1. Рассчитаны условные константы равновесия реакций комплексообразования ($K_{Hg(R_1)} = 1.33 \cdot 10^5$, $K_{Hg(R_2)} = 1.31 \cdot 10^5$, $K_{Hg(R_3)} = 1.30 \cdot 10^5$). Изучены бактерицидная и фунгицидная активности стрептоцида, стрептомицина и их металлокомплексов по отношению к патогенным микроорганизмам *Enterococcus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*.

SUMMARY

The complexformation of Hg (II) ions with analginum (R_1), streptocide (R_2) and streptomycin (R_3) was studied by means of Metal-indicator method for the purpose of creation new Metal-complex bacterias medicinal forms and development of the new taking away pain chemistrytherapy preparation and additives for food-stuffs medical-preventive action for oncology sick. The correlation component in complex Hg : R ($C_2O_4^{2-}$) = 1 : 1 is

installed. Conditional constants of the balance reaction complexformation was calculated ($K_{Hg(R1)} = 1,33 \cdot 10^5$, $K_{Hg(R2)} = 1,31 \cdot 10^5$, $K_{Hg(R3)} = 1,30 \cdot 10^5$). The bacterial and fungitsidus activity of streptocide, streptomycine and their metalocomplexes to pathogenic microorganism *Enterococcus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* was studied.

ЛІТЕРАТУРА

1. Хелатные комплексы ртути с цистеином и метионином, способ их получения и лекарственный препарат «Меркурид» - модулятор апоптоза, обладающий противоопухолевым, противовирусным, противопаразитарным и иммуномодулирующим действием [Текст] : пат. 2456001 Рос. Федерация: МПК Рос. Федерация: А61К 33/28, А61К 31/198, С01G 13/00, А61Р 35/00, А61Р 31/12, А61Р 37/02, А61Р 33/00 (2006.01) / Гусев С.Н., Гусев Р.С., Грамма А.И.; заявители и патентообладатели Гусев С.Н., Гусев Р.С., Грамма А.И. – № 2010107176/15; заявл. 26.02.10; опубл. 20.07.12, Бюл. № 25. – 3 с.
2. Бабко А. К. Металл - индикаторный метод изучения комплексов в растворе / А. К. Бабко, М. Й. Штокало. – К.: Наукова думка, 1969. – С. 100.
3. Гладышев В. П. Аналитическая химия ртути / В. П. Гладышев. – М.: Наука, 1974. – С. 224.
4. Пат. № 49538 А. Україна. МПК 7 С01G13/00. Спосіб визначення мікро кількостей меркурію (II) / Костенко Є. Є. ; заявник і власник патенту Національний університет харчових технологій. - № 2001128967; заявлено 25.12.01; Опубл. 16.09.2002, Бюл. № 9. – 4 с.
5. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии / Ю. Ю. Лурье. – М.: Химия, 1979. – С. 475.

Поступило до редакції 01.05.2015 р.

С. В. Качан
Київський національний педагогічний університет
імені М. П. Драгоманова

УДК 541.1 117:541.124.7

ВИЗНАЧЕННЯ КОНСТАНТ ДИСОЦІАЦІЇ АМІНІВ У ВОДНИХ І ВОДНО-ОРГАНІЧНИХ СЕРЕДОВИЩАХ

Застосування неводних розчинників для аналізу розширює коло сполук, які визначаються методами прямого титрування. Для оцінки можливостей і умов кислотно-основного титрування у неводних середовищах однією із характеристик слугують константи протонування (в загальному випадку – константи дисоціації), поряд з потенціалами нейтралізації і константами титрування.

У реальних умовах розчинники, як правило, містять домішки води і інших співрозчинників, які викривлюють їхні кислотно-основні властивості. Це викликає необхідність дослідження фізико-хімічних властивостей змішаних розчинників.

Аміни володіють яскраво вираженими токсичними властивостями, у природі здатні до проявів взаємодії з речовинами кислотного характеру. Поширеність, різноманітність хімічного складу у різних об'єктах навколишнього середовища, поряд із токсичністю їх самих, похідних і супутніх їм речовин, а також активні прояви взаємодії потребують детального вивчення кислотно-основних властивостей нітрогеновмісних органічних основ, причому в широкому інтервалі температур, а також при варіюванні вмісту органічних розчинників, які впливатимуть на силові показники амінів.

З літератури відомо, що константи і термодинамічні характеристики процесу дисоціації органічних кислот, кількісні розрахунки ступеня перебігу цих процесів, константи для органічних основ, у тому числі, нітрогеновмісних (В), одержані методом потенціометричного титрування у неводних і водно-органічних сумішах [1], відносяться до найбільш точних і широко вживаних. Це послужило основою вибору методу дослідження, переваги якого проаналізовані в [2,3].

Для створення нових, специфічних методів визначення амінів необхідно оперувати значеннями їхніх констант дисоціації у водних і водно-органічних розчинниках.

Задачею цього експериментального дослідження є визначення констант дисоціації (pK_{BH}^+) деяких основ у воді (I), у органічних розчинниках – етанолі, ЕТ (II), ацетоні, АЦ (III), ацетонітрилі, АН (IV), N,N-диметилформаміді, ДМФА (V), 1,4 – діоксані, ДО (VI), а також у відповідних водно-органічних сумішах з різним умістом органічного компонента – 25, 50 і 75 об.% методом потенціометричного титрування. Для роботи вибрані наступні моноаміни і аміноспирти: анілін (1), гексаметилентетрамін, ГМТА (2), піридин (3), триетаноламін, ТЕЛА (4), морфолін (5), діетаноламін, ДЕЛА (6), бензиламін, БА (7), моноетаноламін, МЕЛА (8), октиламін, ОА (9), піперидин (10). Указані основи наведені у відповідності зі зростанням їхньої сили у воді [4]. Використовувані реактиви попередньо підготовлені і очищені, їхні фізико-хімічні