

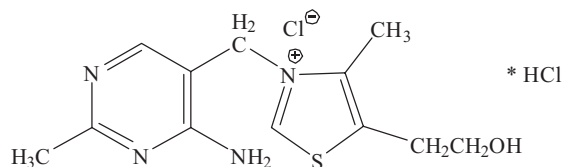
ФІЗИКО-ХІМІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ РЕАКЦІЇ ВЗАЄМОДІЇ ОРГАНІЧНОГО КАТІОНА ТІАМІНУ З 12-МОЛІБДЕНФОСФАТНОЮ ГЕТЕРОПОЛІКИСЛОТОЮ ТА РОЗРОБКА ІОНСЕЛЕКТИВНОГО ЕЛЕКТРОДА ОБОРОТНОГО ДО КАТІОНА ТІАМІНУ

ДВНЗ “Український державний хіміко–технологічний університет”, м. Дніпропетровськ

Вивчено взаємодію органічного катіона тіаміну (Тіа) з гетерополіаніоном $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$. Утворений малорозчинний асоціат був використаний як електродноактивна речовина в пластифікованій мембрані іонселективного електрода (ІСЕ) оборотного до органічного катіона тіаміну. Розроблено методику прямого потенціометричного визначення тіаміну гідрохлориду у водних розчинах субстанції, яка відрізняється достатньою чутливістю (до 10^{-5} моль/л), експресністю, селективністю та точністю.

Тіамін – гетероциклічна сполука, яка відноситься до групи водорозчинних вітамінів (вітамін В1). Є похідною піримідину, в молекулі якої піримідиновий цикл сполучений з похідною іншої гетероциклічної сполуки – тіазолом метиленовим містком.

Структурна формула тіаміну хлориду [1,2]:



Тіамін стійкий в кислому середовищі до процесу нагрівання та до дії окисників, таких як перекис водню, перманганат калію, озон. В сильно кислому середовищі при 150°C під тиском відбувається розщеплення аміногрупи. Хімічні властивості тіаміну визначаються головним чином ядром тіазолу, який під впливом лугів розщеплюється і переходить у відкриту тіольну форму [3]. Тіольна форма зберігає фізіологічну активність вітаміну В₁[2,4]. Концентровані кислоти розщеплюють молекулу тіаміну з виділенням аміаку. В присутності натрій сульфїту молекула тіаміну розщеплюється на такі складові частини як піримідиновий та тіазоловий компоненти [3].

В промисловості тіамін використовується у вигляді гідрохлориду, гідробромїду, фосфотіаміну чи кокарбоксілази – як нутрієнт в харчовій, фармацевтичній, медичній, косметичній галузях, виконуючи функцію доповнення харчового ра-

ціону чи ліків. Тому важливою аналітичною задачею є експресне визначення вмісту тіаміну у промисловій продукції.

Серед методів вмісту тіаміну є: мікробіологічний [5,6], хроматографічний [7–9], спектрофотометричний [10,11], кінетичний [12], флуориметричний [13–19], хемілюмінесцентний [20–23], потенціометричний [24–26], вольтамперометричний [27–30] та капілярного електрофорузу [31].

Спектрофотометричні методи визначення тіаміну базуються на аналізі як у видимій ділянці спектра так і в ультрафіолетовій. Деякі спектрофотометричні методи базуються на попередньому окисненні вітаміну В1 до тіохрому. Флуориметричні методи є більш чутливими і селективними ніж спектрофотометричні. Тіамін не дає флуоресценцію, тому його переводять в тіохром, який дає синю флуоресценцію, за допомогою окисників чи ультрафіолетового опромінення (фотодеградації) [10]. Метод ультрафіолетового опромінення має свої переваги – відсутність домішок від реактивів. Окиснення тіаміну завжди супроводжується утворенням дисульфїду тіаміну [18]; з перекисом водню при $\text{pH}=8,5$ дає 95% вихід тіохрому, який дає флуоресценцію при 440 нм зі збудженням при 375 нм [32].

Потенціометричне титрування [24,25] тіаміну є більш тривалим ніж пряме потенціометричне визначення. Значним недоліком при прямій потенціометрії тіаміну є використання токсичних речовин – ацетону та 1,2-дихлоретану [26] при виготовленні ІСЕ та використання високовартісних речовин – тетрафенїлборатів, як протиіонів на органічний катіон тіаміну в

електродноактивній речовині (ЕАР) [25].

Недоліком амперометричного визначення тіаміну є також використання токсичних речовин – 1,2-дихлоретану, нітробензолу, сполук ртуті [27,28,30] та коштовних аналітичних реагентів – субстанцій гуаніну та аденіну [29].

Недоліком методу капілярного електрофору [31] є надзвичайно висока напруга 30 кВ в системі, що аналізується, та використання токсичного метанолу.

Суттєвими недоліками мікробіологічних [5,6], хроматографічних [7–9] та кінетичних [12] методів визначення тіаміну є тривала пробопідготовка, використання токсичних реактивів, наявність певних кваліфікаційних навичок персоналу та коштовного обладнання.

Для аналітичного моніторингу тіаміну перспективними є електрохімічні методи аналізу [24–30], зокрема пряма потенціометрія з використанням ІСЕ та амперометричне титрування. Ці методи поєднують чутливість визначення з експресністю та невисокою вартістю обладнання. Як аналітичні реагенти на тіамін можуть бути використані гетерополіаніони (ГПА) структури Кегіна, зокрема 12-молібдофосфатна гетерополікислота (МФК). Дослідження реакцій взаємодії МФК з органічним катіоном тіаміну методом амперометричного титрування дає змогу використовувати дану реакцію, як аналітичну з індикацією точки еквівалентності за струмом електровідновлення ГПА [33]. Окрім того, одержана малорозчинна речовина з іонно-асоціативним характером зв'язку між ГПА та органічним катіоном тіаміну може бути використана як ЕАР при розробці ІСЕ [33].

Експериментальна частина

Реєстрацію оптичної густини виконували на спектрофотометрі СФ-46 в кварцевих кюветках з товщиною світло-поглинаючого шару 1 см. Для роботи використовували реактиви марки «ч.д.а.», тіамін – «фармацевтичний».

Пластифіковані полівінілхлоридні мембрани для ІСЕ синтезували за відомою методикою [34]. В якості ЕАР було використано асоціат тіаміну з МФК – $(\text{Tia})_3(\text{PMo}_{12}\text{O}_{40})_2$. Для одержання мембрани ІСЕ беруть 0,4500 г полівінілхлориду, 1,1 мл дибутилфталату (ДБФ) або діоктилфталату (ДОФ) і розчиняють в 4,5 мл циклогексанону при температурі 60–70°C та безперервному перемішуванні. В одержаний гомогенний розчин вносять наважку 0,0100 г ЕАР. Після повного розчинення компонентів суміші її переносять в чашку Петрі (діаметр 80 мм) і витримують у витяжній шафі до повного випаровування розчинника – циклогексанону. Одержують гомогенну еластичну плівку з вмістом ЕАР 0,62%.

Перед використанням ІСЕ вимочували в розчині тіаміну з концентрацією, яка відповідає

середині діапазону вмісту речовини, що визначається. Для реєстрації електродних характеристик використовували електрохімічну комірку:



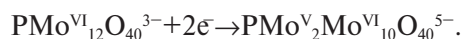
Результати та їх обговорення

Вивчення реакції взаємодії тіаміну з МФК

Тіамін в кислих розчинах протонується до двозарядної частки, а в нейтральному середовищі органічний катіон тіаміну є однозарядним. Таким чином, можна передбачити, що можливе утворення асоціату зі співвідношенням тіамін: МФК – 3:1 та 3:2 [37].

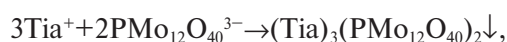
Співвідношення реагуючих речовин вивчали методом амперометричного титрування, в основі якого є реакція взаємодії між органічним катіоном тіаміну та гетерополіаніоном 12-молібденофосфатної кислоти з утворенням малорозчинної сполуки.

При катодній поляризації в інтервалі від +0,5 В до –0,5 В тіамін не є електроактивним, але гетерополіаніон 12-молібденофосфатної гетерополікислоти (ГПК) на фоні 0,1 М розчину сульфату натрію дає чітку хвилю електровідновлення двох атомів молібдену [33]:

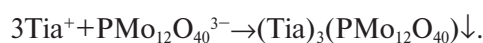


Величина сили дифузійного струму даного електродного процесу залежить лінійно від концентрації деполіаризатора до $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Виходячи з того, що між речовиною, яка визначається і титрантом протікає реакція з утворенням малорозчинної сполуки, а титрант є електроактивною речовиною, можливе амперометричне титрування тіаміну водним розчином МФК з індикацією точки еквівалентності за силою дифузійного струму електровідновлення гетерополіаніона.

Реакція взаємодії між двома гетерополіаніонами $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ і трьома молекулами тіаміну протікає стехіометрично в водному середовищі при рН=2,0–5,5 за реакцією



а у нейтральному та слабколужному середовищі реакція взаємодії протікає між трьома молекулами органічного катіона тіаміну та гетерополіаніоном 12-молібденофосфатної кислоти:



Таким чином, за результатами амперометричного титрування встановлено, що співвідношення реагуючих речовин складає $\text{Tia}:\text{МФК}=3:2$, рис. 1 та $3:1$ рис. 2.

Електронейтральність одержаної сполуки може свідчити про утворення іонного асоціату, що було підтверджено спектрофотометричним дослідженням реакції взаємодії між органічним катіоном тіаміну та гетерополіаніоном 12-молібденофосфатної кислоти в УФ-області спектра, рис. 3.

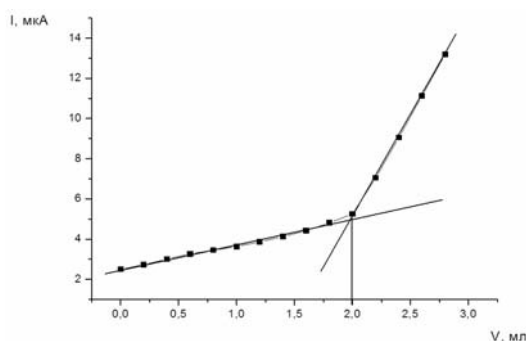


Рис. 1. Крива амперометричного титрування тіаміну розчином МФК при рН=4: $C_{\text{МФК}}=1 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{\text{Тіа}}=1 \cdot 10^{-3}$ М; $V_{\text{Тіа}}=3,0$ мл

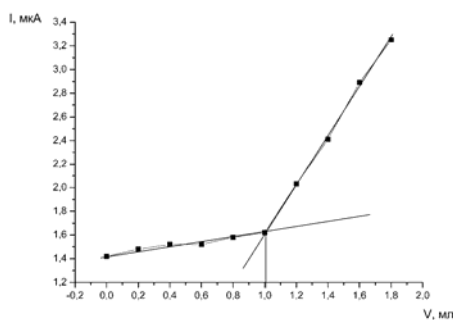


Рис. 2. Крива амперометричного титрування тіаміну розчином МФК при рН=7: $C_{\text{МФК}}=1 \cdot 10^{-3}$ М; $C_{\text{Тіа}}=1 \cdot 10^{-3}$ М; $V_{\text{Тіа}}=3,0$ мл

Як видно з рис. 2 при рН=4 спостерігається максимум поглинання в області 247 нм і плече 253–270 нм обумовлені протонізацією атома азоту піримідинового циклу тіаміну [36,37]. МФК має інтенсивний пік при 215 нм, плече 222–232 нм та малий пік при 320 нм [33]. Утворена сполука має відповідні піки, що також свідчить про наявність асоціативного характеру.

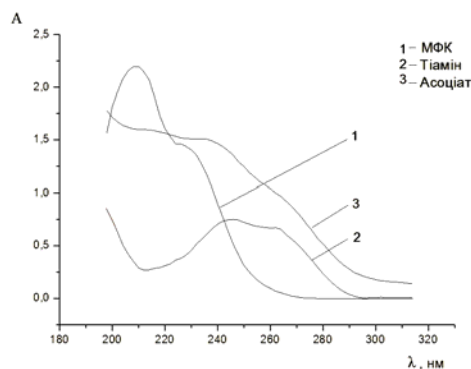


Рис. 3. УФ-спектр поглинання тіаміну гідрохлориду, МФК та їх асоціату: $l=1,0$ см, кварцеві кювети, розчин порівняння – дистильована вода, $C_{12\text{-МФК}}=2,5 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{Тіа}}=1 \cdot 10^{-5}$ М, $C_{\text{асоціат}}=8 \cdot 10^{-6}$ М, рН=4

Електродна функція ICE на тіамін

Встановлено, що залежність електродної сили від логарифму концентрації тіаміну для мембран в інтервалі концентрацій $1 \cdot 10^{-1}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л лінійна і виражається рівнянням

$$E=a+b \cdot \lg c.$$

Нахил градувального графіка близький до теоретичного для двозарядного катіона ($S=29$ мВ/рС).

Вивчено вплив величини рН на нахил електродної функції (параметр b) та інтервал лінійності визначуваних концентрацій. Результати наведені в табл. 1.

З табл. 1 видно, що кращі показники має ICE з використанням, в якості пластифікатора, ДБФ. Варіювання вмісту ЕАР майже ніяк не відображається на електродних характеристиках при масі ЕАР 0,0150 г – гомогенність мембрани порушується, тобто стає помітно включення ЕАР.

Час відгуку ICE на тіамін складає 30–60 с при 10^{-5} моль/л і зменшується до 10–30 с при концентраціях 10^{-4} – 10^{-2} моль/л. Дрейф потенціалу ICE – приблизно 2–7 мВ/добу. Час життя

Таблиця 1

Залежність електродних характеристик ICE від рН розчину при $t=10^{\circ}\text{C}$

Пластифікатор	Електродні характеристики	рН					
		1	2	3	4	5	6
ДБФ	S, мВ/рС	26±2	27±2	28±2	28±2	26±2	24±3
	Інтервал лінійності, моль/л	$1 \cdot 10^{-2}$ – $5 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-2}$ – $5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-2}$ – $1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-2}$ – $1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-2}$ – $1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-2}$ – $2 \cdot 10^{-5}$
ДОФ	S, мВ/рС	24±3	26±2	26±2	27±3	26±3	24±3
	Інтервал лінійності, моль/л	$1 \cdot 10^{-2}$ – $7 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-2}$ – $8 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-2}$ – $2 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-2}$ – $1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-2}$ – $1 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-2}$ – $5 \cdot 10^{-5}$

ІСЕ складає 60–90 дБ при умові його зберігання на повітрі, а за годину до вимірювання вимочувати в розчині з концентрацією, яка відповідає середині діапазону вмісту тіаміну.

Методика визначення тіаміну у субстанції

Наважку тіаміну гідрохлориду масою 0,3373 г кількісно переносять в мірну колбу на 1000 мл, доводять до мітки водою, що відповідає 10^{-3} моль/л тіаміну гідрохлориду, аліквотну частину приготованого розчину 1,0 мл вносять у мірну колбу на 100,0 мл, доводять до мітки водою. Аліквотну частину приготованого розчину 10,0 мл вносять комірку і вимірюють потенціал ІСЕ. Концентрацію тіаміну знаходять за градувальним графіком (рис. 4).

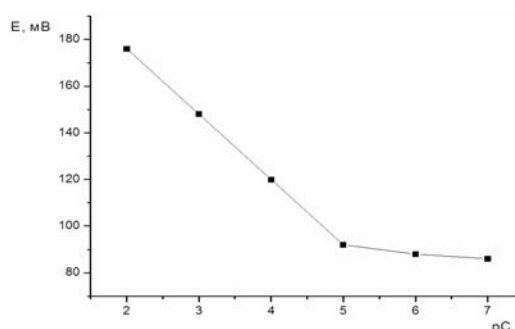


Рис. 4. Залежність потенціалу ІСЕ від концентрації тіаміну: $m_{EAP}=0,0100$ г, пластифікатор – ДБФ, рН=4

Для проби, яка вміщує 33,73 мкг тіаміну знайдено $33,98 \pm 0,36$ мкг ($P=0,95$; $n=7$). До переваг запропонованої методики прямого потенціометричного визначення тіаміну слід віднести високу чутливість (10^{-5} моль/л) та експресність.

В табл. 2 наведені метрологічні характеристики аналізу тіаміну методом прямої потенціометрії.

Таблиця 2

Визначення тіаміну в розчині методом прямої потенціометрії (n=7, P=0,95)

Введено тіаміну, m_0 , мкг	Знайдено тіаміну, m , мкг	Середня маса тіаміну, M , мкг	Метрологічні характеристики
33,73	34,03	33,98	Sr=0,01 ($x \pm \delta$)=34,84±0,36
	33,91		
	33,80		
	33,64		
	34,03		
	33,55		
	33,91		

Висновки

Вивчено взаємодію органічного катіона тіаміну з ГПА($PMo_{12}O_{40}$)³⁻. Малорозчинний асоціат було використано в якості ЕАР в пластифікованій мембрані ІСЕ оборотного до катіона тіа-

міну, досліджено його електродні характеристики. Пропонується методика прямого потенціометричного визначення тіаміну у субстанції, яка відрізняється високою чутливістю (10^{-5} моль/л), простотою визначення активної речовини та дозволяє швидко здійснювати контроль кількісного вмісту тіаміну у субстанції.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Березовский В.М. Химия витаминов. – М.: Пищевая промышленность, 1973. – 626 с.
2. Державна фармакопея України // Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – Харків: ПІРЕГ. – 2001. – 556 с.
3. Шнайман, Л.О. Виробництво вітамінів. – М: Изд. Харчова промисловість, 1973. – 443 с.
4. Коротченкова Н.В., Самаренко В.Я. Витамины гетероциклического ряда. Строение, свойства, синтез, химическая технология: Методические указания. – СПб.: Изд. СПХФА, 2006. – 58 с.
5. Macias R.F.M. Improved medium for assay of thiamine with lactobacillus fermenti // Applied Microbiology. – 1957. – Vol.5. – P.249-252.
6. Diebel R.H., Evans J.B. and Niven C.F.Jr. Microbiological assay for thiamin using lactobacillus viridescens // J. Bacteriology. – 1957. – Vol.74. – P.818-821.
7. Hart J.P., Norman M.D., Tsang S. Voltammetric behavior of vitamin B1 (thiamine) at a glassy carbon electrode and its determination in multivitamin tablets using anion exchange liquid chromatography with amperometric detection under basic conditions // Analyst. – 1995. – Vol.120. – № 4. – P.1059-1064.
8. Determination of water-soluble vitamins in infant milk by high-performance liquid chromatography / S. Albalahurtado, M.T. Veciananognes, M. Izquierdopulido, M. Marinefont // J. Chromatography A. – 1997. – Vol.778. – P.247-253.
9. Jakobsen J. Optimisation of the determination of thiamin, 2-(1-hydroxyethyl) thiamin, and riboflavin in food samples by use of HPLC // Food Chemistry. – 2008. – Vol.106. – P.1209-1217.
10. Danna F., Calatayud J.M. Fia-spectrophotometric determination of thiamine after UV-irradiation // Talanta. – 1994. – Vol.41. – P.2147-2151.
11. Ozdemir D., Dinc E. Determination of thiamine HCl and pyridoxine HCl in pharmaceutical using UV-visible spectrophotometry and generic algorithm based multivariate calibration methods // Chemical and Pharmaceutical Bulletin. – 2004. – Vol.52. – P.810-817.
12. Motolla H.A. Kinetic determinations of reactants utilizing uncatalyzed reactions // Analytica Chimica Acta. – 1993. – Vol.279-293.
13. Flow injection on-line photochemical reaction coupled to spectrofluorimetry for the determination of thiamine in pharmaceuticals and serum / H.N. Chen, J.P. Zhu, X.X. Cao, Q.J. Fang // Analyst. – 1998. – Vol.123. – P.1017-1021.
14. Fluorometric determination of periodate with thiamine and its application to the determination of ethylene glycol and

- glycerol / Jie N.Q., Yang D.L., Zhang Q.N., Yang J.H., Song Z.Q. // *Analytica Chimica Acta*. – 1998. – Vol.359. – P.87-92.
15. *Flow injection fluorimetric determination of thiamine and copper based on the formation of thiochrome* / T. Perez Ruiz, C. Martinez Lozano, V. Tomas, I. Ibarra // *Talanta*. – 1992. – Vol.39. – P.907-911.
16. *Jie N.Q., Yang J.H., Zhan Z.G. Fluorimetric determination of thiamine with cobalt(II)* // *Analytical Letters*. – 1993. – Vol.26. – P.2283-2289.
17. *Determination of thiamine (vitamin B1) by in situ sensitized photochemical spectrofluorimetry* / Guo X.Q., Xu J.G., Wu Y.Z., Zhao Y.B., Huang X.Z., Chen G.Z. // *Analytica Chimica Acta*. – 1993. – Vol.276. – P.151-160.
18. *Flow injection determination of thiamine based on thiochrome by mercury(II)* / Martinez Lozano C., Perez Ruiz T., Tomas V., Abellan C. // *Analyst*. – 1990. – Vol.115. – P.217-220.
19. *Ryan M.A., Ingle J.D. Fluorometric reaction rate method for the determination of thiamine.* // *Analytical Chemistry*. – 1980. – Vol.52. – P.2177-2184.
20. *Grekas N., Calokerinos A.C. Determination of thiamine by continuous flow chemiluminescence measurement* // *Talanta*. – 1990. – Vol.37. – P.1043-1048.
21. *Hemiluminescence microfluidic system on a chip to determine vitamin B1 using platinum nanoparticles triggered luminol–AgNO₃ reaction.* / M. Kamruzzaman, A.M. Alam, S.H. Lee, T.D. Dang // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2013. – Vol.185. – P.301-308.
22. *Highly sensitive electrochemical luminescence determination of thiamine.* / C. Zhang, G. Zhou, Z. Zhang, M. Aizawa // *Analytica Chimica Acta*. – 1999. – Vol.394. – P.165-170.
23. *An immediate luminescence enhancement method for determination of vitamin B1 using long-wavelength emitting water-soluble CdTe nanorods* / Li Y., Wang P., Wang X., Cao M., Xia Y.S., Cao C., Liu M.G. Zhu C.Q. // *Microchimica acta*. – 2010. – Vol.169. – P.65-71.
24. *Hassan S.S.M., Elnemma E. Selective determination of thiamine (vitamin B1) in pharmaceutical preparations by direct potentiometric argentometric titration with use of the silver–silver sulphide ion-selective electrode* // *Talanta*. – 1989. – Vol.36. – P.1011-1115.
25. *Campiglio A. Potentiometric microtitration of vitamin B1 with phosphotungstic acid by using a phosphotungstate-sensitive electrode and its application to the analysis of pharmaceutical preparations* // *Analyst*. – 1994. – Vol.119. – P.2209-2212.
26. *Vitamin B1 sensitive poly(vinyl chloride) membrane electrode based on hydrophobic tetraphenylborate derivatives and their application.* / Zhang G. H., Imato T., Asano Y., Sonoda T., Kobayashi H., Ishibashi N. // *Analytical chemistry*. – 1990. – Vol.62. – P.1644-1648.
27. *Vitamin B1 ion-selective microelectrode based on a liquid-liquid interface at the tip of a micropipette.* / Huang B., Yu B., Li P., Jiang M., Bi Y., Wu S. // *Analytica Chimica Acta*. – 1995. – Vol.312. – P.329-335.
28. *Ciszewski A., Wang J. Determination of thiamine by cathodic stripping voltammetry* // *Analyst*. – 1992. – Vol.117. – P.985-988.
29. *Brahman P. K., Dar R. A., Pitre K. S. DNA-functionalized electrochemical biosensor for detection of vitamin B1 using electrochemically treated multiwalled carbon nanotube paste electrode by voltammetric methods* // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2013. – Vol.177. – P.807-812.
30. *Ваць В., Якубовська М., Гырски Л. Application of renewable silver amalgam annular band electrode to voltammetric determination of vitamins C, B1 and B2* // *Talanta*. – 2011. – Vol.84. – P.1032-1037.
31. *Shabangi M., Sutton J. A. Separation of thiamin and its phosphate esters by capillary zone electrophoresis and its application to the analysis of water-soluble vitamins* // *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2005. – Vol.38. – P.66-71.
32. *Li J. Z., Zhang Z. J., Li L. A simplified enzyme-based fiber optic sensor for hydrogen peroxide and oxidase substrates* // *Talanta*. – 1994. – Vol.41. – P.1999-2002.
33. *Ткач В.І. Гетерополіаніони як аналітичні реагенти на азотвміщуючі органічні речовини.* – Дніпропетровськ: ДДУ, 1995. – 196 с.
34. *Никольский Б.П., Матерова Е.А. Ионселективные электроды.* – Л.: Химия, 1980. – 240 с.
35. *Zhang B., Beck H.P. A rapid and sensitive method for the fluorimetric determination of phosphate by flow-injection* // *Analytical letters*. – 2001. – Vol.34. – P.2721-2733.
36. *Beadle B. W., Greenwood D. A., Kraybill H. R. Stability of thiamine to heat: I. Effect of pH and buffer salts in aqueous solutions* // *Journal biological chemistry*. – 1943. – Vol.149. – P.339-347.
37. *Sutton J., Shabangi M. Activation of the electrochemical properties of thiamin and its phosphate esters in acidic solutions* // *J. of electroanalytical chemistry*. – 2004. – Vol.571. – P.283-287.

Надійшла до редакції 25.11.2013