

## Determination of Thiamine as a Complex with 11-Molybdobismuth(III)phosphate in Sequential Injection Lab-at-valve System

A.B. Vishnikin<sup>\*†</sup>, Y.V. Miekh<sup>†</sup>, T.A. Denisenko<sup>†</sup>, V.G. Kozhemiaka<sup>†</sup>, V.Yu. Vishnikina<sup>†</sup>, M.K.E.A. Al-Shwaiyat<sup>‡</sup>, Ya.R. Bazel<sup>§</sup>, V. Andrich<sup>§</sup>

<sup>†</sup>Oles Honchar Dnipro National University, Gagarina Avenue, 72, 49010 Dnipro, Ukraine; \*e-mail: vishnikin@hotmail.com

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

<sup>§</sup>P.J. Šafárik University, Šrobaróva, 2, Košice, 04154, Slovak Republic

Received: December 18, 2017; Accepted: February 05, 2018

DOI: 10.17721/moca.2018.xx-xx

*Metalsubstituted heteropoly complexes were used as analytical reagents for the determination of sulfur-containing substances capable of forming complexes with a metal-substituent. It was shown that the reaction between thiamine and 11-molybdobismuth(III)phosphate heteropoly complex is accompanied by the increase of absorbance in the near visible and ultraviolet regions of the spectrum. The maximum deviation of absorbance from additivity is observed at 390 nm ( $\epsilon^{390}=6.0 \cdot 10^3 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). The developed method is simple, green, highly sensitive and selective. B vitamins, moderate excess of ascorbic acid, a number of other reducing agents, other components of pharmaceutical preparations which have a reducing properties do not interfere with the determination. The procedure for the determination of thiamine was automated using the sequential injection analysis manifold supplemented with an external reactor. This allowed to eliminate the Schlieren effect, improve the accuracy and sensitivity of determination. The calibration graph was linear in the range of thiamine concentrations from  $3 \cdot 10^{-6}$  to  $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , detection limit was  $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  ( $l = 1 \text{ cm}$ ), and the throughput of the method was 15 determinations per hour. The accuracy of the method was assessed by analysis of the vitamin B complexes.*

**Keywords:** heteropoly complex, 11-molybdobismuth(III)phosphate, thiamine, sequential injection analysis, lab-at-valve

## Определение тиамин в виде комплексного соединения с 11-молибдовисмут(III)фосфатом методом последовательного инъекционного анализа с внешним реактором

А.Б. Вишникин<sup>\*†</sup>, Ю.В. Мех<sup>†</sup>, Т.А. Денисенко<sup>†</sup>, В.Г. Кожемяка<sup>†</sup>, В.Ю. Вишникина<sup>†</sup>, М.К.И.А. Аль-Швейят<sup>‡</sup>, Я.Р. Базель<sup>§</sup>, В. Андрих<sup>§</sup>

<sup>†</sup>Днепро́вский национальный университет имени Олеса Гончара, просп. Гагарина, 72, Днепр, Украина, 49010, \*e-mail: vishnikin@hotmail.com;

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

<sup>§</sup>P.J. Šafárik University, Šrobaróva, 2, Košice, 04154, Slovak Republic

Поступила: 18 декабря 2017 г; Принята: 05 февраля 2017 г

DOI: 10.17721/moca.2018.xx-xx

*Впервые для определения серосодержащих веществ, способных к образованию комплексов с металлом-заместителем, в качестве аналитических реагентов использованы металлозамещенные гетерополикомплесы. Показано, что при реакции тиамин с 11-молибдовисмут(III)фосфорным гетерополикомплесом увеличивается интенсивность светопоглощения в ближней видимой и ультрафиолетовой областях спектра. Максимум отклонения от аддитивности находится при 390 нм ( $\epsilon^{390}=6.0 \cdot 10^3 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$ ). Разработанная методика отличается простотой выполнения, высокой чувствительностью, производительностью и отвечает принципам «зеленой аналитической химии». Определению не мешают витамины В группы, небольшой избыток аскорбиновой кислоты и других компонентов фармацевтических препаратов, проявляющие восстановительные свойства. Методика определения тиамин автоматизирована с использованием конфигурации метода последовательного инъекционного анализа, дополненной внешним реактором. Это позволило устранить Schlieren эффект, повысить точность, а также чувствительность определения. Градуировочная зависимость является линейной в интервале концентраций тиамин от  $3 \cdot 10^{-6}$  до  $2 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}$ , предел обнаружения составляет  $1 \cdot 10^{-6} \text{ моль/л}$  ( $l=1 \text{ см}$ ), производительность методики – 15 определений/час. Правильность методики подтверждена анализом витаминных комплексов.*

**Ключевые слова:** гетерополикомплес, 11-молибдовисмут(III)фосфат, тиамин, последовательный инъекционный анализ, внешний реактор

Металлозамещенные тройные гетерополи-комплексы (ГПК) общей формулы  $XZM_{11}O_{40}^{n-}$  (где X – центральный атом (P(V), Si(IV), As(V) и др.), Z – металл-заместитель (Co(II), Mn(II), Fe(III), Ti(IV) и др.), M – Mo, W) можно представить как продукт замещения одного из атомов молибдена или вольфрама в исходном насыщенном ГПК структуры Кеггина на ион металла [1, 2]. К настоящему времени они нашли широкое применение в катализе [3]. В аналитической химии эта разновидность ГПК используются эпизодически. Известно, например, что одной из основных аналитических форм при определении ортофосфата являются восстановленные металлозамещенные ГПК с сурьмой(III) или висмутом(III) в качестве металла-заместителя [4, 5].

Практически сразу вслед за открытием металлозамещенных ГПК было показано, что они способны к дальнейшему комплексообразованию за счет введенных ионов металла [2, 6]. Ион металла в этих комплексах гексакоординирован. Пять координационных мест заняты мостиковыми атомами кислорода гетерополианиона (ГПА). В качестве шестого лиганда в случае двухвалентных металлов обычно выступает молекула воды, для тех ионов металлов, которые имеют валентность четыре или более высокую – оксо-ион. В случае трехвалентных металлов встречаются все три возможных варианта  $XM_{11}ZLO_{39}^{q-}$  (L =  $H_2O$ ,  $-OH$ ,  $=O$ ) [7, 8]. Молекула воды теряется при переводе ГПА в органические неполярные растворители с использованием фазопереносных реагентов, например, тетрагептиламмоний бромида. Полученные таким образом пентакоординированные ионы металлов являются весьма реакционноспособными и способны присоединять большое количество лигандов (спирты, ацетон, пиридин, хлорид,  $SO_2$  и др.) [9].

В [10] было предложено использовать титан(IV) замещенные ГПК, как аналитические реагенты для определения пероксосоединений. Интенсивно окрашенные в желтый цвет комплексные соединения с пероксидом водорода образуются в широком интервале кислотности, в том числе и в щелочной среде. Проведение реакции возможно в органических растворителях, что показано на примере взаимодействия с моноадфталевой кислотой.

Недавно нами был впервые синтезирован металлозамещенный ГПК, содержащий висмут(III) [5, 11]. Образование таких комплексов в растворе было показано в [12]. Поскольку висмут(III) проявляет свойства типичной мягкой кислоты Льюиса, сделано предположение, что молекула воды в этих комплексах способна замещаться на лиганды, содержащие серу (мягкие основания по теории ЖМКО) [13]. В результате поисков найдено несколько веществ, способных к образованию достаточно устойчивых комплексов

с 11-молибдовисмута(III)фосфорным ГПК (11-МВФК), в том числе тиамин и сульфид-ионы.

Реакции замещения лиганда в металлозамещенных ГПК являются высокоселективными. Замыкание циклов и образование хелатных комплексов с ионами металла в таких соединениях невозможно, поскольку для координации доступно только одно место. Это понижает устойчивость таких соединений, но способствует повышению избирательности. Следует заметить, что прямое использование ионов висмута(III) в качестве реагента на серосодержащие вещества весьма осложняется сильной склонностью ионов висмута(III) к гидролизу и недостаточно высокой селективностью таких реакций. Оба этих недостатка удачно преодолеваются при использовании металлозамещенных ГПА. Металлозамещенные ГПА являются хорошо растворимыми и устойчивыми веществами. В широком интервале pH от 2 до 5, где они устойчивы, гидролиза ионов висмута(III) не происходит.

Недостаток витамина  $B_1$  относится к так называемым болезням цивилизации. Основными причинами ее являются, с одной стороны, возрастающее потребление хлебных изделий из пшеничной муки высшего и первого сорта, которые бедны тиамином, а с другой, высокое потребление сахара и кондитерских изделий, что приводит к увеличению потребности в тиамине. Недостаток тиамин ведет к развитию разных патологий в системах пищеварения, нервной и сердечнососудистой. Дневная потребность в витамине  $B_1$  составляет от 1.5 до 2.5 мг в зависимости от энергзатрат.

Общепринятый метод определения тиамин базируется на его окислении до тиохрома гексацианоферратом калия в щелочной среде, с последующим измерением возникающей при этом люминесценции [14, 15]. К существенным недостаткам метода относятся трудоемкость и длительность, а также то, что эксперименты должны проводиться опытным и квалифицированным аналитиком. Следует учитывать то, что тиамин и тиохром подвержены действию света, поэтому все этапы анализа, такие как окисление тиамин, экстракция, центрифугирование должны выполняться в темноте. Данная методика не отвечает принципам «зеленой химии», поскольку в ней используется хлороформ, входящий в список веществ, разрушающих озоновый слой. В другой методике [16] гексацианоферрат заменяют ртутью(II), но этот реагент является высокотоксичным.

Для определения витамина  $B_1$  в смесях с другими витаминами широко используют хроматографические методы, но и в этом случае популярным является постколоночное определение, основанное на измерении

интенсивности люминесценции тиохрома [17]. Методики спектрофотометрического определения тиаминa немногочисленны, особенно характеризующиеся высокой чувствительностью и селективностью. Основным способом детектирования в проточных автоматизированных системах является спектрофотометрический, что требует развития и совершенствования соответствующих методов определения тиаминa.

Последовательный инъекционный анализ (ПосИА, sequential injection analysis, SIA) представляет собой эволюционное развитие идей проточного инъекционного анализа (ПИА, FIA) [18]. Этот метод и его разновидности являются в настоящее время основой современных подходов к автоматизации химических реакций с использованием управления потоками жидкостей. В нём устраняются некоторые из основных недостатков, присущих ПИА, такие как требование физической реконфигурации проточной системы для разных методологий или непрерывное потребление реагентов. По сравнению с ПИА он является более универсальным и многоцелевым методом, подходящим для различных применений.

Первая попытка объединить проточные системы с внешним смесительным реактором предпринята в [19], но только начиная с работы [20] концепция проточных анализаторов (Flow-batch analysis, FBA) стала развиваться систематически [21]. В большинстве систем FBA, описанных в литературе, используются перистальтические насосы и мультикоммутирующая схема, включающая трехходовые электромагнитные клапаны для управления потоками.

Вместо множества каналов, используемых в FBA, только один канал используется в циклическом инъекционном анализе (stepwise injection analysis, SWIA) для доставки образца и реагентов в ВР [22]. Кроме того, для перемешивания вместо магнитной мешалки используется воздушное барботирование. Эти функции делают SWIA более простым и универсальным решением за счет снижения производительности.

Несмотря на то, что системы, в которых внешний реактор входит в состав ПосИА, были отнесены к FBA [21], более логично представить их как отдельный метод. В соответствии с этим предложена концепция «Lab-at-valve» (LAV) [23]. Эта и другие системы с ВР можно рассматривать как экономически эффективную альтернативу системам микроанализа (micro total analysis systems). В системе SI-LAV пробоподготовка образца, химическая реакция и/или детектирование осуществляются в специально сконструированном блоке LAV, присоединённом к одному из портов многопозиционного крана-распределителя.

Системы FBA, SWIA и SI-LAV могут быть легко адаптированы для автоматизации медленных реакций [24], титрования [25], многостадийных

реакций [26]. В них может быть полностью устранено сильное влияние, вызванное Schlieren эффектом при анализе органической матрицы или растворов с высокой концентрацией солей [27].

Целью настоящей работы являлась разработка высокоселективной, чувствительной, автоматизированной методики определения тиаминa в виде комплексного соединения с 11-МВФК с использованием метода последовательного инъекционного анализа с внешним реактором (SI-LAV).

### Экспериментальная часть

Ультрачистую воду получали при помощи системы очистки воды Millipore™ (Bedford, USA). Гуанидиниевую соль 11-МВФК  $(\text{Gua})_6\text{PBi(III)Mo}_{11}\text{O}_{40} \cdot 11\text{H}_2\text{O}$  синтезировали и пере-кристаллизовывали в соответствии с методикой, описанной в [5].  $2 \cdot 10^{-3}$  моль/л раствор 11-МВФК получали путем растворения 230 мг соли в 50 мл воды. Раствор 11-МВФК устойчив в течение месяца при условии отсутствия контакта с веществами, обладающими восстановительными свойствами. Дигидрат монофосфата хлорида тиаминa (>99 % чистоты), ацетат натрия, уксусную кислоту приобретали у Fluka Analytical (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland).

Методику определения тиаминa автоматизировали методом ПосИА с использованием коммерчески доступной системы FIAlab 3500 (FIAlab Instruments, USA) (рис.1), снабженной шприцевым насосом (объем резервуара 5.0 мл) и 8-портовым многоходовым краном Cheminert (Valco Instrument Co., USA). Система была оборудована ПЗС-детектором (CCD) для видимой и ультрафиолетовой области USB4000-UV-VIS (Ocean Optics Inc., USA), оптоволоконными кабелями и вольфрамовой лампой LS-1 в качестве источника излучения (Ocean Optics Inc., USA). Вся система контролировалась программой FIAlab для Windows 5.0. Использовались тефлоновые трубки диаметром 0.75 мм и проточные ячейки SMA-Z фирмы FIAlab с длиной оптического пути 10 и 20 мм.

*Методика спектрофотометрического определения тиаминa.* В колбах на 25 мл смешивают 1 мл  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л раствора 11-МВФК, добавляют 2 мл ацетатного буферного раствора с pH 3.8, 1 мл 1% раствора тритона X-100, аликвоту раствора тиаминa, доводят дистиллированной водой до метки. Измеряют оптическую плотность в стеклянных кюветах с  $l = 5$  см при 390 нм.

*Методика определения тиаминa методом SIA-LAV.* Общая аналитическая процедура состояла из четырех стадий: промывка ВР, подача компонентов реакции в ВР, проведение химической реакции и измерение аналитического сигнала (рис.1). На первой стадии скорость потока устанавливают равной 200 мкл/с; клапан шприцевого насоса переключают в положение

IN; и шприцевой насос заполняют 1500 мкл ультрачистой воды, используемой в качестве носителя (carrier solution). Затем клапан шприцевого насоса переключают в положение OUT, и 450 мкл воды подают в ВР через порт 2 многопозиционного крана-распределителя. При обратном перемещении шприцевого насоса (500 мкл) промывную жидкость сначала направляют обратно в удерживающую спираль (УС), а затем через порт 1 (600 мкл) в ёмкость для слива.

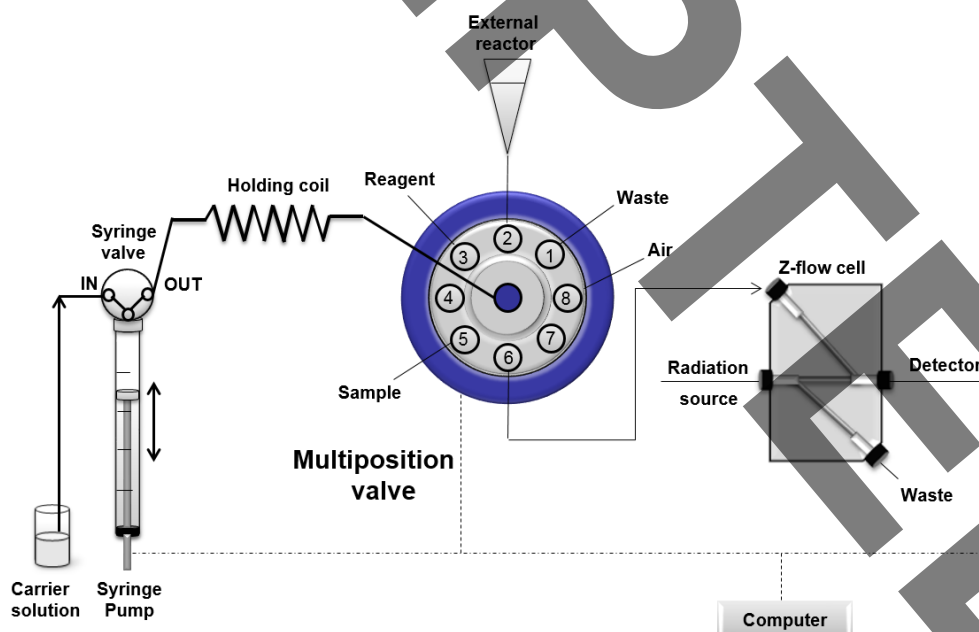
На второй стадии скорость потока снижают до 50 мкл/с и в УС вводят 120 мкл воздуха через порт 8 с целью изолирования и предотвращения разбавления реакционной смеси потоком носителя, затем подают 250 мкл образца и 20 мкл 4 ммоль/л 11-МВФК, вводимые через порты 5 и 3, соответственно. Полученную смесь перемещают в ВР с 340 мкл воды, оставляя при этом 50 мкл воздуха в УС.

На третьей стадии в УС вводят 525 мкл воздуха через порт 8, а затем после переключения крана распределителя на порт 2 через раствор в ВР пропускают 500 мкл воздуха. Этого объема воздуха достаточно для полного перемешивания и получения гомогенного раствора.

На последней стадии измеряют сигнал холостого раствора, находящегося в этот момент в проточной ячейке. Реакционную смесь сначала вводят в УС (380 мкл), а затем 280 мкл раствора вытесняют через порт 6 и проточную ячейку при скорости

потока 30 мкл/с, после чего поток останавливают на 20 с. Последний объем подобран таким образом, чтобы во время остановки потока в проточной ячейке находилась примерно середина сегмента реакционной смеси. Значения светопоглощения, полученные в этот промежуток времени, усредняют. Оптическая плотность раствора измеряют при 384 нм. Наконец, оставшийся раствор и воду, содержащиеся в системе, направляют в ёмкость для слива путем полного опорожнения шприцевого насоса. Обнаружено, что промывка системы этанолом является эффективным способом для предотвращения сорбции пузырьков воздуха на внутренних стенках трубок и проточной ячейки.

*Методика определения содержания тиамин в витаминных комплексах.* При анализе витаминных комплексов растирали 5 таблеток в ступке до гомогенного состояния. Взвешивали количество образца, эквивалентное по массе одной таблетке, и растворяли в воде с добавлением 5 мл 0.1 М HCl, доводили объем до метки в колбе на 100 мл. Колбу помещали в ультразвуковую баню на 15 минут для полного перевода витамина В<sub>1</sub> в раствор. Раствор фильтровали через плотный фильтр или часть его центрифугировали. Отбирали аликвоту этого раствора и разбавляли в колбе на 25 мл так, чтобы концентрация этого раствора соответствовала примерно середине градуировочного графика. Далее анализ проводили как указано выше.

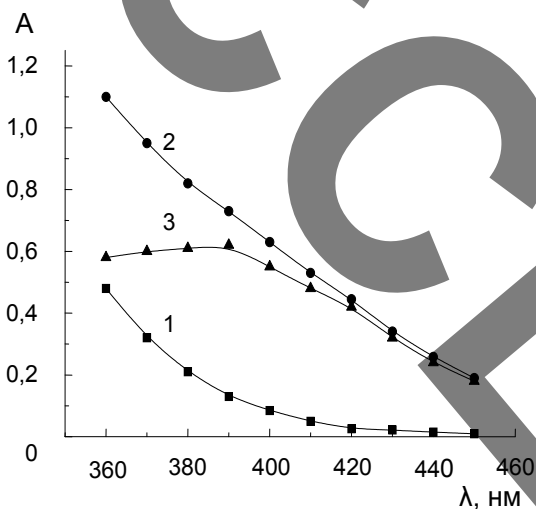


**Рис. 1.** Схема ПИА системы для определения тиамин в виде комплексного соединения с 11-МВФК. Z-flow cell (проточная кювета Z конфигурации); multiposition valve (8-портовый многоходовой кран-распределитель); holding coil (удерживающая спираль); syringe pump (реверсивный шприцевой насос); syringe valve (клапан переключения направления потока); carrier solution (несущий раствор); waste (стоки); reagent (реагент); sample (образец); external reactor (внешний реактор); air (воздух) [24].

## Результаты исследований и их обсуждение

### Исследование реакции тиаминa с 11-МВФК

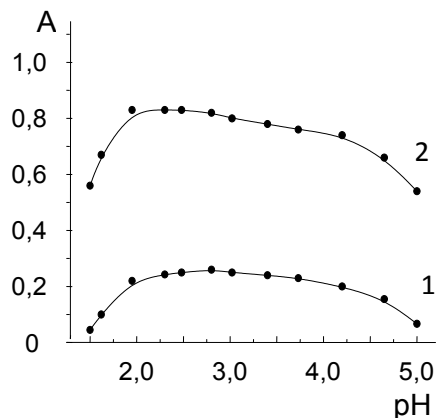
При взаимодействии растворов 11-МВФК и тиаминa происходит мгновенное образование комплексного соединения, вследствие чего раствор окрашивается в интенсивно желтый цвет. ГПК тоже имеет слабо желтую окраску и поглощает свет в ближней ультрафиолетовой и видимой частях спектра. Максимальное различие в спектрах растворов реагента и его смеси с тиамином наблюдается в диапазоне длин волн от 360 до 390 нм (рис.2). В качестве аналитической выбрана длина волны 390 нм, при которой поглощение холостого раствора минимально. Молярный коэффициент комплекса с тиамином составляет при этой длине волны  $6.0 \cdot 10^3$  моль<sup>-1</sup>·л·см<sup>-1</sup>.



**Рис.2.** Спектры поглощения 11-МВФК (1), смеси 11-МВФК с тиамином (2) и разностный спектр (3).  $C_{11-МВФК} = 4 \cdot 10^{-5}$  моль/л,  $C_{\text{тиамин}} = 2 \cdot 10^{-5}$  моль/л, pH = 4.0, l = 5 см.

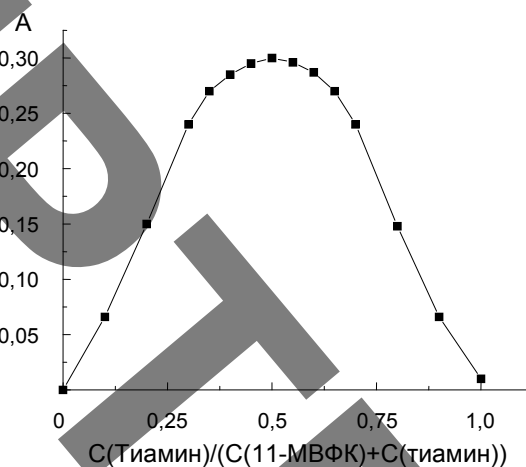
Показано, что в интервале pH примерно от 2.0 до 4.5 происходит количественное образование комплекса тиаминa с 11-МВФК (рис.3). Этот интервал совпадает с областью устойчивости 11-МВФК. При pH меньше 2.0 светопоглощение уменьшается по причине кислотного гидролиза 11-МВФК, а при pH > 4.5 – за счет его щелочного разложения.

В исследуемой системе возможно образование малорастворимых соединений при взаимодействии гетерополианиона с тиамином, содержащим аминогруппу, способную к протонированию. Кроме того в молекуле тиаминa присутствует положительный заряд, локализованный на атоме азота тиазолового кольца. Вследствие этого, особенно в более кислой среде, растворы становятся слегка мутными. Полностью устранить образование малорастворимых соединений во всем исследованном интервале pH можно за счёт добавления неионных ПАВ.



**Рис.3.** Зависимость оптической плотности 11-МВФК (1) и его комплекса с тиамином (2) от pH.  $C_{11-МВФК} = 4 \cdot 10^{-5}$  моль/л;  $C_{\text{тиамин}} = 4 \cdot 10^{-5}$  моль/л;  $\lambda = 390$  нм, l = 5 см.

При исследовании состава комплексного соединения методом изомолярных серий найдено (рис. 4), что соотношение 11-МВФК к тиамину в нем составляет 1: 1. На основании полученных данных рассчитана константа устойчивости комплекса 11-МВФК с тиамином, которая оказалась равной  $K_{\text{уст}} = (4.7 \pm 0.3) \cdot 10^4$ .



**Рис.4.** Определение состава комплекса 11-МВФК с тиамином методом изомолярных серий.  $C_{11-МВФК} + C_{\text{тиамин}} = 4 \cdot 10^{-5}$  моль/л; pH = 3.8;  $\lambda = 390$  нм; l = 5 см.

### Оптимизация условий определения тиаминa с 11-МВФК методом ПИА с внешним реактором

Обычно в методе ПосИА смешивание реагентов и химическая реакция происходят в потоке или в удерживающей спирали, что не позволяет достичь состояния равновесия и гомогенизации раствора. Эти недостатки преодолеваются перемешиванием реагентов магнитной мешалкой или пропусканием потока воздуха через реакционную смесь во внешнем реакторе. Полученная система сочетает в себе преимущества автоматизированного

управления потоками, такие как высокая производительность, полный и точный контроль объемов реагентов и таймингов операций, низкая стоимость единичного анализа, низкое потребление реагентов и небольшой объем сточных вод – принципы, находящиеся в соответствии с требованиями зеленой аналитической химии – с широким диапазоном применения, характерным для проведения аналитических определений в обычных неавтоматизированных условиях [21].

При разработке методик ПИА или ПосИА следует учитывать, что оптимальные условия, подобранные для фотометрических методик, не могут быть прямо перенесены и использованы. К примеру, с учётом дисперсии концентрации реагентов в ПИА и ПосИА обычно должны быть намного выше, чем в спектрофотометрическом методе. Эта проблема легко решается использованием ПИА с ВР, поскольку большую часть параметров можно прямо взять из результатов оптимизации неавтоматизированных вариантов фотометрических методик.

Поэтому, учитывая ранее полученные данные, при оптимизации условий SIA-LAV определения тиамин исходные концентрации 11-МВФК и НПАВ приняты равными  $4 \cdot 10^{-3}$  моль/л и 1 %, соответственно. Концентрация 11-МВФК близка к максимально возможной, учитывая ограниченную растворимость гуанидиниевой соли. pH раствора поддерживали равным 4.0 введением 1 мл ацетатной буферной смеси в раствор тиамин на стадии приготовления образца. В дальнейшем оптимизировали конечную концентрацию реагента и НПАВ варьированием объемов растворов реагентов, инжектируемых в удерживающую спираль через соответствующие каналы многопозиционного многоходового крана-распределителя. Объемы носителя, реагентов и воздуха подбирали таким образом, чтобы, с одной стороны, полностью переместить компоненты реакционной смеси во ВР или в удерживающую спираль, а с другой – предотвратить смешивание с потоком носителя.

Увеличение концентрации реагента в смеси 11-МВФК с тиамин приводит к постоянному росту разности оптических плотностей рабочего и холостого растворов (рис.5). В качестве оптимального объема 11-МВФК выбраны 20 мкл. При увеличении этого значения начинается более резкий рост оптической плотности холостого раствора. Высокое значение светопоглощения холостого раствора нежелательно, поскольку приводит к существенному ухудшению воспроизводимости. Увеличение светопоглощения раствора комплекса 11-МВФК с тиамин связано как со смещением равновесия в сторону продукта реакции, так и с увеличенным рассеянием света, вызванным повышением концентрации малорастворимых

продуктов реакции 11-МВФК с Тритон X-100 и тиамин [28].

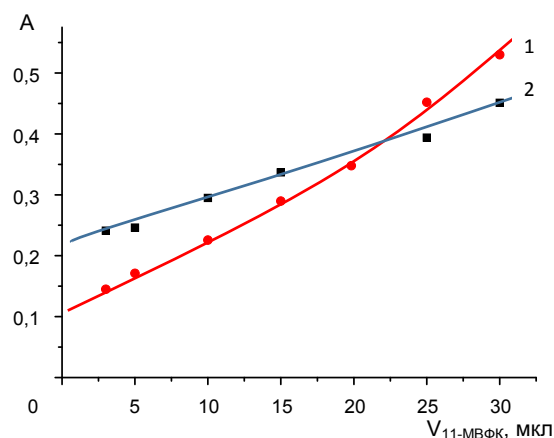


Рис. 5. Зависимость светопоглощения раствора 11-МВФК (1) или отклонения от аддитивности светопоглощения смеси 11-МВФК и тиамин от объема 11-МВФК (2).  $C_{11-МВФК} = 4 \cdot 10^{-3}$  моль/л, pH = 4.0,  $V_{Тритон X-100} = 10$  мкл,  $C_{Тритон X-100} = 1\%$ ,  $V_{тиамин} = 250$  мкл,  $C_{тиамин} = 8 \cdot 10^{-5}$  моль/л,  $\lambda = 384$  нм,  $l = 1$  см.

Как уже говорилось, введение неионных ПАВ позволяет, хотя и не полностью, устранить образование малорастворимых продуктов реакции тиамин с 11-МВФК. Рост оптической плотности стабилизируется, начиная с 10 мкл раствора тритон X-100, которые выбрали для проведения дальнейших опытов (рис. 6).

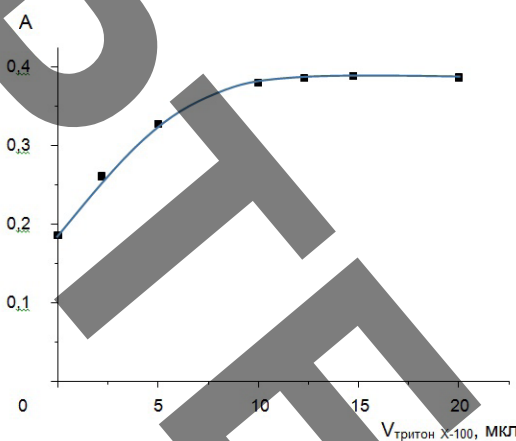


Рис. 6. Влияние объема Тритона X-100 на светопоглощение раствора комплекса 11-МВФК с тиамин.  $C_{11-МВФК} = 4 \cdot 10^{-5}$  моль/л,  $C_{тиамин} = 2 \cdot 10^{-5}$  моль/л,  $l = 5$  см.

#### Оценка мешающего влияния

Для оценки сферы возможного практического применения реакции взаимодействия 11-МВФК и тиамин изучено влияние веществ, которые обычно сопровождают его в фармацевтических препаратах.

Предложенная реакция имеет высокую селективность. Не было обнаружено мешающего

влияния сахарозы, ацетилсалициловой кислоты, парацетамола, никотиновой кислоты, кофеина и других обычных ингредиентов фармацевтических препаратов в количествах, значительно превышающих их обычное содержание.

Важно, что витамины В группы, включая пиридоксин, рибофлавин и цианокобаламин не вступают в реакцию с 11-МВФК. Спектры рибофлавина и комплекса тиамин с 11-МВФК перекрываются. До соотношения 1:1 (моль/моль) вклад рибофлавина можно учесть, если предварительно измерить светопоглощение анализируемого раствора без добавления реактива и вычесть его из получаемых результатов. Пиридоксин не влияет на светопоглощение раствора по крайней мере до концентрации  $2 \cdot 10^{-4}$  моль/л (5-молярный и выше избыток по отношению к тиамину).

В [5] показано, что из обычных восстановителей, которые могут содержаться в фармацевтических препаратах или растительных объектах 11-МВФК вступает в реакцию только с аскорбиновой кислотой. Интересным фактом является то, что даже в этом случае восстановление ГПА не приводит к существенному изменению спектра в области поглощения комплекса 11-МВФК с тиамин. Это дает принципиальную возможность одновременного определения двух веществ при помощи одного реагента. При 10-кратном молярном избытке аскорбиновой кислоты спектр ГПА в ближней ультрафиолетовой области начинает изменяться. Светопоглощение растет и в этой области из-за наложения увеличенной по интенсивности полосы поглощения гетерополисини в видимой области. Определению тиамин с 11-МВФК не мешает по крайней мере 10-кратный избыток таких неорганических восстановителей

и окислителей как Fe(II), Fe(III), Cu(II), гидразин, сульфит.

*Метрологические параметры методики определения тиамин с 11-МВФК методом SIA-LAV*

Градуировочный график для спектрофотометрического определения тиамин при использовании кюветы с толщиной поглощающего слоя 5 см линейен в интервале концентраций от  $5 \cdot 10^{-7}$  до  $4 \cdot 10^{-5}$  моль/л. Предел обнаружения составляет  $2 \cdot 10^{-7}$  моль/л.

Уравнение градуировочного графика для SIA-LAV определения тиамин в интервале концентраций от  $3 \cdot 10^{-6}$  до  $2 \cdot 10^{-4}$  моль/л имеет следующий вид:  $A_{384} = (3300 \pm 40) \cdot C_{AK}$  ( $R^2 = 0.9993$ ). Воспроизводимость предложенной методики была оценена при повторном инжестировании стандартных растворов тиамин. Относительное стандартное отклонение 10 инжестий растворов, содержащих 10, 40 и 160 мкмоль/л тиамин равнялось 4.8, 3.6 и 2.7%, соответственно. Предел обнаружения, полученный исходя из утроенного значения стандартного отклонения свободного члена уравнения градуировочного графика, составил  $1 \cdot 10^{-6}$  моль/л. Производительность методики равняется 15 определениям в час (без учета пробоподготовки).

В таблице 1 приведены результаты определения витамин В<sub>1</sub> в виде комплекса с 11-МВФК ГПК в витаминах.

Результаты определения тиамин в образцах, содержащих большое количество других витаминов, указывают на высокую селективность предложенной методики. Этот вывод подтверждается отсутствием значимого различия между найденным содержанием тиамин и гарантированным производителем.

**Таблица 1.** Результаты определения витамин В<sub>1</sub> в витаминных комплексах (n = 5, P = 0.95).

Витамин	Указано производителем	Найдено в виде комплекса с 11-МВФК
Геримакс энерджи (Nucomed, Дания) *	1.5 мг/1170 мг таблетки	$1.47 \pm 0.03$ ; $S_r = 0.016$
Нейрорубин-Форте Лактаб (Merph, Швейцария)**	200 мг/таблетку	$203 \pm 6$ ; $S_r = 0.024$

\* Состав препарата Геримакс. 1 таблетка массой 1170 мг содержит: экстракт женьшеня – 85 мг (3.4 мг гинзенозидов); экстракт зеленого чая – 37.2 мг (18.6 мг катехинов); витамин А – 800 мкг; гидрохлорид тиамин – 1.5 мг; витамин В<sub>2</sub> – 1.7 мг; витамин В<sub>6</sub> – 2.2 мг; витамин В<sub>12</sub> – 2 мкг; витамин С – 60 мг; витамин Е – 10 мг; фолиевая кислота – 200 мкг; никотинамид – 19 мг; пантотеновая кислота – 6 мг; магний – 250 мг; железо – 10 мг; цинк – 15 мг; медь – 2.5 мг; марганец – 3.8 мг; хром – 40 мкг; молибден – 45 мкг; вспомогательные вещества

\*\* Состав препарата Нейрорубин-Форте Лактаб. 1 таблетка содержит: нитрат тиамин – 200 мг; пиридоксин гидрохлорид (витамин В<sub>6</sub>) – 50 мг; цианокобаламин (витамин В<sub>12</sub>) – 1 мг.

## Выводы

Впервые в качестве аналитического реагента для определения серосодержащих веществ использованы металлозамещенные ГПА. Разработана методика определения тиамин методом ПосИА с ВР и спектрофотометрическим детектированием с использованием висмута(III)замещенных ГПК, которая отличается простотой, высокой чувствительностью, производительностью, полностью автоматизирована. 11-МВФК является высокоселективным реагентом на тиамин. Определению не мешают витамины В группы, умеренные избытки аскорбиновой кислоты, и ряд других веществ, содержащихся в фармацевтических препаратах и проявляющих восстановительные свойства. Правильность методики подтверждается результатами, полученными при анализе некоторых витаминных комплексов.

Универсальность системы ПосИА значительно улучшается за счет интеграции с внешним реактором, что позволяет устранить Schlieren эффект, повысить точность, а также

чувствительность определения. Проведение процесса смешивания в ВР гарантирует эффективное и быстрое полное перемешивание реагентов и достижение равновесия. Количество реагента, объемы проб и сточных вод поддерживаются на минимально возможном для SIA метода уровне, находясь в соответствии с принципами зеленой химии [29]. Объем сточных вод в предложенной методике составляет около 2 мл, количество реагента – 0.08 мкмоль, объем образца – 0.25 мл, что на порядок меньше, чем в неавтоматизированном варианте. По сравнению с экстракционно-люминесцентным методом определения тиамин в предложенной методике исключено использование токсичных органических растворителей (хлороформ).

Преимуществом метода SIA-LAV по сравнению с методом FBA является то, что нет необходимости конструировать специальный внешний реактор. Важно и то, что при создании методик, основанных на использовании ВР, в методе SIA-LAV не нужно разрабатывать новое программное обеспечение, поскольку оно уже является частью коммерческих систем SIA.

## Список литературы

1. Pope M.T. Heteropoly and isopoly oxometalates. Springer: N.Y., 1983. P. 180.
2. Baker L.C.W., Figgis J.S. A new fundamental type of inorganic complexes – hybrid between heteropoly and conventional coordination complexes. *J. Amer. Chem. Soc.* 1970, 92, 3794–3795.
3. Kozhevnikov I. Catalysis by polyoxometalates. J. Wiley&Sons: Chichester, 2002. P. 196.
4. Nagul E.A., McKelvie I.D., Worsfold P., Kolev S. The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited. Opening the black box. *Anal. Chim. Acta.* 2015, 890, 60–82.
5. Vishnikin A.B., Svinarenko T.Ye., Sklenářová H., Solich P., Bazel Ya.R., Andruch V. 11-Molybdobismuthophosphate – a new reagent for the determination of ascorbic acid in batch and sequential injection systems. *Talanta.* 2010, 80 (5), 1838–1845.
6. Weakley T.J.R. Heteropolyanions containing two different heteroatoms. Part III. Cobalto(II)undecapentaphosphate and related anions. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 1973, 341–346.
7. Zonnevillje F., Tourne C.M., Tourne G.F. Preparation and characterization of heteropolytungstates containing group 3A elements. *Inorg. Chem.* 1982, 21(7), 2742–2750.
8. Zonnevillje F., Tourne C.M., Tourne G.F. Preparation and characterization of iron(III)- and rhodium(III)-containing heteropolytungstates. Identification of novel oxo-bridged iron(III) dimers. *Inorg. Chem.* 1982, 21(7), 2751–2757.
9. Katsoulis D.E., Pope M.T. New chemistry for heteropolyanions in anhydrous nonpolar solvents.

Coordinative unsaturation of surface atoms. Polyanion oxygen carriers. *J. Amer. Chem. Soc.* 1984, 106, 2737–2738.

10. Свинаренко Т.Е., Вишникін А.Б., Тимофеева М.Н. Синтез и физико-химическое исследование гетерополианиона  $\text{PMo}_{11}(\text{TiO})\text{O}_{39}^{5-}$ . *Журн. неорган. химии.* 2008, 53(9), 1457–1463.

11. Вишнікін А.Б. Модифіковані форми гетерополіаніонів у спектроскопічних методах аналізу: Автореф. дис. док. хім. наук: 02.00.02, Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України, Одеса, 2012.

12. Трохименко О.М., Трачевский В.В. Экстракционно-атомно-абсорбционное определение фосфора виде фосфоровисмута-молибденового комплекса по аналитической линии висмута. *Укр. хим. журн.* 1996, 62(11), 46–50.

13. Пирсон Р.Дж. Жесткие и мягкие кислоты и основания. *Успехи химии.* – 1971 – Т. 40, № 7. – С. 1259–1282.

14. Alonso A., Almendral M.J., Porras M.J., Curto Y. Flow-injection extraction without separation. Fluorimetric determination of thiamine by the thiochrome method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 42(2), 171–177.

15. Mohamed, A.-M.I., Mohamed, H.A., Abdel-Latif, N.M., Mohamed, M.R. Spectrofluorimetric determination of some water-soluble vitamins. *J. AOAC Int.* 2011, 94(6), 1758-1769.

16. Martínez-Lozano C., Pérez-Ruiz T., Tomás V., Abellán C. Flow injection determination of thiamine based on its oxidation to thiochrome by mercury(II). *Analyst.* 1990, 115, 217-220.



17. Pérez-Ruiz T., Martínez-Lozano C., García-Martínez M.D. Simultaneous determination of thiamine and its phosphate esters by a liquid chromatographic method based on post-column photolysis and chemiluminescence detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009, 50(3), 315–319.

18. Vishnikin A.B., Sklenařova H., Solich P., Petrushina G.A., Tsiganok L.P. Determination of ascorbic acid with Wells-Dawson type molybdophosphate in sequential injection system. *Anal. Lett.* 2011, 44(1-3), 514-527.

19. Sweileh J.A., Dasgupta P.K. Applications of in situ detection with an automated micro batch analyzer. *Anal. Chim. Acta.* 1988, 214, 107-120.

20. Honorato R.S., Araújo M.C.U., Lima R.A.C., Zagatto E.A.G., Lapa R.A.S., Costa Lima J.L.F. A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search. *Anal. Chim. Acta.* 1999, 396, 91-97.

21. Diniz P.H.G.D., Almeida L.F., Harding D.P., Araújo M.C.U. Flow-batch analysis. *Trends Anal. Chem.* 2012, 35, 39-49.

22. Bulatov A.V., Moskvina A.L., Moskvina L.N., Mozhuhin A.V. The stepwise injection analysis as a new opportunity for automation of chemical analysis of liquid, gaseous and solid-phase samples. *J. Flow Injection Anal.* 2010, 27, 13-19.

23. Grudpan K. Some recent developments on

cost-effective flow-based analysis. *Talanta.* 2004, 64, 1084-1090.

24. Al-Shwaiyat M.K.E.A., Miekh Y.V., Denisenko T.A., Vishnikin A.B., Andruch V., Bazel Ya.R. Simultaneous determination of rutin and ascorbic acid in a sequential injection lab-at-valve system. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, 149, 179-184.

25. Alerm L., Bartroli H. Development of a sequential microtitration system. *Anal. Chem.* 1996, 68, 1394-1400.

26. Guzman M., Pollema C., Ruzicka J., Christian G.D. Sequential injection technique for automation of complex analytical procedures: Fluorometric assay of factor thirteen. *Talanta* 1993, 40, 81-87.

27. Vishnikin A.B., Al-Shwaiyat M.K.E.A., Petrushina G.A., Tsiganok L.P., Andruch V., Bazel Ya.R., Sklenarova H., Solich P. Highly sensitive sequential injection determination of p-aminophenol in paracetamol formulations with 18-molybdodiphosphate heteropoly anion based on elimination of Schlieren effect. *Talanta.* 2012, 96, 230-235.

28. Vishnikin A.B. Novel indirect spectrophotometric methods for determination of phosphate and arsenate using polyoxometalates and micellar medium. *J. Molec. Liquids.* 2005, 118(1-3), 51-55.

29. Melchert W.R., Reis B.F., Rocha F.R.P. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. *Anal. Chim. Acta.* 2012, 714, 8-19.