

УДК 543.218.1

## ЗАСТОСУВАННЯ ГЕТЕРОПОЛІКИСЛОТ СТРУКТУРИ КЕГГІНА ДЛЯ ІОНОМЕТРИЧНОГО ВИЗНАЧЕННЯ РИБОФЛАВІНУ

Н. Панасюк, Я. Ткаченко, В. Ткач

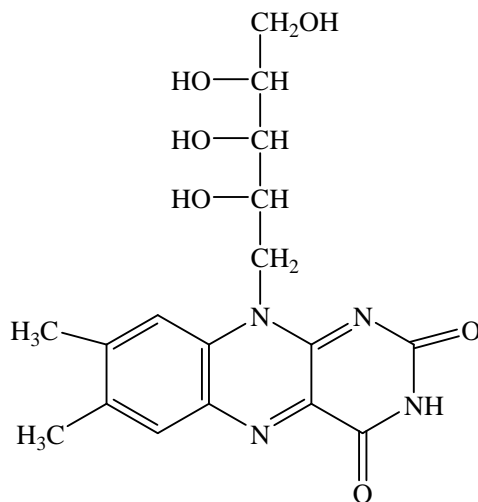
ДВНЗ “Український державний хіміко-технологічний університет”,  
пр. Гагаріна, 8, 49005 Дніпропетровськ, Україна,  
e-mail: neonyllap@gmail.com

Вивчено взаємодію органічного катіона рибофлавіну з аніонами 12-вольфрамофосфатної, 12-молібдофосфатної, 12-кремнемолібденової гетерополікислот методами УФ-спектроскопії та амперометричного титрування. Синтезовано електродно-активні речовини малорозчинних асоціатів, сконструйовано плівкові іоноселективні електроди та досліджено їхні характеристики. Розроблено методику іонOMETРИЧНОГО визначення рибофлавіну в косметичному кремні “Травель”, яка має задовільні метрологічні характеристики.

*Ключові слова:* рибофлавін, гетерополікислоти структури Кеггіна, іоноселективний електрод, електродно-активна речовина.

Вітаміни – це клас біологічно активних сполук, які впливають на обмін речовин у живих організмах. Здебільшого їх використовують у вигляді лікарських форм для перорального та парентерального застосування. Проте сьогодні досліджено їхню активність у разі місцевого застосування, наприклад, у вигляді косметичних кремів та масок у випадку захворювань шкіри.

З’ясовано, що рибофлавін виявляє окисно-відновну біологічну активність, завдяки наявності в його структурі діімінної  $-N=C-C=N-$  групи, яка здатна приєднувати два атоми водню. В структурі вітаміну В<sub>2</sub> є ізоаллоксазинове кільце, а в бічному ланцюзі – залишок спирту рибітолу.



6,7-диметил-10-(1'- D-Рибітил)-ізоаллоксазин, C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, рибофлавін

Оскільки рибофлавін має жовте забарвлення та виявляє біологічну активність, то його використовують як забарвлювальну та вітамінізувальну домішку в косметичній та харчовій промисловостях.

Для аналізу вітамінних сумішей використовують вольтамперометричні методи з різними модифікаціями індикаторного електрода та хімічною модифікацією визначуваної речовини [1–4].

Завдяки наявності смуг поглинання в широкому діапазоні довжин хвиль і здатності флуоресціювати використовують абсорбційні [5] та люмінесцентні [6] методи аналізу рибофлавіну, а також хроматографічні та електрофоретичні методи визначення флавінових коферментів [7–11].

Як відомо, аналіз багатокомпонентних сумішей є досить складним та тривалим у процесі пробопідготовки, потребує застосування токсичних розчинників, дорогого обладнання.

Тому альтернативою є використання прямої іонометрії з застосуванням іоноселективних електродів (ІСЕ) на основі малорозчинного асоціату органічного катіона рибофлавіну та гетерополіаніона (ГПА) структури Кеггіна. Те, що асоціати на основі ГПА структури Кеггіна є малорозчинними, мають велику молекулярну масу та низьку розчинність у воді, – дає змогу використовувати їх як електродно-активні речовини ІСЕ, оборотні до органічного катіона рибофлавіну [12].

Наша мета – дослідження реакції утворення катіона рибофлавіну з гетерополікислотами структури Кеггіна, дослідження їхніх фізико-хімічних властивостей, синтез електродно-активних речовин, конструювання ІСЕ та розробка простих експресних методик визначення катіона вітаміну В<sub>2</sub>.

У роботі використали рибофлавін (7,8-диметил-10-(1-D-рибітил)-ізоалоксазин,  $M = 376,36$  ч.д.а., 12-молібдофосфору (МФК), 12-вольфрамофосфору (ФВК), 12-кремнемолібденову (КМК) кислоти, 0,1 М натрій гідроксид, дибутилфталат (ДФБ), діоктилфталат (ДОФ), трикрезилфосфат (ТКФ), циклогексанон (ЦГ) марок ч.д.а. або х.ч., полівінілхлорид (ПВХ) марки G-101. Спектрофотометричні дослідження проводили на спектрофотометрі СФ-46 в УФ та видимій ділянках світла. Амперометричне титрування виконували на установці АУ-4М, що містить блок живлення, чутливий мікоамперметр М-95 та два електроди: індикаторний – графітовий торцевий, та порівняння – насичений каломелевий.

Пластифіковані мембрани виготовляли за відомою методикою [13] з використанням ЕАР на основі рибофлавіну та ГПК структури Кеггіна. Електродні характеристики реєстрували на приладі іономір І-130. Значення рН розчинів доводили розчинами соляної кислоти та натрію гідроксиду, застосовуючи скляний індикаторний електрод та аргентумхлоридний, як електрод порівняння.

Використали розчини рибофлавіну з концентрацією від  $10^{-2}$  до  $10^{-6}$  М, які готували з точної наважки субстанції рибофлавіну на 0,1 М розчині гідроксиду натрію.

Рибофлавін добре поглинає в УФ та видимій ділянках світла, що пов'язане з наявністю в його структурі системи спряжених зв'язків. В інтервалі  $\text{pH} \leq 7,0$  рибофлавін перебуває в катіонній формі, у цьому разі протон приєднується до десятого атома нітрогену  $\text{AH}_2^+$  за кислотності середовища 6,5–10,5 рибофлавін перебуває в рівновазі: семіхінонна форма  $\text{AH}_2$  – нейтральна форма рибофлавіну. При  $\text{pH} \geq 10,5$  молекула рибофлавіну переходить в аніонну форму  $\text{A}^-$ , у якій немає протона біля третього атома нітрогену [14].

На спектрах простежуються смуги поглинання, які відповідають  $\pi$ - $\pi^*$ - та  $n$ - $\pi^*$ -переходами, причому в інтервалі рН від 7,0 до 11,0 у видимій ділянці зникають максимуми смуг поглинання, що пов'язане з переходом рибофлавіну в безбарвну сполуку – лейкорибофлавін. Схема перетворень у молекули рибофлавіну показана на рис. 1, а спектри поглинання – на рис. 2.

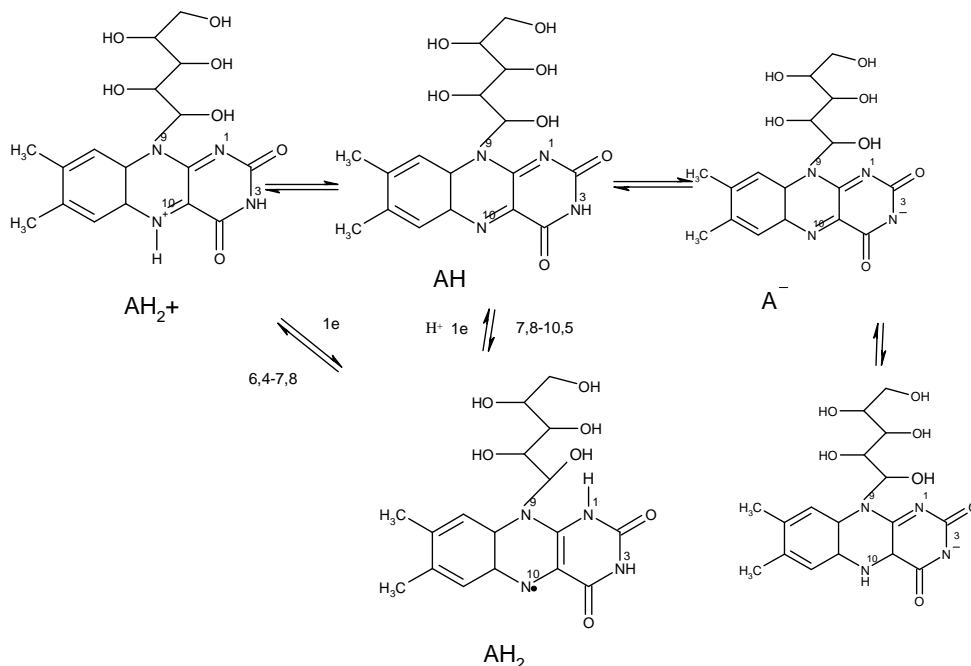


Рис. 1. Схема кислотно-основної рівноваги в розчині рибофлавіну

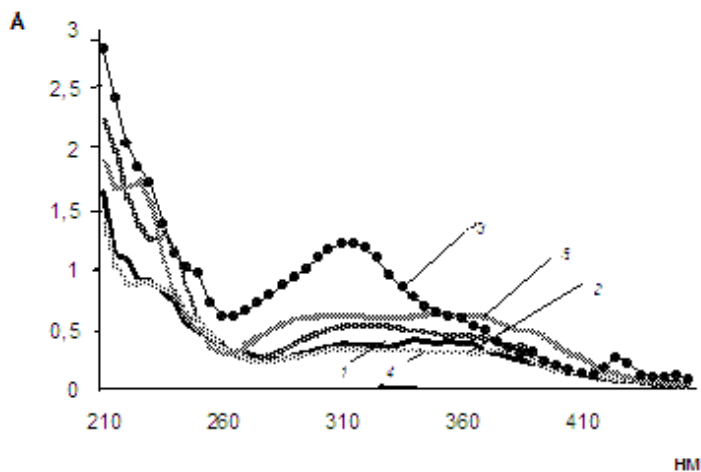


Рис. 2. УФ спектр поглинання рибофлавіну ( $C = 1,2 \cdot 10^{-4}$  М):  
1 – рН 3,0; 2 – рН 5,0; 3 – рН 6,0; 4 – рН 8,0; 5 – рН 11,0

ГПК – це складні координаційні сполуки, що мають певні спектри коливання: зв'язки Mo–O, W–O мають піки при 1 100–400  $\text{cm}^{-1}$ , які спостерігають в ІЧ-спектрах асоціатів, що свідчить про незмінність структури кеггінівського ядра в гетерополіаніонах  $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ ,  $\text{SiMo}_{12}\text{O}_{40}^{4-}$ ,  $\text{PW}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ , також спостерігають характеристичні смуги поглинання для C=O, C=N та C=C 1 320–1 240 та 1 640  $\text{cm}^{-1}$  зв'язків у структурі молекули асоціату. Тобто наявність смуг поглинання в ІЧ-спектрах малорозчинних асоціатів дає підстави зробити висновок, що в малорозчинних сполуках асоціативний тип зв'язку [12].

Рибофлавін на обертальному графітовому електроді не дає дифузійних струмів електровідновлення за заданого значення різниці потенціалів, тоді як титрант дає чітку хвилю електровідновлення двох атомів металу в структурі Кеггіна (рівняння (1.1)).

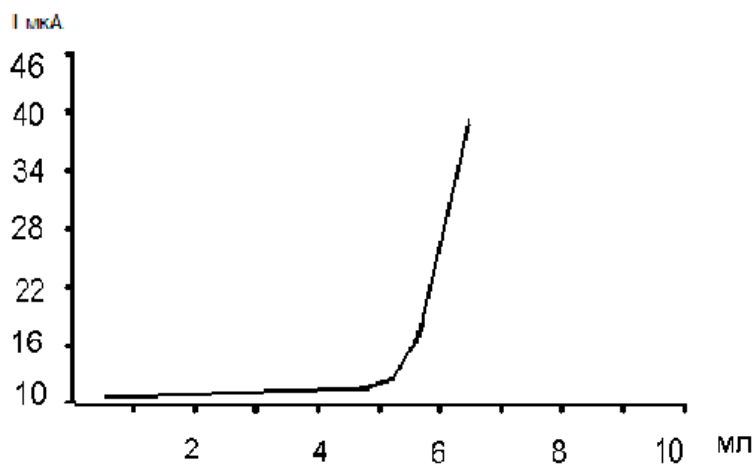
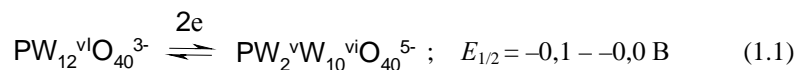
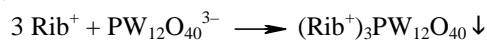


Рис. 3. Крива амперометричного титрування 20 мл  $10^{-3}$  М вітаміну В<sub>2</sub>  $10^{-3}$  М ФВК

Визначено мольне співвідношення компонентів, що реагують ( $P = 0,95$ ,  $n = 5$ ):  $(\text{Rib}^+)_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40} = (3,2):(1,12)$ ,  $(\text{Rib}^+)_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40} = (3,08):(1,17)$ ,  $(\text{Rib}^+)_4\text{SiMo}_{12}\text{O}_{40} = (4,04):(1,14)$ .

Тобто в розчині відбувається реакція утворення малорозчинного асоціату жовтого кольору за реакцією:



За точкою еквівалентності простежується різке збільшення сили струму, що зумовлене електровідновленням двох атомів вольфраму в структурі ФВК за реакцією наведеною у рівнянні (1.1).

Отримані асоціати використали як електродно-активні речовини для синтезу мембран іоноселективних електродів. Для одержання ЕАР зливали 0,01 М розчини ГПК та вітаміну В<sub>2</sub>, осад відділяли центрифугуванням та сушили при 30 °С у сушильній шафі.

Пластифіковані мембрани виготовляли за методикою, наведеною в праці Б.П. Нікольського. ІСЕ виготовили на основі плівкових мембран. Перед роботою електроди вимочували у розчині рибофлавіну 0,001 М.

Дослідження засвідчили, що ICE на основі електродно-активних речовин  $(\text{Rib}^+)_{3}\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$  та  $(\text{Rib}^+)_{4}\text{SiMo}_{12}\text{O}_{40}$  мають гірші характеристики, ніж з  $(\text{Rib}^+)_{3}\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ .

Для низькополярних молекул вітамінів з розвинутою просторовою структурою, таких як  $\text{B}_2$ , ліпшими пластифікаторами є ефіри фталевої кислоти, радіус молекули яких становить  $\sim 4,5 \text{ \AA}$ , що є ідентичним до періоду ПВХ. ДБФ має більшу діелектричну проникність ( $\epsilon = 6,1$ ), ніж ДОФ ( $\epsilon = 5,1$ ), що корелює з електродним нахилом ICE на вітамін  $\text{B}_2$ , тоді як ефіри фталевої кислоти – радіус молекул трикрезилфосфату ( $18 \text{ \AA}$ ) та діелектрична проникність ( $\epsilon = 6,7$ ).

ICE, оборотні до органічного катіона рибофлавіну, мають лінійний Нернстівський нахил в межах  $5 \times 10^{-4} - 10^{-2} \text{ М}$  для ЕАР з протійонами ФВК і КМК та  $5 \times 10^{-4} - 10^{-3} \text{ М}$  для МФК.

У табл. 1 наведено основні електродні характеристики розроблених ICE.

Таблиця 1

Електродні характеристики ICE оборотного до катіона вітаміну  $\text{B}_2$ 

ЕАР	Пластифікатор	Інтервал лінійності, М	Крутість електродної функції мВ/рС	Час існування, діб	pH
$(\text{Rib}^+)_{3}\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$	Діоктилфталат	$5 \times 10^{-5} - 10^{-2}$	54,3	45	5,0–6,0
	Дибутілфталат	$10^{-4} - 5 \times 10^{-3}$	46,5	35	
	Трикрезилфосфат	$10^{-4} - 10^{-2}$	42,5	30	

Залежність крутості електродної функції лінійна, її описує рівняння:  $E = a + blgc$ . Параметри градуїзованого графіка  $a$  і  $b$ , дисперсії констант  $a$  і  $b$  –  $Sa$  і  $Sb$  та коефіцієнт кореляції  $r$  наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Результати регресійного аналізу градуїзованих графіків для визначення рибофлавіну

Пластифікатор	$a$	$b$	$Sa$	$Sb$	$r$
Діоктилфталат	116,47	-5,27	59,69	0,26	0,9996
Дибутілфталат	79,16	-3,5	38,26	0,17	0,9788
Трикрезилфосфат	44,97	-4,84	50,48	0,75	0,9891

Вивчили вплив pH на крутість електродної функції ICE оборотного до катіона рибофлавіну. Оптимальним діапазоном є pH у межах 5,0–6,0 одиниць. За значень pH понад 7,0 відбувається звуження робочого інтервалу ICE, що зумовлено існуванням рибофлавіну в аніонній формі. За низьких значень pH також простежується зменшення нахилу електродної функції та звуження робочого інтервалу ICE, оборотного до катіона рибофлавіну, що, можливо, зумовлене його існуванням у рівноважній кето-енольній формі. Зменшення робочого діапазону електрода за великої концентрації вітаміну ( $10^{-2} \text{ М}$ ) можна пояснити гідрофобністю великої молекули рибофлавіну та її низькою полярністю.

У ході вивчення селективності ICE на катіон рибофлавіну щодо катіонів  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  та  $\text{Ca}^{2+}$  з'ясовано, що ці йони не заважають виявленню вітаміну  $\text{B}_2$ .

Час відгуку становить від 60 до 120 с для низьких концентрацій та 15–20 с – для  $10^{-2} - 10^{-3} \text{ М}$ . Дрейф потенціалу – 4–6 мВ/добу. Помірно невеликий час існування мембран можна пояснити частковим вимиванням електродно-активної речовини з фази мембрани.

Під час порівняння електродних характеристик визначено, що ліпшим пластифікатором на ІСЕ, оборотного до органічного катіона рибофлавіну, є діоктилфталат.

Роботу іоноселективного електрода та відновлюваність результатів перевірили на субстанції вітаміну В<sub>2</sub> методом додатків ( $n = 7$ ,  $P = 0,95$ ). Результати вимірювань такі: міститься 6,65 мг; уведено 1,00 мг; знайдено  $x = 7,63$  мг; метрологічна характеристика:  $x_{cp} = 7,63$ ;  $\delta = 2,1 \times 10^{-3}$ ,  $Sr = 0,03$ ;  $x \pm \Delta = 7,63 \pm 0,02$ .

На підставі досліджень розроблено методику іонометричного визначення вітаміну В<sub>2</sub> у косметичних засобах.

*Методика визначення рибофлавіну у косметичному кремі "Травель".* Наважку крему 5,000 г (точна наважка) поміщають у хімічний стакан і додають 30 мл 0,1 н соляної кислоти, нагрівають на водяній бані до 45 °С. Потім відділяють жирову фазу від водної на центрифугі  $n = 3000$  об/хв. Отриманий водний розчин переносять в електрохімічну комірку, доводять рН до 6,0 та вимірюють потенціал ІСЕ.

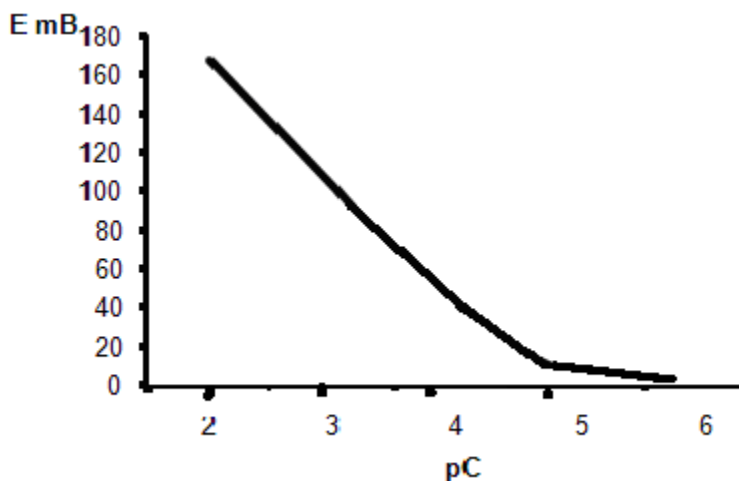


Рис. 4. Градуирований графік ІСЕ на рибофлавін, рН 5,5, ДОФ

Вміст рибофлавіну визначають за градуированим графіком (рис. 4). Результати вимірювань рибофлавіну методом прямої потенціометрії:  $3,20 \pm 0,01$  мг,  $Sr = 0,02$ ;  $P = 0,95$ ;  $n = 7$ .

1. *Katarzina M.* Simultaneous voltammetric determination of riboflavin and L-ascorbic acide in multivitaminic pharmaceutical preparations // *J. Trace Microprobe Techn.* 2003. Vol. 21. N 1. P. 111–120.
2. *Imrana S.* Voltammetric determination of vitamins in pharmaceutical formulation // *J. Pharm. Biomed Anal.* 2001. Vol. 26. N 5–6. P. 1009–1020.
3. *Chengxiao Z.* Highly sensitive electrochemical luminescence determination of riboflavin // *The Pittsburgh Conference of analytical chemistry and applied Spectroscopy*, New Orleans, La March 17–22, 2002. N 4–5. P. 1255–1269.
4. *Kang S.* Selective determination of vitamin В<sub>2</sub> at electrochemically activated carbon electrode // *Electroanalysis*. 2000. Vol. 12. N 2. P. 134–144.

5. *Евтифеева О.А.* Валідація фотоколориметричної методики кількісного визначення рибофлавіну в розчинах аптечного виготовлення // Фармаком. 2007. № 1. С. 69–74.
6. *Wang K.* Flow injection renewable drops spectrofluorimetry for sequential determinations of Vitamins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub> // Anal. Chim. Acta. Vol. 527. 2004. P. 187–193.
7. *Mikelová R.* Simultaneous determination of water- and fat-soluble vitamins in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection // Anal. Chim. Acta. Vol. 520. 2004. P. 57–69.
8. *Lebiedzinska A.* Vitamins B in grain and cereal-grain food, soy-products and seeds // Food Chemistry 95, 2008. P. 116–125.
9. *Ivanovic D.* Reversed-phase ion-pair HPLC determination of some water-soluble vitamins in pharmaceuticals // J. Pharm. Biomed. Anal. 1999. Vol. 18. P. 999–1009.
10. *Huopalahti R.* Use of capillary zone electrophoresis in the determination of B vitamins in pharmaceutical products // J. Chromatogr. 1993. Vol. 6. P. 133–149.
11. *Dinelli G.* Micellar electrokinetic capillary chromatography analysis of water-soluble vitamins and multi-vitamin integrators // Electrophoresis. 1994. Vol. 15. P. 1147–1150.
12. *Ткач В.І., Карандеева Н.І.* та ін. Використання гетерополіаніонів структури Кеггіна в аналізі органічних та неорганічних сполук. Дніпропетровськ, УДХТУ, 2002.
13. *Никольский Б.П., Матерова Е.А.* Ионселективные электроды. Л.: Химия, 1980.
14. *Ксенжек О.С.* и др. Электрохимические свойства обратимых биологических редокс-систем. М.: Наука, 1986.

#### **APPLICATION OF KEGGIN STRUCTURE HETEROPOLYACIDS FOR IONOMETRIC DETERMINATION OF RIBOFLAVIN**

**N. Panasyuk, Y. Tkachenko, V. Tkach**

*SHEE "Ukrainian State Chemical Technology University",  
Ven. Gagarina, 8, 49005, Dnepropetrovsk, Ukraine,  
e-mail: neonyllap@gmail.com*

The interaction of riboflavin organic cation with 12-tungstenphosphate, 12-molybdc-phosphate, 12-silicomolybdc heteropolyanions was investigated by UV spectroscopy and amperometric titration. Slightly soluble associates of electrode-active substances were synthesized, ion-selective electrodes were designed and their characteristics were investigated. Ionometric method of riboflavin determination in brewer's yeast was elaborated. The method has satisfactory metrological characteristics.

*Key words:* riboflavin, Keggin structure heteropolyacids, ion selective electrode, the electrode-active substance.

## **ПРИМЕНЕНИЕ ГЕТЕРОПОЛИКИСЛОТ СТРУКТУРЫ КЕГГИНА ДЛЯ ИОНОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РИБОФЛАВИНА**

**Н. Панасюк, Я. Ткаченко, В. Ткач**

*ГВУЗ “Украинский государственный химико-технологический университет”,  
пр. Гагарина, 8, 49005 Днепропетровск, Украина,  
e-mail: neonyllap@gmail.com*

Изучено взаимодействие органического катиона рибофлавина с анионами 12-вольф-рамофосфорной, 12-молибдофосфатной, 12-кремнемолибденовой гетерополикислот методами УФ-спектроскопии и амперометрического титрования. Синтезировано электродно-активные вещества малорастворимых ассоциатов, сконструировано ионоселективные электроды и изучено их характеристики. Разработано методику ионометрического определения рибофлавина в пивных дрожжах, которая имеет удовлетворительные метрологические характеристики.

*Ключевые слова:* рибофлавин, гетерополикислоты структуры Кеггина, ионоселективный электрод, электродно-активное вещество.

Стаття надійшла до редколегії 31.05.2011

Прийнята до друку 21.12.2011