

На правах рукописи

Боев Артем Сергеевич

**ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОРМ
ВИТАМИНА В₆ С ПОМОЩЬЮ ХИМИЧЕСКИ
МОДИФИЦИРОВАННОГО ФТАЛОЦИАНИНОМ КОБАЛЬТА
ЭЛЕКТРОДА**

02.00.02 — аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск — 2008

Работа выполнена на кафедре физической и аналитической химии
Томского политехнического университета

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ: доктор химических наук,
профессор
Бакибаев Абдигали
Абдимананович

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ: доктор химических наук,
профессор Стожко
Наталья Юрьевна

кандидат химических наук,
с.н.с. Джабарова
Наиля Кашафовна

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Алтайский государственный
университет (г. Барнаул)

Защита диссертации состоится 19 ноября 2008 г. в 16.30 на заседании совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.269.04 при Томском политехническом университете по адресу: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-технической библиотеке Томского политехнического университета по адресу: г.Томск, ул. Белинского, 53.

Автореферат разослан: «___» октября 2008 г.

Ученый секретарь
совета по защите
докторских и кандидатских диссертаций
канд. хим. наук, доцент



Гиндуллина Т.М

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одним из главных направлений развития современной электроаналитической химии является разработка эффективных методов исследования и анализа органических соединений, имеющих фармацевтическое значение. Это актуально особенно в последнее время, когда на рынке все чаще появляются некачественные препараты. Создание новых, удобных в работе методик и тест-систем по контролю качества препаратов может позволить повысить качество лечения и профилактики ряда заболеваний.

Электрохимические методы характеризуются высокой чувствительностью, точностью, экспрессностью, поэтому они находят все более широкое применение, как для определения, так и для исследования свойств органических соединений, имеющих фармацевтическое значение, и создают разумную альтернативу традиционным методам анализа.

Считают, что многие проблемы вольтамперометрии связаны с электродами. Новое поколение сенсоров, которое сейчас интенсивно развивается, основано на химически модифицированных (ХМ) электродах. На поверхность электродов наносят химические соединения или полимерные пленки, которые существенным образом изменяют их способность к вольтамперометрическому отклику. Использование ХМЭ в вольтамперометрии существенно расширяет ее возможности как метода анализа.

Ранее установлены многие важные закономерности, которыми руководствуются при закреплении модификаторов на электродной поверхности. Дальнейшее развитие исследований должно быть связано с разработкой, как теоретических закономерностей, так и практического применения новых ХМЭ в анализе различных объектов.

Витамин В₆ находит широкое применение в лечении и профилактике ряда заболеваний. Однако, в связи с разными формами его существования, в аналитической химии остаются проблемы его экспрессного, селективного и чувствительного определения.

Цель работы: Разработать вольтамперометрический метод определения форм витамина В₆ в биологически активных добавках (БАД) и фармацевтических препаратах при помощи электрода, модифицированного фталоцианинами металлов.

Для достижения цели поставлены следующие основные задачи:

- исследовать закономерности окисления-восстановления форм витамина В₆ на электродах различных типов, используя метод циклической вольтамперометрии, определить условия получения аналитического сигнала;

- изучить способы модификации рабочей поверхности твердых индикаторных электродов фталоцианинами металлов с целью увеличения селективности анализа и воспроизводимости аналитического сигнала форм витамина В₆;

- исследовать влияние модификатора, природы фонового электролита, pH раствора и материала электрода на аналитический сигнал форм витамина В₆;

- исследовать антиоксидантные свойства форм витамина В₆, используя метод катодной вольтамперометрии;

–разработать методику количественного химического анализа витамина В₆ (пиридоксина) в фармацевтических препаратах и БАД методом вольтамперометрии;

Научная новизна.

1. Впервые исследованы теоретические закономерности процесса окисления витамина В₆ (пиридоксина) в условиях нестационарной диффузии на ХМЭ, осложненного наличием предшествующей химической реакции образования промежуточного комплекса с модификатором. Численным методом конечных разностей решена граничная задача процесса. Определены некоторые кинетические и термодинамические параметры процесса окисления витамина В₆ (пиридоксина) на платиновом и ХМ электродах (формальный потенциал, энергия активации, константа скорости предшествующей химической реакции, число электронов, участвующих в лимитирующей стадии электродного процесса). Предположение, что процесс отвечает СЕ механизму нашло косвенное подтверждение, в результате сравнения теоретической модели с экспериментальными данными.

2. Предложен новый способ модификации поверхности платинового электрода фталоцианином Со с помощью его адсорбции из насыщенного сернокислого раствора.

3. Впервые исследованы электроаналитические свойства различных форм витамина В₆, предложены схемы их окисления-восстановления на стеклоуглеродном, платиновом и ХМ электродах. Выявлено существенное влияние различных факторов (рН среды, материала электрода, природы фонового электролита) на их аналитические сигналы.

Практическая значимость.

На основе разработанного способа модификации поверхности платинового электрода фталоцианином Со(II) получен новый ХМЭ, который может быть использован для селективного определения форм витамина В₆ в БАД.

Предложена методика КХА витамина В₆ (пиридоксина) в биологически активных добавках и некоторых лекарственных препаратах на ХМЭ методом анодной вольтамперометрии, обладающая достаточной чувствительностью ($4,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л), воспроизводимостью и простотой в использовании.

Проведены исследования антиоксидантных свойств форм витамина В₆ и лекарственных препаратов с действующим веществом витамин В₆ (таблетки, инъекционный раствор), установлены различия в активности форм.

На защиту выносятся:

1. Результаты исследования электроаналитических свойств форм витамина В₆ методом циклической вольтамперометрии на стеклоуглеродном, платиновом и ХМ электродах.

2. Способ модификации поверхности платинового электрода фталоцианином Со из насыщенного сернокислого раствора.

3. Результаты определения некоторых кинетических и термодинамических параметров процесса окисления пиридоксина на платиновом и ХМ электродах.

4. Метод определения витамина В₆ (пиридоксина) методом вольтамперометрии на модифицированном фталоцианином Со платиновом электроде.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы докладывались и обсуждались на:

- IV Всероссийской научно-практической конференции студентов и аспирантов «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2005);
- 2nd International Symposium on RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS, (Prague, Czech Republic, 2005);
- International Conference “Chemistry, Chemical engineering and Biotechnology”, (Tomsk, 2006);
- Международная конференция молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов 2006», (Москва, 2006);
- Всероссийской научной конференции «Химия и химическая технология на рубеже тысячелетий», (Томск, 2006);
- VIII Всероссийская научно-практическая конференция студентов и аспирантов «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2007)
- Научно-технических семинарах кафедры физической и аналитической химии Томского политехнического университета;

Результаты выполненных исследований отражены в 12 печатных работах, в т.ч. в 8 тезисах докладов, 3 статьях и патенте РФ.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа изложена на 173 страницах, содержит 22 таблицы, 46 рисунков и библиографию из 125 наименований. Работа состоит из введения, четырех глав, обсуждения результатов, выводов, списка литературы и приложения.

Во введении раскрыта актуальность темы, определены цели и задачи исследования, сформулированы научная новизна и практическая значимость работы.

В первой главе приведен литературный обзор, в котором рассмотрены физико-химические свойства, биологическая роль, методы определения различных форм витамина В₆. Описаны общепринятые подходы и способы модификации электродов в электрохимическом анализе, приведены примеры их применения.

В второй главе рассмотрены теоретические закономерности электродных процессов с предшествующей реакцией образования промежуточного комплекса, описаны критерии механизма СЕ. На примере окисления витамина В₆ в присутствии фталоцианина Со(II) рассмотрен механизм СЕ с предшествующей реакцией образования промежуточного комплекса в условиях нестационарной полубесконечной диффузии. Численным методом конечных разностей решена граничная задача процесса.

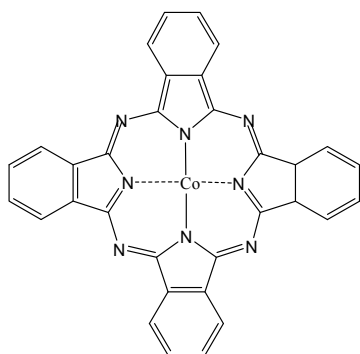
В третьей главе описаны условия эксперимента, способы приготовления растворов и модификации электродов, представлены данные об используемом оборудовании и объектах исследования. Исследованы электрохимические свойства форм витамина В₆ на различных видах электродов, предположительные механизмы окисления разных форм витамина В₆ на платиновом и ХМ электродах. Рассмотрено влияние материала электрода, различных фоновых электролитов, pH раствора на электрохимические свойства форм витаминов группы В₆. Определены некоторые кинетические и термодинамические параметры процесса.

В четвертой главе предложена методика определения витамина В₆ методом вольтамперометрии, рассчитаны ее метрологические характеристики.

Основное содержание работы

Исследования проводили на полярографе ПУ–1 (Белоруссия г. Гомель) с двухкоординатным самописцем ЛКД–4 и компьютеризованном вольтамперометрическом анализаторе ТА–2 («Техноаналит» г. Томск). В работе использовали метод анодной и циклической вольтамперометрии в постоянноточковом и дифференциально-импульсном режимах. Вольтамперограммы обрабатывались в компьютерной программе ASSAER.

Вольтамперограммы исследуемых растворов регистрировали на стационарных электродах с линейной либо дифференциально-импульсной разверткой потенциала с варьируемой скоростью 20–250 мВ/с. В качестве фонового электролита использовался фосфатный буфер Na₂HPO₄ (pH=6,86). Использовалась трех-электродная электрохимическая ячейка, состоящая из рабочего электрода, хлорид-серебряного электрода (ХСЭ) сравнения и вспомогательного ХСЭ.



Фталоцианин Co(II)

Фталоцианины металлов, как развитые электронные структуры, очень широко используют в различных химических процессах как катализаторы, их достаточно часто применяют для создания химически модифицированных электродов, что приводит к улучшению метрологических характеристик методик определения различных веществ. Однако механизм влияния модификаторов на аналитический сигнал исследуемых веществ остается спорным.

Модификация электрода

В работе большое внимание уделено выбору электрода для количественного определения форм витамина В₆. Для поиска аналитического сигнала и получения желаемых метрологических характеристик методики количественного определения витамина В₆ были использованы шесть видов твердых электродов: платиновый, стеклоуглеродный, золотографитовый, графитовый, ртутно-пленочный электрод, и модифицированный фталоцианинами металлов (платиновый, графитовый, стеклоуглеродный) электрод. Основываясь на физико-химических свойствах фталоцианинов,

предложен способ модификации поверхности твердых электродов фталоцианинами металлов из сернокислых растворов металлокомплексов. Для модификации поверхности электродов использовались фталоцианины Cu, Co, Ni.

Схему обработки рабочей поверхности индикаторного электрода можно разложить на следующие стадии:

1. Обработка поверхности платинового электрода азотной кислотой для удаления всевозможных органических и неорганических загрязнителей.

2. Удаление азотной кислоты, промывание электрода дистиллированной водой, сушка поверхности.

3. Нанесение фталоцианина металла на платиновый электрод посредством сил адсорбции, из насыщенного раствора данного металлокомплекса в серной кислоте.

4. Чтобы закрепить модификатор на подложке электрода, удаляется серная кислота посредством кратковременного погружения рабочей поверхности электрода в дистиллированную воду.

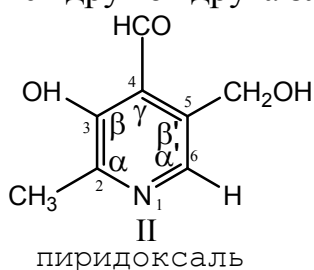
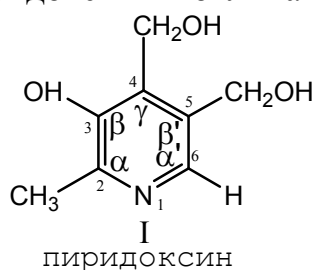
5. После этого, электрод сушится до полного высыхания в термостатируемом шкафу при температуре не более 100 °С.

Визуально и снятием емкостных кривых установлено, что модификация рабочей поверхности графитового, платинового электродов из сернокислых растворов упомянутых фталоцианинов проходит успешно. Модифицированный графитовый электрод показывал стабильные характеристики при воспроизводимости фоновых кривых и низкий фоновый ток.

Результаты исследований

Объекты исследования

В качестве объектов исследования были выбраны производные 3-оксипиридина (формы витамина В₆), объединяемых общим названием "пиридоксин" и отличающихся друг от друга заместителями в положении 4.



Возможность аналитического применения методики определения витамина В₆ была рассмотрена на медицинских препаратах и продуктах питания:

Раствор пиридоксина гидрохлорида 5%;

Таблетки «Пиридоксин гидрохлорид»;

Биологически активная добавка «Дрожжи Пивные»;

Восстановленные фруктовые соки.

Влияние материала электрода, pH раствора, природы фонового электролита на электроаналитические свойства форм витаминов группы В₆.

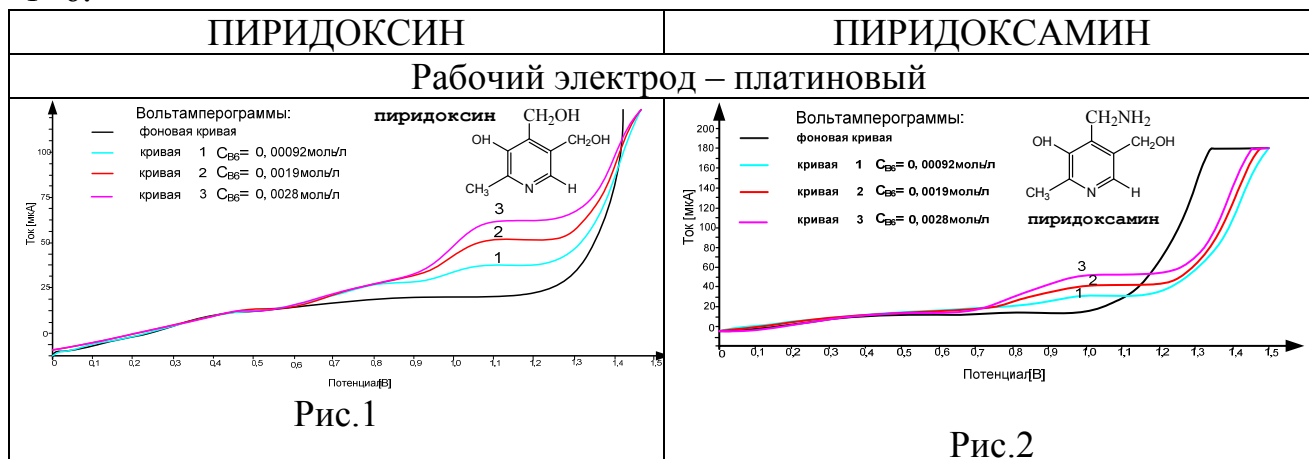
Изучено влияние материала электрода на аналитический сигнал пиридоксина. Потенциалы окисления разных форм витамина В₆ на платиновом, стеклоуглеродном и ХМ электродах представлены в Таблице 1. На остальных электродах (графитовый, золотографитовый, графитовый модифицированный фталоцианинами Со, Сu, Ni, ртутно-пленочный) сигнал отсутствовал. Созданные на основе фталоцианинов Сu, Ni электроды, не привели к положительным результатам. Использование в качестве модификатора фталоцианина Со(II), напротив, оказывает положительный эффект на процесс окисления пиридоксина протекающего на электроде. Наблюдается увеличение аналитического сигнала на 45% по сравнению с платиновым электродом при одинаковых условиях эксперимента. Это стало одной из причин предположения, что электродный процесс протекает по СЕ механизму с предшествующей химической реакцией образования промежуточного комплекса между модификатором и витамином.

Таблица 1.

Влияние материала электрода на электрохимические свойства форм витаминов группы В₆.

	Структурные формы витамина В ₆		
Условия эксперимента	Пиридоксин гидрохлорид	Пиридоксаль гидрохлорид	Пиридоксамин дихлорид
Фоновый электролит	Фосфатный буфер pH=6.86		
электроды	$E_{\text{пика}}$ (В)		
1. Платиновый	+1,10 (рис.1)	сигнал отсутствует	+1,00 (рис.2)
2. Стеклоуглеродный	+0,90 (рис.2)		+1,00 (рис. 4)
3. Модифицированный фталоцианином Со(II)	+0,85 (рис.3)		+1,03 (рис.6)

Для исследования электроаналитических свойств форм витамина В₆ были сняты циклические вольтамперограммы при $V=40\text{ мВ/с}$, представленные на рис. 1 -6.



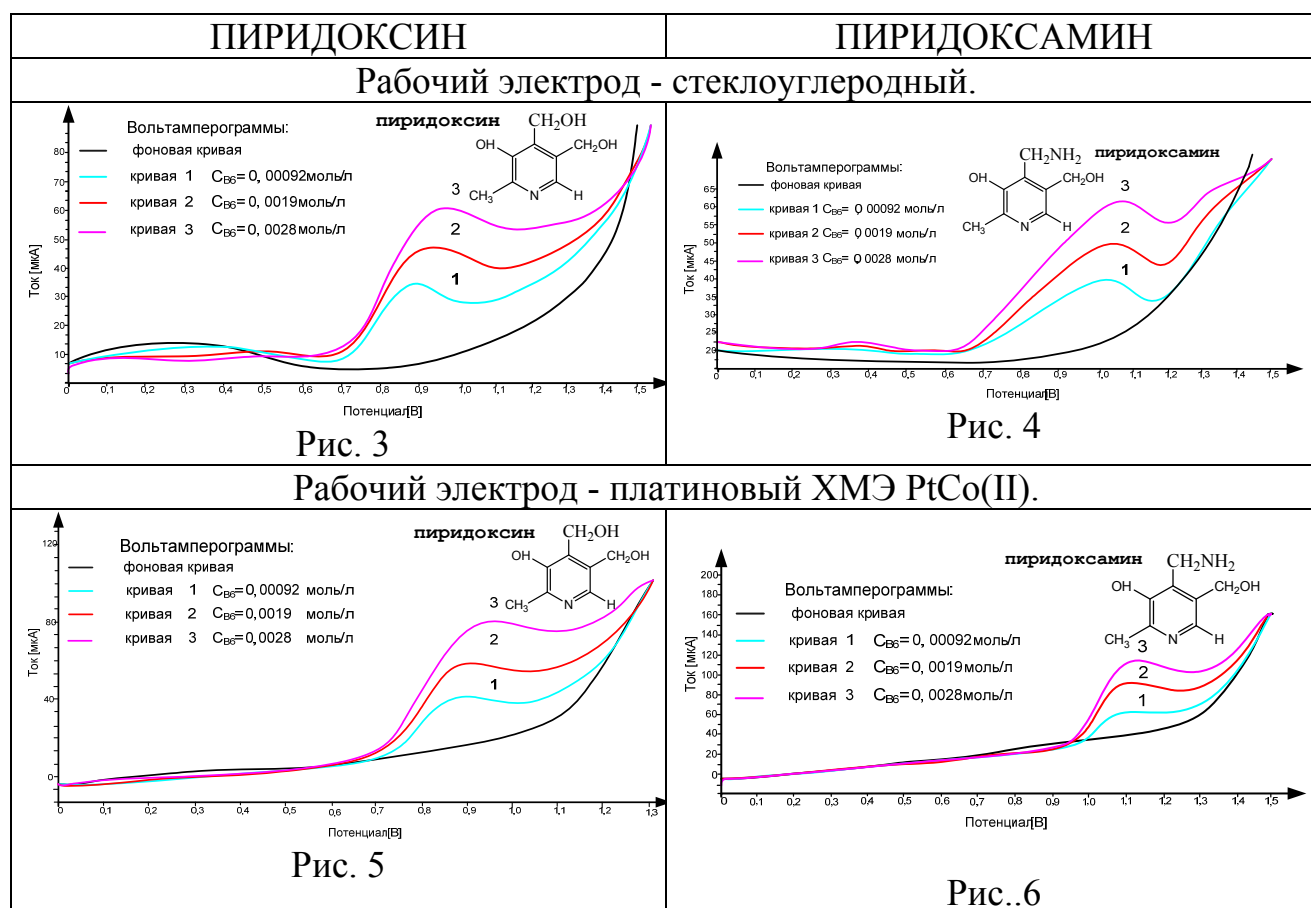


Рис.(1,2,3,4,5,6) Вольтамперограммы окисления форм витамина В₆ на разных типах электродов в зависимости от концентрации витамина в растворе.

При оценке влияния природы фоновой электролита и рН для аналитического определения витамина В₆ использовались следующие буферные растворы:

- рН= 4.01 калий фталевокислый кислый
- рН= 6.86 калий дигидрофосфат, натрий гидрофосфат
- рН= 9.18 натрий тетраборнокислый

В качестве рабочих электродов в дальнейших экспериментах использовались платиновый, модифицированный фталоцианином Со(II) платиновый и стеклоуглеродный электроды. Результаты исследования представлены в Таблице 2.

Таблица 2.

Влияние рН на аналитический сигнал пиридоксина гидрохлорида.

Пиридоксин		
Электроды	Диапазоны исследуемого рН	
1. Платиновый	рН=4.01-6.86 С уменьшением рН наблюдается увеличение предельного тока и уменьшение ширины пика. Уменьшение рН в сторону кислотной среды приводит к смещению потенциала пика в положительную сторону.	
2. Стеклоуглеродный		
3. Модифицированный фталоцианином Со(II) платиновый электрод		
		рН=9.18 Сигнал уменьшается по величине, превращается в волну

Были проведены подобные исследования для другой формы витамина В₆ – пиридоксамина. В Таблице 3 приведены результаты влияния рН на аналитический сигнал пиридоксамина.

Таблица 3.

Влияние рН на аналитический сигнал пиридоксамина.

Пиридоксамин	
Электроды	Диапазоны исследуемого рН
1. стеклоуглеродный	рН=4.01-9,18 Получение аналитического сигнала возможно во всем указанном диапазоне, но пики получаемы при рН=4.01, рН=9,18 имеют более удобную для оценивания форму, чем пики, получаемые при нейтральной среде. Уменьшение рН в сторону кислотной среды приводит к смещению потенциала пика в положительную сторону.
2. Платиновый	рН=4.01-6.86 С уменьшение рН наблюдается увеличение предельного тока и уменьшение ширины пика. Уменьшение рН в сторону кислотной среды приводит к смещению потенциала пика в положительную сторону.
3. Модифицированный фталоцианином Со(II) платиновый электрод	рН=9.18 Сигнал уменьшается по величине, превращается в волну

Обе формы витамина В₆ являются стабильными в нейтральной и кислотной среде, в щелочной среде разрушаются под действием света.

Основываясь на полученных данных и свойствах форм витамина В₆, можно рекомендовать для определения пиридоксина и пиридоксамина кислую и нейтральные среды, в частности с успехом могут быть использованы буферные смеси с рН= 6.86, рН=4.01.

Влияние способа иммобилизации фталоцианина Со(II) на электрохимические свойства форм витамина В₆.

Для получения наилучшего аналитического сигнала витамина В₆, были применены следующие способы его введения в систему:

1. Модификация платинового электрода из сернокислого насыщенного раствора фталоцианина Со(II) посредством адсорбции;
2. Электрохимическое нанесение фталоцианина Со(II);
3. Добавка определенной концентрации фталоцианина Со(II) в ячейку во время измерения.

Первый способ модификации электрода посредством адсорбции оказался наиболее удачным и простым. Он показал наилучшие результаты. После модификации поверхность электрода покрывалась равномерным слоем адсорбировавшегося модификатора. Удаление модификатора для обновления поверхности рабочего электрода также осуществлялось простым окунанием в сернокислый раствор и растворением модификатора с поверхности электрода в нем. При необходимости обновления поверхности, операция повторяется и при этом толщина образующейся пленки одинакова.

Исследование схем окисления разных форм витамина В₆ на платиновом и ХМ электродах.

Для оценки предположительных механизмов окисления различных форм витамина В₆ на платиновом и ХМ электродах были рассмотрены вольтамперограммы окисления пиридоксина рис. (1,3) и пиридоксамина рис. (4,6).

Анализируя полученные сигналы пиридоксина гидрохлорида и пиридоксамина дихлорида на платиновом и ХМ электродах можно сделать вывод, что электрохимическая реакция протекает при непосредственном участии заместителей в положении (4) R=CH₂OH у пиридоксина и R=CH₂NH₂ у пиридоксамина. У третьей из исследуемых форм витамина В₆ пиридоксаль R=CHO, группа в положении (4), не проявляет электрохимической активности в интересующей нас области потенциала, с помощью используемых электродов.

Отсутствие сигнала у пиридоксаль подтверждает гипотезу о том, что активной группой у пиридоксина и пиридоксамина являются —CH₂OH и —CH₂NH₂ соответственно, остальные функциональные группы у этих трех форм витамина идентичны.

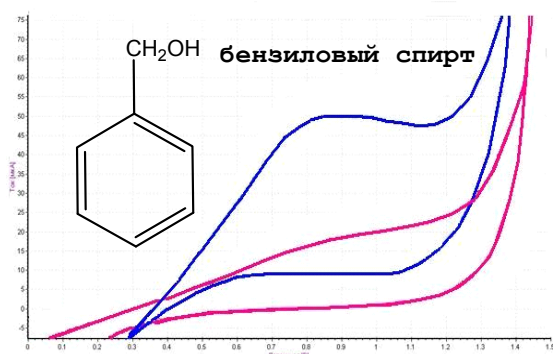


Рис. 7. Вольтамперограмма окисления бензилового спирта, на ХМЭ PtCo(II).

Для подтверждения вышеизложенной гипотезы нами был исследован бензиловый спирт, как вещество, имеющее схожее строение с пиридоксином, он так же имеет R=CH₂OH функциональную группу рис. 7.

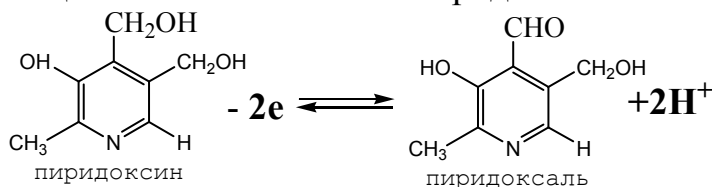
На полученной вольтамперограмме обнаружен сигнал бензилового спирта в ожидаемой области потенциалов.

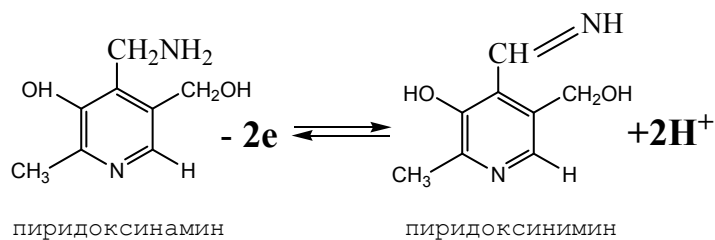
Это доказывает, что реакция протекает по группе (4) у пиридоксина, а следовательно

схемы протекания окисления пиридоксина и бензилового спирта на ХМЭ фталоцианином Со(II) платиновом электроде подобны.

Предположительная схема окисления пиридоксина и пиридоксамина на платиновом электроде.

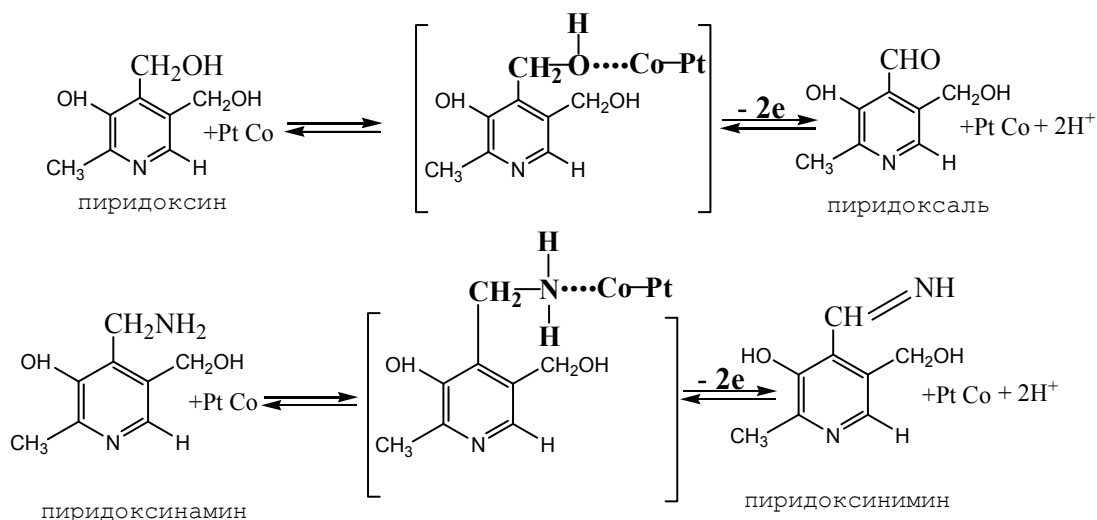
Основываясь на результатах исследований можно предположить следующую схему окисления веществ группы витамина В₆ на платиновом и модифицированном фталоцианином кобальта электродах:





Наиболее вероятная схема окисления пиридоксина идет путем отрыва двух ионов водорода от заместителя в положении (4), при участии двух электронов. Конечные продукты реакции не являются электроактивными в данных условиях эксперимента. В ходе протекания реакции хемосорбция водорода на платинном электроде будет способствовать протеканию реакции в прямом направлении. Поэтому сигнал, полученный в кислых и нейтральных средах, является более воспроизводимым и чувствительным.

Предположительные схемы окисления пиридоксина и пиридоксамина на модифицированном фталоцианином Co(II) платиновом электроде



Процесс окисления пиридоксина и пиридоксамина на ХМ электроде проходит через образование промежуточного комплекса фталоцианина кобальта и исходного вещества. Электрохимическая реакция протекает по той же функциональной группе, с отдачей двух ионов водорода и двух электронов, и образованием двойной связи в функциональной группе в положении (4).

Определение энергии активации процесса окисления пиридоксина.

Из литературных данных известно, что фталоцианин Co(II) оказывает влияние на процесс окисления пиридоксина образуя промежуточный комплекс, облегчающий процесс окисления.

Энергия активации процесса окисления пиридоксина (табл. 4) оказалась меньше на электроде, модифицированном фталоцианином Co(II), по сравнению с платиновым электродом, что является косвенным доказательством образования промежуточного комплекса между фталоцианином Co(II) и пиридоксином. Однако, разница между полученными E_a незначительна, что указывает на однотипность механизма окисления на двух типах электродов. Энергия активации оценивалась по зависимости предельного тока окисления I_{ox}

от изменения температуры протекания реакции в соответствии с уравнением Аррениуса.

Таблица 4.

Энергия активации процесса окисления пиридоксина на двух типах электродов.

Материал электрода	E_a
Платиновый	34,5 КДж/моль
Модифицированный платиновый	22,8 КДж/моль

Полученное абсолютное значение E_a указывает на смешанную кинетику протекания процесса окисления пиридоксина, контролируемого как массопереносом, так и собственно электрохимической стадией.

Кулонометрическое определение числа переносимых электронов участвующих в протекающей на рабочем электроде реакции

Соответствующие измерения были проведены основываясь на законах Фарадея с тремя индикаторными электродами. Вольтамперометрический комплекс ТА-2, позволяет остановить изменение потенциала в любой точке заданного диапазона, и регистрировать зависимость тока (I) от времени (t), площадь интеграла под кривой ток-время является регистрируемым сигналом.

Для расчета использовали формулу:

$n = \frac{Q}{\nu F}$	где Q - количество электричества, перенесенного в ходе электрохимического процесса, n - число электронов, участвующих в электрохимической реакции, ν - количество исходного вещества в растворе электролита.
-----------------------	--

Пиридоксин гидрохлорид – исходное вещество, окисляющееся на индикаторном электроде. Процесс идет при постоянном перемешивании и неизменном потенциале, и протекает до нуля по току. На рис. 8 показаны зависимости для двух концентраций исходного вещества в ячейке на ХМ фталоцианином Со(II) платиновом электроде

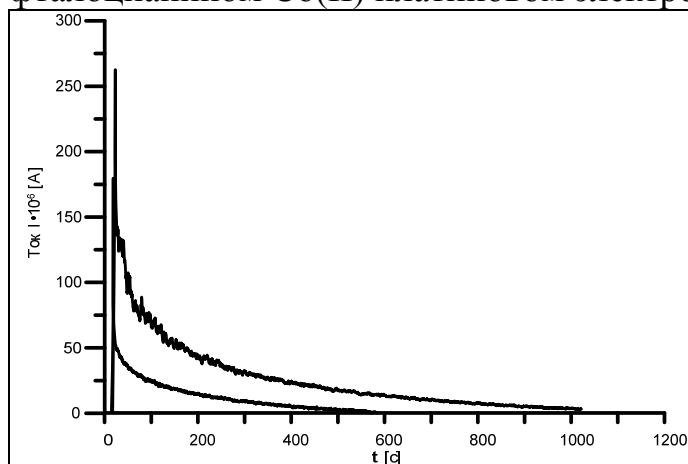


Рис. 8. Зависимость ток-время процесса окисления пиридоксина на ХМ фталоцианином Со(II) платиновом электроде.

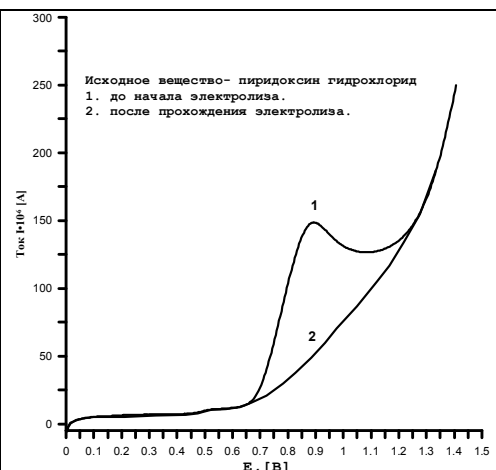


Рис. 9. Вольтамперограмма окисления пиридоксина гидрохлорида, до и после электролиза.

Для проведения эксперимента, выбирается минимально возможный объем ячейки и концентрация реагирующего вещества витамина В₆, данные условия в совокупности с вольтамперограммой окисления пиридоксина

гидрохлорида, до и после электролиза представленной на рис. 9 (кривая 2), позволяют утверждать, что вещество полностью окислилось на электроде.

Определение числа переносимых электронов, участвующих в протекающей на рабочем электроде реакции, было проведено для трех исследуемых электродов, Результаты приведены в Таблице 5.

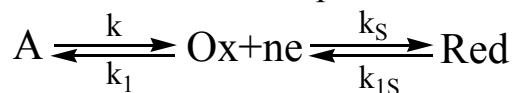
Таблица 5.

Число электронов, участвующих в лимитирующей стадии окисления пиридоксина на трех типах электродов.

Индикаторный электрод	Число электронов
Стеклоуглеродный	1,9 (≈ 2)
Платиновый	1,8 (≈ 2)
ХМ PtCo(II) платиновый электрод	1,8 (≈ 2)

Для теоретического обоснования полученных результатов и определения некоторых кинетических и термодинамических параметров процесса была поставлена граничная задача для квазиобратимого электродного процесса окисления витамина В₆ на ХМЭ в условиях наличия предшествующей химической реакции псевдопервого порядка по схеме СЕ.

В общем виде данный механизм можно представить в виде:



Постановка задачи.

$$\frac{\partial C_A(x,t)}{\partial t} = D_A \frac{\partial^2 C_A(x,t)}{\partial x^2} - k C_A(x,t) \quad 1 < x < \infty$$

$$\frac{\partial C_{Ox}(x,t)}{\partial t} = D_{Ox} \frac{\partial^2 C_{Ox}(x,t)}{\partial x^2} + k C_A(x,t), \quad 1 < x < \infty$$

Граничные условия имели следующий вид:

$$1. \quad t=0, x \geq 0, \frac{C_{Ox}(x,0)}{C_A(x,0)} = \frac{k}{k_1} = K, C_{Red}=0. C_{Ox}(x,0) + C_A(x,0) = C^0,$$

$$2. \quad t > 0, x \rightarrow \infty \quad C_{Ox}(x,t) + C_A(x,t) \rightarrow C^0 \quad \frac{C_{Ox}(x,t)}{C_A(x,t)} = K = \frac{k}{k_1} \rightarrow \infty \quad C_{Red} \rightarrow 0$$

$$3. \quad D_A \left[\frac{\partial C_A(x,t)}{\partial x} \right]_{x=l} = - D_{Ox} \left[\frac{\partial C_{Ox}(x,t)}{\partial x} \right]_{x=l}$$

$$4. \quad t > 0, x=l, D_{Ox} \frac{\partial C_{Ox}}{\partial x} = k C_{Ox} = k_i C_{Ox} \exp(bt)$$

$$\text{где } b = \frac{an_a FV}{RT}, \quad k_i = k_s \exp \left[\left(-\frac{an_a F}{RT} \right) (E_i - E^o) \right]$$

Данная задача была решена численным методом конечных разностей с использованием пакета программ «Fortran 90»*. Полученные теоретические вольтамперограммы сравнивались с экспериментальными рис. 10, результаты

* Результаты поставленной задачи, получены при непосредственном участии доцента каф. общей физики Ка-таева Сергея Григорьевича

сопоставимы, особенно в области малых скоростей развертки потенциала (0.02 В/с.), которые выбраны рабочими для методики количественного химического анализа витамина В₆, что косвенно подтверждает заложенный в основу механизм протекания процесса.

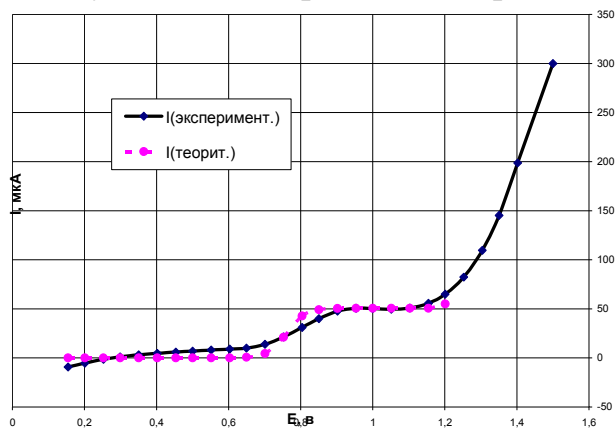


Рис. 10 Экспериментальная и теоретическая вольтамперограммы окисления пиридоксина на ХМЭ фталоцианином Со(II) электроде, при $V = 20$ мВ/с, $C_{B_6} = 0.00092$ моль/л.

Корреляция между теоретической и экспериментальной вольтамперограммой оценивалась по коэффициенту детерминации (D), также рассчитывались значения средне- квадратичного отклонения (СКО) между теоретическими и экспериментальными значениями тока для разных скоростей развертки потенциала, которые сравнивались с дисперсией воспроизводимости эксперимента (табл. 6).

Используя полученные результаты и взяв за исходные параметры толщину слоя модификатора (L), коэффициент диффузии деполяризатора (D_{ox}), константу равновесия предшествующей химической реакции (K), были определены константа скорости предшествующей химической реакции образования промежуточного комплекса (k , с⁻¹), формальный потенциал процесса (E_o , В) представленные в табл. 6. Определена также константа скорости лимитирующей стадии электродного процесса (k_s , см/с). Ее значение указывает на квазиобратимый характер протекания электродного процесса, что совпадает с экспериментальными данными.

Таблица 6.

Исходные, расчетные кинетические и термодинамические параметры процесса.

Исходные параметры						
L (см)	D_{ox} (см ² /с)	C_0 (моль/л)	S (см ²)	K		
0.8	$1 \cdot 10^{-5}$	0.00092	0.196	10^{10}		
Расчетные параметры						
N	E_0 (В)	k_s (см/с)	k (с ⁻¹)	D	СКО	$S^2_{\text{восп}}$
V=0.02 в/с						
10	1.22	$1 \cdot 10^{-3}$	3.26	0.96	7.43	9.57
V=0.07 в/с						
10	1.22	$1 \cdot 10^{-3}$	6.8	0.89	9.48	9.8

Из полученных данных следует, что в данных условиях эксперимента химическая реакция протекает с более высокой скоростью, чем электрохимическая, которая лимитирует процесс в целом. По результатам исследований определены оптимальные условия получения аналитического сигнала витамина В₆.

На основании проведенных исследований разработана методика определения витамина В₆ на ХМЭ в биологически активных добавках,

препаратах фармацевтического назначения, отличающаяся высокой селективностью и воспроизводимостью сигнала.

Методика определения витамина В₆ методом вольтамперометрии.

Полученные пики окисления форм витамина В₆ (рис. 1-6) можно использовать в качестве аналитических сигналов для разработки методик их количественного определения в составах, где преимущественно присутствует пиридоксин, либо пиридоксамин, а так же для их суммарного количественного определения методом вольтамперометрии в многокомпонентных смесях.

Методика определения заключается в съемке вольтамперограмм окисления форм витамина В₆ (пиридоксина, пиридоксамина) на химически модифицированном фталоцианином кобальта электроде в трех-электродной электрохимической ячейке при скорости развертки потенциала 40 мВ/с, в фоновом электролите фосфатного буфера (рН=6.86).

Для оценки метрологических характеристик методики рассмотрен аналитический сигнал пиридоксина гидрохлорида ($E=0,85$ В) при анодной развертке потенциала, в диапазоне концентраций $4,6 \cdot 10^{-4}$ - $4,32 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Калибровочная зависимость тока окисления пиридоксина от его концентрации в ячейке в условиях постоянно токовой вольтамперометрии для модифицированного платинового электрода приведена на рис. 11.

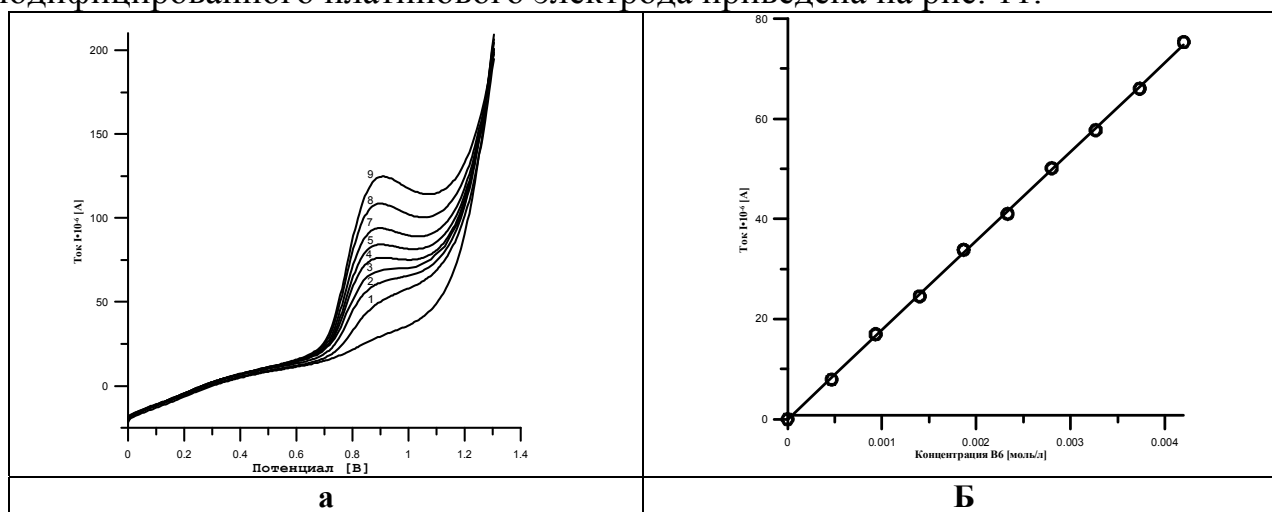


Рис. 11. а) Вольтамперограмма тока окисления пиридоксина гидрохлорида в зависимости от его концентрации в растворе в оптимальных условиях эксперимента, б). Калибровочная зависимость тока окисления пиридоксина от его концентрации в ячейке для ХМ фталоцианином Со(II) платинового электрода

Метрологические характеристики методики количественного химического анализа (КХА).

При рассмотрении численных значений метрологических показателей методики (табл. 7.) можно заметить, что идет возрастание значений показателя повторяемости (σr), воспроизводимости (σR), точности результатов измерения ($\pm \Delta$) при возрастании концентрации пиридоксина гидрохлорида в ячейке. Изменение качественных характеристик МВИ не носит линейный характер (рис. 12).

Рассчитаны показатели повторяемости, воспроизводимости, точности результатов измерения методики определения пиридоксина (табл. 7).

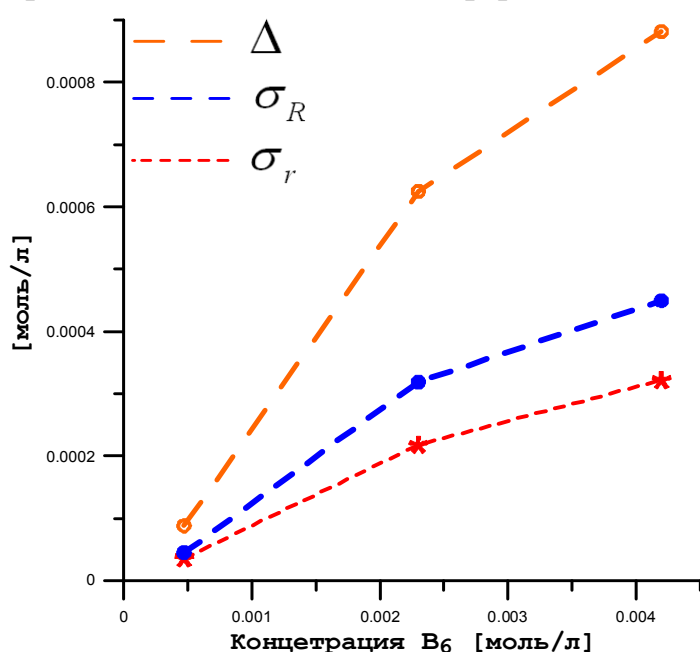
Проверена правильность методики методом «введено-найдено».

Таблица 7.

Показатели качества методики анализа.

моль/л	σ_r	σ_R	r	R	$\pm\Delta$
0,00047	$3,6 \cdot 10^{-5}$	$4,5 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$8,8 \cdot 10^{-5}$
0,0023	$2,2 \cdot 10^{-4}$	$3,2 \cdot 10^{-4}$	$7,2 \cdot 10^{-4}$	$8,9 \cdot 10^{-4}$	$6,3 \cdot 10^{-4}$
0,0042	$3,2 \cdot 10^{-4}$	$4,5 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$8,8 \cdot 10^{-4}$

Предел обнаружения разработанной методики $C=4,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л достаточен для применения ее в пищевой и фармацевтической промышленности.



$\sigma_r \approx S_{rm}$ — значение показателя повторяемости для результатов, полученных по методике в конкретной лаборатории,

r — показатель повторяемости методики анализа в виде предела повторяемости

$\sigma_R \approx S_{Rm}$ — значение показателя промежуточной прецизионности результатов, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности,

R — предел воспроизводимости для двух результатов анализа

$\pm\Delta_c$ — показатель правильности или систематическая погрешность лаборатории при реализации методики,

$\pm\Delta$ — показатель точности результатов измерения.

Рис. 12. Значение качественных характеристик МВИ по диапазонам.

Таблица 8

Применение методики КХА витамина В₆ на реальных объектах

Анализируемая проба	Концентрация заявленная производителем, (г/мл)	Найдено по методу добавок, n=3, (г/мл)
ВИТАМИН В ₆ (раствор пиридоксина гидрохлорида для инъекций)	0,05	$0,052 \pm 0,012$
	Содержание заявленное производителем (г в 1 таблетке)	Найдено по методу добавок, n=3. (г в 1 таблетке)
Таблетки Пиридоксин гидрохлорид	0,01	$0,0093 \pm 0,0023$
БАД «Пивные дрожжи» (содержание 0,04)	0,004	$0,0040 \pm 0,0018$

В работе было исследовано мешающее влияние ряда веществ на аналитический сигнал витамина В₆ ($4 \cdot 10^{-4}$ моль/л), особенно витаминов группы В. Показано, что присутствие 10-кратной концентрация витаминов В₁, В₁₂ и 20-

кратной концентрации витамина С не оказывает существенного влияния на ток окисления витамина В₆. Результаты приведены в Таблице 9.

Таблица 9

Влияние витаминов группы В и С на аналитический сигнал витамина В₆ ($4 \cdot 10^{-4}$ моль/л) при их совместном присутствии

Название витаминов	Допустимый уровень (моль/л)	Ошибка относительно модельного сигнала пиридоксина (%)	
		ХМЭ	платиновый
Витамин В ₁ , В ₁₂	$4 \cdot 10^{-3}$	5.0	8.0
Витамин С	$8 \cdot 10^{-3}$		

Определение антиоксидантных свойств форм витамина В₆

В данном разделе представляло интерес изучить антиоксидантные свойства витамина В₆ в зависимости от его структуры, а также его лекарственных форм.

Для исследования антиоксидантной активности препаратов были сняты вольтамперограммы предельного тока ЭВ О₂ в присутствии исследуемых веществ в растворе. Проведенные исследования показали уменьшение предельного тока катодного восстановления кислорода при добавлении витамина В₆ в раствор (рис. 13). По-видимому, это связано с взаимодействием исследуемых веществ с продуктами восстановления кислорода. Об эффекте взаимодействия и антиоксидантном влиянии говорит и сдвиг потенциала волны ЭВ О₂ в положительную область при добавлении Витамина В₆ в раствор фоновое электролита.

Для оценки антиоксидантной активности исследуемых веществ были построены зависимости относительного изменения предельного тока ЭВ О₂ от времени взаимодействия вещества с активными кислородными радикалами

$$\left(1 - \frac{I_i}{I_0}\right) = f(t) \text{ (рис. 14).}$$

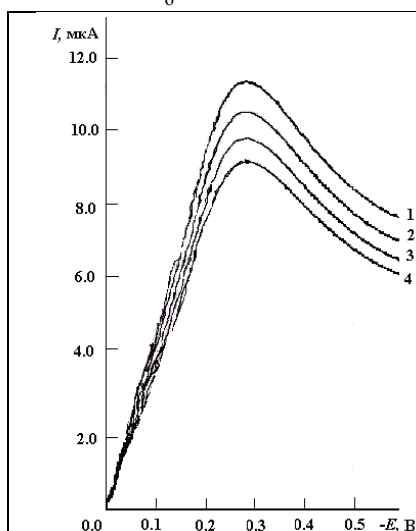


Рис. 13 Вольтамперограммы тока ЭВ О₂ на РПЭ в фоновом электролите в отсутствие (1) и в присутствии 5.0 мг/мл пиридоксина гидрохлорида: при t : 10 мин (2), 20 мин (3), 30 мин (4).

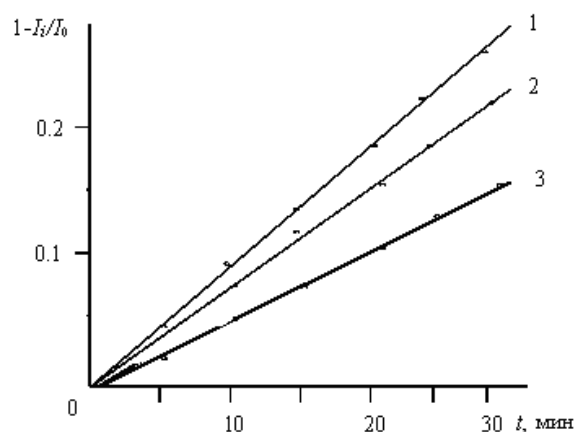


Рис. 14 Зависимость относительного изменения тока ЭВ О₂ от времени протекания процесса в фоновом электролите в присутствии 5.0 мг/мл: пиридоксина гидрохлорида (1); пиридоксамин гидрохлорида (2) и пиридоксаль гидрохлорида (3).

Степень уменьшения тока ЭВ O₂ является показателем антиоксидантной активности исследуемых веществ. По тангенсу угла наклона полученных зависимостей определены коэффициенты антиоксидантной активности веществ по кинетическому критерию $K_{кин}$:

$K_{кин} = \left(1 - \frac{I_i}{I_0}\right) \cdot \frac{C_{O_2}^0}{t}$	где I_i - ток ЭВ O ₂ в присутствии АО в растворе, мкА, I_0 - ток ЭВ O ₂ в отсутствии АО в растворе, мкА; $C_{O_2}^0$ - исходная концентрация кислорода в растворе, мкмоль/л, t - время протекания реакции взаимодействия антиоксиданта с активными кислородными радикалами, мин.
--	---

В табл. 10 приведены коэффициенты АОА исследуемых веществ.

Таблица 10

Коэффициенты антиоксидантной активности
исследуемых веществ (n=5, p=0.95)

С, мг/мл	$K_{кин}$, мкмоль/л·мин			
	пиридоксаль гидрохлорид	пиридоксин гидрохлорид	пиридоксамин гидрохлорид	аскорбиновая кислота
5.0	0.19±0.024	0.39±0.081	0.27±0.053	
1.0	0.17±0.031	0.35±0.075	0.25±0.015	1.43±0.12
0.5	0.13±0.049	0.34±0.098	0.21±0.038	1.38±0.24
0.1	0.09±0.026	0.32±0.054	0.17±0.041	1.15±0.18
0.05	0.04±0.057	0.21±0.073	0.13±0.020	0.68±0.041
0.01	0.07±0.064	0.17±0.022	0.12±0.029	

Анализ полученных результатов показывает, что исследуемые соединения обладают близкой по значению антиоксидантной активностью, поскольку имеют сходные фрагменты в структуре своих молекул. Однако антиоксидантная активность всех форм витамина В₆, как видно из таблицы 3, намного меньше антиоксидантной активности аскорбиновой кислоты. Следует также отметить, что наибольшей антиоксидантной активностью обладает пиридоксин гидрохлорид, который применяется в изготовлении фармпрепаратов.

ВЫВОДЫ

1. Исследованы физико-химические закономерности процесса окисления витамина В₆ (пиридоксина) в условиях нестационарной диффузии на химически модифицированном электроде, осложненного наличием предшествующей химической реакции образования промежуточного комплекса с модификатором. Численным методом конечных разностей решена граничная задача процесса. Рассчитаны некоторые кинетические и термодинамические параметры процесса. Дано теоретическое обоснование механизма окисления витамина В₆ (пиридоксина) на химически модифицированном электроде. Сделано предположение, что процесс отвечает СЕ механизму.

2. На основе исследования способов модификации поверхности платинового электрода фталоцианинами металлов, разработан новый электрод, химически модифицированный фталоцианином Со, для определения витамина В₆ в объектах.

3. Исследовано влияние различных факторов (рН, материала электрода, способа модификации, природа фонового электролита) на аналитический

сигнал витамина В₆ (пиридоксина). Определены оптимальные условия получения аналитического сигнала.

4. Исследованы электрохимические свойства форм витамина В₆ (пиридоксина, пиридоксамина и пиридоксаля) методом циклической вольтамперометрии на стеклоуглеродном, платиновом и химически модифицированных электродах. Определены предположительные схемы их окисления-восстановления.

5. Исследованы антиоксидантные свойства форм витамина В₆ методом вольтамперометрии на основе модельного процесса электровосстановления кислорода

6. Разработана методика определения витамина В₆ (пиридоксина) методом вольтамперометрии на платиновом электроде, модифицированном фталоцианином Со. Проведена оценка метрологических характеристик методики.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. И.В. Севастьянова, А.С. Боев Использование фталоцианина Со для создания сенсора для определения витамина В₆. Тез. докл. IV Всерос. научно практической конф. студентов и аспирантов «Химия и химическая технология в XXI веке» 11-12 мая 2005г. Томск с.189.

2. E.I. Korotkova, A.S. Boev, A.A. Bakibaev New voltammetric sencor with phthalocyanine Co for the В₆ vitamin determination in food additives.// Book of Abstracts, 2nd International Symposium on RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS, Prague, Czech Republic, November 2-4, 2005 p. 71.

3. E.I. Korotkova, A.S. Boev, A.A. Bakibaev The total antioxidant activity determination of some food additives by voltammetry.// Book of Abstracts, 2nd International Symposium on RECENT ADVANCES IN FOOD ANALYSIS, Prague, Czech Republic, November 2-4, 2005 p. 83.

4. Е.И. Короткова, А.С. Боев, В.И. Чернов, А.Н Мержа. Новый вольтамперометрический комплекс для определения антиоксидантной активности биологически активных веществ.// Тез. докл. 2-ой Всероссийской конференции «Аналитические приборы 2005» 27 июня - 1 июля 2005г. г Санкт-Петербург с.102

5. А.С. Боев, М.А. Гавриленко Комплексообразование при модифицировании полиэтиленгликолевых хроматографических фаз ацетилацетонатами металлов // Известия Томского политехнического университета, №6, 2005. с. 108-112

6. A.S. Boev, E.I. Korotkova, A.A. Bakibaev. Voltammetric method of В₆ vitamin determination.// Inter. Congress on Analytical Sciences ICAS-2006. June 25-30 2006, Moscow, Russia.- Book of abstracts, Moscow, Russia, 2006. v.1, p.277.

7. A.S. Boev, E.I. Korotkova, A.A. Bakibaev. Voltammetric method of В₆ vitamin determination. // Book of abstracts. Inter. conf. "Chemistry, Chemical engineering and Biotechnology", Tomsk, 11 – 16 September 2006.- Book of abstracts v.2. p. 165-166.

8. А.С. Боев, Вольтамперометрический сенсор с фталоцианином Со для определения витамина В₆ в БАД.// Тез. докл. Международная конференция молодых ученых по фундаментальным наукам "ЛОМОНОСОВ-2006" – ХИМИЯ 12-15 апреля 2006г. г.Москва с.12.

9. M.A. Gavrilenko, A.S. Boev, A.G. Kuzmina Gas-chromatographic separation of phenols on nickel, copper and zinc diethyldithiocarbamates // Mendeleev Communication, 2006. №4.p.121-122

10. А.С. Боев, Е.И. Короткова, А.А. Бакибаев. Вольтамперометрическое определение пиридоксина, при помощи модифицированного платинового электрода.// Тез. докл. VIII Всероссийская научно-практическая конференция студентов и аспирантов «Химия и химическая технология в XXI веке», Томск, 14–15 мая 2007 г. с 197-198.

11. А.С. Боев, Е.И. Короткова, А.А. Бакибаев., Д.М. Медведев, Способ определения витамина В₆ в биологически активных добавках.// Патент на изобретение № 2322665, 2008г.

12. А.С. Боев, А.А. Бакибаев Е.И Короткова. Вольтамперометрическое определение пиридоксина (витамина В₆) на модифицированном платиновом электроде.// Известия высших учебных заведений. Химия и химическая технология – 2008. - Т. 51. №. 5. - С. 21-24.

Автор считает своим долгом выразить искреннюю признательность научному руководителю – д.х.н., профессору, заведующему кафедры ФАХ, ТПУ Бакибаеву Абдигали Абдимановичу, консультанту - к.х.н., доценту, Коротковой Елене Ивановне за всестороннюю помощь при подготовке и написании диссертационной работы, а также д.х.н., профессору каф. ФАХ, ТПУ Романенко С.В. за помощь в постановке ряда экспериментов и консультации по использованию программы ASSAER, к.х.н., доценту каф. ФАХ, ТПУ Пикуле Н.П. за консультации по расчету качественных метрологических показателей МВИ, Медведеву Д.М. за консультативную помощь по методам модификации рабочих электродов, также хочется поблагодарить за внимательное отношение и конструктивные предложения по работе д.х.н., проф., ТПУ Колпакову Н.А., д.х.н. зав. лаб. Слепченко Г.Б., к.х.н. доцента ТПУ Гиндуллину Т.М..