

На правах рукописи

МИХЕЕВА ЕЛЕНА ВАЛЕНТИНОВНА

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ВИТАМИНОВ В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ СУХИХ
ВИТАМИНИЗИРОВАННЫХ СМЕСЯХ

02.00.02 – аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск-2005

Работа выполнена на кафедре физической и аналитической химии Томского политехнического университета

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ

кандидат химических наук,
Слепченко Г.Б.

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ

доктор химических наук,
профессор Марьянов Б.М.

кандидат химических наук,
Мордвинова Н.М.

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ

Кубанский государственный
университет, г.Краснодар

Защита диссертации состоится «18» мая 2005 г. в 16³⁰ часов
на заседании диссертационного совета Д.212.269.04 при Томском
политехническом университете (634050, г.Томск, пр.Ленина, 30).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Томского политехнического
университета по адресу: ул. Белинского, 53.

Автореферат разослан «14» апреля 2005 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук, доцент

Гиндуллина Т.М.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Увеличение степени загрязнения окружающей среды, жесткая технологическая обработка производимых продуктов питания привели к существенному снижению содержания в потребляемых продуктах биологически активных веществ, а особенно, витаминов. На восстановление качества продуктов питания направлен закон РФ № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов» от 2 января 2000г. Приняты правительственные общероссийские программы:

- «Обогащение пищевых продуктов микроэлементами»;
- «Концепция здорового питания России», утвержденная постановлением Правительства № 247, одним из разделов которой является «Разработка быстрых и надежных методов контроля».

В настоящее время на рынке появилось огромное количество витаминизированных продуктов питания для человека и кормов для животных, представляющих собой сухие многокомпонентные смеси, ассортимент таких продуктов представлен достаточно широко. Это, прежде всего биологически активные добавки к пище, премиксы, комбикорма для животных и птиц, поливитаминные препараты. Критерием качества таких продуктов может являться их анализ на содержание витаминов и, особенно, таких жизненно необходимых, как водорастворимые витамины В₁, В₂ и жирорастворимый витамин Е, количество которых регламентируется нормативными документами и санитарными нормами качества.

Для определения витаминов применяют различные методы. Широко распространенные оптические методы анализа трудоемки, требуют больших затрат времени и дорогостоящих реактивов, применение хроматографических методов осложнено использованием дорогостоящего оборудования.

Электрохимические методы анализа в настоящее время переживают бурное развитие в связи с их применением для определения органических веществ. Одним из наиболее универсальных электрохимических методов определения следовых количеств веществ является вольтамперометрический метод анализа. В 1999 году данный метод приобрел статус арбитражного (вышел ГОСТ Р 51301-99) для определения тяжелых металлов в пищевых продуктах. Методы вольтамперометрии также нашли применение при анализе органических веществ, в том числе и витамина С. Однако, методики вольтамперометрического определения водорастворимых витаминов В₁, В₂ и жирорастворимого витамина Е практически отсутствуют.

Проведение исследований по оптимизации условий вольтамперометрического определения витаминов в присутствии сложной органической матрицы, создание методик количественного химического анализа витаминизированных продуктов питания для человека и животных на содержание витаминов методом вольтамперометрии и метрологическая аттестация разработанных методик является актуальным и имеет большую практическую значимость.

Цель работы заключалась в исследовании электрохимического поведения водорастворимых витаминов В₁, В₂ и жирорастворимого витамина Е, разработке вольтамперометрических методик их количественного химического анализа в многокомпонентных сухих витаминизированных смесях.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

- установить рабочие условия вольтамперометрического определения водорастворимых витаминов В₁, В₂ и жирорастворимого витамина Е;
- исследовать физико-химические закономерности электрохимического поведения витаминов и оценить некоторые параметры электродной реакции (pK , n , βn);
- изучить адсорбционную способность витамина В₁ с использованием метода двойного обратного интегрирования;
- провести оценку мешающего влияния сопутствующих примесей на аналитические сигналы определяемых компонентов и разработать алгоритм подготовки проб при определении витаминов;
- разработать и метрологически аттестовать методики количественного химического анализа многокомпонентных сухих витаминизированных смесей на содержание витаминов методом дифференциальной вольтамперометрии.

Научная новизна:

- Впервые предложен способ определения жирорастворимого витамина Е (α -токоферола ацетата), а также водорастворимых витаминов В₁ (тиамина) и В₂ (рибофлавина) методом дифференциальной вольтамперометрии и установлены условия проведения электродного процесса.
- Проведена оценка некоторых физико-химических параметров электродного процесса с участием витаминов (pK , n , βn).
- Рассчитаны параметры адсорбции витамина В₁ методом двойного обратного интегрирования.
- Предложены условия по устранению мешающего влияния сложной органической матрицы.
- Разработан алгоритм подготовки проб для вольтамперометрического определения витаминов.

Практическая значимость работы состоит в том, что:

- на основании проведенных исследований предложены алгоритмы методик количественного химического анализа водорастворимых витаминов В₁, В₂ и жирорастворимого витамина Е для широкого круга объектов: поливитаминных препаратов, витаминизированных подкормок и кормов для животных, биологически активных добавок;
- методики: «Витаминизированные корма и подкормки. Определение массовых концентраций витамина В₁ методом вольтамперометрии»,

«Витаминизированные корма и подкормки. Определение массовых концентраций витамина В₂ методом дифференциальной вольтамперометрии» и «Биологически активные добавки. Вольтамперометрический метод определения массовых концентраций витаминов С, В₁, В₂, Е и кверцетина» метрологически аттестованы, внесены в Федеральный Реестр МВИ.

На защиту выносятся:

- рабочие условия вольтамперометрического определения витаминов В₁, В₂ и Е;
- параметры электродной реакции с участием витаминов и их адсорбционную способность;
- способ подготовки проб, включая процедуру выделения определяемых органических веществ из многокомпонентных смесей;
- алгоритм методик количественного химического анализа многокомпонентных сухих витаминизированных смесей на содержание витаминов методом дифференциальной вольтамперометрии.

Апробация работы. Отдельные разделы диссертации докладывались на: симпозиуме «Теория электроаналитической химии и метод ИВ – 2000» (Томск, 2000); VI конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока-2000» (Новосибирск, 2000); IV Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2000» (Краснодар, 2000); II Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием «ЭМА-2004» (Уфа, 2004); III Всероссийской научной конференции «Химия и химическая технология на рубеже тысячелетий» (г.Томск, 2004); 8th Korea-Russia International Symposium of Science and Technology (Tomsk, 2004); VII конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока – 2004» (Новосибирск, 2004), а также на объединенных научных семинарах кафедры физической и аналитической химии и проблемной лаборатории микропримесей Томского политехнического университета.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах, 3 статьи в трудах симпозиумах и конференций, 5 тезисов докладов, получен 1 патент на изобретение РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 163 страницах машинописного текста, включая 41 рисунок, 22 таблицы, состоит из введения, пяти глав, выводов, приложения и списка литературы из 251 наименования.

Основное содержание работы

Введение. Обоснована актуальность проблемы, определены цели и задачи исследования.

Глава 1. Представлен обзор литературы по физико-химическим методам исследования и определения витаминов в различных объектах, в котором рассмотрены основные свойства наиболее важных водорастворимых витаминов В₁, В₂ и жирорастворимого витамина Е, аналитические возможности физико-химических и особенности электрохимических методов анализа водо- и жирорастворимых витаминов, сформулированы задачи исследования.

Глава 2. Дана характеристика используемой аппаратуры, типов электродов, описаны объекты исследования и методика проведения эксперимента.

Глава 3. Выбор рабочих условий вольтамперометрического определения витаминов.

Для определения витамина Е (α -токоферола ацетата) впервые предложен высокочувствительный метод дифференциальной вольтамперометрии (ДВА), основанный на способности витамина электрохимически окисляться на углеродных электродах различных типов в неводных средах. В качестве индикаторных электродов использовали графитовый электрод (ГЭ), пропитанный смесью полиэтилена с парафином в вакууме, стеклоуглеродный (СУЭ) и углеситаловый (УСЭ) электроды. Высокую чувствительность определения, низкое значение остаточного тока и хорошую воспроизводимость аналитических сигналов наблюдали на СУЭ, который и был выбран в качестве рабочего. Вольтамперограммы электроокисления витамина Е (α -токоферола ацетата) на стеклоуглеродном электроде представлены на рис. 1.

$dI/dE, \text{мкА/мВ}$

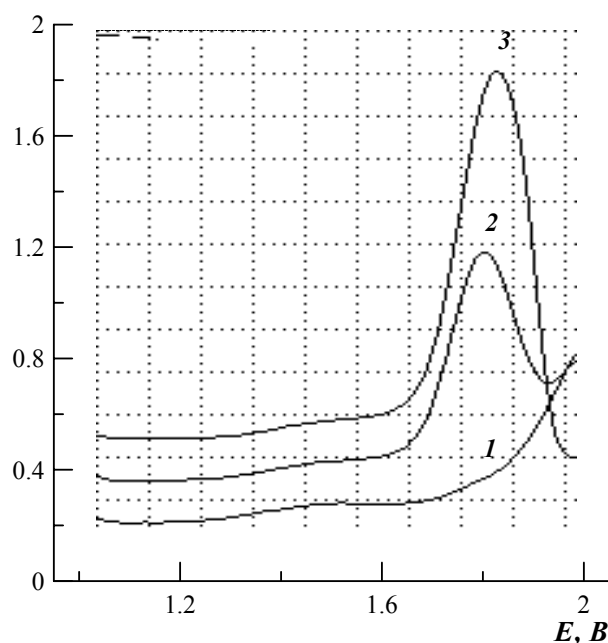


Рис. 1. Вольтамперограммы электроокисления витамина Е (α -токоферола ацетата) на СУЭ, $w=20\text{мВ/с}$:

- 1 – фон $0,1 \text{ М NaClO}_4$ в ацетонитриле;
- 2 – $C_1=3,0 \text{ мг/дм}^3$;
- 3 – $C_2=6,0 \text{ мг/дм}^3$.

Витамин Е относится к жирорастворимым витаминам, он нерастворим в воде, поэтому его электрохимическое определение возможно только в неводных средах. Исследование электрохимического окисления α -токоферола ацетата проводили в апротонных диполярных растворителях: диметилформамиде, диметилсульфоксиде, 1,4-диоксане, пропиленкарбонате, ацетонитриле и их смесях. Четкие пики окисления получены в ацетонитриле, пропиленкарбонате, имеющих широкую анодную область рабочих потенциалов. Тангенс угла наклона градуировочного графика в ацетонитриле в 3,26 раз больше, чем в пропиленкарбонате, что говорит о более высокой чувствительности определяемого компонента, поэтому рабочим растворителем выбран ацетонитрил.

В качестве фоновых электролитов применяли растворы перхлоратов натрия, калия, тетраметил-, тетраэтиламмония, сульфатов натрия, калия, аммония. Каждый из этих растворов можно использовать для количественного определения витамина, однако оптимальным является раствор перхлората натрия в ацетонитриле, на фоне которого регистрируются четко выраженные пики с хорошей воспроизводимостью, относительное стандартное отклонение S_r не превышает 0,05 (рис.2.).

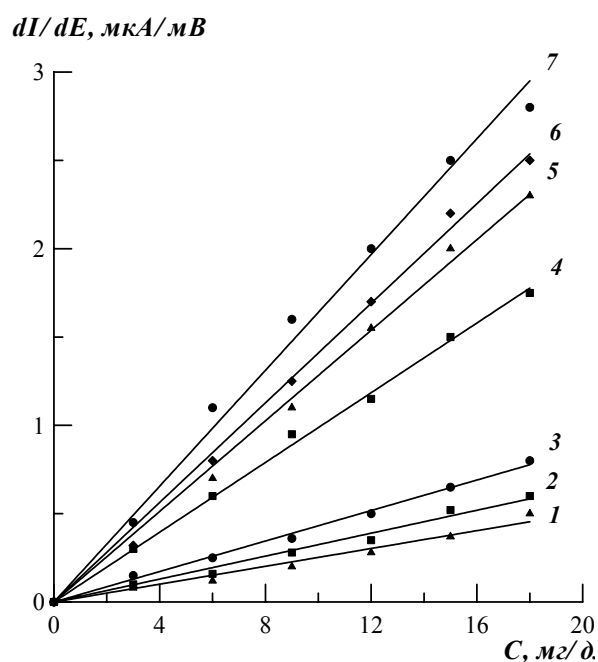


Рис. 2. Градуировочные графики зависимости тока электроокисления витамина Е (α -токоферола ацетата) в растворах различных фоновых электролитов в ацетонитриле, СУЭ, $w=20$ мВ/с:

- 1 – 0,1 М K_2SO_4 ;
- 2 – 0,1 М Na_2SO_4 ;
- 3 – 0,1 М $(NH_4)_2SO_4$;
- 4 – 0,1 М $KClO_4$;
- 5 – 0,1 М $(CH_3)_4ClO_4$;
- 6 – 0,1 М $(C_2H_5)_4ClO_4$;
- 7 – 0,1 М $NaClO_4$.

Для количественного определения водорастворимого витамина B_2 (рибофлавина) использовали стеклоуглеродный электрод. Рабочими фоновыми электролитами выбраны растворы 0,1 М аммоний лимоннокислый двузамещенный ($C_6H_6O_7N_2$) и 0,1 М натрий виннокислый кислый ($C_4H_5O_6Na \cdot H_2O$). Линейная зависимость градуировочных графиков на указанных фонах сохраняется в широком диапазоне концентраций от 2,0 мг/дм³ до 28,0 мг/дм³. Электролит $C_4H_5O_6Na \cdot H_2O$ также является хорошим высаливателем водорастворимых белков, мешающих экспрессному

определению рибофлавина в кормах. Вольтамперограммы электроокисления рибофлавина на стеклоуглеродном электроде представлены на рис. 3.

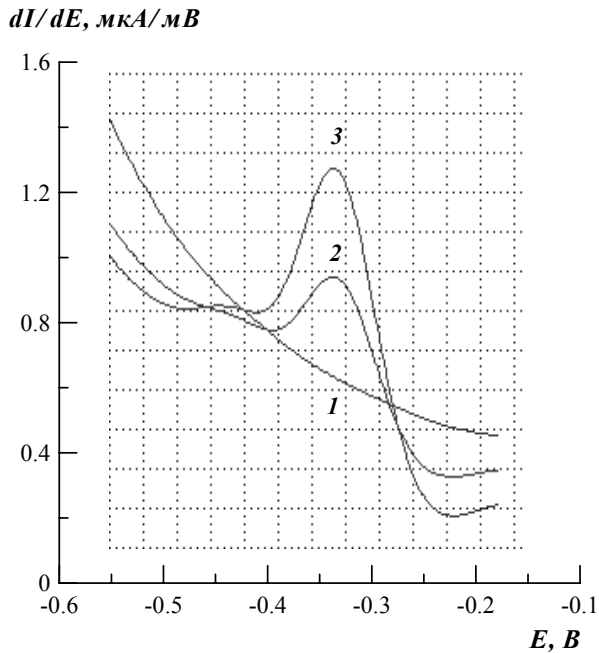


Рис. 3. Вольтамперограммы электроокисления витамина В₂ (рибофлавина) на СУЭ, $w=20$ мВ/с:
1 — фон 0,1 М $C_6H_{14}O_7N_2$;
2 — $C_1=3,0$ мг/дм³;
3 — $C_2=6,0$ мг/дм³.

Для вольтамперометрического определения витамина В₁ (тиамина) предложены два способа. Первый способ основан на способности витамина образовывать малорастворимые соединения (МРС) на поверхности ртутно-пленочного электрода (РПЭ) в стадии анодной поляризации ртути. Сконцентрированный осадок органического вещества со ртутью удаляли с поверхности электрода катодной поляризацией. Пик витамина В₁ регистрировали в диапазоне потенциалов $-(0,30 \div 0,38)$ В. Вольтамперограммы электровосстановления МРС тиамин на ртутно-пленочном электроде представлены на рис.4.

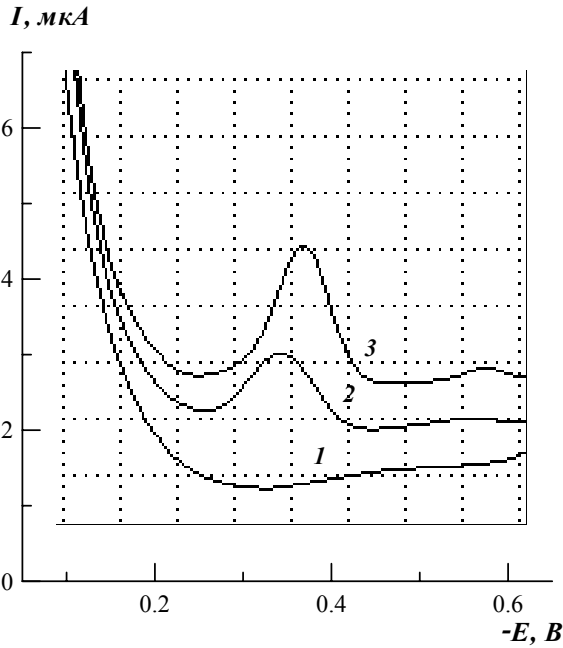


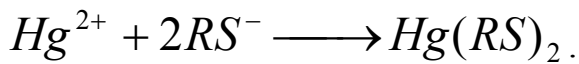
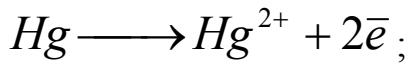
Рис. 4. Вольтамперограммы восстановления МРС витамина В₁ (тиамина) на РПЭ, $w=50$ мВ/с:

1 – фон 0,1 М $C_6H_8O_7$;

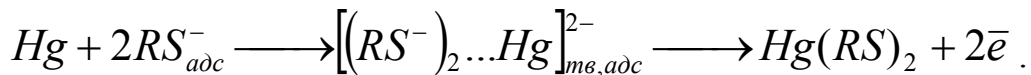
2 – $C_1= 4,0$ мг/дм³;

3 – $C_2= 8,0$ мг/дм³.

Образование пленки малорастворимого соединения органического вещества со ртутью может возникнуть путем осаждения соли из приэлектродного слоя раствора при достаточно положительных потенциалах в условиях значительных токов электро растворения металлической ртути т.е. путем перехода катиона ртути в раствор и последующей химической реакции, продукты которой осаждаются на электроде:

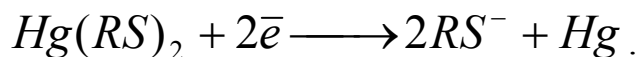


С другой стороны, образование осадка на поверхности ртутно-пленочного электрода может протекать непосредственно на поверхности электрода через стадию образования активированного комплекса электрохимической реакции:



По нашему мнению, оба механизма являются вероятными, однако для веществ, обладающих повышенной адсорбционной способностью, более вероятен второй механизм.

При катодной поляризации электрода регистрируются пики восстановления осажденного малорастворимого соединения:



Предложенный способ вольтамперометрического определения тиамина в виде малорастворимого соединения имеет высокую чувствительность и рекомендован для разработки методик его количественного химического анализа в продуктах, содержащих остаточные количества витамина В₁.

Для вольтамперометрического определения тиамина в витаминизированных многокомпонентных смесях, содержащих большое количество органических веществ, способных также накапливаться на

поверхности ртутно-пленочного электрода, использовали метод катодной вольтамперометрии, основанный на восстановлении тиамин при $E = -1,3$ В. Вольтамперограммы электровосстановления витамина В₁ на ртутно-пленочном электроде представлены на рис.5.

С целью выбора рабочего фонового электролита исследовали электровосстановление тиамин в растворах: 0,1 М Na₂HPO₄, 0,1 М (NH₄)₂SO₄, 0,1 М Na₂B₄O₇, 0,1 М Na₃PO₄, 0,1 М NaClO₄, 0,1 М KNO₃, 0,1 М K₂CO₃, буферных растворах Бриттона-Робинсона с pH 6,01 ÷ 10,41 (рис.6.). Все перечисленные электролиты можно использовать для вольтамперометрического определения витамина В₁, однако рабочим фоновым электролитом выбран 0,1 М Na₂HPO₄ (pH 7,5 – 8,5), на фоне которого регистрируются четко выраженные и хорошо воспроизводимые пики восстановления.

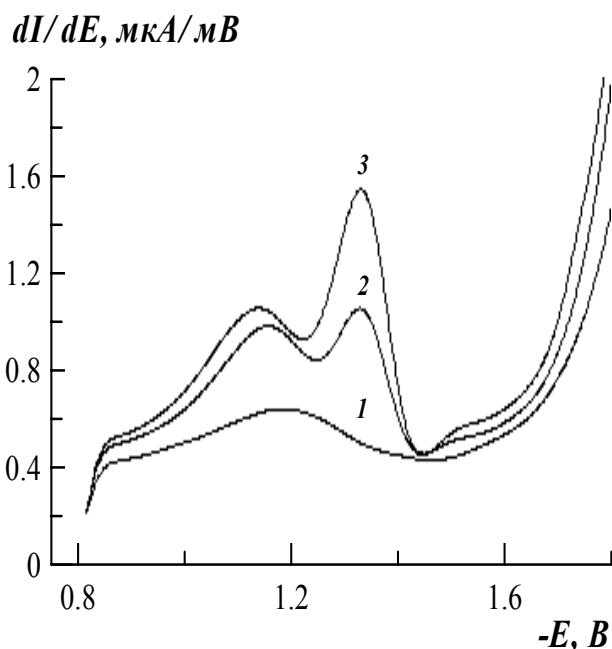


Рис. 5. Вольтамперограммы электровосстановления витамина В₁ на РПЭ, $w=30$ мВ/с:

- 1 – фон 0,1 М Na₂HPO₄;
- 2 – $C_1 = 2,0$ мг/дм³;
- 3 – $C_2 = 4,0$ мг/дм³

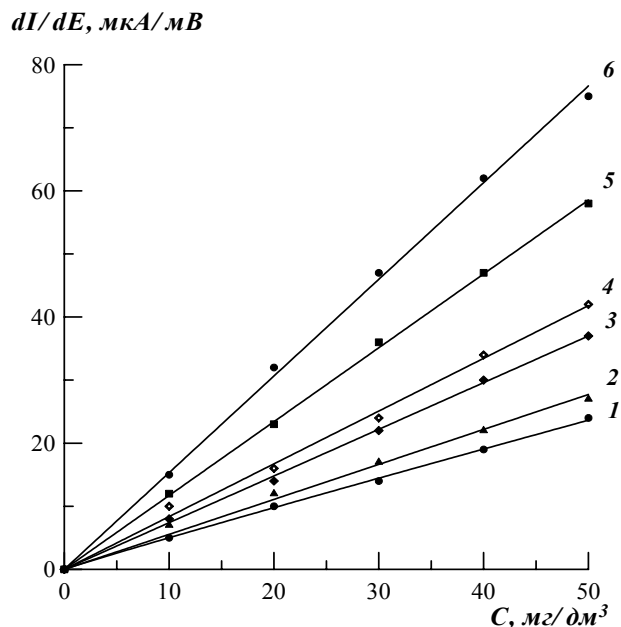


Рис. 6. Градуировочные графики зависимости тока электровосстановления витамина В₁ в растворах различных фоновых электролитов, РПЭ, $w=30$ мВ/с:

- 1 – 0,1 М Na₂B₄O₇;
- 2 – 0,1 М (NH₄)₂SO₄;
- 3 – 0,1 М Na₃PO₄;
- 4 – 0,1 М NaClO₄;
- 5 – 0,1 М KNO₃;
- 6 – 0,1 М Na₂HPO₄.

При определении витаминов использовали дифференциальный режим регистрации вольтамперограмм. Одним из преимуществ такого режима

полярографирования является регистрация аналитического сигнала в виде четко выраженного пика и более точное измерение его величины.

Рабочие условия вольтамперометрического определения витаминов представлены в таблице 1.

Важным фактором при определении органических веществ, оказывающим влияние не только на скорость электродного процесса, но и на его механизм, является рН среды.

Зависимость потенциала максимума анодного пика рибофлавина от рН имеет сложный характер (рис.7.). С увеличением концентрации гидроксид ионов происходит смещение потенциала пика в катодную область, т.е. способствует облегчению процесса электроокисления рибофлавина, что, по-видимому, связано с протеканием ступенчатой реакции депротонизации различных форм витамина В₂. Депротонизация может предшествовать стадии отдачи электрона от молекулы деполяризатора к электроду или протекать одновременно с ней.

Таблица 1.

Рабочие условия вольтамперометрического определения витаминов В₁, В₂ и Е.

Компонент	Витамин В ₁		Витамин В ₂	Витамин Е
	ИВА	Катодная ДВА	Анодная ДВА	Анодная ДВА
Индикаторный электрод	РПЭ	РПЭ	СУЭ	СУЭ
Фоновый электролит	0,1 М С ₆ Н ₈ О ₇ (рН 3,0 ÷ 3,5)	0,1 М Na ₂ НРО ₄ (рН 7,5 ÷ 8,5)	0,1 М С ₆ Н ₁₄ О ₇ Н ₂ (рН 4,0 ÷ 5,0)	0,1 М NaClO ₄ в ацетонитриле
Диапазон определяемых содержаний, мг/дм ³	0,20 ÷ 10,0	1,0 ÷ 50,0	2,0 ÷ 28,0	2,0 ÷ 20,0
С _{min,p} , мг/дм ³	0,08	0,58	0,48	0,35
С _н , мг/дм ³	0,11	0,85	0,69	0,80
Диапазон развертки потенциала, В	0,1 ÷ -0,5	-0,8 ÷ -1,6	-0,6 ÷ -0,1	1,0 ÷ 2,0
Потенциал пика, В	-(0,35 ± 0,05)	-(1,3 ± 0,05)	-(0,35 ± 0,03)	(1,65 ± 0,15)

В водных растворах в зависимости от рН среды рибофлавин может находиться в катионной, нейтральной и анионной формах, а также в виде семихинонов. При $pH < 8$ рибофлавин существует в трех катионных формах: AN_2^+ , AN_3^+ , AN_4^+ .

В очень кислых растворах, при $pH < 4$, рибофлавин находится преимущественно в катионных формах AN_3^+ и AN_4^+ (протонирован атом азота в положении 1 и 10). С увеличением концентрации гидроксид ионов ($pH > 4$), рибофлавин переходит в менее протонированную форму в виде AN_2^+ и AN_3^+ (протонирован атом азота в положении 10). При дальнейшем увеличении кислотности среды в интервале $pH > 7$ рибофлавин, по-видимому, существует в виде нейтральной молекулы $АН$ и $АН_2$. При $pH > 10$ возможно образование анионных форм рибофлавина A^- и $АН_2^-$ (отсутствует протон у атома азота в положении 3).

Характер зависимости потенциала пика от рН обусловлен смещением протолитического равновесия органического вещества в растворе. Значения рН в точках пересечения продолжений прямолинейных участков экспериментальной зависимости потенциала пика от рН соответствует величинам рК. Найденные значения рК рибофлавина составили: $pK_1=3,6$ и $pK_2=7,2$. Вычисленные эффективные значения констант диссоциации различных форм рибофлавина удовлетворительно согласуются с литературными данными.

Тангенс угла наклона зависимости потенциала пика витамина B_2 от рН равен 0,62, что свидетельствует об участии в электродном процессе одного электрона и одного протона.

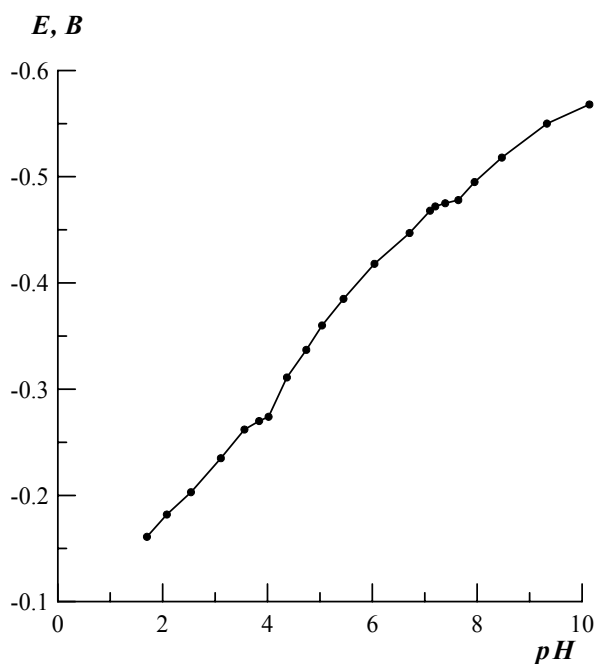


Рис. 7. Зависимость потенциала пика электроокисления витамина B_2 от рН среды на СУЭ:
 $C = 6,0 \text{ мг/дм}^3$, $w=20 \text{ мВ/с}$.

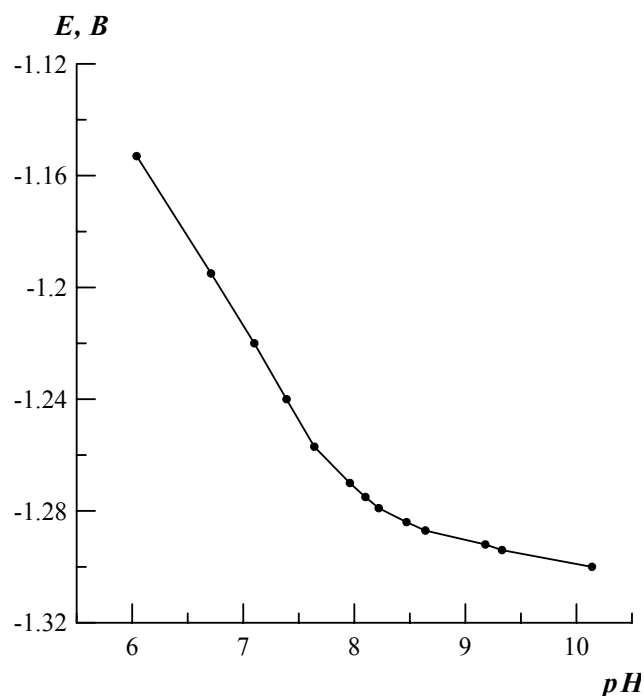


Рис. 8. Зависимость потенциала пика электровосстановления витамина B_1 от рН среды на РПЭ:
 $C = 5,0 \text{ мг/дм}^3$, $w=30 \text{ мВ/с}$.

Величина тока электроокисления витамина В₂ также зависит от рН, что можно объяснить изменением механизма электрохимического окисления органического вещества с увеличением рН среды.

Следует обратить внимание, что в кислых растворах при рН<4 на вольтамперограмме наблюдается появление дополнительного небольшого предпика при более отрицательном потенциале, что затрудняет использование кислых растворов для количественного определения витамина. Появление дополнительного предпика (меньшего по высоте) может быть связано с адсорбцией рибофлавина на поверхности электрода, занятой молекулами дегидрорибофлавина, а также наличием промежуточных соединений – комплексов с переносом заряда, образованных либо двумя идентичными семихинонами, либо молекулами окисленной и восстановленной форм. Для аналитических целей используют больший по величине пик, высота которого прямопропорциональна концентрации определяемого органического вещества в растворе.

Значение рН среды влияет и на механизм протекания электродного процесса при вольтамперометрическом определении витамина В₁. Из зависимости потенциала максимума пика тиамин от кислотности среды следует, что с увеличением рН происходит смещение потенциала пика в катодную область (рис.8.), т.е. к затруднению процесса восстановления витамина.

Известно, что в водных растворах в зависимости от рН среды тиамин может существовать в виде катионной, молекулярной и анионной форм. При значениях рН<6 тиамин находится в растворе преимущественно в виде соли четвертичного основания, устойчивого в кислой среде.

С увеличением концентрации гидроксид ионов (рН 6÷8) происходит размыкание тиазолового цикла молекулы с образованием открытой тиольной формы RSH. При рН>8 возможно образование анионной формы тиамин RS^- .

Интервал рН от 8,1 до 8,6, по-видимому, соответствует состоянию протолитического равновесия: $RSH \rightleftharpoons RS^- + H^+$.

Из экспериментальных данных впервые вычислено значение эффективной константы диссоциации, которое составляет $K_{эфф} = 6,2 \cdot 10^{-9}$.

Зависимость тока электровосстановления тиамин от рН проходит через максимум. При увеличении рН от 6,0 до 8,0 ток восстановления растет и достигает максимального значения при рН 7,5 ÷ 8,5, при дальнейшем увеличении концентрации гидроксид ионов ток уменьшается, что можно объяснить образованием малорастворимого соединения на поверхности электрода, затрудняющего процесс восстановления. Исходя из проведенных исследований, рабочим фоновым электролитом выбран раствор 0,1 М NaH_2PO_4 (рН 7,5 ÷ 8,5).

Таким образом, установлены рабочие условия вольтамперометрического определения витаминов В₁, В₂, и Е, которые были использованы для разработки методик их количественного химического анализа в многокомпонентных сухих витаминизированных смесях.

Глава 4. Исследование физико-химических закономерностей электрохимического поведения витаминов и оценка некоторых параметров электродной реакции.

Изучение обратимости процессов электроокисления витаминов В₂ и Е проводили по экспериментальным данным. В расчетах использовали известные в литературе критерии и метод циклической вольтамперометрии.

Установлено, что процесс электроокисления витамина В₂ на стеклоуглеродном электроде протекает практически обратимо, что подтверждает вид циклической вольтамперограммы. Высота аналитического сигнала рибофлавина при катодном и анодном реверсе потенциала практически одинакова, разность потенциалов не превышает 20 мВ (рис.9).

Из зависимости величины $I_{пред}$ от $\omega^{1/2}$ вычислена адсорбционная составляющая электродного процесса. Вклад адсорбционной составляющей невелик и составляет менее 9% суммарного тока, что свидетельствует о диффузионной природе тока, осложненной адсорбционными процессами.

Число электронов, принимающих участие в электродном процессе, вычисленное из полулогарифмических зависимостей и по уравнению Левича, близко к единице и составляет $1,05 \pm 0,22$.

$dI/dE, \text{ мкА/мВ}$

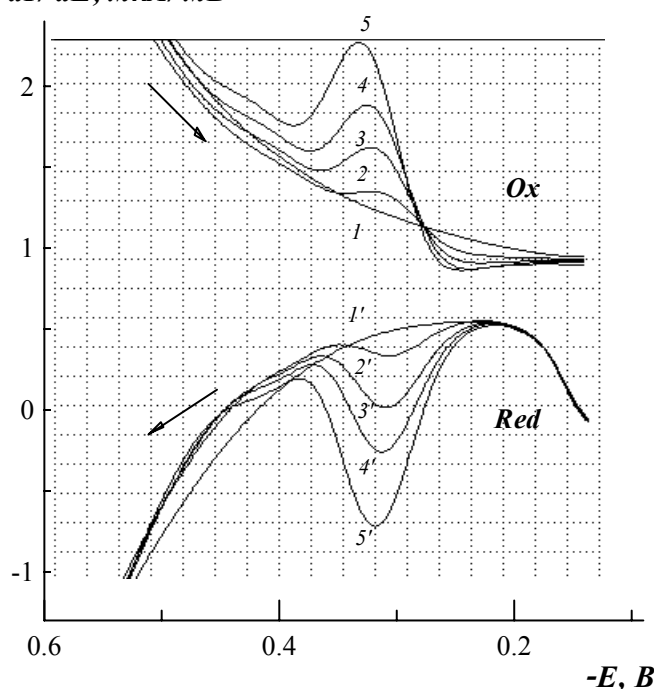


Рис. 9. Циклические вольтамперограммы окисления-восстановления рибофлавина на СУЭ, $w=30$ мВ/с:

- 1, 1' – фон 0,1 М $C_6H_{14}O_7N_2$;
- 2, 2' – $C_1=2,0$ мг/дм³;
- 3, 3' – $C_2=4,0$ мг/дм³;
- 4, 4' – $C_3=6,0$ мг/дм³;
- 5, 5' – $C_4=8,0$ мг/дм³.

Таким образом, процесс электроокисления витамина В₂ на стеклоуглеродном электроде при рН 4-5 является диффузионным, протекает с участием одного электрона и одного протона через образование катионной формы семихинона AN_2^+ и может быть осложнен как адсорбционными явлениями, так и предшествующими и последующими реакциями с участием органического вещества.

При исследовании обратимости процесса электроокисления витамина Е (α -токоферола ацетата) установлено, что при окислении токоферола на стеклоуглеродном электроде в ацетонитриле замедленной стадией является

стадия переноса электрона. Подтверждением значительного отклонения процесса электроокисления витамина Е от обратимого является вид циклической вольтамперограммы. При анодной развертке потенциала наблюдается четко выраженный аналитический сигнал витамина. При катодном реверсе потенциала пик восстановления витамина Е выражен очень слабо, отношение величины катодного тока к анодному составляет 1/6, разница между потенциалами анодного и катодного пика более 100 мВ.

Рассчитанные значения эффективных коэффициентов переноса, на фонах 0,1 М NaClO₄ и 0,1 М (NH₄)₂SO₄ в ацетонитриле равны $0,41 \pm 0,05$ и $0,44 \pm 0,07$ соответственно. Число электронов, принимающих участие в электродном процессе, вычислено из полулогарифмических зависимостей (рис.10.) и составляет значение близкое к единице ($n=1,19 \pm 0,07$).

Таким образом, электродный процесс электроокисления α -токоферола ацетата на СУЭ в ацетонитриле близок к необратимому, протекает с участием одного электрона через образование промежуточного радикала с последующими химическими превращениями до конечных продуктов, что соответствует литературным данным.

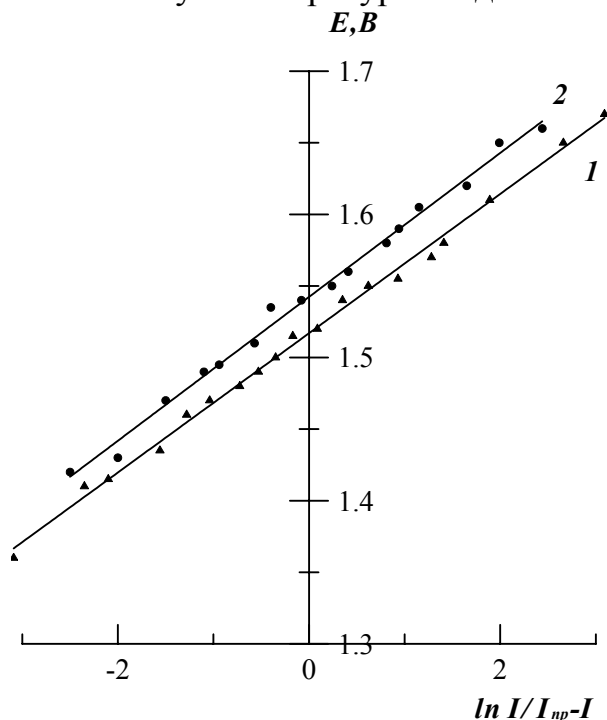


Рис.10. Полулогарифмические зависимости $\ln I/I_{пр}-I$ от потенциала пика электроокисления α -токоферола ацетата на СУЭ, фон 0,1 М NaClO₄ в ацетонитриле, $\omega = 700$ об/мин:

- 1 — $C_1 = 2 \cdot 10^{-3}$ М;
2 — $C_2 = 5 \cdot 10^{-3}$ М.

Известно, что органические вещества, содержащие тиольную группу, обладают большой адсорбционной способностью. Для изучения адсорбции витамина В₁ на ртутно-пленочном электроде впервые применили метод двойного обратного интегрирования емкостных токов.

Из анализа полученных данных следует, что в растворах 0,1 М Na₃PO₄ и 0,1 М КОН имеет место анионный тип адсорбции витамина. Этот факт подтверждает известные в литературе данные о том, что в щелочных средах тиамин существует в виде аниона RS⁻. Потенциал десорбции витамина В₁ находится на отрицательной ветви электрокапиллярной кривой (рис.11.) и равен $E_{дес} = -0,7$ В на фоне 0,1 М Na₃PO₄ и $E_{дес} = -1,05$ В в растворе 0,1 М КОН.

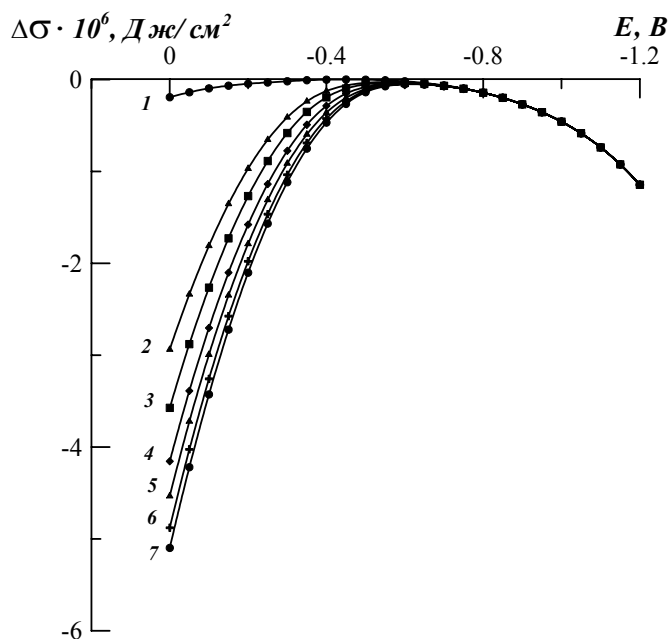


Рис. 11. Зависимость изменения величины поверхностного натяжения от потенциала РПЭ (витамин В₁):

- 1 – фон 0,1 М Na₃PO₄;
- 2 – C₁ = 5,0 · 10⁻⁵ М;
- 3 – C₂ = 1,0 · 10⁻⁴ М;
- 4 – C₃ = 2,0 · 10⁻⁴ М;
- 5 – C₄ = 3,0 · 10⁻⁴ М;
- 6 – C₅ = 4,0 · 10⁻⁴ М;
- 7 – C₆ = 5,0 · 10⁻⁴ М.

Полученные опытные данные позволили оценить параметры адсорбции витамина В₁ (табл.2.), величина которых свидетельствует о вкладе адсорбционной составляющей в величину предельного тока восстановления тиаминa с поверхности ртутно-пленочного электрода.

Таблица 2.

Параметры адсорбции витамина В₁ на ртутно-пленочном электроде.

Фон	- E, В	K, дм ³ /моль	Γ _∞ · 10 ¹⁰ , моль/см ²	$\overline{\Delta G_A}$, кДж/моль
0,1 М Na ₃ PO ₄	0,0	95,0	1,5	-2,8
	0,1	126,0	3,0	-2,9
0,1 М КОН	0,5	74,1	1,8	-2,6
	0,6	65,6	2,3	-2,5

Глава 5 посвящена оценке мешающего влияния сопутствующих примесей на аналитические сигналы определяемых компонентов и разработке алгоритма подготовки проб при определении витаминов.

При разработке методик изучено влияние ряда соединений и ионов, оказывающих негативное влияние на величину аналитического сигнала. Показано, что присутствие сопутствующих органических веществ: витаминов А, Д, В₆, В_с, С, Р, РР, флавоноидов, полифенольных и других соединений; стократные избытки ионов Zn²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Se⁴⁺, Fe³⁺ не влияют на аналитические сигналы определяемых компонентов.

Мешающее влияние оказывают белковые примеси, прочно адсорбирующиеся на поверхности электрода и снижающие чувствительность, воспроизводимость и точность анализа. С целью освобождения от белковых примесей использовали метод высаливания. Электролит натрий виннокислый (C₄H₅O₆Na · H₂O), подобранный экспериментально, оказался лучшим высаливателем водорастворимых белков.

Для извлечения витамина Е из витаминизированных твердых сухих смесей предложен метод экстракции с использованием аппарата Сокслета, применение которого позволяет улучшить метрологические характеристики результатов анализа.

На примере определения витамина Е в витаминизированном премиксе для цыплят «Солнышко» методом дифференциальной вольтамперометрии проведена оптимизация процедуры пробоподготовки методом факторного планирования эксперимента. В качестве функции отклика выбрано содержание витамина в премиксе (г/кг). Исследуемые факторы на основном и двух уровнях представлены в таблице 3.

Для получения модели использовали полный факторный эксперимент. Полученное уравнение регрессии имеет вид:

$$\hat{y} = 1,83 + 0,70X_1 + 0,36X_2 - 0,014X_3 - 0,015X_4$$

Проверка значимости коэффициентов регрессии показала, что значимыми факторами являются масса навески пробы премикса и время экстракции пробы.

Таблица 3.

Уровни и интервалы варьирования факторов.

Факторы	Единицы измерений	Уровни		
		Основной	Верхний	Нижний
Масса навески (X_1)	м, г	2	3	1
Время экстракции (X_2)	t, мин	30	45	15
Объем аликвоты (X_3)	$V_{ал}$, мл	0,3	0,4	0,2
Объем добавки (X_4)	$V_{доб}$, мл	0,07	0,1	0,04

Из уравнения регрессии сделан вывод о необходимости увеличения значимых факторов. Полученные данные учитывались при разработке методик количественного химического анализа витамина Е.

Оценку предела обнаружения и нижней границы определяемых содержаний проводили с использованием 3σ -критерия на современных вольтамперометрических анализаторах, оснащенных различными типами развертки поляризующего напряжения (табл.4.). Использование анализатора СТА с накопительной разверткой потенциала позволяет увеличить чувствительность определения витаминов более чем на порядок по сравнению с полярографами типа ПУ-1.

Таблица 4.

Пределы обнаружения и нижние границы определяемых содержаний витаминов Е, B_1 и B_2 ($n=10$, $P=0,95$)

Витамин	Приборы	Режимы полярографирования	C_{min,p_3} мг/дм ³	$C_{н_3}$ мг/дм ³
Е	Полярограф ПУ-1	постоянно-токовый	0,35	0,80
	Анализатор СТА	постоянно-токовый	0,12	0,38
		накопительный	0,011	0,048
	Анализатор ВАМ	ступенчатый	0,058	0,12

В ₁	Полярграф ПУ-1	постоянно-токовый	0,58	0,85
	Анализатор СТА	постоянно-токовый	0,55	0,92
		дифференциально-импульсный	0,26	0,42
В ₂	Полярграф ПУ-1	постоянно-токовый	0,48	0,69
	Анализатор СТА	постоянно-токовый	0,44	0,68
		накопительный	0,036	0,072

На основании проведенных исследований впервые разработаны экспрессные методики определения витаминов В₁, В₂ и Е в сложных многокомпонентных сухих витаминизированных смесях, таких как поливитаминные препараты, витаминизированные подкормки для животных и птиц, биологически активные добавки. Правильность разработанных методик подтверждена сравнением с методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (табл. 5.), а также методом «введено-найденно» (табл. 6.).

Таблица 5.

Сравнение результатов анализа проб биологически активных добавок на содержание витамина Е (α -токоферола ацетата) двумя методами.

Анализируемая проба БАД	Найдено α -токоферола ацетата, мг/г	
	Дифференциальная вольтамперометрия	ВЭЖХ
«Формула женщины»	11,4 \pm 2,2	10,8
«Дискавери»	2,5 \pm 0,8	2,65
«Диенал»	1,8 \pm 0,4	2,05
«Маньчжу Айсинь»	6,3 \pm 1,3	7,1

Таблица 6.

Результаты вольтамперометрического определения витамина В₁ в витаминизированных подкормках и премиксах методом «введено-найденно» (Р=0,95; n=8)

Анализируемая проба	Средний результат анализа пробы, мг/кг	Введено мг/кг	Средний результат анализа пробы с добавкой, мг/кг	Найдено, мг/кг
Премикс для цыплят «Солнышко»	114 \pm 8	200	301 \pm 29	188 \pm 25
	114 \pm 8	50	162 \pm 17	48 \pm 8
	114 \pm 8	500	686 \pm 72	502 \pm 57
Премикс для гусей	54 \pm 4	100	155 \pm 16	108 \pm 15

«Иван Иваныч»	54 ± 4	50	108 ± 15	55 ± 7
Витаминизированная подкормка для собак и кошек	820 ± 34	1000	1797 ± 68	977 ± 139
	820 ± 34	500	1311 ± 70	491 ± 84

Предлагаемые способы вольтамперометрического определения витаминов имеют ряд преимуществ по сравнению с уже известными методами (табл. 7). Они просты, имеют высокую чувствительность, минимальный расход реактивов, низкую величину стоимости приборов и оборудования и могут быть рекомендованы для разработки методик количественного химического анализа витаминов в пищевых продуктах, биообъектах, технологическом анализе сточных и природных вод производства лекарственных веществ и других отраслях промышленности.

Сравнение способов количественного химического анализа витамина Е.

Параметры	Спектрофотометрический ФС 42-2192-93	ВЭЖХ ФС 42-2192-93	Газовая хроматография ФС 42-2192-93	Дифференциальная вольтамперометрия
$C_{\min, p}$, мг/дм ³	1,2	0,04	2,7	0,35
Линейность градуировоч- ных графиков, мг/дм ³	7 ÷ 35	1 ÷ 100	15 ÷ 150	2 ÷ 20
Время анализа	4-5 часов	1-2 часа	1-2 часа	0,5-1 час
Используемые реактивы	50 мл 95% C ₂ H ₅ ОН, 3 мл 50 % КОН, аскорбиновая кислота, 250 мл эфира, 8 г Na ₂ SO ₄ безводн., 0,2 г палладиевого катализатора, 0,3 г силикагеля, 1мл 0,5 % спиртового раствора о-фенантролина, 1 мл 0,2 % спиртового раствора FeCl ₃ .	Гексан, эфир	Газ-носитель- гелий или азот особой чистоты, цетилпальмитат, 50 мл гексана	20 мл хлороформа, 10 мл ацетонитрила, NaClO ₄ .
Используемое оборудование и его стоимость	Водяная баня с обратным холодильником, делительная воронка, колба для отгона в токе азота или под вакуумом, спектрофотометр (20 тыс.-100 тыс. руб)	Хроматограф для ВЭЖХ (400 тыс.-1500 тыс. руб)	Газо-жидкостный хроматограф (200 тыс.-1000 тыс.руб)	Вольтамперометри- ческий анализатор, три электрода. (40 тыс.-80 тыс.руб)
Способ определения концентрации	Метод калибровочного графика	Метод внешнего стандарта	Метод внутреннего стандарта	Метод добавок

Выводы

1. Впервые для определения витамина Е (α -токоферола ацетата) предложен метод дифференциальной вольтамперометрии, основанный на способности витамина электрохимически окисляться на углеродных электродах различных типов в неводных средах, что подтверждено патентом на изобретение. Установлены условия вольтамперометрического определения водорастворимых витаминов В₁ (тиамина хлорида) и В₂ (рибофлавина).
2. Впервые изучена обратимость процессов электроокисления витаминов В₂ и Е на стеклоуглеродном электроде, рассчитаны некоторые физико-химические параметры электродной реакции (pK , n , βn), имеющие аналитическое значение, и предложены вероятные схемы электродного процесса.
3. Методом двойного обратного интегрирования изучена адсорбция витамина В₁ на ртутно-пленочном электроде. Показано, что в растворах 0,1 М Na₃PO₄ и 0,1 М КОН имеет место анионный тип адсорбции витамина. Дана численная оценка параметров адсорбции.
4. Предложены условия выделения определяемых органических веществ из многокомпонентных смесей. Показано, что присутствие сопутствующих органических веществ: витаминов А, Д, В₆, В₁₂, В_с, С, Р, РР, флавоноидов, полифенольных и других соединений; стократные избытки ионов Zn²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Se⁴⁺, Fe³⁺ не влияют на аналитические сигналы определяемых компонентов. Предложены условия устранения мешающего влияния белковых примесей. Проведена процедура оптимизации пробоподготовки, включающая многофакторное планирование эксперимента в выборе наиболее значимых параметров, оказывающих влияние на результаты анализа.
5. Впервые разработаны и метрологически аттестованы методики количественного химического анализа многокомпонентных сухих витаминизированных смесей на содержание витаминов методом дифференциальной вольтамперометрии. Методики внесены в Федеральный Реестр методик выполнений измерений, применяемых в сферах распространения государственного метрологического контроля, что подтверждается свидетельствами об аттестации.

Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах:

1. Михеева Е.В., Анисимова Л.С. Вольтамперометрическое определение водорастворимых витаминов В₁ и В₂ в витаминизированных подкормках и кормах. //Материалы симпозиума «Теория электроаналитической химии и метод ИВ – 2000». – г.Томск, 2000. – С. 244 – 247.
2. Анисимова Л.С., Михеева Е.В. Определение водорастворимых витаминов В₁ и В₂ в пищевых продуктах и кормах. //Материалы VI конференции

- «Аналитика Сибири и Дальнего Востока – 2000». – г. Новосибирск, 2000 г. – С. 367.
3. Анисимова Л.С., Михеева Е.В., Слипченко В.Ф., Филичкина О.Г. //Материалы IV Всероссийской конференции по анализу объектов окружающей среды «Экоаналитика-2000».–г.Краснодар, 2000. –С. 240–242.
 4. Анисимова Л.С., Михеева Е.В., Слипченко В.Ф. Определение рибофлавина в витаминизированных подкормках и кормах вольтамперометрическим методом. //Журн. аналит. химии. – 2001. – Т. 56, №7. – С.739 – 744.
 5. Анисимова Л.С., Михеева Е.В. Способ количественного определения витамина Е (α -токоферола ацетата) методом дифференциальной вольтамперометрии. //Патент РФ № 2180747.; Приоритет от 14.12.2000.
 6. Михеева Е.В., Анисимова Л.С., Десятов В.А. Вольтамперометрическое определение витамина Е в биологически активных добавках. //Изв. ВУЗов. Химия и хим. технология. – 2000. – Т.45, № 3. – С.71 – 74.
 7. Михеева Е.В., Анисимова Л.С., Слепченко Г.Б. О возможности вольтамперометрического определения жирорастворимых витаминов в продуктах питания и фармпрепаратах. //Материалы II Всероссийской конф. по электрохимическим методам анализа с международным участием «ЭМА – 2004». – г. Уфа, 2004. – С.180 – 181.
 8. Михеева Е.В., Карбаинов Ю.А., Карбаинова С.Н., Слепченко Г.Б., Куртенкова О.В. Адсорбционные процессы витамина В₁ на ртутном пленочном электроде. //Материалы III Всероссийской науч. конф. «Химия и химическая технология на рубеже тысячелетий». – г.Томск, 2004. – С.208 – 209.
 9. Слепченко Г.Б., Романенко С.В., Десятов В.А., Михеева Е.В. Электрод сравнения для вольтамперометрического определения органических веществ. //Материалы III Всероссийской науч. конф. «Химия и химическая технология на рубеже тысячелетий». – г.Томск, 2004. – С.222 – 223.
 10. Slepchenko G.B., Anisimova L.S., Fedorchuk V.A., Slipchenko V.F., Slepchenko E.S., Mikheeva E.V., Akeneyev Y.A., Pikula N.P. Voltammetric determination of drugs in complicated multicomponent systems. //8th Korea-Russia International Symposium of Science and Technology. Korus 2004. – Tomsk,2004. –V.1. – P.84 – 88.
 11. Михеева Е.В, Анисимова Л.С., Слепченко Г.Б. Вольтамперометрический контроль витамина В₁ в фармпрепаратах, биологических и других объектах. //Материалы VII конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока – 2004». – г. Новосибирск, 2000 г. – С. 130.
 12. Михеева Е.В, Анисимова Л.С, Пикула Н.П. Определение витамина Е в поливитаминных препаратах методом дифференциальной вольтамперометрии. //Фармация. – 2004. – №5. – С.16 – 17.
 13. Слепченко Г.Б., Анисимова Л.С., Слипченко В.Ф., Михеева Е.В., Пикула Н.П. Контроль качества биологически активных добавок методами вольтамперометрии. Определение витаминов В₁, В₂, С, Е, и кверцетина. //Хим.-фарм. журн. – 2005. – №2. – С.85 – 87.

14. Михеева Е.В., Анисимова Л.С. Физико-химические методы определения витамина Е в различных объектах (обзор). //Зав. лаборатория. Диагностика материалов. – 2005.–Т.71, №2. – С.3 – 9.