

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа содержит 78с, табл.24, рис.8, 27 источников.

Даунорубицин, анодная вольтамперометрия, противоопухолевые антибиотики, дифференциально-импульсная вольтамперометрия.

Объект исследования: методика определения даунорубицина методом вольтамперометрии.

Цель работы: выбор рабочих условий определения даунорубицина методом анодной вольтамперометрии, позволяющих проводить анализ даунорубицина на уровне 10^{-7} моль/л.

Для получения планируемого результата были исследованы закономерности получения сигнала даунорубицина методом анодной вольтамперометрии на углеродсодержащих электродах, подобраны рабочие условия определения даунорубицина и изучены факторы, влияющие на аналитический сигнал. В результате исследования разработан способ определения даунорубицина методом анодной вольтамперометрии, позволяющий проводить анализ даунорубицина на уровне 10^{-7} моль/л.

Дипломная работа выполнена в текстовом редакторе Microsoft Word.

ESSAY

Final qualifying work includes 78c, Table 24, Figure 8, 27 sources.

Daunorubicin, anodic voltammetry, antitumor antibiotics, differential pulse voltammetry.

Object of research: method of determination of daunorubicin by voltammetry.

Objective: To determine the range of operating conditions of daunorubicin by anodic stripping voltammetry, allowing to carry out the analysis of daunorubicin at 10^{-7} mol / l.

For obtaining the intended result patterns daunorubicin signal by anodic stripping voltammetry have been studied for the carbonaceous electrodes, operating conditions are selected to determine the daunorubicin and factors affecting are studied. The method for determining daunorubicin by anodic stripping voltammetry are developed a, allowing an analysis of daunorubicin at 10^{-7} mol / l.

The diploma work is done in a text editor Microsoft Word.

Определения, обозначения, сокращения, нормативные ссылки

ВА – вольтамперометрия;

КатВА – катодная вольтамперометрия;

АнВА – анодная вольтамперометрия;

ВЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;

ЛС – лекарственное средство;

УЭ – углеродсодержащий электрод;

АнИВ – анодная инверсионная вольтамперометрия

СО – социальная ответственность;

ЭЧ – экономическая часть;

ГЭБ – гемато-энцефалический барьер;

DNR – даунорубицин.

Оглавление

РЕФЕРАТ	1
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1. Общие сведения о даунорубицине.	7
1.1.1 Физико-химические свойства даунорубицина	7
1.1.2 Фармакологическое действие	7
1.1.3 Применение даунорубицина.....	9
1.1.4 Противопоказания	9
1.1.5 Ограничения к применению	9
1.1.6 Побочные действия.....	10
1.1.7 Взаимодействие с другими веществами.....	11
1.1.8 Способ применения и дозы.....	11
1.1.9 Меры предосторожности вещества даунорубицин	12
1.1.10 Особые указания	13
1.2 Методы определения даунорубицина.....	13
1.3 Вольтамперометрические методы анализа даунорубицина.....	15
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	17
2.1 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы.....	17
2.1.1 Средства измерений.....	17
2.1.2 Вспомогательные устройства, материалы и реактивы	18
2.1.3 Приготовление растворов	18
2.2 Анодная вольтамперометрия.....	19
2.2.1 Выбор фонового электролита	20
2.3.2 Зависимость анодного тока пика от pH фонового электролита.....	22

2.3.3 Стабильность аналитического сигнала.....	23
2.3.4 Зависимость анодного тока пика от потенциала электроконцентрирования	24
2.3.5 Зависимость анодного тока пика от времени электроконцентрирования	25
2.3.6 Зависимость анодного тока пика от скорости развертки	25
2.3.7 Мешающее влияние.....	26
2.3.8 Вид сигнала даунорубицина и градуировочные зависимости в выбранных рабочих условиях.....	27
3 Заключение	29
Список используемой литературы	30

ВВЕДЕНИЕ

Даунорубицин является известным на сегодняшний день противоопухолевым антибиотиком, который применяется при различных раковых заболеваниях. Как и многие другие, фармакологически активные вещества, данный препарат может оказывать побочные действия, имеет противопоказания и меры предосторожности к применению. Данный антибиотик может оказывать эмбриотоксическое и кардиотоксическое действие, следовательно, необходимо учитывать суммарную дозу препарата при его применении. Поэтому важным является изучение и получение новых знаний и навыков в определении даунорубицина наиболее точным методом в различных образцах.

В литературе встречается несколько методов анализа даунорубицина: жидкостная хромато-масс-спектрометрия, спектрофотометрический метод, ВЖХ с УФ-детектированием, вольтамперометрический метод. В данной дипломной работе выбран вольтамперометрический метод анализа (ВА). Достоинствами ВА метода являются: относительная простота анализа; низкая стоимость; высокая чувствительность; достаточная селективность и экспрессность определения; возможность автоматизации процесса измерения.

В работе впервые для определения даунорубицина методом вольтамперометрии в качестве рабочего электрода используется углеродсодержащий электрод.

Задачей данной работы была разработка способа определения даунорубицина методом анодной вольтамперометрии, позволяющего проводить анализ на уровне 5×10^{-8} моль/л.

Целью работы являлся выбор рабочих условий определения даунорубицина методом анодной вольтамперометрии, позволяющих проводить анализ даунорубицина на уровне 5×10^{-8} моль/л.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие сведения о даунорубине.

Даунорубин (рубамидина гидрохлорид, рубомицин, рубидомицин, дауномицин) - цитостатический препарат из ряда антрациклиновых антибиотиков, продуцируемый микроорганизмами *Streptomyces coeruleorubidus* или *Streptomyces peucetius*. Даунорубин известен как противоопухолевый препарат, используемый при лечении раковых заболеваний. Данный антибиотик убивает раковые клетки, повреждая их гены, препятствует их размножению. Даунорубин состоит из неустойчивого основного аминсахара даунозамина, связанного гликозидной

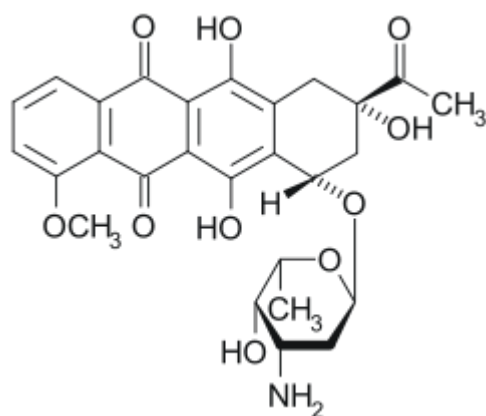


Рис. 1. Структурная молекула даунорубина

связью с красным пигментированным тетрациклическим даунорубиноном (рис. 1) [1].

1.1.1 Физико-химические свойства даунорубина

Ацетил-10-[(3-амино-2,3,6-тридезоксигальфа-L-лихсо-гексопиранозил) окси]-7,8,9,10-тетрагидро-6,8,11-тригидрокси-1-метокси-5,12-нафтацендион (и в виде

гидрохлорида или цитрата). Брутто-формула: $C_{27}H_{29}NO_{10}$.

Молекулярная масса 563,99. Гигроскопический кристаллический порошок или пористая масса красного цвета. Растворим в воде и этаноле, рН водного раствора в концентрации 5 мг/мл — 4,5–6,5, плавится при 177 °С с разложением [1].

1.1.2 Фармакологическое действие

Фармакологическое действие - противоопухолевое. Подавляет синтез ДНК и РНК предположительно посредством интеркаляции между парами

азотистых оснований (нарушается матрица и изменяется пространственная структура). Антимитотическая активность является циклонеспецифической, но в наибольшей степени проявляется в фазе S. Оказывает цитотоксическое действие на быстропролиферирующие ткани, в том числе опухолевые. Характеризуется высокой антимитотической активностью и низкой избирательностью действия. Обладает иммунодепрессивным (ингибирует продукцию гетерогемагглютининов у мышей и бластотрансформацию собачьих лимфоцитов *in vitro*), миелосупрессивным и кардиотоксическим действием, что обусловлено изменением внутриклеточной регуляции метаболизма миокардиоцитов и нарушением энергетических процессов. Имеет антибактериальные свойства, но в качестве противомикробного средства не применяется. Может вызывать отдаленные побочные эффекты в виде развития вторичных злокачественных опухолей (риск повышается при длительном применении).

Оказывает канцерогенное действие у животных (при подкожном введении) и потенциально канцерогенен для человека. В экспериментах на животных влияет на половую функцию, проявляет мутагенное и тератогенное действие, вызывает выкидыш.

Липосомальная форма даунорубицина цитрата обладает выраженной селективностью противоопухолевого действия в отношении солидных опухолей. Такое действие вероятно обусловлено повышенной проницаемостью новообразованных сосудов опухоли для частиц, по размеру подобных липосомальной форме даунорубицина цитрата. Липосомальная форма даунорубицина так же защищает действующее вещество от химического и ферментного разрушения в сосудистом русле, значительно уменьшает его связывание с белками плазмы крови и захват нормальными (неретикулоэндотелиальными) тканями [2].

Быстро распределяется в организме, особенно в почках, селезенке, печени и сердце, в виде неизмененного вещества и метаболитов; не проходит через ГЭБ. В течение 1 ч метаболизируется в печени с

образованием активного даунорубинола и, в дальнейшем, других метаболитов. Выводится длительно почками (25% в активной форме). Согласно расчетам 40% экскретируется с желчью. $T_{1/2}$ фазы распределения — 45 мин, фазы выведения 18,5 ч. $T_{1/2}$ метаболитов — 55 ч, в т. ч. даунорубинола — 26,7 ч.

Фармакокинетические параметры липосомальной формы даунорубина цитрата составляют: Cl — 17,3 мл/мин, объем распределения — 6,4 л, $T_{1/2}$ — 4,4 ч [1].

1.1.3 Применение даунорубина

Даунорубин применяется при таких онкологических заболеваниях, как: острый лимфобластный и нелимфобластный (миелобластный, монобластный, эритробластный) лейкоз, нейробластома, неходжкинские лимфомы, опухоль Юинга, опухоль Вильмса, хронический миелолейкоз, рак яичников, рак легких, рак щитовидной железы, лимфогранулематоз, лимфосаркома, рак молочной железы, саркомы мягких тканей, остеогенная саркома, рак мочевого пузыря [3].

1.1.4 Противопоказания

Гиперчувствительность, угнетение функции костного мозга, кахексия, терминальные стадии опухолевого процесса, метастазы в костный мозг, лейкопения, тромбоцитопения, вирусные инфекции (ветряная оспа, опоясывающий лишай), органические поражения сердца, выраженные нарушения функции печени и почек, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки в стадии обострения, беременность, кормление грудью [2].

1.1.5 Ограничения к применению

Пожилой возраст (повышенный риск кардиотоксического действия и угнетения функции костного мозга), подагра или почечные конкременты в

анамнезе (риск гиперурикемии) [3]. При беременности и кормлении грудью применение данного препарата противопоказано, так как возможен риск для грудных детей (неблагоприятные эффекты, мутагенное и канцерогенное действие) [3].

1.1.6 Побочные действия

Со стороны сердечно-сосудистой системы и крови (кроветворение, гемостаз): кардиотоксическое действие в форме застойной сердечной недостаточности (тахикардия, одышка, отечность стоп и лодыжек) и в виде перикардита-миокардита, лейкопения, тромбоцитопения (обычно бессимптомная), анемия, гранулоцитопения; редко — необычные кровотечения или кровоизлияния.

Со стороны органов ЖКТ: тошнота, рвота (отмечаются вскоре после введения и продолжаются 24–48 ч), эзофагит или стоматит (появляются через 3–7 дней после применения препарата), ротоглоточный кандидоз, анорексия, диарея, изъязвление слизистых оболочек ЖКТ, тенезмы.

Со стороны мочеполовой системы: гиперурикемия или нефропатия, связанная с повышенным образованием мочевой кислоты (боль в суставах, в нижней части спины или в боку), наиболее часто возникает в начальный период лечения; красноватая окраска мочи (исчезает в течение 48 ч), цистит.

Со стороны кожных покровов: выпадение волос (обратимое), потемнение или покраснение кожи, панникулит, целлюлит.

Аллергические реакции: редко — кожная сыпь или зуд, отек, повышенная температура тела или озноб.

Прочие: головная боль, оппортунистические инфекции; экстравазат, некроз ткани, флебит в месте введения [2].

1.1.7 Взаимодействие с другими веществами

Другие противоопухолевые препараты и лучевая терапия потенцируют эффект и аддитивно угнетают функцию костного мозга; циклофосфамид может усиливать кардиотоксичность (особенно у больных с нарушениями функции сердечно-сосудистой системы). Снижает противовоспалительную эффективность аллопуринола, колхицина и сульфинпиразона. При введении живых вирусных вакцин возможна репликация вакцинного вируса и усиление побочных эффектов, инактивированных вакцин — уменьшение выработки противовирусных антител [3]. Снижает противовоспалительную эффективность аллопуринола, колхицина и сульфинпиразона. Совместим с винкристином, циклофосфамидом, 6-меркаптопурином, преднизолоном, L-аспарагиназой, метотрексатом. Фармацевтически несовместим с гепарином и дексаметазона фосфатом — осадок; сильнощелочными растворами (pH более 8) — разрушение молекулы даунорубицина; ЛС, содержащими бактериостатические агенты (бензиловый спирт), — преждевременное высвобождение активного препарата [1].

1.1.8 Способ применения и дозы

Режим дозирования устанавливают индивидуально, в зависимости от показаний и стадии заболевания, состояния системы кроветворения, схемы противоопухолевой терапии.

Режим дозирования представлен в таблице 1.

Таблица 1

Дозировка ЛС даунорубицина

Возрастная категория	Суточная доза, мг/м ²	Частота применения, число раз/день	Курс, день	Периодичность, день
Взрослые	60	Ежедневно	3	7 – 15
	20 – 40		5	
Дети	25	1	1	5 – 7
Пожилые	Применение не рекомендуется			

При нарушении функции почек дозу даунорубицина уменьшают в зависимости от клиренса креатинина. При нарушении функции печени дозу снижают до 3/4 (при уровне билирубина 20,5–51,3 мкмоль/л) или 1/2 (при уровне билирубина выше 51,3 мкмоль/л или креатинина выше 0,3 ммоль/л) [4].

1.1.9 Меры предосторожности вещества даунорубицин

Перед каждым курсом лечения даунорубицином следует проверить функции сердца, почек и печени. Применение даунорубицина желательно проводить, контролируя показатели крови.

Для предотвращения развития вторичной гиперурикемии рекомендуется заблаговременное применение аллопуринола и достаточное употребление жидкости в процессе лечения.

С осторожностью применяют у больных с недостаточным резервом костного мозга.

Появление признаков угнетения функции костного мозга, необычных кровотечений или кровоизлияний, черного дегтеобразного стула, крови в моче или кале или точечных красных пятен на коже требуют немедленной консультации врача.

Стоматологические вмешательства следует по возможности завершить до начала терапии или отложить до нормализации картины крови (возможно повышение риска микробных инфекций, замедление

процессов заживления, кровоточивость десен). В ходе лечения необходимо соблюдать осторожность при использовании зубных щеток, нитей или зубочисток.

Необходимо избегать попадания раствора под кожу или в мягкие ткани. Об образовании инфильтрата (местное повреждение тканей и рубцевание), покраснении, боли или припухлости в месте введения необходимо информировать врача.

При образовании экстравазата (жжение или острая боль в месте инъекции) введение следует немедленно прекратить и возобновить в другую вену до введения полной дозы.

В период лечения не рекомендуется проведение вакцинации вирусными вакцинами [3].

1.1.10 Особые указания

Использование даунорубицина должно производиться квалифицированным медицинским персоналом с соблюдением установленных мер предосторожности при приготовлении и разбавлении инъекционных растворов (в стерильном боксе с использованием одноразовых хирургических перчаток и масок), уничтожении игл, шприцев, флаконов, ампул и остатка неиспользованного препарата.

При случайном попадании порошка или раствора на кожу или слизистые оболочки их необходимо тщательно промыть водой с мылом [2].

1.2 Методы определения даунорубицина

Даунорубицин и другие представители антрациклинов, стали ключевыми компонентами лечебных курсов для раковых опухолей, демонстрируя клиническую полезность этого класса соединений. К сожалению, их клиническое применение сопровождается ограничением дозировок, которые могут впоследствии привести к застойной сердечной недостаточности, с конечной смертностью 20-40% . Следовательно, основной

интерес в последние годы был сосредоточен на определении концентрации даунорубицина и его аналогов в биологических образцах с использованием быстрых и надежных методов. Для этого необходимо тщательно исследовать фармакокинетические и метаболические механизмы [5].

В настоящее время существует несколько методов определения даунорубицина и его аналогов. У каждого из методов есть свои преимущества и недостатки.

ВЖХ с УФ-детектированием ограничен комплексом операций и дорогостоящим оборудованием. Его достоинствами являются то, что он может быть применен не только для анализа даунорубицина, но и других антрациклиновых антибиотиков: эпирубицина и его аналогов. Данный метод имеет относительно низкий предел обнаружения — $2,7 \times 10^{-6}$ М. В статье автор делает вывод о том, что молекулы даунорубицина более стабильны в кислой среде, а так же исследует влияние солей на распад молекулы даунорубицина [6].

Спектрофотометрические методы анализа могут быть применены для определения следов антрациклиновых антибиотиков в сыворотке крови и моче человека. Но все же данный метод анализа по сравнению с другими методами имеют низкую чувствительность и специфичность, поэтому требуют более подробного и глубокого изучения [7].

Однако многие методы являются сложными и затратными. В таблице 2 представлены различные методы определения даунорубицина и их пределы обнаружения.

Таблица 2

Методы определения даунорубицина

Метод	Предел обнаружения	Ссылка
Вольтамперометрический метод	8×10^{-9} М	[8]
Жидкостная хромато-масс-спектрометрия	8×10^{-7} М	[7]
Спектрофотометрический метод	$1,4 \times 10^{-7}$ М	[7]
ВЖХ с УФ-детектированием	$2,6 \times 10^{-7}$ М	[6]

Из данных сводной таблицы можно сделать вывод, что наиболее высокой чувствительностью обладает вольтамперометрический метод анализа. Кроме того, ВА методы анализа обладают достаточной селективностью и экспрессностью, занимают немного времени и требуют небольшие затраты относительно других методов.

1.2 Вольтамперометрические методы анализа даунорубина

Был проведен обзор литературных источников посвященных исследованиям в области вольтамперометрических методик и способов определения даунорубина за последние 29 лет. В таблице 3 представлены параметры основных методов.

Вольтамперометрические методы определения даунорубина

Метод	Фоновый электролит	Рабочий электрод	Предел обнаружения	Ссылка
-------	--------------------	------------------	--------------------	--------

Катодная ВА	Фосфатный буферный раствор pH 6.5	Стеклоуглеродный электрод	1×10^{-9} М	[8]
Адсорбционная инверсионная ВА	КатВА: Ацетатный буферный раствор pH 4.4	Ртутно- капельный электрод	1×10^{-9} М	[9]
	АнВА: Фосфатный буферный раствор pH 7.4	Угольно-пастовый электрод		
Дифференциально-импульсная ВА	Фосфатный буферный раствор pH 7.4	Pt электрод	8×10^{-7} М	[10]
Линейная ВА	Фосфатный буферный раствор pH 7.05	Электрод, модифицированный оксидом индия-олова (In ₂ O ₃ -SnO ₂) (ITO) с имплантированными ионами COOH ⁺	$1,0 \times 10^{-7}$ М	[11]
Циклическая ВА	Фосфатный буферный раствор pH 7.8	Углеродный дисковый электрод	8×10^{-7} М	[12]
Квадратно-волновая ВА	Фосфатный буферный раствор pH 7.02	Золотой наноэлектродный ансамбль	$8,9 \times 10^{-8}$ М	[13]

Видно, что даунорубин определяется как методом КатВА и АнВА, т. е. способно к окислению и восстановлению. Анализируя данные литературного обзора, можно сделать вывод о том, что наиболее часто в своих исследованиях авторы в качестве фонового электролита использовали фосфатный буферный раствор с pH 4.8. В качестве рабочего электрода использованы различные виды: золотой наноэлектродный ансамбль, ртутно-

капельный, стеклоуглеродный, угольно-пастовый, платиновый электроды, в том числе электроды с модифицированной поверхностью. Наиболее высокой чувствительностью обладают такие виды ВА, как: катодная и адсорбционная инверсионная. В данных методах авторы используют ацетатный (рН 4.4) и фосфатный (рН 6.5; рН 7.4) буферные растворы с более кислой средой, чем в других методах. Самым чувствительным элементом во всех ВА методиках является рабочий электрод, его надежность, стабильность, возможность обновления поверхности, коммерческая доступность, дешевизна. Поэтому мы впервые провели исследование по использованию коммерчески доступного в Томске углеродсодержащего электрода, зарекомендовавшего себя как надежный, доступный, недорогой сенсор с широким диапазоном рабочих потенциалов [14].

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Средства измерений, вспомогательные устройства, материалы и реактивы

2.1.1 Средства измерений

При выполнении измерений применяли следующие средства измерений: анализатор вольтамперометрический ТА-4 в комплекте с IBM-совместимым компьютером, весы аналитические типа ВЛА-200, дозаторы пипеточные с дискретностью установки доз (0,01-1,00) см³, пипетка стеклянная 10,0 см³ 1 или 2 класса.

Анализатор ТА-4 содержит три кварцевые трехэлектродные электрохимические ячейки и две УФ лампы. На стадии регистрации вольтамперограмм использовали дифференциальный импульсный режим поляризации электрода, позволяющий варьировать параметры развертки потенциала в диапазоне от минус 3,0 до 3,0 В.

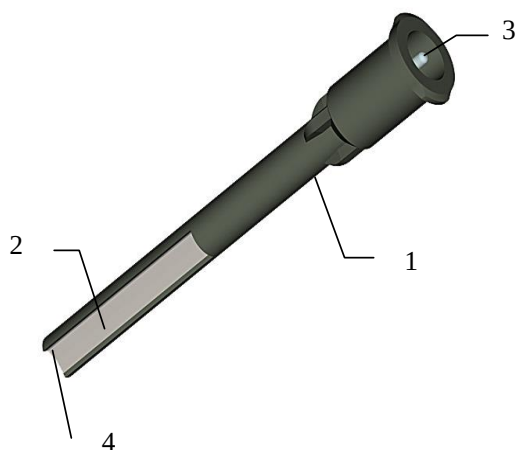
В качестве вспомогательного электрода и электрода сравнения применяли хлоридсеребряный электрод ($\text{Ag}/\text{AgCl}/1\text{M KCl}$). В качестве индикаторного электрода при исследованиях электрохимического поведения даунорубицина использовали углеродсодержащий электрод (УЭ).

Углеродсодержащий электрод (рис. 1) является твердым углеродным композитным электродом. Его готовят по технологии «литье под давлением» из полиэтиленового концентрата технического углерода, с содержанием углерода 30 %. Обновление поверхности углеродсодержащих электродов проводят путем срезания верхнего слоя (0,1–0,3 мм) специальным резаком – устройством для обновления поверхности электродов.

Все растворы готовили на бидистиллированной воде с применением ГСО, реактивов квалификации «ос.ч.» или «х.ч.».

2.1.2 Вспомогательные устройства, материалы и реактивы

При выполнении измерений применяли следующие вспомогательные устройства, материалы и реактивы: дистиллятор, эксикатор, посуда стеклянная лабораторная, кварцевые тигли (стаканчики), бумага фильтровальная, вода бидистиллированная, калия хлорид, ос.ч., кислота



уксусная, х. ч. ледяная, кислота борная, х. ч., натр едкий технический, кислота азотная, х. ч., кислота ортофосфорная, х. ч.

Рис. 2. Углеродсодержащий электрод 1-полиэтиленовый корпус, 2-электро-проводящая смесь полиэтилена и сажи, 3 контакт, 4-рабочая поверхность

2.1.3 Приготовление растворов

Аттестованные смеси с содержанием даунорубицина 1×10^{-3} моль/л и 1×10^{-4} моль/л готовили методом последовательного разбавления

растворов в мерных колбах вместимостью 15мл бидистиллированной водой.

Ацетатный буферный раствор pH 3.8. 421,5 мл раствора уксусной кислоты (1 н.) поместили в колбу на 500 мл и добавили 50 мл NaOH (1 н.). Смесь разбавили бидистиллированной водой до метки.

Фосфатный буферный раствор pH 4.8. Раствор гидрофосфата натрия (0,0667 М раствор готовить растворением 11,866 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 1 л воды) объемом 0,35 мл поместили в колбу вместимостью 100 мл и разбавили раствором дигидрофосфата калия (0,0667 М раствор готовить растворением 9,072 г KH_2PO_4 в 1 л воды) до метки.

Калия хлорид 1 М. 7,46 г KCl растворяли бидистиллированной водой в мерной колбе вместимостью 100 мл. Доводили объем раствора до метки бидистиллированной водой.

Универсальный раствор Бриттона-Робинсона pH 1.6: навеску борной кислоты массой 24,73 г растворили в 0,5 л горячей воды. После охлаждения добавили 23 мл ледяной уксусной кислоты и 21 мл 80% ортофосфорной кислоты. Объем полученного раствора довели до метки в колбе вместимостью 1 л. Для достижения нужного pH раствор разбавляли щелочью. pH контролировался pH-метром.

2.2 Анодная вольтамперометрия

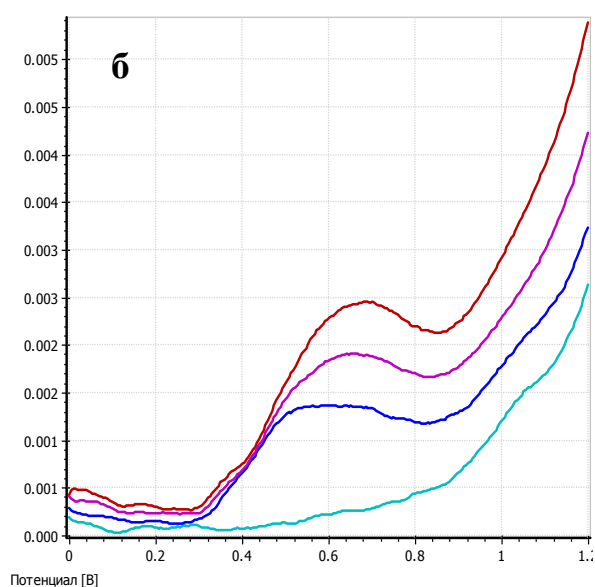
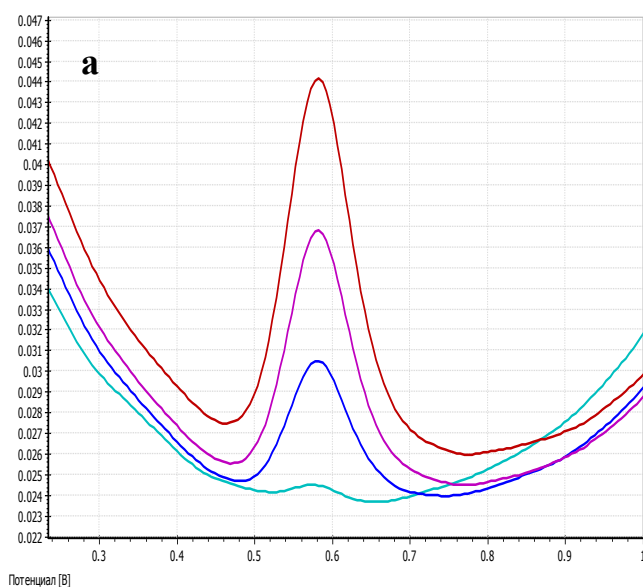
В качестве аналитического сигнала даунорубицина использовали высоту пика, регистрируемого на анодной вольтамперограмме в области потенциалов от 0 – 1,2 В.

Регистрацию вольтамперограмм проводили следующим образом. Перед началом анализа устраняли мешающее влияние дезактивации рабочего электрода путем выдерживания электрода при отрицательном потенциале, либо съемки циклических вольтамперограмм в растворе 0,5 М серной кислоты. Исследуемый раствор с добавкой фонового электролита и стандартного раствора даунорубицина помещали в электрохимические ячейки анализатора ТА-4. Для получения сигнала анализируемого объекта

использовался дифференциально-импульсный режим развертки со следующими параметрами: $W_p = 20$ мВ/с без электроконцентрирования, шаг развертки - 5 мВ; задержка измерения - 25 мс; амплитуда волны - 30 мВ.

2.2.1 Выбор фонового электролита

Как известно, на величину аналитического сигнала большое влияние оказывает природа и рН фонового электролита. Поэтому были проведены исследования по влиянию фонового электролита на сигнал даунорубицина. Для эксперимента были выбраны 3 буферных раствора: ацетатный, фосфатный и универсальный буферный раствор Бриттона-Робинсона (рис.3). Результаты анализа показали, что наиболее выраженный сигнал даунорубицина наблюдается в ацетатном и фосфатном буферных растворах. Для сравнительного анализа было изучено поведение анодного тока пика в тетраоксалатном буферном растворе. Так как в присутствии последнего аналитический сигнал был неявным, в дальнейших экспериментах данный раствор не использовался.



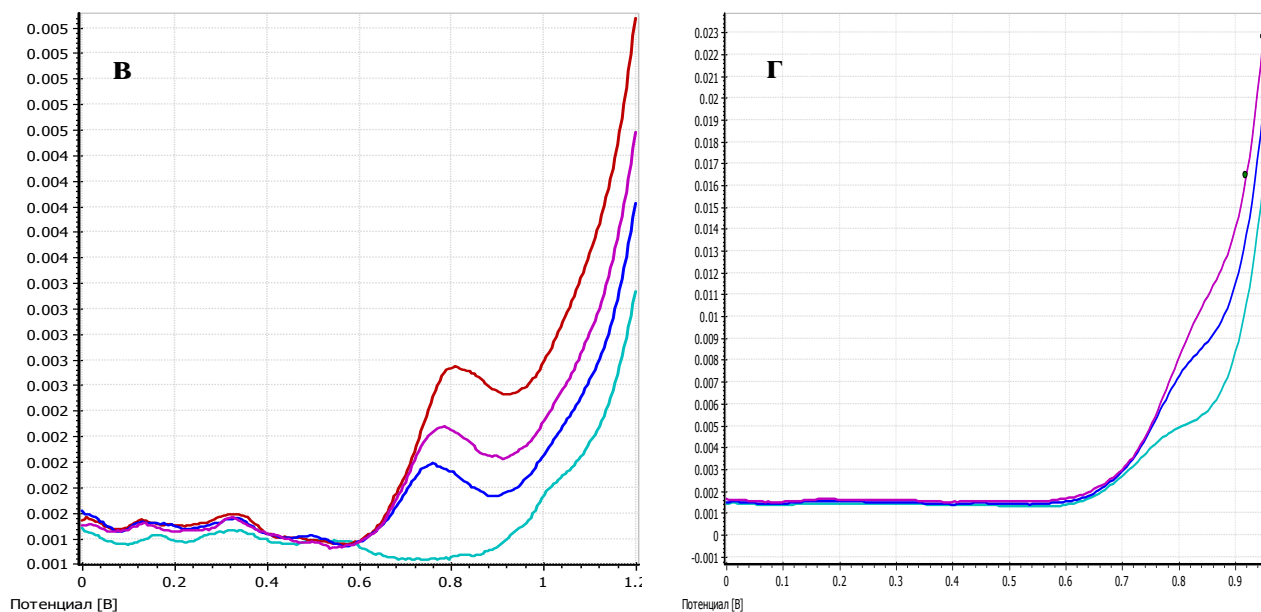


Рис. 3. Вид анодных вольтамперограмм в разных буферных растворах: а) ацетатный pH 3.8; б) фосфатный pH 4.8; в) универсальный раствор Бриттона-Робинсона pH 2; г) тетраоксалатный pH 1.65

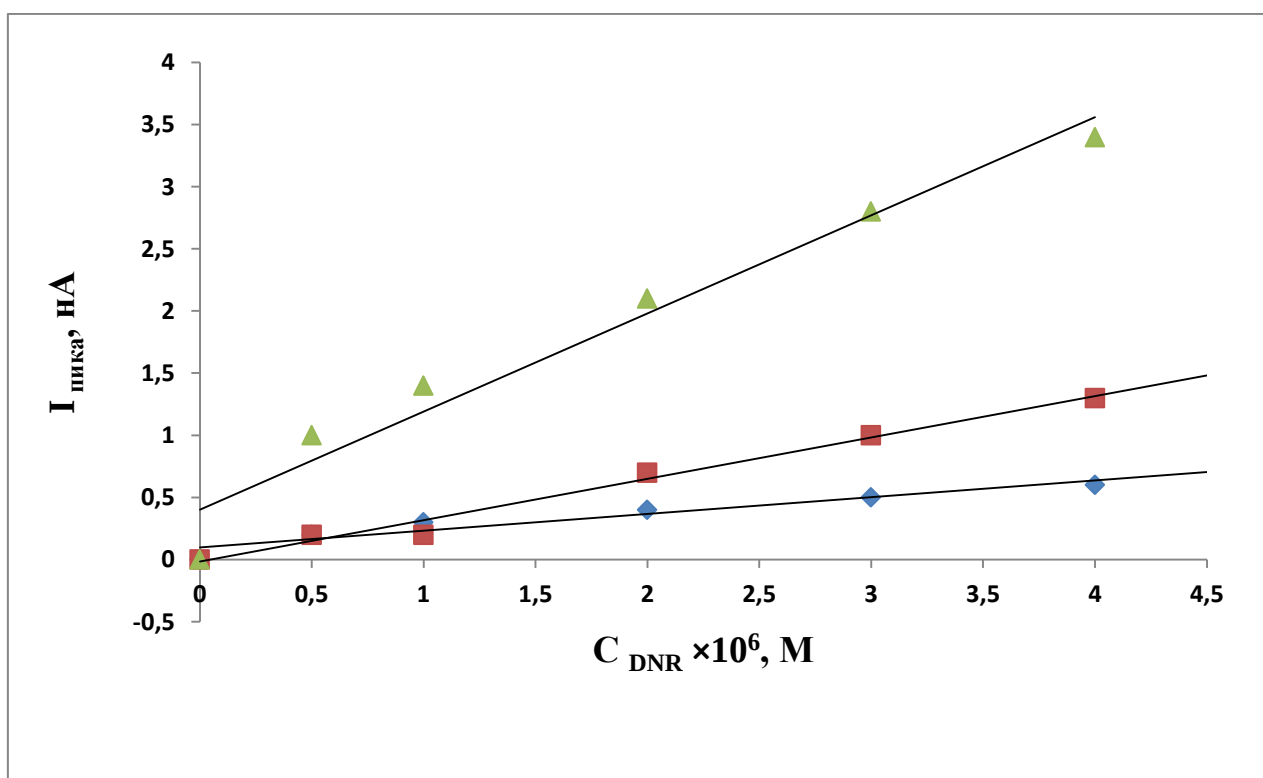


Рис. 4. Зависимость I_n от C_{DNR} в различных буферных растворах. $C_{DNR} = 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 \times 10^{-6}$ моль/л; без накопления, $W_p = 20$ мВ/с : а) ацетатный pH 3.8; б) фосфатный pH 4.8; в) универсальный раствор Бриттона-Робинсона pH 2.

Так как величина анодного тока пика даунорубицина выше в присутствии фосфатного и ацетатного буферных растворов, они были выбраны в качестве фоновых электролитов для дальнейшего изучения влияния рН на величину аналитического сигнала (рис. 4).

2.3.2 Зависимость анодного тока пика от рН фонового электролита

В ходе эксперимента выявлено, что анодный сигнал даунорубицина очень сильно зависит от рН фонового электролита. При этом смещение рН в более кислую область приводит к существенному повышению тока пика и смещению потенциала пика в анодную область. При увеличении рН ток пика падает и сигнал смещается в катодную область (рис. 5). Таким образом, эти зависимости обуславливают выбор меньшего значения рН как оптимального для определения даунорубицина.

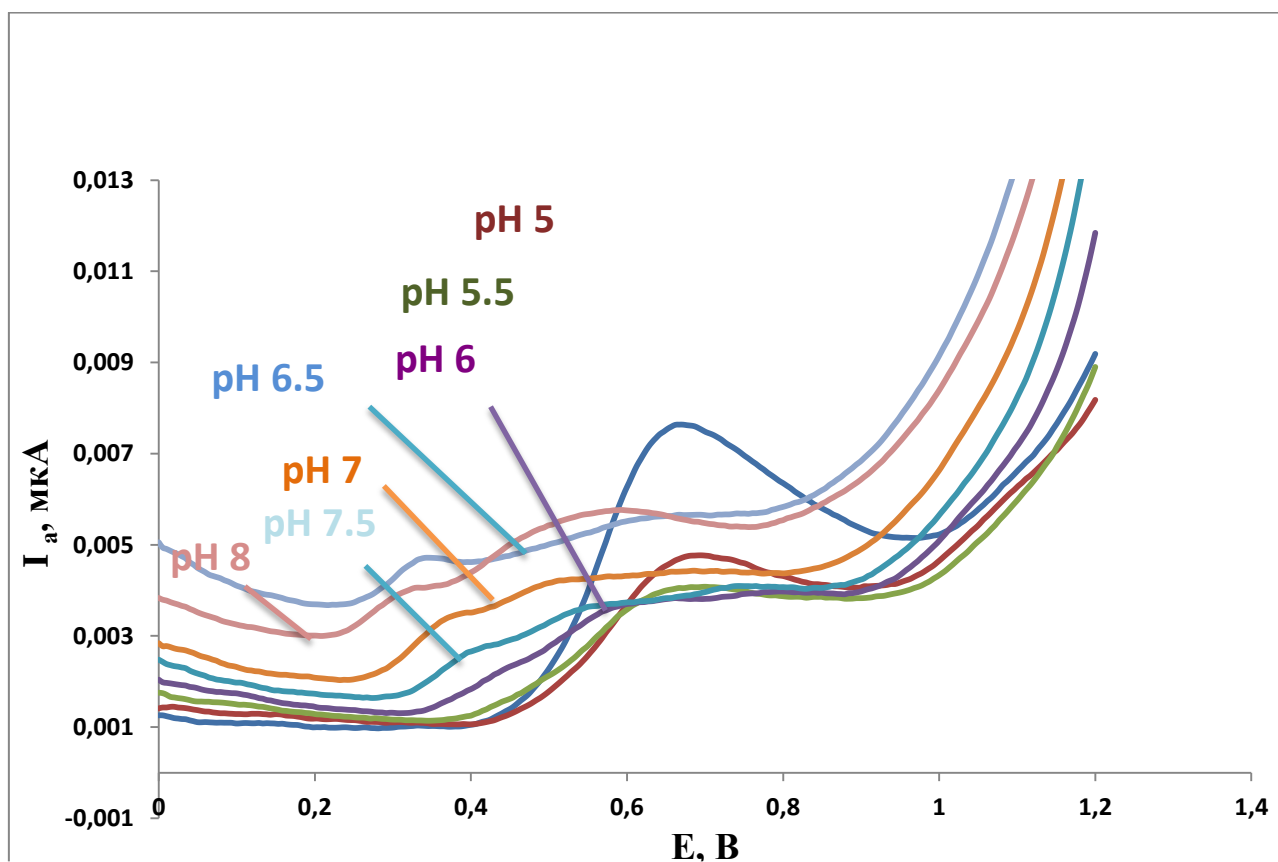


Рис.5. Зависимость I_n от рН. Условия съемки: фосфатный буферный раствор; $C_{DNR} = 2 \times 10^{-6} M$; $W_p = 20$ мВ/с; без накопления.

Были построены зависимости тока пика и потенциала от рН фонового электролита. На рис. 6 видно, что при увеличении значения рН буферного раствора потенциал смещается в анодную область, а значение анодного тока пика падает.

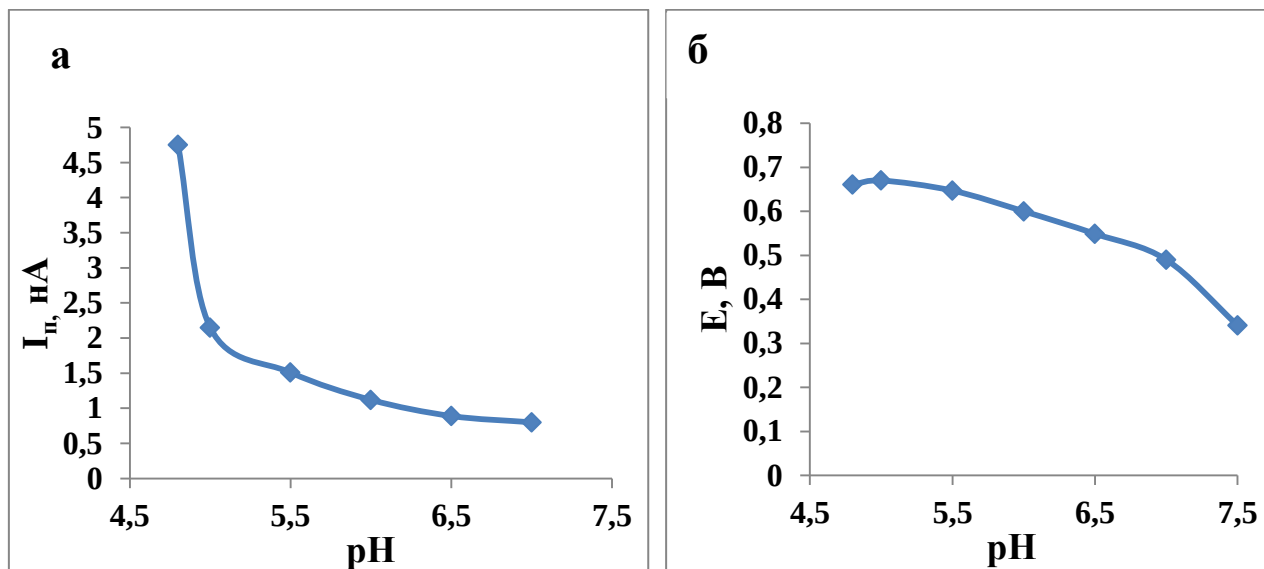


Рис. 6. Зависимость от рН. а) I_n ; б) E_n . Условия съемки: фосфатный буферный раствор; $C_{DNR} = 2 \times 10^{-6} M$; $W_p = 20 \text{ мВ/с}$; без накопления.

2.3.3 Стабильность аналитического сигнала

Для определения органических веществ методами ВА особое внимание обращают на стабильность аналитического сигнала. Такие эксперименты были проведены. Из рис. 7 видно, что ток пика выше и сигнал наиболее устойчив в ацетатном буферном растворе. Это еще раз обуславливает выбор ацетатного буферного раствора в качестве фонового электролита

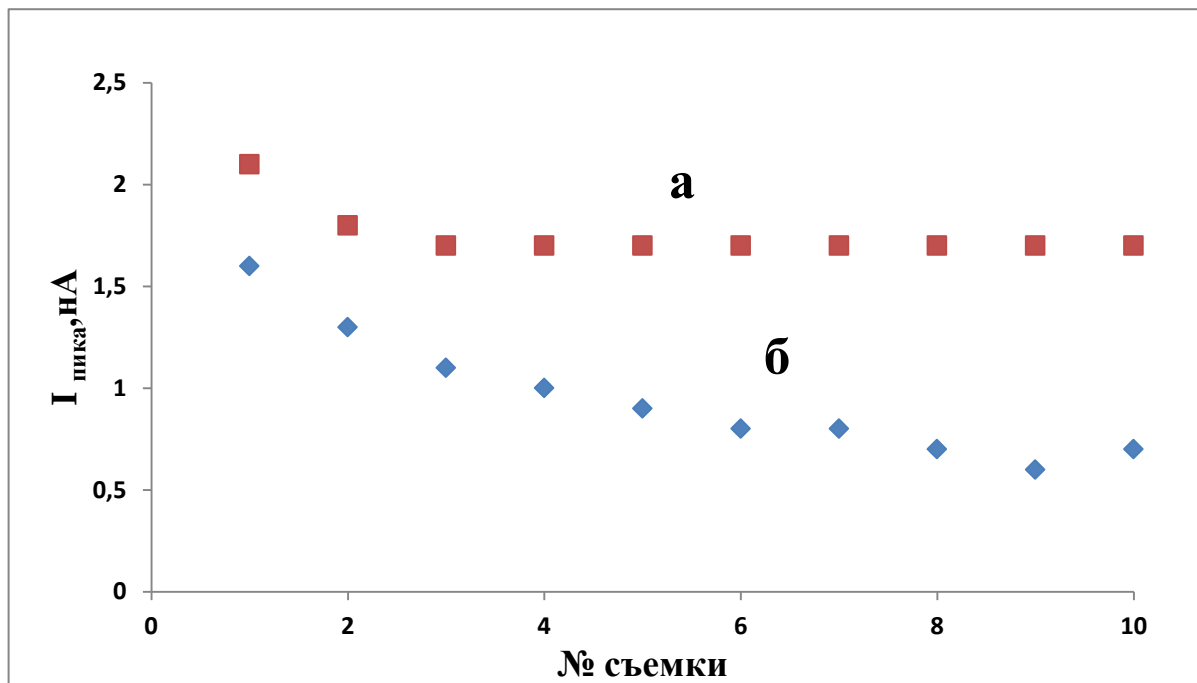


Рис. 7. Воспроизводимость анодного I_n даунорубина в буферных растворах. а) ацетатный; б) фосфатный. Условия съемки: $W_p = 20$ мВ/с; без электроконцентрирования; $C_{DNR} = 2 \times 10^{-6}$ М

2.3.4 Зависимость анодного тока пика от потенциала

электроконцентрирования

В связи с выбором ацетатного буферного раствора в качестве фонового

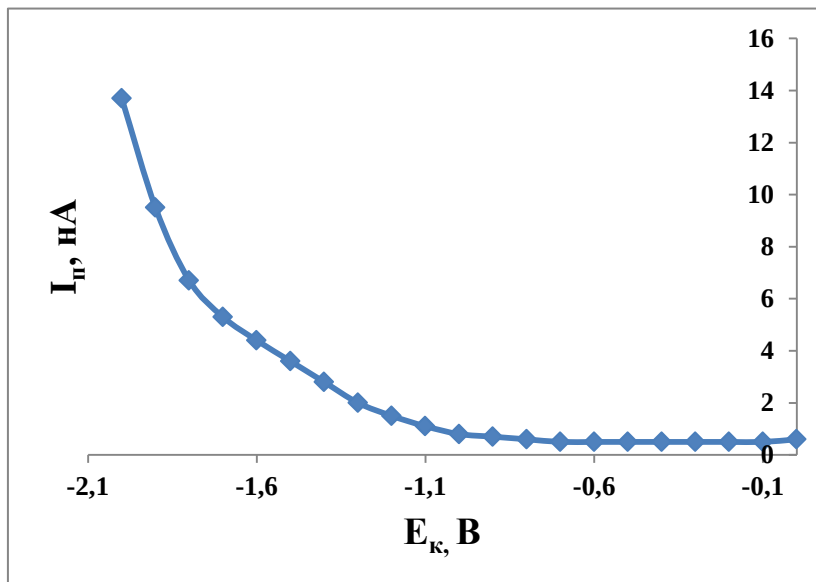


Рис.8. Зависимость I_n от E_k . Условия съемки: ацетатный буферный раствор; $C_{DNR} = 4 \times 10^{-7}$ М; $W_n = 20$ мВ/с; $t_r = 10$ с

электролита, имело место изучить условия съемки, влияющие на сигнал, а именно: потенциал электроконцентрирования, время электроконцентрирования и скорость развертки. На рис. 8 видно, что при более отрицательных значениях потенциала

электроконцентрирования, величина пика анодного тока увеличивается. Это объясняется тем, что при отрицательных значениях потенциала выделяется водород, который способствует десорбции веществ с поверхности рабочего электрода, приводящей к увеличению доли активной поверхности и как следствию тока анодного пика. Поэтому был выбран **потенциал электроконцентрирования – 1.6 В**.

2.3.5 Зависимость анодного тока пика от времени электроконцентрирования

Выбрано оптимальное **время электроконцентрирования – 10 с**. Выбор времени обусловлен тем, что активная поверхность электрода небольшая (в составе материала электрода углерода всего 30 %). Несмотря на то, что при более длительном времени накопления сигнал тока пика все же растет, это может привести к концентрированию анализируемого вещества на всей поверхности электрода, что будет мешать дальнейшему определению даунорубицина (рис. 7).

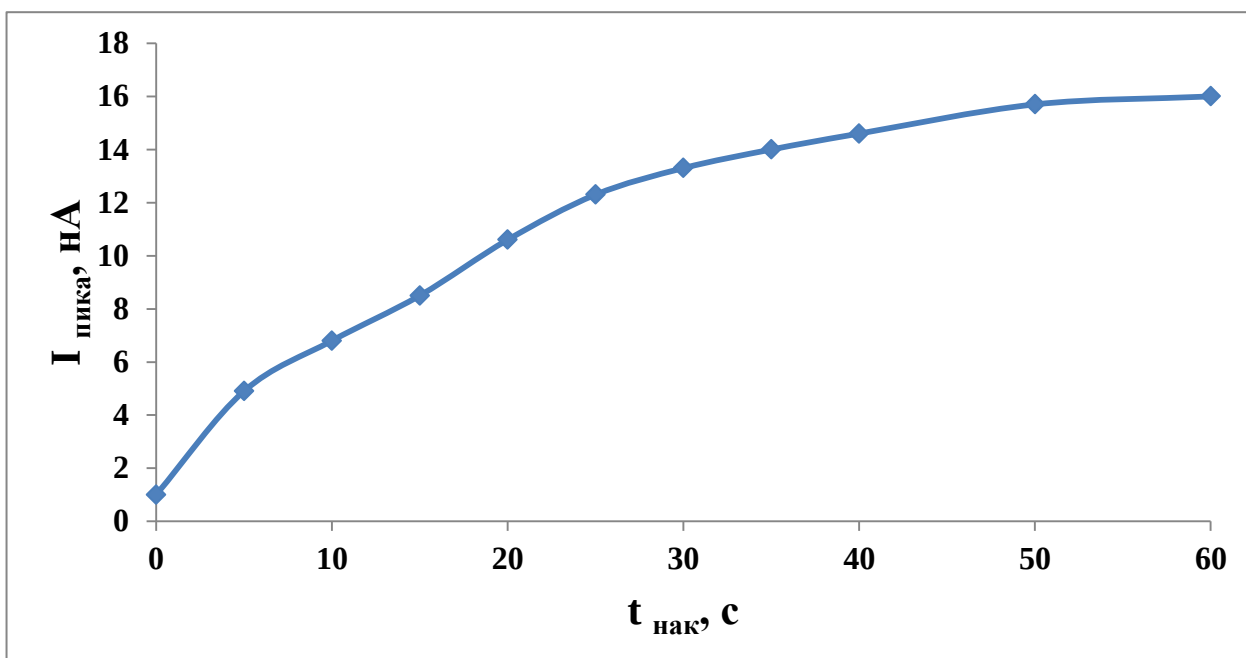
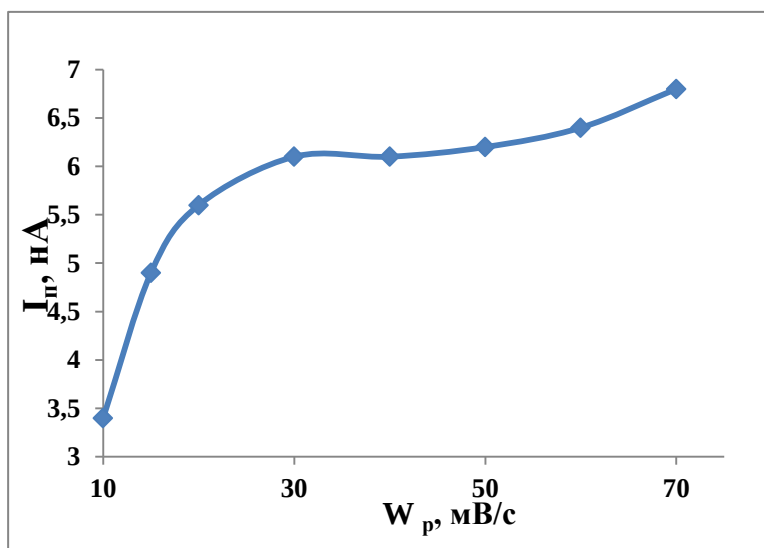


Рис.9. Зависимость I_n от t_k . Условия съемки: ацетатный буферный раствор; $C_{\text{DNR}} = 4 \times 10^{-7} \text{ M}$; $W_p = 20 \text{ мВ/с}$; $E_k = -1,6 \text{ В}$

2.3.6 Зависимость анодного тока пика от скорости развертки Изучена зависимость скорости развертки потенциала при оптимальном времени и



потенциале электроцентрирования. По рис 10 видно, что зависимость имеет нелинейный характер. Это говорит о том, что лимитирующей стадией является диффузия. Установлено оптимальное значение скорости развертки – 50 мВ/с.

Рис.10. Зависимость I_n от W_p . Условия съемки: ацетатный буферный раствор; $C_{DNR} = 4 \times 10^{-7} \text{ М}$; $E_k = -1,6 \text{ В}$; $t_k = 10 \text{ с}$

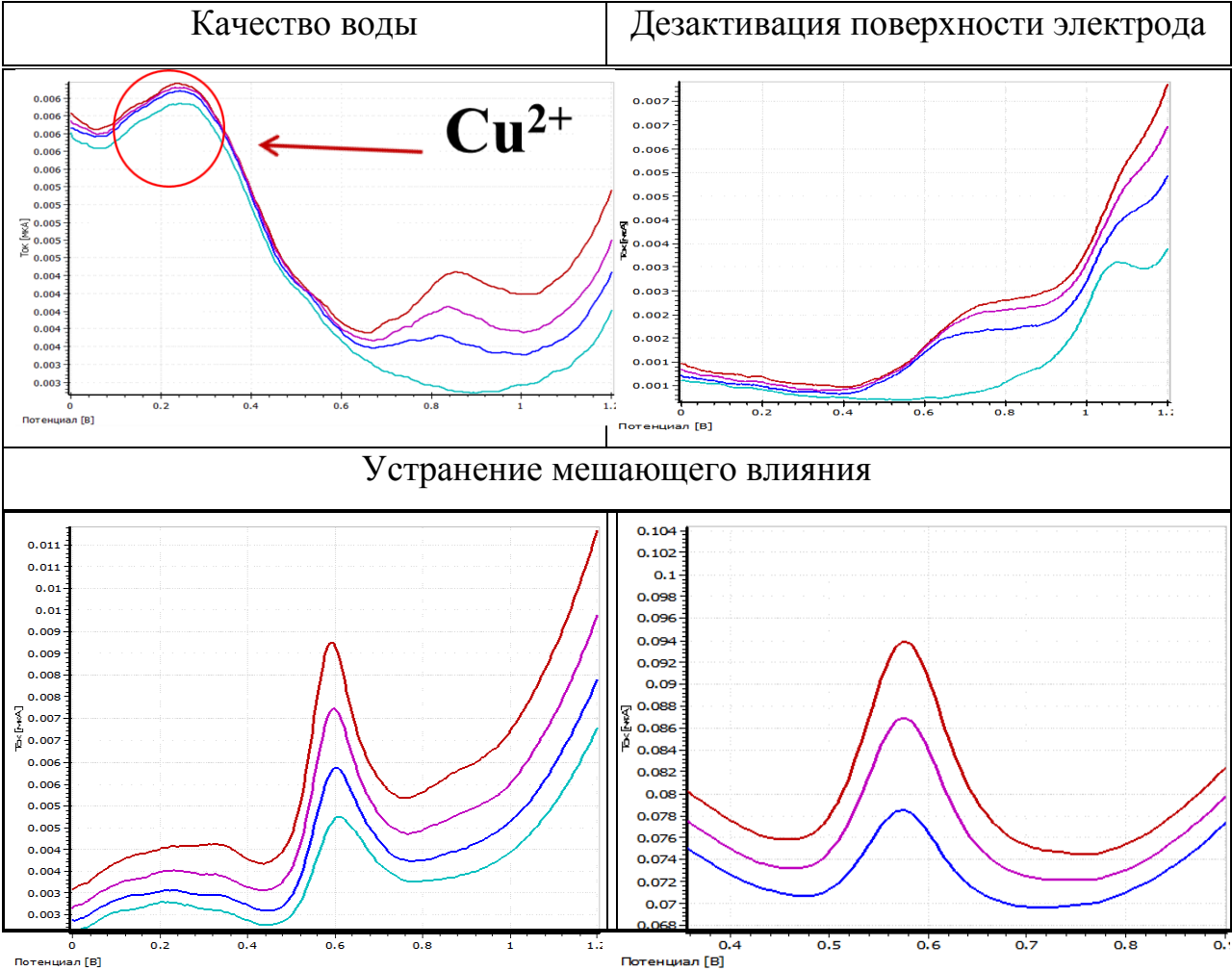
2.3.7 Мешающее влияние

В ходе исследований, мы столкнулись с такими проблемами, как мешающее влияние примесей тяжелых металлов Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} в воде и дезактивацией поверхности электрода. Для устранения мешающего влияния примесей, дистиллированная вода была заменена на бидистиллированную воду и «Аква Минерале». Причинами дезактивации могут быть: адсорбция исследуемого вещества на поверхности рабочего электрода, примеси, содержащиеся в растворе. Для активации поверхности рабочего электрода применены электрохимические способы, а в исключительных случаях – срез рабочей поверхности электрода. Во время выдерживания электрода при отрицательном потенциале выделяется водород, который способствует десорбции веществ с поверхности рабочего электрода, приводящей к увеличению доли активной поверхности и анодного тока пика. Еще одним эффективным методом очистки рабочей поверхности электрода является съемка циклических вольтамперограмм в широком диапазоне потенциалов в 0,05 М растворе серной кислоты. Съемка 20 циклов

приводит к полной очистке поверхности и готовности электрода к дальнейшим исследованиям. Виды вольтамперограмм при мешающем влиянии и его устранения представлены в таблице 4.

Таблица 4

Мешающее влияние и его устранение



2.3.8 Вид сигнала даунорубина и градуировочные зависимости в выбранных рабочих условиях

В результате исследований влияния различных факторов на анодный сигнал даунорубина разработана методика определения даунорубина методом анодной инверсионной вольтамперометрии с использованием

углеродсодержащего электрода в диапазоне от 1×10^{-6} М до 5×10^{-8} М. Рабочие условия разработанной методики представлены в таблице 5.

Таблица 5

Рабочие условия определения даунорубицина методом анодной вольтамперометрии

Рабочие условия	
Фоновый электролит	Ацетатный буферный раствор
рН	3.8
Потенциал электроконцентрирования	- 1.6 В
Время электроконцентрирования	10 с
Скорость развертки	50 мВ/с
Предел обнаружения	5×10^{-8} моль/л
Диапазон линейности	$(0-14) \times 10^{-7}$ моль/л

2.4 Анализ модельных растворов

Для проверки правильности разработанной методики были проведены исследования модельных растворов содержащих различные концентрации даунорубицина. Концентрация определяемого вещества вычислялась методом стандартных добавок и методом градуировочного графика (линейного и квадратичного). Посчитаны погрешности определения ДНР данными методиками и выявлен более точный метод расчета.

Таблица 6

Результаты анализа модельных растворов методом «введено-найдено»

Введено, C_{DNR} , М	Найдено, C_{DNR} , М		Погрешность, %	
	Метод стандартных добавок	Метод градуировочного графика	Метод стандартных добавок	Метод градуировочного графика

		лин.	квадр.		лин.	квадр.
1×10^{-6}	$1,6 \times 10^{-6}$	$1,53 \times 10^{-6}$	$1,02 \times 10^{-6}$	60	53	2
$2,5 \times 10^{-6}$	$2,93 \times 10^{-6}$	$3,1 \times 10^{-6}$	$2,47 \times 10^{-6}$	17	24	1,2
$4,5 \times 10^{-6}$	$6,4 \times 10^{-6}$	$6,98 \times 10^{-6}$	$6,03 \times 10^{-6}$	42	55	34
$0,5 \times 10^{-7}$	$0,59 \times 10^{-7}$	$0,58 \times 10^{-7}$	$0,3 \times 10^{-7}$	18	16	19
$1,5 \times 10^{-7}$	$1,63 \times 10^{-7}$	$1,59 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-7}$	8,7	6	13
3×10^{-7}	$4,65 \times 10^{-7}$	$3,3 \times 10^{-7}$	$3,09 \times 10^{-7}$	55	10	3

Исходя из значений относительной погрешности, можно сказать, что использование градуировочного графика, описанного квадратичным уравнением зависимости тока анодного пика от концентрации даунорубицина в растворе анализируемого вещества является более правильным способом расчета, так как значения погрешностей не велики и допустимы.

3 Заключение

В ходе проведения исследований по определению даунорубицина методом анодной вольтамперометрии с использованием углеродсодержащего электрода получены следующие результаты:

- 1.
1. Обобщены литературные данные по определению даунорубицина различными методами, в том числе методом вольтамперометрии.

2. Впервые получен сигнал даунорубицина на углеродсодержащих электродах в различных фоновых электролитах (ацетатный, фосфатный, универсальный раствор Бриттона-Робинсона) методом анодной вольтамперометрии.
3. Исследованы факторы, влияющие на аналитический сигнал даунорубицина (природа фонового электролита, pH, E_k , t_k , W_p).
4. Выбраны рабочие условия определения даунорубицина методом АнВА: фоновый электролит- ацетатный буферный раствор pH 3.8; $E_k = -1.6$ В; $t_k = 10$ с; $W_p = 50$ мВ/с.
5. Разработан способ определения даунорубицина методом анодной вольтамперометрии, позволяющий проводить его анализ: диапазон линейности градуировочного графика $(0-14) \times 10^{-7}$ моль/л; предел обнаружения : 5×10^{-8} моль/л.

Список используемой литературы

1. Даунорубицин: : [Электрон. ресурс] // Свободная энциклопедия Википедия // URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/> (Дата обращения 2.02.2016).
2. Даунорубицин (Daunorubicin): инструкция, применение и формула: [Электрон. ресурс] //Регистр лекарственных средств России, 2000

- 2016. URL: http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_456.htm (Дата обращения: 2.02.2016).
3. Даунорубицин: [Электрон. ресурс] // Реестр лекарственных средств // URL: <http://www.reles.ru/>. (Дата обращения: 2.02.2016).
4. A. Trouet. Daunorubiein-DNA and Doxorubiein-DNA // A. Trouet and D. Deprez-De Campeneere // *Cancer Chemotherapy Pharmacology* – 1979.– Vol. 2 – S. 77 – 79.
5. Zhanguang Chen. Highly sensitive determination of doxorubicin and daunorubicin based on their effect on the resonance light scattering signals of the ethidium-DNA complex / Zhanguang Chen, Sihua Qian, Guoliang Liu, Xi Chen, Junhui Chen // *Microchimica Acta* – 2011. – Вып. 3 – 4 – S. 217 – 223
6. Anna Jelinska. Validation of a Stability Indicating LC-UV Method for [(N-Morpholine)methylene] daunorubicin Hydrochloride / Anna Jelinska, Marianna Zajac, Judyta Cielecka-Piontek, Kinga Glab, Bartosz Tomaszewicz, Anna Krause, Irena Oszczapowicz, Małgorzata Wasowska // *Chromatographia Supplement* – 2008. – Vol. 67 – S. 107 – 111.
7. Yuhui Yang. Development and validation of a high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for quantification of daunorubicin in rat plasma // *Talanta* – 2007. – Vol. 71 – S. 596–604.
8. Hui Jiang. Highly sensitive detection of daunorubicin based on carbon nanotubes–drug supramolecular interaction / Hui Jiang, Xue-Mei Wang // *Electrochemistry Communications* – 2009. – Vol. 11 – S. 126–129.
9. Joseph Wang. Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Low Levels of Daunorubicin / Joseph Wang, Meng Shan Lin, Vince Villa // *Analyst* – 1987. – Vol. 112 – S. 1303 – 1307.
10. José A. Ribeiro. Electrochemical Study of the Anticancer Drug Daunorubicin at a Water/Oil Interface: Drug Lipophilicity and Quantification / José A. Ribeiro, F. Silva, Carlos M. Pereira // *Analytical chemistry* – 2013. – Vol. 85 – S. 1582 – 1590.

11 DongMei Gao. Determination of daunomycin at a novel COOH/indium tin oxide ion implantation-modified electrode / DongMei Gao, JingBo Hu, Meng Yang, QiLong Li // Analytical Biochemistry – 2006. – Vol. 358 – S. 70 – 75.

12. Qin Hu, Lan Zhang. Determination of daunorubicin in human urine by capillary zone electrophoresis with amperometric detection / Qin Hu, Lan Zhang, Tianshu Zhou, Yuzhi Fang // Analytica Chimica Acta – 2000. – Vol. 416 – S. 15 – 19.

13. Lixin Cao. Gold 3D Brush Nanoelectrode Ensembles with Enlarged Active Area for the Direct Voltammetry of Daunorubicin / Lixin Cao, Peisheng Yan, Kening Sun, Donald W. Kirk // Electroanalysis – 2009. – Vol. 21 – № 10 – S. 1183 – 1188.

14. Noskova, G. N. 'Fabrication and application of gold microelectrode ensemble based on carbon / Noskova G. N., Zakharova E. A., Chernov V. I., Zaichko, A.V., Elesova, E. E., Kabakaev A. S – 2011. – Vol. 30 – S. 1135.