

На правах рукописи



Мезенцева Ольга Леонидовна

**ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГАЛОНАЛА,
ГАЛОДИФА И МЕЛЬДОНИЯ НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ
УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩИХ ЭЛЕКТРОДАХ**

02.00.02 - Аналитическая химия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Томск-2019

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»

Научный руководитель д.х.н., профессор Слепченко Галина Борисовна

Официальные оппоненты:

Бакибаев Абдигали Абдиманович, д.х.н., профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», ведущий научный сотрудник лаборатории органического синтеза, профессор кафедры органической химии;

Козицина Алиса Николаевна, д.х.н., доцент, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Уральский федеральный университет имени первого президента России Б.Н. Ельцина», заведующая кафедрой аналитической химии, директор инновационного центра химико-фармацевтических технологий.

Защита состоится «24» декабря 2019 года в 14 часов 30 минут

(дата, время)

на заседании диссертационного совета ДС.ТПУ.08 ФГАОУ ВО «НИ Томский политехнический университет», 634050, г.Томск, пр.Ленина, 30, корпус №2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет» и на сайте: dis.tpu.ru

Автореферат разослан _____

(Дата)

Ученый секретарь диссертационного совета

Е. Дорожко

Дорожко Е. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы.

Одними из трендов программы развития фармацевтической промышленности «Фарма-2030» является создание полноценного рынка отечественных лекарственных средств, с учетом внедрения перспективных препаратов, направленных на терапию социально значимых заболеваний. Перспективными препаратами для коррекции заболеваний, связанных с алкоголизмом (абстиненции, печеночные и сердечно-сосудистые патологии и др.) являются лекарственные вещества синтетической природы – галонал (5-этил-5-фенил-1-о-фтор-бензоилбарбитуровая кислота), галодиф (1-[(3-хлорфенил)(фенил)метил]мочевина) и мельдоний (3-(2,2,2-триметилгидразиний) дигидрат). Структуры объектов исследования приведены на рисунке 1.

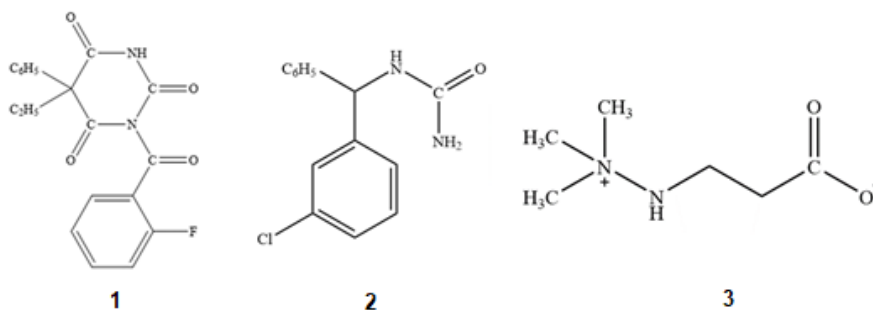


Рисунок 1 - Структурные формулы галонала (1), галодифа(2) и мельдония(3)

Галонал и галодиф – перспективные противосудорожные средства. Помимо этого, являются индукторами ферментных систем, увеличивают скорость метаболизма веществ-ксенобиотиков и снижению их токсичности. Гепатопротекторный эффект данных веществ доказан на различных патологических моделях. Преимуществами галодифа также являются: малая токсичность, отсутствие побочных эффектов, таких как: сонливость, заторможенность, нарушение репродуктивной функции у мужчин.

Мельдоний – вещество с доказанной фармакологической активностью в многочисленных клинических исследованиях: обладает метаболическим, кардиопротективным, антиангинальным, антигипоксическим,

вазодилатирующим, адаптогенным эффектами, оказывает легкое тонизирующее действие на центральную нервную систему.

Для внедрения в медицинскую практику новых лекарственных препаратов (или по новым медицинским показаниям), согласно GCL (good clinical practice – надлежащая клиническая практика), необходимо проведение ряда доклинических и клинических исследований, позволяющих оценить эффективность препарата и степень его безопасности. Поэтому проблема аналитического сопровождения является крайне актуальной задачей. Наряду с фармакопейными инструментальными методами, такими как: хроматография, спектрометрия и другими, вольтамперометрия является одним из перспективных физико-химических методов для анализа лекарственных веществ, позволяет решать широкий круг аналитических задач: изучение фармакокинетики и фармакодинамики препаратов, токсичности; осуществление клинического контроля и контроля качества лекарственных форм. Вольтамперометрические методы также перспективны для решения вопросов строения органических веществ (кетто-енольной таутомерии, цис- /транс- и оптической изомерии). Модификация поверхности электродов позволяет расширить область применения вольтамперометрии, и решать такие задачи в фармации, как: взаимодействие в системе «лекарственное вещество : рецептор», изучение энантиомерной принадлежности для оценки качества синтезированной партии вещества, обнаружение контрафактной продукции, определение потерь активной субстанции вещества при неправильном хранении либо транспортировке вещества. Таким образом, применение вольтамперометрии для разработки новых методик контроля фармацевтических препаратов целесообразно в условиях современной аналитической практики.

Целью данной работы является проведение исследований по физико-химическому поведению некоторых лекарственных веществ (галонал, галодиф и мельдоний) на модифицированных углеродсодержащих электродах, а также разработка новых методик вольтамперометрического определения

изучаемых лекарственных веществ в фармацевтических препаратах и биологических средах.

Для этого необходимо решить следующие **задачи**:

1) Осуществить выбор рабочих условий вольтамперометрического определения галонала, галодифа и мельдония на углеродсодержащих электродах, в т.ч. и модифицированных;

2) Разработать методики модификации поверхности графитовых и стеклоуглеродных электродов арендиазония тозилатами для определения галонала и мельдония;

3) Изучить закономерности физико-химических процессов окисления-восстановления галонала, галодифа и мельдония на углеродсодержащих электродах;

4) Провести оценку мешающего влияния вспомогательных компонентов на аналитический сигнал определяемых лекарственных веществ и разработать условия пробоподготовки таблеток и капсул;

5) Разработать методики количественного химического анализа лекарственных препаратов на содержание галонала и галодифа, биологических жидкостей на содержание мельдония методом вольтамперометрии. Рассчитать основные метрологические характеристики разработанных методик.

Научная новизна. В рамках работы:

1. Впервые разработаны вольтамперометрические условия определения органических веществ: галонала на стеклоуглеродных (с модификацией и без) электродах на фоне 0,1М Na₂SO₃; галодифа на золото-графитовом электроде на фоне боратного буферного раствора с рН 9,18; мельдония на золото-графитовом электроде, модифицированного солями арендиазония на фоне буферного раствора Бриттона-Робинсона);

2. Впервые для определения галонала и мельдония предложен способ модифицирования углеродсодержащих электродов арендиазония тозилатами с различными заместителями и проведено исследование поверхности электрода с

помощью зондовой микроскопии;

3. Предложен алгоритм хемометрической обработки вольтамперных кривых для оценки содержания энантиомерных форм в субстанции галодифа;

4. Впервые исследована природа электрохимического процесса бензоилпроизводных барбитуровой кислоты - определена как квазиобратимая; установлен механизм реакции восстановления; рассчитаны следующие физико-химические параметры: коэффициент диффузии, эффективный коэффициент переноса катодного процесса; эффективные константы диссоциации галонала. Определены закономерности влияния структур бензоильных производных фенобарбитала на потенциал пика, определен вклад физической адсорбции в электрохимический процесс;

5. Впервые разработан вольтамперометрический способ определения мельдония в присутствии L-карнитина на золото-графитовом электроде, модифицированного АДТ;

6. Предложен алгоритм методик вольтамперометрического определения галонала, галодифа и мельдония в различных объектах.

Теоретическая и практическая значимость. Выявленные закономерности получаемого аналитического сигнала производных бензоилбарбитуратов от вида галоген-заместителя и его положения, а также установленный механизм электровосстановления галонала как представителя бензоилбарбитуратов являются теоретически значимыми. Данные о дифференцировании сигналов энантиомеров позволят дополнить научные знания в данной области. Разработанные методики вольтамперометрического определения изучаемых препаратов рекомендованы для применения в рамках фармакокинетических исследований, а также определения содержаний лекарственных веществ в биологических объектах (моча) и фармацевтических препаратах, что и является практической значимостью работы.

Методология и методы исследования. В работе использовались различные методы вольтамперометрии, позволяющие получить необходимую

аналитическую информацию; обработка результатов эксперимента выполнялась с использованием программного обеспечения MS Office, хемометрическая обработка данных проводилась с использованием программы MathCAD 15. Также применялись дополнительно различные виды хроматографии – тонкослойная и высокоэффективная жидкостная.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследований вольтамперометрического поведения галонала, галодифа и мельдония с учетом влияния различных факторов (материал электрода, pH фонового электролита и др.);
2. Результаты исследований о зависимости строения ряда бензоилбарбитуратов на регистрируемый электрохимический сигнал, механизм реакции восстановления галонала;
3. Способ модификации поверхности углеродсодержащих электродов для вольтамперометрического определения мельдония, галодифа, и галонала;
4. Способ оценки соотношения содержания энантиомерных форм в образцах галодифа с использованием хемометрической обработки данных;
5. Результаты исследований по оценке возможности одновременного вольтамперометрического определения мельдония и L-карнитина;
6. Методики определения галонала, галодифа и мельдония в лекарственных формах и биологических объектах.

Апробация работы. Основные результаты научной работы обсуждались на XVII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулева, посвященной 120-летию Томского политехнического университета «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2016); XX Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2016); XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2016); IX Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием и молодежной научной школой «ЭМА-2016»

(Екатеринбург, 2016); X Всероссийской научной конференции с международным участием «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (Барнаул, 2016); XVIII Международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулёва «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2017); VI Международной научной конференции «Теоретическая и экспериментальная химия» (Караганда, 2017); V Республиканской конференции по аналитической химии с международным участием «Аналитика РБ - 2017» (Минск, 2017); XIX Международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулёва «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2018); XXI Всероссийской конференции молодых ученых-химиков (с международным участием) (г. Нижний Новгород, 2018); VI Республиканской конференции по аналитической химии с международным участием «Аналитика РБ - 2018» (Минск, 2018); Международной научно-практической конференции «Интеграция науки, образования и производства – основа реализации Плана нации» (Сагиновские чтения № 10), (Караганда, 2018); XX Международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулёва «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2019).

Публикации. По материалам выпускной квалификационной работы опубликовано 20 работ, из них 3 статьи в журналах, индексируемых в базах Scopus и 1 статья, в журнале, рекомендованного ВАК. Получен 1 патент на изобретение.

Личный вклад автора. Заключается в сборе, анализе и переработке литературных данных, непосредственном выполнении экспериментальной части исследовательской работы, статистической обработке полученных данных, а также публикация полученных результатов в виде тезисов и статей.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во *введении* указана актуальность работы, определены цели и задачи исследования в рамках научной работы, сформулированы научная новизна,

практическая значимость полученных результатов, а также положения, выносимые на защиту, оценен личный вклад автора в работу, указана структура и объем выпускной квалификационной работы.

В *первой главе* описаны физические, химические и фармакологические свойства лекарственных веществ - объектов исследования (гало нал, галодиф и мельдоний), приведен обзор литературы об основных физико-химических методах определения исследуемых веществ в различных объектах, продемонстрированы тренды в области модифицирования поверхности электродов для вольтамперометрического определения различных лекарственных препаратов.

Во *второй главе* описаны методы и условия проведения экспериментов, применяемые электрохимические ячейки, реактивы и растворители. В качестве объектов исследования рассмотрены лекарственные вещества гало нал, галодиф и мельдоний. В работе использовали комплекс аналитический вольтамперометрический СТА, в комплекте с компьютером с установленным пакетом программ «Анализатор СТА». Снятие циклических вольтамперограмм проводили с использованием потенциостата - гальваностата Palmsens 4 (PalmSens, Нидерланды) со специализированным программным обеспечением PStace. Определение рН раствора осуществляли с использованием рН-метра-Эксперт-001-3 (0,1) с комбинированным рН стеклянным электродом (Эконикс-эксперт, Россия).

Приведены описание электродов, реактивов, мерной посуды, необходимой для выполнения научной работы, описаны методики определения и модифицирования электродов для вольтамперометрического определения изучаемых веществ. Приведены принципы хемометрической и статистической обработки данных исследования.

В *третьей главе* обсуждаются результаты выявленных закономерностей процессов окисления-восстановления изучаемых веществ и представлены

выбранные условия вольтамперометрического определения на различных типах углеродсодержащих электродов.

Вольтамперометрическое поведение галонала на стеклоуглеродном электроде. Зависимость строения ряда бензоилбарбитуратов на регистрируемый аналитический сигнал, механизм реакции восстановления галонала.

Для выбора условий вольтамперометрического определения галонала получена циклическая вольтамперограмма на углеродсодержащих электродах, показывающая наличие собственной окислительно-восстановительной способности у данного вещества. Для последующего вольтамперометрического определения использовали катодный пик, ввиду большей выраженности аналитического сигнала, в сравнении с анодным. Полученные методом инверсионной вольтамперометрии градуировочные зависимости показали, что использование стеклоуглеродного электрода в качестве рабочего более предпочтительно ввиду большей линейности и чувствительности определения.

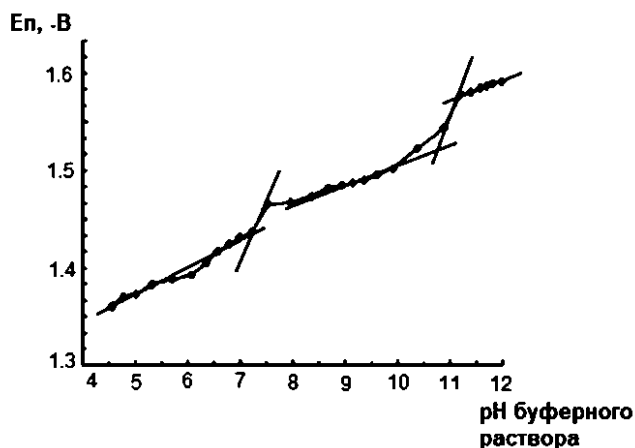


Рисунок 2 - Зависимость E_p галонала от pH фонового электролита.
Система – СУЭ/ХСЭ (1М КСl)

Для изучения влияния pH фонового электролита на потенциал пика получена соответствующая зависимость, представленная на рисунке 2. В качестве фонового электролита использовали буферный раствор Бриттона-Робинсона в диапазоне pH от 4,0 до 12,0. Рассчитаны эффективные значения констант диссоциации различных форм галонала, соответствующие значениям pH в

точках пересечения продолжений прямолинейных участков данной зависимости, которые соответственно составляют 7,5 и 11,2. Тангенс угла наклона полученной зависимости составляет 0,0589, следовательно, в электродном процессе участвует один протон.

В процессе изучения кинетики электровосстановления галонала на стеклоуглеродном электроде, а именно, зависимостей получаемого аналитического сигнала от потенциала и времени накопления, а также полученных циклических вольтамперограмм установлено, что данный процесс носит квазиобратимый характер и осложнен адсорбционными процессами, при этом вклад физической адсорбции превалирует. На основании уравнения Шевчика

Для лучшего понимания электрохимического процесса восстановления ряда бензоилбарбитуратов изучено влияние положения и вида галоген-заместителя на получаемые аналитические сигналы. В ряду галоген-радикалов при увеличении электроотрицательности от $I\cdot$ к $F\cdot$, потенциал пика производных смещается в катодную область, что согласуется с литературными данными. Положение галогена в бензольном остатке молекулы так же влияет на получаемый аналитический сигнал. *O*- и *n*- положения усиливают восстановительные свойства молекулы, а присутствие галогена в *m*- положении – ослабляет, что связано с более выгодным положением связи в пространстве для электронной «атаки». Для объяснения обнаруженных закономерностей произведены DFT квантово-химические расчеты методом B3LYP в базисе 6-311+G. Потенциалы пиков ряда галогенпроизводных барбитуратов и рассчитанные энергии LUMO представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Значение потенциалов пика исследованных производных барбитуровой кислоты и рассчитанные значения энергии LUMO

Вещество	$E_{\text{пика}}, \text{В}$	$E_{\text{LUMO}}, - \text{а.у.}$
Бензонал	-1,34	0.21861
Галонал (<i>o</i> -фторбензонал)	-1,38	0.21080
<i>o</i> -хлорбензонал	-1,36	0.20859
<i>o</i> -бромбензонал	-1,33	0.21272
<i>m</i> -фторбензонал	-1,36	0.21772
<i>m</i> -хлорбензонал	-1,27	0.21755
<i>n</i> -фторбензонал	-1,43	0.20682
<i>n</i> -хлорбензонал	-1,39	0.20662
Дибензонал	-1,38	0.22043
фенобарбитал	-	0.18689

Значение энергии LUMO фенобарбитала, не подвергающегося электровосстановлению в выбранных рабочих условиях, имеют действительно более высокие энергии сравнительно с бензоилбарбитуратами, что подтверждает значительный вклад этих LUMO в процесс электровосстановления и на характеристики аналитического сигнала исследуемых производных фенобарбитала: нижняя граница энергий LUMO должна быть между -0.2041 и -0.20682 а.е. В ряду монобензоилбарбитуратов наблюдается закономерная тенденция смещения потенциала пика электровосстановления в положительную сторону с повышением энергии LUMO с удовлетворительной линейной корреляцией ($r=0.930$) между этими величинами.

Для изучения состава осадка при электровосстановлении галонала на поверхности электрода нами проведен ВЭЖХ-анализ исходного раствора галонала в ДМФА, а также смывов с поверхности электрода после электронакопления. Установлено, что единственным веществом, обнаруженным в исследуемых образцах, является галонал, таким образом доказано, что ни при растворении в ДМФА, ни при электровосстановлении не происходит деструкции амидной связи. Таким образом, механизм электровосстановления галонала на стеклоуглеродном электроде представлены на рисунке 3.

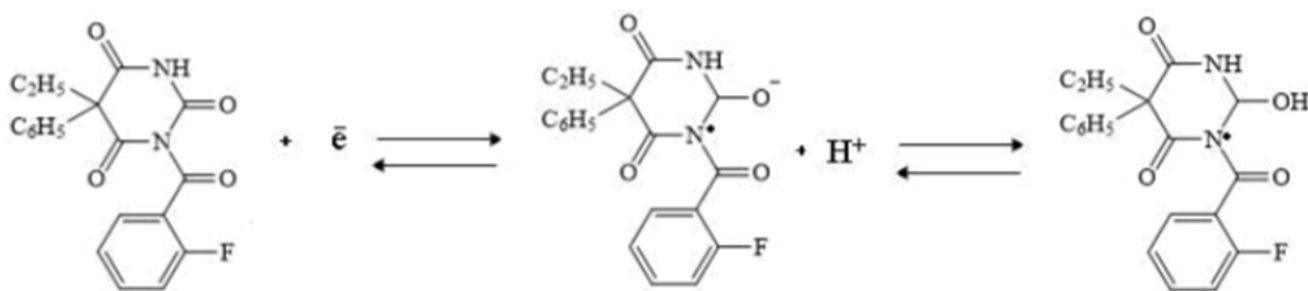


Рисунок 3 - Возможный механизм реакции восстановления галонала на поверхности СУЭ, фоновый электролит - 0,1М Na₂SO₃, E_{нак} - -0,8В, t_{нак} - 30 с

Закономерности электрохимического поведения галодифа на золото-графитовом электроде и выбор рабочих условий. Оценка возможности дифференциации аналитических сигналов энантиомерных форм с использованием хемометрической обработки данных.

Циклические вольтамперограммы, полученные на различных углеродсодержащих электродах, при широком диапазоне рН фонового электролита (использовался буферный раствор Бриттона-Робинсона) показали, что галодиф не обладает собственной окислительно-восстановительной активностью, поэтому дальнейшей стратегией определена необходимость выбора модификатора электрода. На основании литературных данных известно, что производные мочевины могут образовывать комплексные соединения с ионами металлов. В качестве модификатора применяли раствор золота, модифицирование проводилось методом «in situ» с использованием метода инверсионной вольтамперометрии. Установлено, что максимальное значение величин аналитических сигналов галодифа получены при потенциале накопления $-1,1\text{В}$, при этом потенциал пика равен $0,73\text{В}$. Отмечено, что при времени накопления более 45 сек, аналитический сигнал снижается, что свидетельствует об адсорбционном характере аналитического сигнала. На основании изученных зависимостей, а именно $I_{\text{п}} = f(\sqrt{W})$ и $\lg I_{\text{п}} = f(\lg W)$ и рассчитанному значению углового коэффициента по критерию Семерано более $0,5$, установлено, что электрохимический механизм окисления галодифа является необратимым и носит адсорбционный характер.

При определении соотношения энантиомерных форм в образце лекарственного вещества с использованием методов вольтамперометрии применялся хемометрический подход.

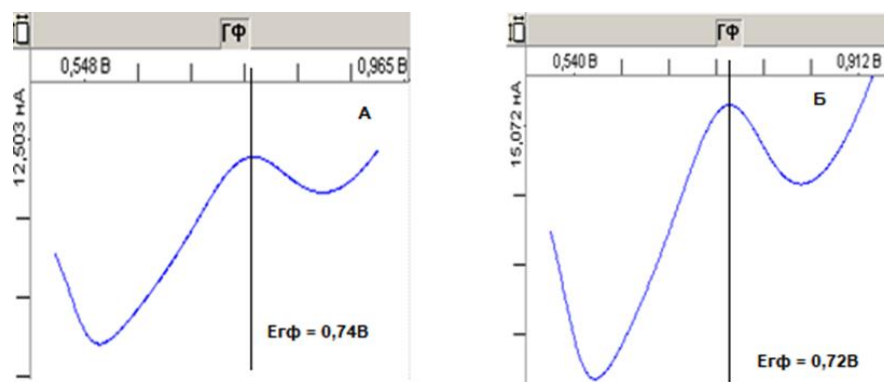


Рисунок 4 - Параллельные опыты регистрации вольтамперограмм энантиомеров галодифа на ЗГЭ на фоне боратного буфера с рН 9,18. А – левовращающая форма, Б – правовращающая форма

Результаты параллельных опытов (рисунок 4) показали, что потенциалы пика лево-(ЛВ) и правовращающих (ПВ) форм имеют незначительное смещение между собой, что не позволяет однозначно определить состав энантиомерной смеси. При этом процесс электроокисления правовращающей формы протекает более обратимо, на что указывает смещение потенциала максимума пика в катодную область. Первоначально были получены данные о потенциалах максимумов пика смесей энантиомеров при различном содержании правовращающей формы. При увеличении содержания правовращающей формы в смеси наблюдали незначительное, но стабильное смещение потенциала максимума в катодную область, закономерность линейного характера, и следовательно, данный параметр с предварительно хемометрической обработкой можно использовать для оценки состава энантиомерной смеси.

Для оценки изменчивости формы сигналов рассчитаны матрицы взаимной корреляции фрагментов вольтамперных характеристик (ВАХ) для энантиомерных смесей разных составов: 1)100%ЛВ; 2)80%ЛВ:20%ПВ; 3)60%ЛВ:40%ПВ; 4) 40%ЛВ:60%ПВ; 5)20%ЛВ:80%ПВ; 5)100%ПВ, представленные на рисунке 5.

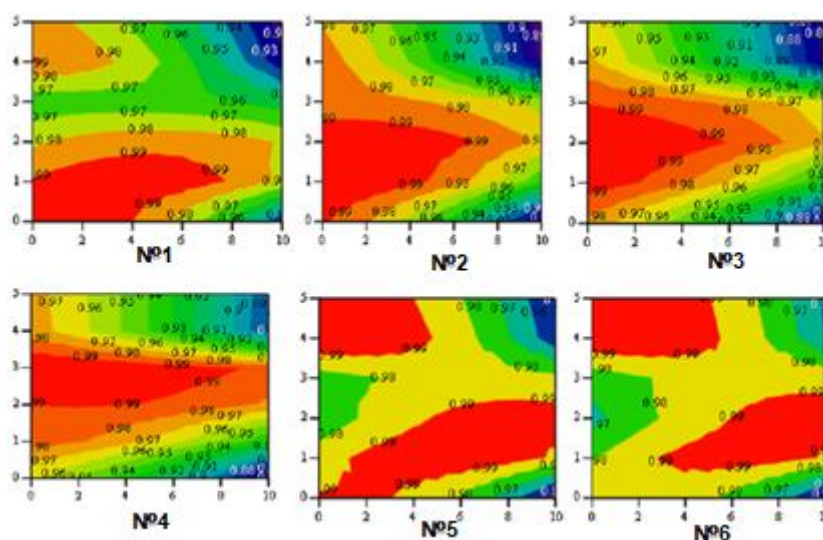


Рисунок 5 - Графики уровней корреляционных матриц при сравнении форм вольтамперных характеристик всех составов с одним из составов

Для оценки смещения максимумов для разных составов производился расчет коэффициентов корреляции при последовательном смещении заданного фрагмента ВАХ на 1 позицию. Весь диапазон смещений составил 10 позиций.

Проведен сравнительный корреляционный анализ форм ВАХ с неизвестным процентным соотношением с эталонными кривыми. Основным параметром являлся рост максимума ВАХ по мере возрастания содержания правовращающей формы в пробе до уровня 50%. Выше этой концентрации форма кривой возвращается к начальной, но при этом пик максимуму кривой смещается в область более низких значений уровня потенциала. Нами рассчитан коэффициент наклона ВАХ при различных соотношениях оптически активных форм в смеси. Для смесей, содержащих правовращающую форму (ПВ) выше 50%, закономерной связи концентраций с коэффициентами наклона не наблюдается.

Зависимость коэффициента наклона от содержания в энантиомерной смеси правовращающей формы представлена на рисунке 6.

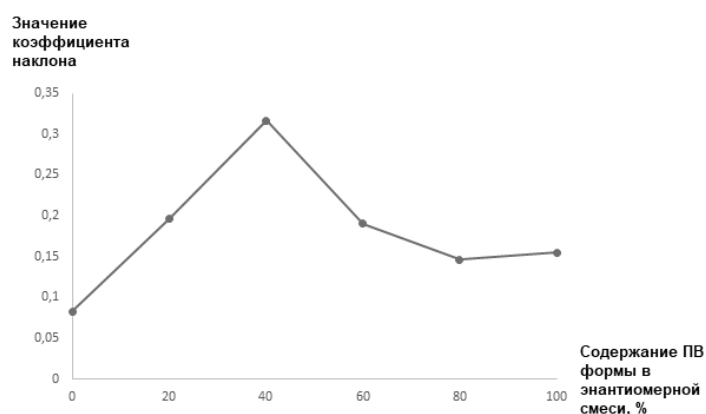


Рисунок 6 - Зависимость значения коэффициента наклона от содержания правовращающей формы в энантиомерной смеси

Таким образом, при содержании правовращающей формы в образце смеси энантиомеров до 50% можно делать заключение о количественном составе образца.

Применение комбинированных модифицированных электродов для вольтамперометрического определения мельдония и галонала.

Условия вольтамперометрического определения мельдония с использованием золото-графитового электрода определены нами ранее. Одной из задач работы являлась оценка возможности увеличения чувствительности определения с использованием металлоорганических электродов.

В качестве органического модификатора рассмотрены соли арендиазония (АДТ) с различными заместителями, зарекомендовавшие себя как перспективные модифицирующие агенты для вольтамперометрического определения неорганических ионов и органических веществ. Нами разработан способ модифицирования поверхности, включающий в себя предварительное накопление золота из раствора в режиме «ex situ» на поверхность графитового электрода, с последующим погружением электрода в раствор АДТ с заданной концентрацией. При этом, на полученных вольтамперограммах наблюдается увеличение аналитического сигнала мельдония.

Исследование циклической вольтамперограммы мельдония показало, что значительное смещение потенциалов максимумов катодной и анодной волн свидетельствует о необратимости электрохимического процесса. При изучении физико-химических закономерностей установлено, что кривая зависимости тока пика от квадратного корня скорости развертки поляризующего напряжения линейна. При этом значение критерия Семерано $\geq 0,5$ (1,65), что свидетельствует об осложнении электрохимического процесса мешающими адсорбционными процессами и подтверждается также характером зависимости аналитического сигнала от времени накопления.

Для объяснения процессов, протекающих на поверхности, нами получены данные зондовой микроскопии с поверхности электрода при различных концентрациях модификатора, представлены на рисунке 7.

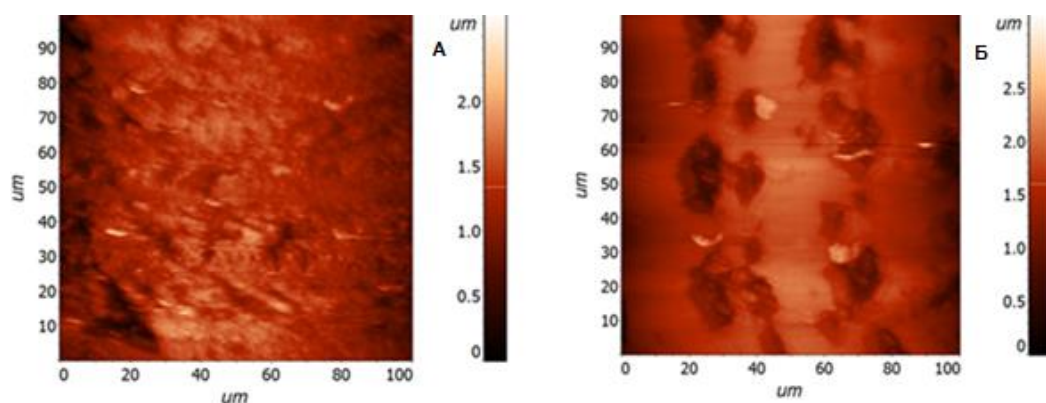


Рисунок 7 - Изображения зондовой микроскопии поверхности модифицированных АДТ графитовых электродов: А – $C_{\text{модиф}} 10 \text{ мг/дм}^3$, Б - $C_{\text{модиф}} 60 \text{ мг/дм}^3$

По результатам зондовой микроскопии, нами сделано предположение, что при концентрации 10 мг/дм^3 на поверхности формируется система ансамблевых ультрамикродатчиков. Основное их преимущество перед графитовыми электродами, широко применяемых в методе инверсионной вольтамперометрии, в том, что емкостная составляющая тока, которая является лимитирующим фактором для быстрых электрохимических процессов на твердых электродах, на ультрамикродатчиках уменьшается до практически незначимого уровня. Скорость массопереноса деполяризатора к ним также возрастает с уменьшением их диаметра и стационарное состояние устанавливается значительно быстрее, чем на электродах обычных размеров, за счет чего существенно увеличивается чувствительность аналитического сигнала. Для мельдония и галонала получены градуировочные зависимости мельдония с использованием модифицированных электродов, представлены на рисунке 8.

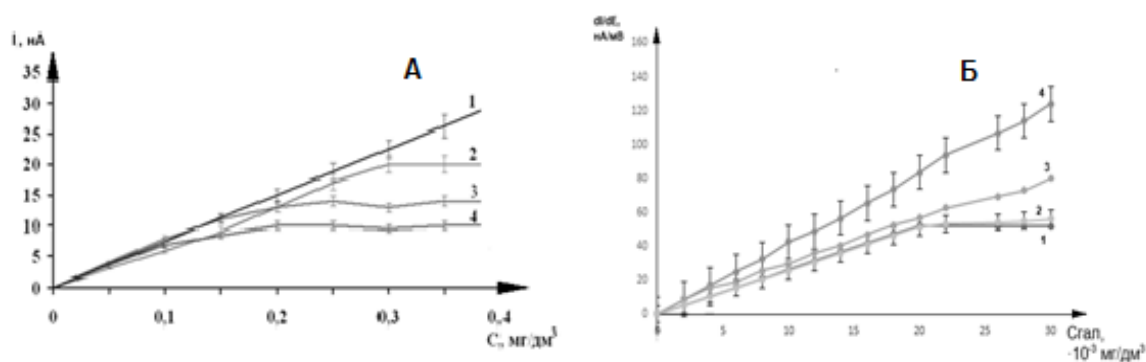


Рисунок 8 -Градуировочные зависимости аналитических сигналов мельдония (А) и галонала (Б) от вида модификатора: А) 1 - АДТ без заместителя; 2 – АДТ с NH_2 -заместителем; 3 – АДТ с COOH -заместителем; 4 – ЗГЭ без модифицирования АДТ. Б) 1 – СУЭ без модифицирования АДТ; 2 – АДТ с NO_2 -заместителем; 3 – АДТ с NH_2 -заместителем; 4 – АДТ с COOH -заместителем.

На основании данных градуировочных зависимостей установлено, что для определения галонала предпочтительнее использовать в качестве модификатора АДТ с карбоксильным заместителем, а для мельдония – АДТ без заместителя.

В *четвертой главе* представлены результаты разработки методик определения изучаемых веществ в различных объектах. Для галонала и галодифа установлено мешающее влияние компонентов таблетированной формы на получаемые значения концентраций. Можно сделать вывод о том, что мешающее

влияние при данных концентрациях не превышает 15%. Результаты исследования соотношения лекарственных компонентов к вспомогательным веществам (магния стеарата и полисорбата 80 составляют 200:1 и крахмала 14,5:1) приближены к условиям их реальных содержаний и погрешность определения галонала и галодифа не превышает погрешности метода 3-5%.

Предложен алгоритм вольтамперометрического определения галонала и галодифа в таблетированных формах на содержание основного вещества, заключающийся в экстрагировании измельченной навески таблетированной формы водой при 20°C, с последующей фильтрацией через фильтр «белая лента». Фильтрат отбрасывается, а осадок растворяется в диметилформамиде с повторной фильтрацией через фильтр «белая лента». Фильтрат используется для дальнейшего вольтамперометрического определения.

Проверку правильности методики определения проводили методом «введено-найдено», результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Результаты определения содержания галонала и галодифа в таблетированной форме методом «введено-найдено»

Проба	Содержание галонала, г/г (n =3, l=5, p=0,95)		
	В пробе	Введено	Найдено
Таблетки «Галонал, 100 мг» Экспериментальная серия	0,10	-	0,11±0,02
		0,10	0,19±0,03
Таблетки «Галодиф, 100 мг» Серия 040813	0,10	-	0,10±0,02
		0,20	0,30±0,03

Результаты согласуются с данными, заявленными производителями, а в ходе проверки правильности методом "введено-найдено" получили удовлетворительные значения, погрешность определения не превышает 18%. Время анализа, включая пробоподготовку – 15 минут.

Готовые лекарственные формы мельдония в препаратах «Милдронат» не требуют специализированной пробоподготовки, ввиду отсутствия мешающего

действия вспомогательных компонентов. Поэтому образцы для анализа разбавляли и растворяли бидистиллированной водой и проводили вольтамперометрическое определение. Проверку правильности проводили методом «введено-найденно», результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Результаты определения содержания мельдония в готовых лекарственных формах методом «введено-найденно»

Образец мельдония	Содержание мельдония, мг/мл (n=5, l = 3, P = 0,95)		
	В пробе	Введено	Найдено
Милдронат, раствор для инъекций, 100 мг/мл	10,00	12,00	21,90±3,30
		20,00	33,90±4,10
Милдронат, капсулы 500 мг	5,00	10,00	14,90±1,50
		20,00	25,00±2,50

Разработанная методика является адекватной и может быть использована в рутинной практической деятельности для контроля качества готовых лекарственных форм.

Для определения мельдония в биологических жидкостях (моче) первоначально оценивалось мешающее влияние близких по химической структуре эндогенных веществ, одним из которых является L-карнитин. При изменении рабочих параметров вольтамперометрического измерения установлено, что при увеличении времени успокоения от 110 секунд и уменьшении скорости развертки поляризующего напряжения до 5 мВ/сек, наблюдается дифференциация аналитических сигналов мельдония и карнитина, что объясняется разницей в молекулярных массах, и может быть использовано для определения мельдония в присутствии L- карнитина.

Одним из этапов алгоритма определения мельдония в моче предложено использование предварительного ТСХ-скрининга. Определены условия: неподвижная фаза – пластинки Silufol, подвижная фаза – смесь метанола, этилацетата и аммиака в соотношении 5:1:1 по объему. Хроматографирование проводили восходящим способом, проявление после просушивания осуществляли в йодной камере. Хроматографирование с использованием стандартных образцов показало удовлетворительные результаты разделения: Rf мельдония – 0,49; Rf

L-карнитина – 0,56. Данная процедура носит качественный характер и позволяет делать предварительное заключение о наличии определяемого вещества в пробе: при положительном результате анализа проводится вольтамперометрическое определение, пробоподготовка аликвоты мочи осуществляется по разработанному нами алгоритму, представленному на рисунке 9.



Рисунок 9 - Алгоритм вольтамперометрического определения мелдония

Далее проводилось определение проб реальных биологических объектов, предположительно содержащих мелдоний. В результате предварительного ТСХ-скрининга установлено, что в двух пробах содержится мелдония. Проведены отбор и подготовка проб, по алгоритму, изложенному выше. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Результаты определения содержания мелдония в реальных пробах – образцах мочи спортсменов

№ образца мочи	Содержание мелдония в пробе, мг/дм ³
1	2,61±0,05
2	0,0010±0,0003
3	Менее 0,0001

Установлено, что в пробах одного из спортсменов выявлено содержание мелдония и подтверждено протоколом из лаборатории WADA. Проведена оценка основных метрологических характеристик разработанной методики: показатели правильности, точности, внутрилабораторной прецизионности.

На основании проведенной работы сформулированы следующие **выводы**:

1. Установлены рабочие условия количественного определения галонала, галодифа и мельдония методом вольтамперометрии с использованием стеклоуглеродного и модифицированных углеродсодержащего электродов.
2. Для лучшего понимания механизма электровосстановления исследуемых бензоилбарбитуратов и объяснения обнаруженных закономерностей влияния их структур на параметры аналитических сигналов проведены DFT квантово-химические расчеты методом B3LYP и определены энергии низших вакантных молекулярных орбиталей (НВМО LUMO), принимающих электрон в стадии электровосстановления. На основании полученных данных предложен механизм электровосстановления галонала.
3. Методами циклической вольтамперометрии для установлено, что процесс электроокисления галонала на стеклоуглеродном электроде является диффузионно-контролируемым процессом, осложненный побочными процессами: как адсорбционными явлениями, так и предшествующими и последующими реакциями с участием органического вещества. На основании уравнения Шевича рассчитан коэффициент диффузии $D = 0.82 \times 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$.
4. Установлены некоторые закономерности процессов окисления-восстановления галодифа и мельдония на выбранных электрохимических системах;
5. Дана оценка мешающего влияния сопутствующих органических веществ на величину тока ОВ процессов галонала, галодифа и мельдония. Установлены условия устранения мешающего влияния компонентов мочи и состава фармацевтических препаратов на аналитический сигнал изучаемых веществ.
6. Разработана методика количественного химического анализа методом вольтамперометрии проб лекарственных препаратов (таблетки, капсулы, раствор для инъекций) на содержание галонала, галодифа и мельдония.
7. Разработана методика количественного химического анализа методом вольтамперометрии проб мочи на содержание мельдония в присутствии

карнитина. Проведена метрологическая аттестация.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

1. **Mezentseva, O.** Electrochemical characterization and voltammetric determination of benzoyl derivatives of phenobarbital using glassy carbon electrode/ O. Mezentseva, G. Slepchenko, V. Filimonov, E. Mikheeva, G. Arbit// *Electroanalysis*. - 2019. - V. 31. – p. 1477-1483. DOI:10.1002/elan.201900179

2. **Мезенцева, О.Л.** Определение галонала и бензонала в таблетированных формах лекарственных препаратов методом инверсионной вольтамперометрии/О.Л. Мезенцева, Г.Б. Слепченко, В.Д. Филимонов, Е.В. Михеева, Г.А. Арбит//*Аналитика и контроль*. - 2018. - Т. 22, №2. - С. 206-213. DOI 10.15826/analitika.2018.22.2.011

3. **Mezentseva, O.** Study of o-fluorbenzonal electrochemical behavior with the carbon electrode using voltammetry/ G. Slepchenko, E. Mikheeva, O. Mezentseva, N. Zaycev// *MATEC Web of conference*. – 2016. – V. 85. DOI: 10.1051 / matecconf / 20168501002

4. Пат. № 2659168 Российская Федерация, МПК G 01 N 27/48. Вольтамперометрический способ количественного определения 1-(2-фторбензоил)-5-фенил-5-этилпиримидин-2,4,6 (1H, 3H, 5H)-триона (галонала) [Текст] / Филимонов В.Д., Арбит Г.А., Слепченко Г.Б., **Мезенцева О.Л.**; заявитель и патентообладатель НИ Томский политехнический университет. - № 2017116317. Заявл. 11.05.2017; опубл. 28.06.2018, Бюл. №19.

5. **Мезенцева, О.Л.** Исследование кинетики электродного процесса восстановления галонала методом вольтамперометрии/О.Л. Мезенцева// *Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XX Всероссийской научно-практической конференции имени профессора Л. П. Кулёва студентов и молодых ученых с международным участием*– Томск: ТПУ, 2019. - С. 259

6. **Мезенцева, О.Л.** Определение и распознавание мельдония и L-карнитина с использованием графитового электрода, модифицированного

арендиазонием/ В.П. Крюковский, О.Л. Мезенцева// Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XX Всероссийской научно-практической конференции имени профессора Л. П. Кулёва студентов и молодых ученых с международным участием.– Томск: ТПУ, 2019. - С. 313

7. **Мезенцева, О.Л.** Возможность применения модифицированных солями арендиазония стеклоуглеродных электродов для вольтамперометрического определения галонала/ О.Л. Мезенцева// Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XIX Всероссийской научно-практической конференции имени профессора Л. П. Кулёва студентов и молодых ученых с международным участием.– Томск: ТПУ, 2018. - С. 323

8. **Мезенцева, О.Л.** Разработка способа пробоподготовки для вольтамперометрического определения мельдония в биологических объектах/ В.П. Крюковский, О.Л. Мезенцева// Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XIX Всероссийской научно-практической конференции имени профессора Л. П. Кулёва студентов и молодых ученых с международным участием.– Томск: ТПУ, 2018. - С. 321

9. **Мезенцева, О.Л.** Вольтамперометрическое определение галодифа в лекарственных субстанциях/А.Ю. Сильченко, О.Л. Мезенцева// Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XIX Всероссийской научно-практической конференции имени профессора Л. П. Кулёва студентов и молодых ученых с международным участием.– Томск: ТПУ, 2018. - С. 330

10. **Мезенцева, О.Л.** Использование органо-модифицированных электродов для вольтамперометрического определения некоторых психоактивных веществ/О. Л. Мезенцева// XXI Всероссийская конференция молодых ученых-химиков (с международным участием). - Нижний Новгород: ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 2018. - С. 298

11. **Мезенцева, О.Л.** Вольтамперометрическое определение лекарственных препаратов (мельдония и галонала) с использованием модифицированных электродов/ О.Л. Мезенцева// Интеграция науки, образования

и производства - основа реализации Плана Нации (Сагиновские чтения №10): труды международной научно-практической конференции. - Караганда: Изд-во КарГТУ, 2018. – Т.7. С. 121

12. **Мезенцева, О.Л.** Вольтамперометрическое определение мельдония с использованием модифицированного солями арендиазония золото-графитового электрода/ О.Л. Мезенцева, М.С. Остапенко // Шестая республиканская конференция по аналитической химии с международным участием «Аналитика РБ - 2018». – Минск: Колорград, 2018. - С.57

13. **Мезенцева, О.Л.** Вольтамперометрическое определение мельдония на углеродсодержащих электродах/Цыбикова С.Б., Мезенцева О.Л.// Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулёва. – Томск: Изд-во ТПУ, 2017. – С. 238-239

14. **Mezentseva, O.L.** The possibility of voltammetric determination of meldonium on carbon-containing electrodes/Mezentseva O.L., Slepchenko G.B., Sybikova S.B. //Theoretical and experimental chemistry: Abstracts of the VIth international scientific conf. - Karaganda: Publ. House of KSU, 2017. - p. 39

15. **Мезенцева, О.Л.** Возможность вольтамперометрического определения мельдония на углеродсодержащих электродах/Мезенцева О.Л., Слепченко Г.Б., Цыбикова С.Б.// Шестая республиканская конференция по аналитической химии с международным участием «Аналитика РБ - 2018». – – Минск: Изд.центр БГУ, 2018. - С. 157.

16. **Мезенцева, О.Л.** Использование углеродсодержащих электродов для вольтамперометрического определения галонала// О. Л. Мезенцева, Г. Б. Слепченко, Е. В. Михеева, Г. А. Арбит// ЭМА 2016: сборник докладов IX Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием и молодежной научной школой. – Екатеринбург: УрО РАН, 2016. – С. 129

17. **Мезенцева, О.Л.** Новый вольтамперометрический способ определения органических и неорганических микрокомпонентов на модифицированных арендиазониевыми солями углеродсодержащих электродов/Г.Б. Слепченко, И.О. Максимчук, О.Л. Мезенцева, И.А. Сорокин, В.И. Дерябина// XX Менделеевский съезд по общей и прикладной химии: тезисы докладов. – Екатеринбург: УрО РАН, 2016. - Т.4. – С. 322

18. **Мезенцева, О.Л.** К вопросу о возможности вольтамперометрического определения галонала / О. Л. Мезенцева, Е. В. Михеева, Г. А. Арбит; науч. рук. Г. Б. Слепченко // Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л. П. Кулева, посвященной 120-летию Томского политехнического университета. – Томск: ТПУ, 2016. — С. 240-241

19. **Мезенцева, О.Л.** Возможность вольтамперометрического определения различных галогенсодержащих производных барбитуровой кислоты/Б.С. Темиргали, О.Л. Мезенцева; науч. рук. Г.Б. Слепченко// Химия и химическая технология в XXI веке: материалы XVII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л. П. Кулева, посвященной 120-летию Томского политехнического университета. – Томск: ТПУ, 2016. — С. 263

20. **Мезенцева, О.Л.** Использование модифицированных углеродсодержащих электродов для определения мельдония в биологических объектах/ О. Л. Мезенцева, Г. Б. Слепченко // Аналитика Сибири и Дальнего Востока: материалы X Всероссийской научной конференции с международным участием. – Барнаул: Изд-во АлтГУ, 2016. — С.80.