

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Мезенцева Ольга Леонидовна

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

Специальность: 02.00.02 – Аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
Доктор химических наук, профессор
Слепченко Галина Борисовна

Томск, 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	11
1.1 Основные свойства галонала, галодифа и мельдония.....	11
1.2 Аналитические возможности современных методов определения галонала, галодифа и мельдония	17
1.3 Особенности электрохимических методов определения барбитуратов и мельдония	32
1.4 Использование модифицированных электродов при вольтамперометрическом определении лекарственных веществ.....	34
1.4.1 Применение комбинированных модификаторов для определения энантиомерных форм.....	37
1.4.2 Применение солей арендиазония для модификации поверхности электродов для вольтамперометрического определения органических веществ.....	38
ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	43
2.1 Приборы, электроды, применяемые ячейки.....	43
2.1.1 Методика поверхностной модификации углеродсодержащих электродов для определения мельдония и галодифа.....	44
2.2 Приготовление растворов, подготовка посуды.....	45
2.3 Методика выполнения определений галонала, галодифа, мельдония.....	47
2.3.1 Вольтамперометрическое определение галогенпроизводных бензонала.....	47
2.3.2 Вольтамперометрическое определение галодифа с использованием золото-графитового электрода.....	48
2.3.3 Вольтамперометрическое определение мельдония в присутствии L-карнитина.....	49

2.4 Хемометрическая обработка данных при оценке энантиомерного состава лекарственного вещества.....	50
2.5 Статистическая обработка данных.....	51
ГЛАВА 3 НЕКОТОРЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПРОЦЕССОВ ОКИСЛЕНИЯ-ВОССТАНОВЛЕНИЯ И ВЫБОР УСЛОВИЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗУЧАЕМЫХ ВЕЩЕСТВ.....	52
3.1 Изучение вольтамперометрического поведения галонала и других бензоилпроизводных барбитуровой кислоты на стеклоуглеродном электроде.....	52
3.1.1 Зависимость аналитического сигнала производных бензоилбарбитуровой кислоты от вида и положения галоген-заместителя.....	59
3.1.2 Применение АДТ для модификации поверхности электрода для вольтамперометрического определения галонала.....	63
3.2 Выбор рабочих условий определения галодифа с использованием золотографитового электрода и изучение некоторых закономерностей электродного процесса.....	65
3.2.1 Некоторые особенности вольтамперометрического поведения галодифа и выбор рабочих условий.....	65
3.2.2 Распознавание энантиомерных форм галодифа с использованием хемометрической обработки данных.....	69
3.3 Выбор условий вольтамперометрического определения мельдония с использованием комбинированных модифицированных электродов.....	78
ГЛАВА 4 РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ.....	84
4.1 Определение галонала, галодифа и мельдония в лекарственных формах.....	84
4.1.1 Изучение мешающего влияния вспомогательных веществ на аналитические сигналы изучаемых веществ	84

4.1.2 Методика количественного химического анализа лекарственных форм «Галонал, таблетки 0,1» и «Галодиф, таблетки 0,1» на их содержание.....	86
4.1.4 Методика вольтамперометрического определения мельдония в лекарственных формах «Милдронат, капсулы 0,5» и «Милронат, раствор для внутривенного, внутримышечного и парабульбарного введения 100 мг/мл».....	88
4.2 Вольтамперометрическое определение мельдония биологических жидкостях.....	90
4.2.1 Изучение мешающего влияния L-карнитина на аналитический сигнал мельдония.....	90
4.2.2 Выбор условий для ТСХ-скрининга мельдония в биологических объектах.....	91
4.3.2 Методика одновременного определения мельдония и L-карнитина в моче методом инверсионной вольтамперометрии.....	92
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	102
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	104
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	105
Приложение А (патент на изобретение)	118
Приложение Б (оценка повторяемости и воспроизводимости разработанных методик количественного химического анализа)	119
Приложение В (акт внедрения результатов измерений)	126

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В последние годы наблюдается тенденция ускорения процессов поиска и разработки методов синтеза биологически активных формул, используемых в диагностике, профилактике и лечении различных заболеваний. Поэтому проблема аналитического сопровождения является крайне актуальной задачей на каждом этапе «жизни» лекарственного вещества – с момента синтеза и доклинических исследований до контроля качества при производстве каждой партии готового лекарственного средства. Поэтому, одним из необходимых критериев, предъявляемых к современным методам определения является универсальность, то есть возможность применения данного метода для идентификации и количественного анализа органических веществ, обладающих биологической активностью, в различных объектах: фармацевтических субстанциях, готовых лекарственных формах, биологических средах. Используемые методы должны обеспечивать широкий диапазон определяемых концентраций, низкий предел обнаружения и определения веществ.

Одним из перспективных инструментальных методов, который может быть использован наряду с хроматографическими методами, является вольтамперометрия, обладающая высокой чувствительностью определения (до 10^{-12} г/дм³), достаточной точностью, имеет возможность полной автоматизации процесса определения при относительно умеренной стоимости аппаратного обеспечения. [1]. Разнообразие вольтамперометрических вариантов (прямой и инверсионной) позволяет решать большое количество аналитических задач в медицине и фармации: изучение биологической активности при учете сходного протекания процессов окисления/восстановления *in vivo*, изучение фармакокинетики и фармакодинамики вещества, а также контроль качества готовых лекарственных форм [2].

Использование различных видов модификаторов 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.

Объектами исследования являются лекарственные вещества синтетического происхождения – 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). Галонал и галодиф – перспективные вещества для лечения алкоголизма и купирования абстиненции, наряду с этим, в доклинических и клинических исследованиях доказана эффективность галодифа как противосудорожного препарата, не имеющего побочных эффектов, характерных для данной фармакологической группы: сонливости, заторможенности, нарушений половых функций и т.д. Мельдоний – вещество, эффективность которого доказана на многочисленных исследованиях при таких заболеваниях, как: сахарный диабет, сосудистые патологии, ишемическая болезнь сердца и др. Разработка методик определения данных веществ необходима для проведения дополнительных фармакологических исследований и дополнительного контроля содержания данных веществ на всем цикле производства препаратов.

Таким образом, применение вольтамперометрии целесообразно в условиях современной аналитической практики, поэтому **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 определены следующие **задачи**:

- 1) Осуществить выбор рабочих условий вольтамперометрического определения галонала, галодифа, 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, 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:

1. Впервые разработаны вольтамперометрические условия определения органических веществ (галонала на стеклоуглеродном и на модифицированном стеклоуглеродном 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 работы. Теоретическая значимость работы заключается в выявленных закономерностях получаемого аналитического сигнала производных бензоилбарбитуратов от вида заместителя и его положения; установлении механизма электровосстановления галонала как представителя бензоилбарбитуратов. 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 определений для контроля содержания лекарственных веществ в биологических объектах (кровь, моча) и фармацевтических препаратах, что и является практической значимостью работы.

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

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследований вольтамперометрического поведения галонала, галодифа и мельдония с учетом влияния различных факторов (материал электрода, рН 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.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты диссертации 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 диссертационной работы опубликовано 19 работ, из них 3 статьи в журналах, индексируемых в базах Scopus и 1 статья в журнале, рекомендованного ВАК. Получен 1 патент на изобретение.

Благодарности. Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю, д.х.н., профессору Слепченко Галине Борисовне за полученные знания, а также поддержку и советы; д.х.н., профессору Филимонову Виктору Дмитриевичу за помощь в проведении квантово-химических расчетов и за консультации по органической химии и механизмам ОВР, Хорсову Н.Н. за проведение хемометрической обработки данных.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на **126** страницах машинописного текста, содержит **53** рисунка, **22** таблицы, состоит из введения, **4** глав, заключения, списка цитируемой литературы, включающего **107** наименований, и **3** приложения.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Основные свойства галонала, галодифа и мельдония

По состоянию на сентябрь 2019 года в государственном реестре лекарственных средств Российской Федерации зарегистрировано более 60000 различных лекарственных препаратов, разрешенных к применению. И ежегодно данный перечень обновляется. Внедрение в медицинскую практику новых лекарственных препаратов для лечения прежде всего социально-значимых заболеваний (в том числе орфанных) является одной из приоритетных задач здравоохранения. Пересматриваются также перспективы применения хорошо изученных лекарственных веществ по новым медицинским показаниям, с проведением дополнительных клинических исследований.

В реестре регламентировано использование производных барбитуратов фенобарбитала и барбитала в качестве противосудорожных и снотворных средств, также для премедикации. Наличие дополнительных фармакологических эффектов позволяет рассматривать данный класс как перспективные средства в комплексной терапии хронического алкоголизма. Однако наличие неблагоприятных побочных эффектов у фенобарбитала требует поиск новых, безопасных препаратов, имеющих, предпочтительно, дополнительно гепатопротекторные или нейропротекторные свойства. Одним из таких препаратов является «Галонал» (; о-фторбензонал; структура представлена на рисунке 1), синтезированный в Томском политехническом университете в 80-90 годах XX века [3].

По физическим свойствам - белый кристаллический порошок без запаха, очень мало растворим в воде, растворим в 96% спирте, диметилформамиде. Водные и спиртовые растворы барбитуратов имеют кислую реакцию (константа диссоциации барбитала $1,3 \cdot 10^{-8}$, фенобарбитала $4,8 \cdot 10^{-8}$) [4].

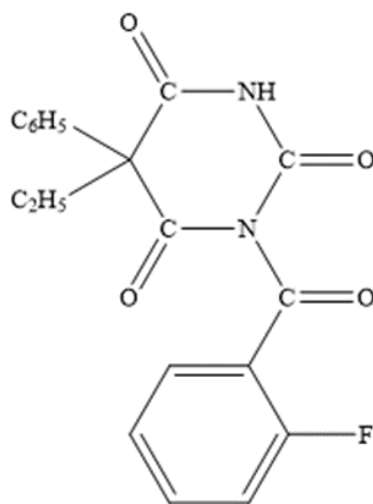


Рисунок 1 - Структурная формула вещества Галонал
5-этил-5-фенил-1-о-фтор-бензоилбарбитуровая кислота

Является производным барбитуровой кислоты – циклическим уреидом, обладает выраженными противосудорожным эффектом за счет взаимодействия с барбитуровым центром ГАМК-Cl-ионофорного комплекса. Оказывает демперирующее действие на двигательную область коры больших полушарий, ядра таламуса, головку хвостового ядра и ретикулярную формацию среднего мозга [5]. Наличие барбиталового цикла обуславливает индукцию цитохрома P450 (индукция фенобарбиталового цикла), что обуславливает увеличение скорости метаболизма веществ-ксенобиотиков, для снижения токсичности. Так же индукция может быть использована для регуляции уровня некоторых эндогенных веществ – стероидных гормонов, глюкокортикоидов, арахидоновой кислоты [6]. Гепатопротекторный эффект галонала доказан на различных патологических моделях, таких как: внепеченочный холестаз, ишемия печени, поражение печени, вызванные хроническими алкогольными интоксикациями [7,8]. Обладает выраженной антиаритмической активностью у больных с экстрасистолами и пароксизмальными нарушениями ритма [9]. В отличие от фенобарбитала, не оказывает снотворного действия.

Еще один класс перспективных противосудорожных средств - производные бензгидрилмочевин. Данная группа характеризуется малой токсичностью и широким спектром фармакологической активности. Одним из представителей

данной группы является вещество галодиф (структурная формула представлена на рисунке 2), синтезированное в Томском политехническом университете [10].

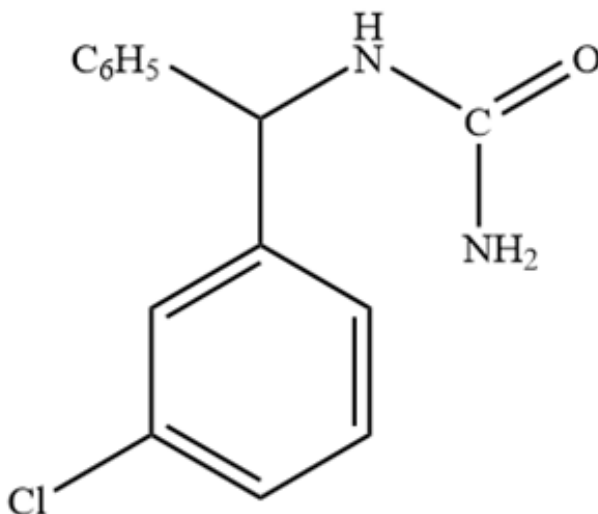


Рисунок 2 - Структурная формула Галодифа
1-[(3-хлорфенил) (фенил)метил]мочевина

Белый мелкокристаллический порошок белого или белого с желтоватым оттенком цвета со слабым специфическим запахом, без вкуса с температурой плавления 136-141°C. Практически нерастворим в воде и гексане, растворим в спирте 96%, изопропанол, легко растворим в органических растворителях - хлороформе, эфире [11]. Вещество обладает высокой антиконвульсивной активностью при электрошоке, судорогах различной этиологии (коразоловых, стрихниновых и камфорных), выраженным центральным М-холинолитическим и слабым Н-холинолитическим действием. Механизм противосудорожного действия связан с блокадой быстрых натриевых каналов нейронов [12]. Препарат имеет малую токсичность и хорошую переносимость, не оказывает выраженных побочных эффектов. При проведении хронических экспериментов на грызунах, кроликах и собаках не было выявлено токсического влияния на функциональное состояние внутренних органов. Вещество не вызывает сонливости, заторможенности и вялости. В отличие от большинства других противоэпилептических средств не влияет на репродуктивную функцию у мужчин.

Помимо противосудорожных свойств, доказана эффективность вещества в комплексной терапии алкоголизма: при алкогольной эпилепсии галодиф предотвращает развитие белой горячки и купирует её в короткие сроки [13]. Отмечены дегидратирующие свойства препарата, за счет нормализующего действия на водно-электролитный баланс головного мозга, обусловленного стабилизацией концентрационного градиента ионов и препятствию изменения мембранной проницаемости и мембранного потенциала клетки, что является существенным дополнением к его противосудорожному эффекту. Отмечен эффект повышения нейромедиации ГАМК на мозге крыс, что вызывает снижение потребности в алкоголе [14]. При исследовании Галодифа на модели алкогольной зависимости выявили, что препарат обладает антиконвульсивным, анальгезирующим и седативным, а также ноотропным и антигипоксическим эффектами.

Одним из широко используемых в клинической практике веществ является мельдоний. Мельдоний (милдронат, кардионат; структура представлена на рисунке 3) – метаболическое средство, нормализующее энергетический обмен клеток, подвергшихся гипоксии или ишемии. Поддерживает энергетический метаболизм сердца и других органов.

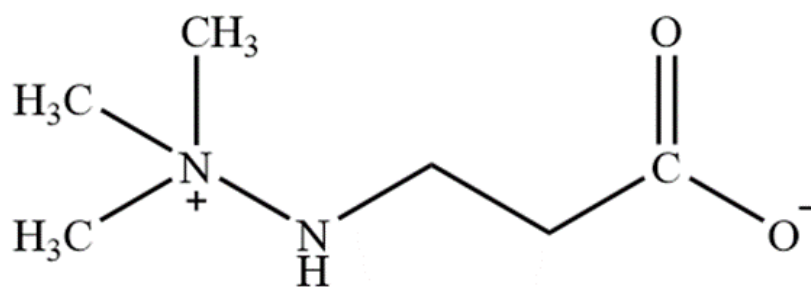


Рисунок 3 - Структурная формула мельдония
3-(2,2,2-триметилгидразиний) дигидрат

По химической структуре представляет собой четвертичное аммониевое основание и является цвиттер-ионом. Белый кристаллический порошок, или бесцветные (или белые) кристаллы, со слабым запахом, очень гигроскопичен. Очень легко растворим в воде, метаноле, легко растворим в 96% спирте,

практически нерастворим в хлороформе [15]. Впервые вещество синтезировано в Институте органического синтеза Латвийской ССР в начале 1970 – х как результат переработки отходов ракетного топлива - гептила. В 80-х годах XX века, мельдоний применялся как анаболическое средство в сельском хозяйстве. Мельдоний корректирует в организме обмен веществ, вовлеченных в производстве энергии, и таким образом способствует адаптации клеток к ишемии. Поэтому предложено применять препарат для лечения таких заболеваний, как: ишемическая болезнь сердца, сердечная недостаточность, атеросклероз, тромбоцитоз и другие [16]. В дальнейшем многочисленные клинические исследования подтвердили, что благодаря своему уникальному механизму действия мельдоний может применяться для лечения заболеваний, связанных с нарушениями кровообращения в том или другом органе человека [17]. Мельдоний обладает метаболическим, кардиопротективным, антиангинальным, антигипоксическим, адаптогенным эффектами, оказывает легкое тонизирующее действие на центральную нервную систему. Повышает клеточный и гуморальный иммунитет. Устраняет синдром абстиненции при хроническом алкоголизме.

Мельдоний является структурным аналогом γ -бутиробетаина, и поэтому может ингибировать фермент γ -бутиробетаингидроксилазу, ответственный за синтез карнитина. Механизм действия мельдония и его связь с эндогенными веществами показана на рисунке 4.

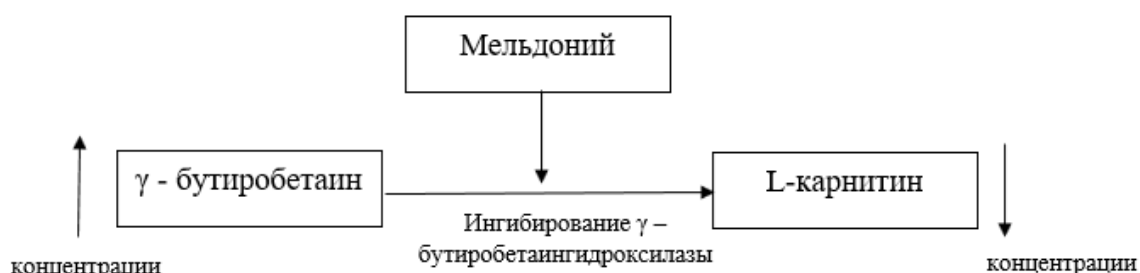


Рисунок 4 - Механизм действия мельдония и его связь с L-карнитином

Мельдоний также снижает абсорбцию экзогенного карнитина в тонкой кишке (из пищи, напитков и т.п.) благодаря конкурентному воздействию на специфический белок-транспортер OCTN2 [18]. Как следствие, в организме

уменьшается концентрация карнитина и замедляется процесс переноса жирных кислот через митохондриальные мембраны клеток сердца (карнитин выступает в данном процессе как переносчик жирных кислот). Такое замедление очень важно в период кислородной недостаточности, поскольку при нормальном поступлении жирных кислот в сердце и недостатке кислорода происходит неполное окисление жирных кислот. При этом накапливаются промежуточные продукты, оказывающие вредное действие на ткани сердца, например, ацилкарнитин, которые блокируют доставку АТФ к органеллам клетки [19]. Одновременно с замедлением метаболизма жирных кислот увеличивается скорость метаболизма углеводов (гликолиза), при котором наблюдается цитозащитный эффект и более эффективное образование АТФ, поскольку при окислении углеводов затрачивается меньше кислорода в расчёте на одну молекулу АТФ, чем при окислении жирных кислот. Более того, мельдоний сам по себе способствует активации гликолиза, усиливая экспрессию гексокиназы, катализирующей превращение глюкозы в глюкозо-6-фосфат [20]. В результате снижения синтеза карнитина повышается содержание γ -бутиробетаина, оказывающего также вазодилатирующее действие. Учитывая широкий спектр применения данного препарата, доказанную эффективность, в 2012 году введен в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов в России. Однако, мельдоний был добавлен к списку Всемирного антидопингового агентства (WADA) 16 сентября 2015 года, с началом действия с 1 января 2016 года. Прежде он находился в списке мониторинга WADA. WADA рассматривало лекарственное вещество как модулятор метаболизма, сходный с инсулином. Согласно публикации в журнале Drug Testing and Analysis за декабрь 2015 года, по данным ряда исследований мельдоний при приёме во время периода тренировок повышает результаты атлетов, выносливость, сокращает время восстановления после выступления, защищает от стресса и активирует функции центральной нервной системы [21]. В результате мельдоний добавлен в класс S4 (Гормоны и модуляторы метаболизма) допингового списка и запрещён к применению в соревновательный и внесоревновательный период [22].

1.2 Аналитические возможности современных методов определения галонала, галодифа и мельдония

Учитывая необходимость контроля содержания изучаемых веществ в различных объектах, разработка высокочувствительных методов определения является актуальной задачей для оперативного аналитического сопровождения. Применение титриметрических методов анализа ограничено, ввиду низкой чувствительности, и используется для определения содержания основного вещества в субстанциях и лекарственных формах. Так, в [23] регламентировано определение фенobarбитала алкаиметрическим титрованием в водно-спиртовой среде в присутствии индикатора тимолфталейна до появления синего окрашивания. Определение мельдония в субстанции проводится ацидиметрическим титрованием в неводной среде, с индикацией конечной точки титрования либо потенциометрически, либо с добавлением раствора кристаллического фиолетового до перехода окраски в голубовато-зеленую [15]. В фармакопейной статье предприятия (**согласовано с МЗ РФ под номером ФС 00860-170614**) для определения качественного содержания галодифа используется метод определения азота в органических соединениях по методу Къельдаля [24]. Затем собирают не менее 150 мл отгона и титруют дистиллят раствором 0,1М хлороводородной кислоты до перехода окраски из зеленой в красно-фиолетовую (0,4 мл смешанного индикатора).

Еще одним титриметрическим методом анализа производных барбитуровой кислоты является обратная меркуриметрия, основанная на образовании нерастворимых солей с ионами ртути (II). Осадок барбитурата ртути, полученный при добавлении к исследуемому образцу (предварительно переведенного в раствор) отфильтровывают, и в растворе оттитровывают избыток ионов ртути с использованием раствора ЭДТА в присутствии индикатора ксиленового оранжевого [25].

Иммуноферментный анализ (ИФА) является одним из активно развивающихся направлений химической энзимологии. Данная группа методов

основана на специфическом связывании определяемого соединения соответствующими антителами и последующей индикацией комплекса антиген-антитело с использованием меток, которые легко детектируются с использованием физико-химических методов анализа (изотопные метки, ферментные, флуоресцентные и др.) [26]. На сегодняшний день находит практическое применение в клинической практике отравлений различными веществами, в том числе и лекарственными препаратами [27]. Безусловными преимуществами методов являются: быстрота выполнения, автоматизация процесса анализа, а также чувствительность определения низкомолекулярных соединений. Основным недостатком данной группы методов – возможность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов [28]. Применяется для скрининговых исследований и носит отрицательный характер [29].

Предложено несколько методов иммуноферментного анализа производных барбитуровой кислоты. Так, в статье [30] приводится сравнение двух твердофазных ИФА-методов, основанных на методах прямого и непрямого взаимодействия. В исследованиях использованы моноклональные тела, меченные пероксидазой хрена. Оба метода характеризуются высокой чувствительностью (предел определения 2 мкг/мл) и линейным диапазоном – 10-40 мкг/мл. Установлено, что предпочтительно применение непрямого ИФА-метода, за счет большей чувствительности (в 4 раза в сравнении с прямым способом), сокращения времени исследования, сокращения объема аликвоты, необходимой для анализа.

В статье [31] приводятся данные об использовании функциональных полистирольных микросфер для определения барбамилла, морфина и тетрагидроканнабиола по реакции латексной агглютинации. Чувствительность определения барбамилла составила 300 нг/мл, а совпадение результатов изучаемым методом с независимыми методами определения составила 99,5%.

Методы иммуноферментного анализа находят применение не только в клинической практике, но и в криминалистике для установления факта употребления контролируемых веществ (в т.ч. и барбитуратов) в срок до 5-7 суток

с момента употребления с использованием тест-полосок, например «Иммунохром–10-Мультиэкспресс», «Наркостоп» [32]. При этом количественная оценка в данном случае невозможна и должна определяться с использованием хроматографических методов. Для определения мельдония и галодифа методик иммуноферментного анализа не предложено.

Однако, большинство литературных данных описывают применение физико-химических методов анализа. На примере обзора статей по методам определения производных барбитуровой кислоты (фенобарбитал и бензонал, барбитал, барбамил и др.) видно, что большее количество литературы посвящено хроматографическим методам анализа. Электрохимические методы анализа в данное время успешно развиваются и используются для определения производных барбитуровой кислоты. Данные представлены на рисунке 5.

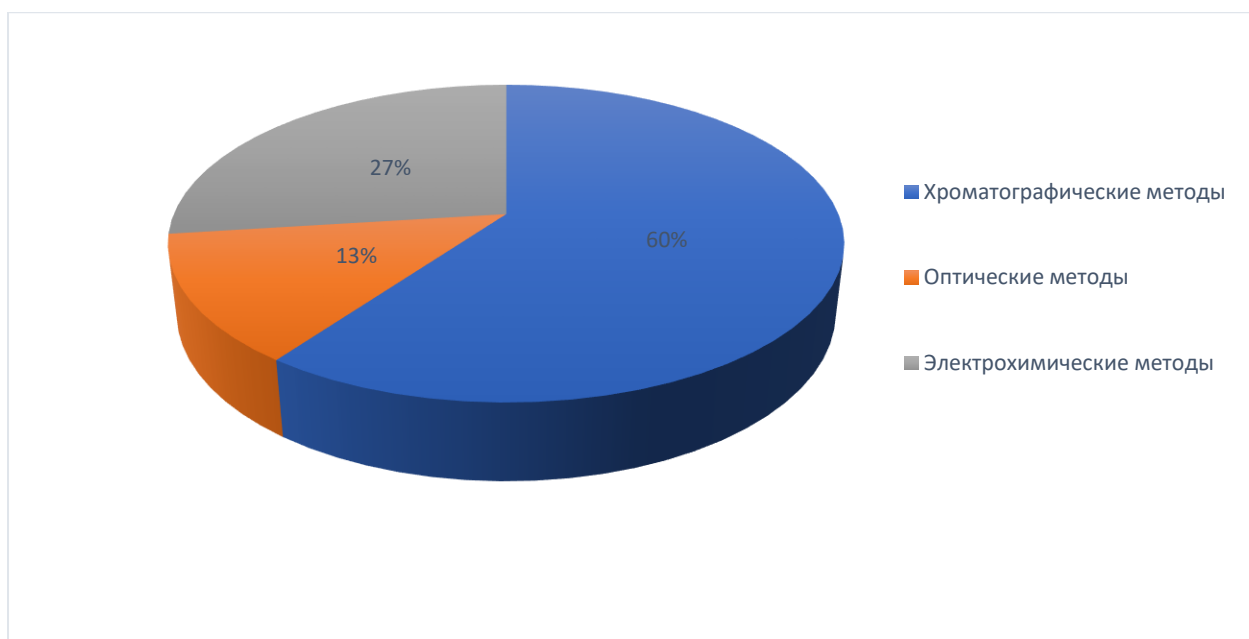


Рисунок 5 - Распределение ФХМА в литературных источниках на примере барбитуратов

Как видно из диаграммы, наиболее часто применяются различные хроматографические техники и методики – более половины всех методов, предлагаемых для определения барбитуратов в различных объектах, однако использование электрохимических методов также находит место для определения органических лекарственных веществ.

Хроматографические методы определения

Хроматографические методы, безусловно, на сегодняшний день являются «лидерами» при определении различных лекарственных препаратов. Широта методик хроматографирования и детектирования является преимуществом, а количество научных и практических задач, решаемых с помощью хроматографии крайне широко: идентификация и количественное определение лекарственных веществ (ЛВ) в субстанциях (проверка качества субстанции, наличие примесей, качество готовой лекарственной формы), определение содержания ЛВ в биологических объектах (Исследовательские и научные работы, рутинный клинический анализ, химико-токсикологический контроль) и др.

Проведенный анализ литературных данных о методах определения производных барбитуровой кислоты, галодифа и мельдония указывают на активное использование хроматографических методов с различными видами детектирования. В таблице 1 приведены характеристики некоторых методик изучаемых лекарственных препаратов.

Трудности анализа производных барбитуровой кислоты методом газовой хроматографии связаны с невысокой летучестью этих соединений из-за наличия в их структуре двух полярных -NH-групп, что приводит к значительному уменьшению интервала концентраций, в которых аналитический сигнал воспроизводим [33]. Поэтому в статье [34] при пробоподготовке объекта исследования проводится параллельная дериватизация (метилование полярных групп) определяемых веществ для получения более летучих производных.

В статьях А.П. Арзамасцева [35-37] описывается применение tandemных методов анализа (хроматомасс-спектрометрия) для различных аналитических задач.

Таблица 1 - Хроматографические методы анализа исследуемых веществ

№ п/п	Определяемое вещество	Объект исследования	Метод определения	Основные условия	Метрологические характеристики	Лит. Ссылка
1.	Фенобарбитал (ФБ) и циклобарбитал (ЦБ)	кровь	ГХ-МС с предварительной дериватизацией	Хроматографическая колонка НР-5-MS длиной 30 м, внутренний слой 0,25 мкм. Газ-носитель – гелий со скоростью потока 1,4 мл/мин. Внутренний стандарт – 0,02 мг/мл гексабарбитала Режим селективного мониторинга ионов	Предел обнаружения – 1,0 мкг/мл (для двух веществ), линейный диапазон 2,0 – 200 мкг/мл	34
2.	Секобарбитал	Плазма крови, моча	ГХ с пламенно-ионизационным детектором	Стальная колонка 3,05 м-3,175 мм, газ-носитель – азот со скоростью потока - 22 мл/мин. Внутренний стандарт 0,2 мл аллилциклопентал барбитуровой кислоты		38
3.	Фенобарбитал	волосы	ГХ-МС с дериватизацией тетраметиламмоний гидроксидом	Колонка НР-5MS длиной 30 м, внутренний слой 0,25 мкм. Газ-носитель – гелий со скоростью потока 0,6 мл/мин. Внутренний стандарт – дейтерированный фенобарбитал	Предел обнаружения 0,1 нг/мг Предел определения – 0,25 нг/мг Линейный диапазон – 0,25 – 10 нг/мг	39

Продолжение таблицы 1

4.	Фенобарбитал	Плазма крови	ВЭЖХ с диодным детектированием	Колонка Wovus- RP (15 см×0,46 см; размер частиц – 5 мкм). ПФ – смесь ацетонитрила (45% по объему) и 0,005 моль/л фосфатного буфера (pH 7,5) (55% по объему), скорость потока 1 мл/мин. Детектирование в диапазоне длин волн 210-400 нм	Предел обнаружения 0,11 мг/мл Предел определения – 0,37 мг/мл	40
5.	Барбитал и производные	Свинина, мясо птицы, свиная печень, рыбные ткани и креветки	ЖХ-МС (электроспрей)	Колонка Phenomenex Luna C18 (150 мм×4,6 мм; размер частиц – 5 мкм). ПФ: А – вода + уксусная кислота (100:0.01 по объему); Б – метанол + уксусная кислота (100:0,01 по объему). Скорость 0,5 мл/мин в градиентном режиме. Внутренний стандарт – дейтерированно меченный фенобарбитал и секобарбитал	Предел обнаружения 0,5 нг/г сырья	41

Продолжение таблицы 1

6.	Фенобарбитал, совместно с другими противосудорожными препаратами	кровь	ВЭЖХ - УФ	Колонка Lichrospher 100 RP-18 (125 мм×4 мм; размер частиц – 5 мкм). ПФ: вода:ацетонитрил (78:22 по объему). Скорость 1,0 мл/мин. Детекция при 220 нм	Линейный диапазон – 0,08-40 мкг/мл; предел определения – 0,08 мкг/мл	42
7.	Фенобарбитал в присутствии других лекарственных веществ	Кровь, моча, желчь	ВЭЖХ	Хроматограф «Милихром А-02» колонка (2×75 мм) с обращено-фазовым сорбентом Prontosil 120-5 C18, многоволновой УФ-детекцией. ПФ: 1 – 0,1% раствор трифторуксусной кислоты в дистиллированной воде, 2 – 0,1% трифторуксусной кислоты в ацетонитриле. Анализ проводится в градиенте элюента Б. скорость потока 150 мкл/мин. Базовая длина волны 210 нм.		43

Продолжение таблицы 1

8.	Фенобарбитал	Сыворотка крови	ВЭЖХ с фотодиодной детекцией	После экстракции твердой фазы, колонка (15*0,46 мм) с сорбентом Alltima 3C18. ПФ – метанол (14,5% по объему), ацетонитрил (19,5%) и 25 мМ фосфатный буфер pH = 6,2 (66%), скорость подачи ПФ – 0,9мл/мин. Длины волн для детекции от 215 до 275 нм	Совместное введение препаратов не мешают их определению. Относительное стандартное отклонение < 1,9%, нижний предел обнаружения – 0,065мг/мл.	44
9.	Фенобарбитал и амобарбитал	Сыворотка крови	ГХ – МАСС-СМ	Масс-селективный детектор НР 5973, газовых хроматограф НР 6890 колонка длиной 30м. диаметр колонки 0,25мм. Газ-носитель – гелий со скоростью 1 мл/мин.	Коэффициенты корреляции калибровочных кривых были 0,9995 или лучше, и точность внутрисуточных и междусуточных анализов были в соответствии FDA критериями.	45
10.	Смесь барбитуратов	-	ГХ с ПИД детекцией	Колонка заполнена 4% Апиэзон Л, газ-носитель – азот с добавлением муравьиной кислоты. Температура детектора – 185С. В качестве пробы раствор барбитуратов в хлороформе.	Данным способом можно определять количественно от 2 до 200 нг	46

Продолжение таблицы 1

11.	Барбитураты	Ткани с пятнами крови (марлевая повязка, образцы одежды)	ТСХ	Пластина НР TLC-Si-60 "merck", размером 10*12 см, система – хлороформ:ацетон (9:1). Проявитель: 0,02% раствор дифенилкарбазон в хлороформе и 2% сульфата ртути в серной кислоте. В качестве стандарта использовали гексабарбитал и фенобарбитал. Пробоподготовка осуществлялась методом Поповой.	-	47
12.	Галодиф	Таблетированная форма	ВЭЖХ-УФ	Колонка 25×0,46 см, заполненная сорбентом С18 с размером частиц 5 мкм; ПФ – смесь метанола и воды в соотношении 60:40 по объему, скорость потока подвижной фазы 1 мл/мин. Аналитическая длина волны для детектирования 225 нм (УФ детектор)		48

Продолжение таблицы 1

13	Примеси галодифа (полупродукты синтеза)	субстанции	ВЭЖХ - УФ	Предколонка Силасорб SPH C18 (60×4,6мм; 6 мкм), колонка Hypersil C18 (200×3,2мм; размер частиц 5 мкм). ПФ – смесь метанола и воды (80:20 по объему). УФ – детекция примесей при длине волны 260 нм.	Нижняя граница определяемых примесей на уровне 0,05%	49
14.	Галодиф	Комбинированные лекарственные формы	ВЭЖХ - УФ	Колонка Силасорб-600 (62×2 мм; 5 мкм размер частиц). ПФ – гексан: хлороформ: изопропанол (70:22:8), скорость потока 0,2 мл/мин. УФ – детекция при длине волны 228 нм	-	50
15.	Мельдоний	Моча человека	ВЭЖХ – МС-МС	Колонка Phenomenex Kinetex HILIC (100×2,1 мм; 2,6 мкм). ПФ – смесь ацетонитрил:10 мМ ацетат аммония градиентный режим элюирования со скоростью потока 0,3 мл/мин. Внутренний стандарт - габапентин. Электрораспылительная ионизация для масс-детекции	Нижняя граница определяемых концентраций – 10 нг/мл, предел детектирования – 7,5 нг/мл, линейный диапазон – 10-250 нг/мл.	51

Продолжение таблицы 1

16.	Мельдоний	Моча человека	ВЭЖХ-МС-МС	Предколонка SiO ₂ (4.0×2.0 мм; 5 мкм), колонка Atlantis HILIC Silica (50×4.6 мм; 3 мкм); Температура колонки – 25°C ПФ А)-вода с добавлением 0,2% муравьиной кислоты, Б) – метанол с добавлением 0,1% муравьиной кислоты Внутренний стандарт- меченный мельдоний-Д3	Линейность – 10-4000 нг/мл (R2 = 0.9971); Предел определения – 10 нг/мл; Предел обнаружения – 3 нг/мл	52
17.	Мельдоний	Плазма крови	ЖХ-МС-МС	Колонка Shim-Pack VP – ODS C18 (150×4,6мм; размер частиц сорбента – 5 мкм). ПФ – метанол:10 mM ацетат аммония (55:45 по объему), скорость потока – 0,4 мл/мин. Внутренний стандарт - ацетаминофен	Линейная зависимость от 0,01 – 20 мкг/мл	53

Окончание таблицы 1

18.	Мельдоний	Моча, плазма крови	ВЭЖХ-МС-МС	Колонка Inersil NH ₂ (250×4.6 мм; 5 мкм) ПФ – вода:метанол (60%:40% по объему), скорость потока – 500 мкл/мин. Внутренний стандарт – L-карнитин. Ионизация электроспреем	Линейный диапазон 1-20 нг/мл	54
19	Мельдоний	моча	ВЭЖХ-МС	Колонка Supercosil LC-NH ₂ (150×3мм; размер частиц – 3 мкм). ПФ – а: раствор 10 мМ формиата натрия в воде; б – ацетонитрил, изокрастически й режим элюирования. Ионизация электроспреем		55

В структуре мельдония, в отличие от галодифа и галонала, отсутствуют хромофорные группы, поэтому детекция с использованием спектрофотометрических методик невозможна без предварительной дериватации. Наиболее часто в литературных данных описывается использование tandemных масс-селективных детекторов, с использованием в качестве внутренних стандартов: дейтерированный мельдоний и левокарнитин, карнитин, ацетаминофен и др.

Разработана также методика одновременного хроматографического определения мельдония и L-карнитина в плазме крови методом ВЭЖХ-МС [56].

Использование метода тонкослойной хроматографии для одновременного определения мельдония и карнитина с использованием циклодекстриновых подвижных фаз предложено в статье [57]. Определено влияние подвижной и

неподвижных фаз на величины подвижности мельдония, определена концентрация циклодестринов в подвижной фазе для лучшего хроматографического разделения. Предложены методики количественного определения мельдония в лекарственных препаратах “Милдронат” и “Идринол” со значениями $Sr = 0.04-0.10$.

Оптические методы определения

Оптические методы анализа распространены для анализа лекарственных средств, при этом большое аппаратное разнообразие позволяет выбрать условия обнаружения и определения широкого круга лекарственных препаратов. К фармакопейным оптическим методам анализа относятся: рефрактометрия, поляриметрия, спектрометрия в инфракрасной, видимой и ультрафиолетовой областях, атомно-абсорбционные и атомно-эмиссионная спектрометрия и др.

В статье [58] приведен обзор применения фотометрических методов для идентификации веществ, оценки качества синтезированной субстанции, а также количественного определения основного вещества в готовых лекарственных формах. В таблице 2 приведены сводные данные об основных условиях определения изучаемых веществ с применением оптических методов.

В работе [63] приведены условия и характеристика ИК-спектра галодифа, полученного с использованием ИК-Фурье-спектрометра Cary 630 FTIR. Полученные данные можно использовать для оценки подлинности лекарственного вещества после синтеза.

Таблица 2 - Оптические методы анализа исследуемых веществ

№ п/п	Определяемое вещество	Объект исследов ания	Метод	Основные условия	Метролог. характерис тики	Лит. ссылка
1.	Барбитуровая кислота	субстанци я	Спектрофот ометрия в видимой области	Спектрофотоме тр Вексман Model 36 с кварцевыми ячейками с толщиной оптического слоя 1 см. Фотометрическ ая реакция с хлоралгидрато м, измерение при длине волны 450 нм.	Предел определения - 0,1 мг/мл, линейный диапазон – 0,1 – 3,0 мг/мл	59
2	Барбитал	Сыворотк а крови животных	Флуоресцен тная спектроскоп ия	Спектро- флуориметр RF-5301PC, УФ- спектрофотоме тр Cary-100UV. Спектры флуоресценции замерены при длине волны возбуждения 280 нм, длина волны излучения 250–500 нм	-	60

Окончание таблицы 2

3	Галодиф	Плазма крови крыс	Спектрофотометрия в видимой области	Спектрофотометр СФ-26, кварцевые кюветы толщиной слоя 10 мм, при длине волны 433 нм. Предварительно проводили фотометрическую реакцию галодифа с п-диметиламинобензальдегидом	График зависимости оптической плотности от концентрации линейен в диапазоне 0,5 – 200 мкг/мл	61
4	Мельдоний	Раствор для инъекций	Рамановская спектроскопия	Комплекс Mini-Ram532, включающий в себя рамановский спектрометр EnSpectrR532 и источник излучения лазер с длиной волны 532 нм.	-	62

В исследованиях производных мочевины часто применяются методы УФ-спектроскопии, описанные в ряде работ как отечественных, так и зарубежных авторов. Однако, чаще всего, эти работы посвящены либо анализу этих соединений в смеси с лекарственными веществами других химических классов, либо исследованием с целью изучения фармакокинетических и химико-токсикологических параметров.

Стоит отметить, что оптические методы анализа для определения изучаемых препаратов в большинстве используются в качестве детектирующих после предварительного хроматографического разделения.

1.3 Особенности электрохимических методов определения барбитуратов и мельдония

Наряду с другими физико-химическими методами, активное распространение получили и электрохимические методы. В фармакопее XIV издания регламентировано использование следующих электрохимических методов: кондуктометрия (для определения электропроводности); амперометрическое и потенциометрическое титрование; электрофорез, в том числе и капиллярный.

Так, применение капиллярного электрофореза, описанного в [64] позволяет добиться хорошего разделения определяемого вещества от матрицы с пределом обнаружения 0,015 мкг/мл и широким линейным диапазоном. Определение проводили в пробах мочи. Среднее извлечение образцов мочи с добавкой 0,02–123,5 мкг/мл варьировалось от 97,6–99,9%.

Одним из наиболее подходящих электрохимических методов для рутинных анализов является вольтамперометрия. Использование различных рабочих электродов в двух- и трехэлектродных системах детектирования в сочетании с возможностью модифицирования органическими и неорганическими веществами обеспечивают низкий порог определения (10^{-9} моль/л) и широкий диапазон определяемых концентраций органических веществ (10^{-3} – 10^{-7} моль/л). К преимуществам метода также относятся: экспрессность, простота и дешевизна аппаратного оформления. Несмотря на то, что в Российской Федерации вольтамперометрия не является фармакопейным методом анализа, электрохимиками накоплен большой опыт определения различных лекарственных

веществ в объектах с применением данного метода. Согласно фармакопее Америки USP 801 электрохимически активные фармацевтические субстанции, такие как азатиоприн, цефамандол, диклофенамид и прокарбазин могут быть определены с помощью вольтамперометрии. Например, определение тиомерсала (ртутьсодержащее соединение, используемое в качестве антисептического и противогрибкового средства) в глазных каплях проводится с дифференциально-импульсным режимом с использованием трехэлектродной ячейки (Рабочий электрод – ртутный-капельный, вспомогательный электрод – платиновая проволока, электрод сравнения – насыщенный хлоридсеребряный электрод) на буферном растворе при $\text{pH} = 7,0$. Потенциал пика тиомерсала при данных условиях - $-0,635$ В.

Известна методика определения мельдония с использованием ртутно-пленочного электрода [65]. Данная методика апробирована для анализа биологических объектов, таких как моча и кровь, показаны удовлетворительные характеристики воспроизводимости и чувствительности. Однако, предполагает использование токсичной ртути для формирования поверхности рабочего электрода.

Авторами К.Р. Вороновой и А.Г. Стромбергом [66] изучены полярографические свойства барбитала и фенобарбитала. На фоне боратного буферного раствора при $\text{pH} = 9,2$ получены две анодные волны барбитала и фенобарбитала, при чем одна имеет адсорбционную природу, а другая – диффузионную. Для определения фенобарбитала в различных лекарственных формах (микстурах, порошках, таблетках) использовали боратный буфер с $\text{pH} 8,0$, содержащий 1M раствор AgNO_3 . Недостатком данной методики является мешающее влияние кофеина, эуфиллина, тиамина и различных ПАВ. Анодные волны барбитала и фенобарбитала в диапазоне концентраций $10^{-5} - 2 \cdot 10^{-4}$ М получены на фоне буферного раствора Бриттона-Робинсона с $\text{pH} 8,8$. Однако, при использовании данной методики невозможно одновременное определение фенобарбитала и барбитала [67].

Для определения производных барбитуровой кислоты разработаны различные сенсоры, в том числе и модифицированные [68-71], обеспечивающие широкий диапазон определяемых концентраций, низкий предел обнаружения, и приемлемые метрологические характеристики.

1.4 *Использование модифицированных электродов при вольтамперометрическом определении лекарственных веществ*

В аналитической практике широкое применение ранее находили немодифицированные металлические (чаще всего ртутные) и углеродсодержащие электроды [72]. По мере расширения количества задач, которые можно решать с помощью вольтамперометрии, а также усложнения химической структуры определяемых веществ возникла потребность в разработке способов модифицирования поверхности электрода. В обзоре [73] описаны современные тенденции в использовании различных электродных мультисистем с модифицированными электродами для целей фармакологии и биохимии. При модифицировании на поверхность электродной подложки наносят один или несколько слоев химических соединений, полимерных пленок или формируют композиты-оксиды из металла, при этом появляется существенно другая способность к вольтамперометрическому отклику из-за наличия специфических свойств. Недостатком химически модифицированных электродов является снижение универсальности электрода, однако увеличение селективности определения элементов и органических веществ значительно возрастает [74].

Для модификации поверхности электрода используют два способа: «in situ» – при этом модификатор вносится непосредственно в раствор фонового электролита. В качестве модификаторов используются: металлы, облегчающие осаждение неорганических элементов или образующие с органическими соединениями комплексы или нерастворимые соединения; водорастворимые

органические вещества (лиганды, БАВы, полимерные материалы). Либо в раствор вводятся органические молекулы, способные к самоорганизации на поверхности электрода с образованием упорядоченных монослоев. Также широко применяются комбинации модификаторов, обеспечивающих необходимый уровень аналитического сигнала. Закрепление модификатора в данном случае достигается путем адсорбции, что значительно влияет на время жизни модифицированного электрода, и, как правило, перед каждым измерением необходимо заново модифицировать поверхность.

При использовании альтернативного способа «*ex situ*» осуществляют предварительную иммобилизацию модификатора на поверхности или в объеме электрода. Сочетание различных материалов поверхности и модификатора позволяет изготовить высокоселективный электрод. Пришивка модификатора осуществляется за счет физической адсорбции, ковалентной пришивки, за счет физических процессов или включения в полимерную пленку. Преимуществами данного способа является формирование высокоселективных электродов, при этом сокращается время анализа [74].

Анализ литературных источников за последние 5 лет показал значительный прирост статей об определении лекарственных препаратов в различных объектах с использованием модифицированных электродов. Поиск литературных источников осуществлялся в базе данных Sciencedirect, путем формирования запроса, по ключевым словам, «*voltammetry drug*» и «*modified electrode voltammetry drug*». Результаты представлены на рисунке 6.

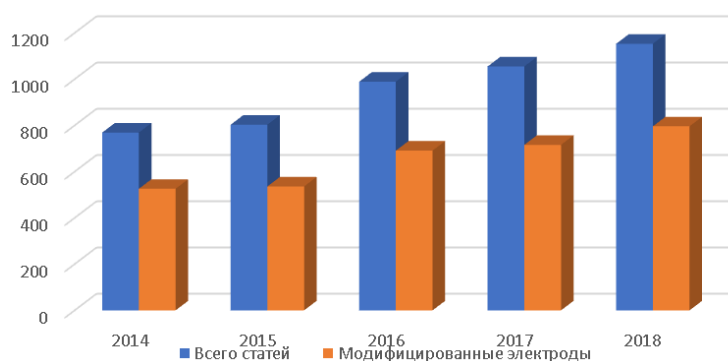


Рисунок 6 - Ретроспективный анализ литературных данных на основании базы Sciencedirect в период с 2014 - 2018 годы

На диаграмме, представленной на рисунке 7, указано распределение научных работ за 2018 год, связанных с использованием модификаторов для вольтамперометрического определения лекарственных веществ. Разделение осуществлялось на основании вида модификатора: неорганические – в данную группу относились модификаторы на основе наночастиц металлов, их оксидов и солей; углеродсодержащие модификаторы – модификаторы на основе УНТ, углеродных нанопластин, оксида графена; органические – электроды, модифицированные различными органическими веществами: красителями, ПАВами, ВМС и т.д.; комбинированные – сочетание нескольких типов модификаторов, чаще всего сочетание наночастиц металлов с последующим модифицированием органическими селекторами.

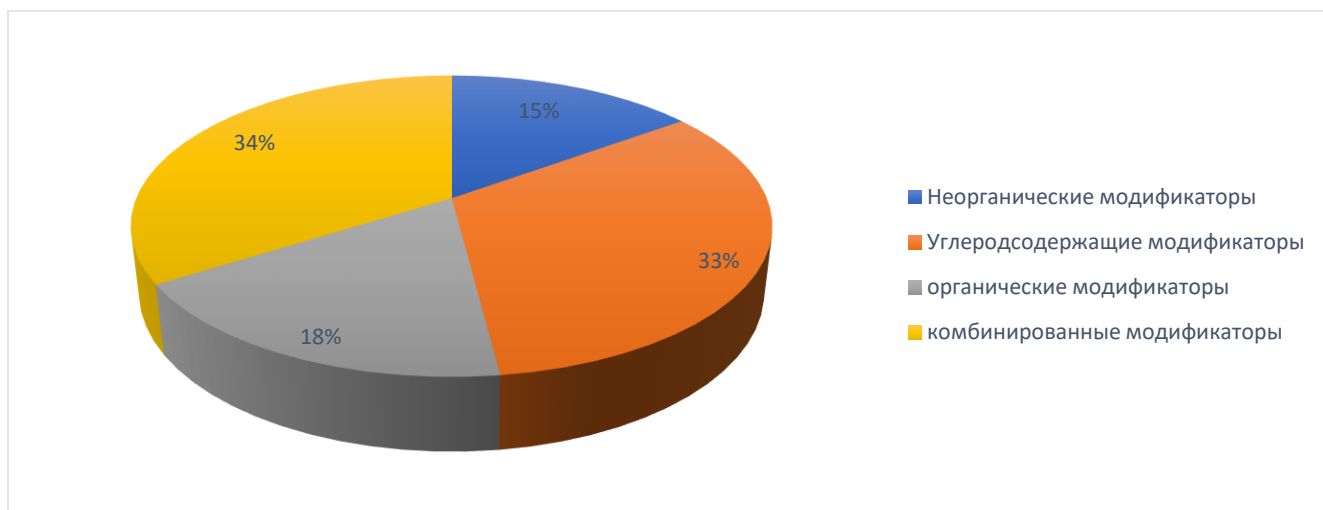


Рисунок 6 - Анализ частоты использования различных видов модификаторов для определения ЛВ в различных объектах (согласно базе ScienceDirect за 2018 год, объем выборки - 500 статей)

Таким образом, наиболее часто для разработки новых сенсоров применяются комбинированные методы модификации поверхности электрода: использование углеродсодержащих компонентов - углеродных нанотрубок, оксида графена и наночастиц благородных металлов. Использование УНТ встречается чаще, что объясняется их разнообразием видов и форм, а также простоте использования.

1.4.1 Применение комбинированных модификаторов для определения энантиомерных форм

Большинство лекарственных препаратов, применяемых в современной медицине, представляют собой рацематы (около 90%) и их основной фармакологический эффект связан с активностью одной из энантиомерных форм [75]. Энантиомеры – это пара изомеров, представляющих собой пространственно предмет и его несовместимое зеркальное отражение [76]. С точки зрения физических либо химических свойств, единственной отличительной особенностью энантиомеров является различная способность отклонять плоскость поляризованного света, т.е. иметь разную оптическую активность. Угол удельного вращения является нормируемой характеристикой (внесенной в фармакопейные статьи), и подтверждает подлинность лекарственного вещества, отсутствие примесей полупродуктов синтеза. При отклонении поляризованного света по часовой стрелке вещество относят к правовращающим и в документации обозначают знаком «+», если против часовой стрелки – то к левовращающим формам и отмечают знаком «-».

В литературных данных отмечено, что оптическая изомерия вещества влияет на фармакодинамику и фармакологическую активность лекарства в целом. Объясняется это селективностью мембран клеток, рецепторов на которых направлен лекарственный препарат. Так, например, D-изомер изопротеренола (бронходилататор) в 50-70 раз сильнее, чем его левовращающая форма [77]. В большинстве случаев применение чистых энантиомерных форм препарата в ряде случаев улучшает общий терапевтический эффект и сокращает риск появления побочных эффектов.

Для определения чистоты оптических изомеров применяются методы: спектрополяриметрия, энантиоселективная хроматография, ЯМР, капиллярный электрофорез, ферментативные и химические методы. Использование вольтамперометрических сенсоров в данной области увеличивается за счет ряда

преимуществ: относительная простота и удобство в работе, экспрессность распознавания и определения, достаточный уровень воспроизводимости и селективности. В отличие от методов хиральной хроматографии и капиллярного электрофореза методы вольтамперометрического определения могут быть легко адаптированы для анализа широкого круга веществ, оставаясь конструктивно простыми и недорогими. Кроме того, энантиоселективные электроды могут быть включены в портативные и миниатюрные устройства, позволяющие решать конкретные аналитические задачи, особенно при разработке скрининговых методов определения лекарственных веществ. В основе действия данных сенсоров лежит механизм хирального распознавания, основанный на способности одного из энантиомеров образовывать более прочные связи с поверхностью электрода, на которой иммобилизованы селекторы. Верный выбор материала электрода, способа иммобилизации селектора влияет на качество энантиоселективности. Наиболее часто применяемые материалы — углеродсодержащие: графит, стеклоуглерод, графен, допированный алмаз, углеродные нанотрубки [78].

1.4.2 Применение солей арендиазония для модификации поверхности электродов для вольтамперометрического определения органических веществ

Как было отмечено выше, поверхностная модификация — это процесс изменения состава поверхности материала, его структуры и морфологии с сохранением его объемных и механических свойств. Применение солей арендиазония как модификатора поверхности впервые описано в работе научной группы Delamar [79], проводилось изучение поведения ряда арендиазоний тетрафтороборатов для поверхностной модификации стеклоуглеродного электродов. Функционализация осуществлялась электрохимически в ацетонитрильных растворах солей диазония разных концентраций с добавками

0.1% $\text{NBu}_4^+\text{BF}_4^-$. Изучено влияние концентрации солей диазония на структуру и свойства полученного слоя: наиболее плотный слой может быть получен при концентрации реагента 5 ммоль/л. Установлено, что образующиеся органические слои чрезвычайно прочно связаны с поверхностью и не разрушаются даже при долговременном ультразвуковом облучении. Механизм процесса функционализации поверхности объясняется высокой реакционной способностью диазокатионов в реакциях восстановления с образованием радикальных частиц. Экспериментально протекание данного процесса было зафиксировано с использованием ЭПР-спектроскопии [80]. В дальнейшем радикалы вступают в реакцию с поверхностью с образованием ковалентной связи. Таким образом, механизм ковалентной пришивки функциональных арильных групп представлен на рисунке 8.

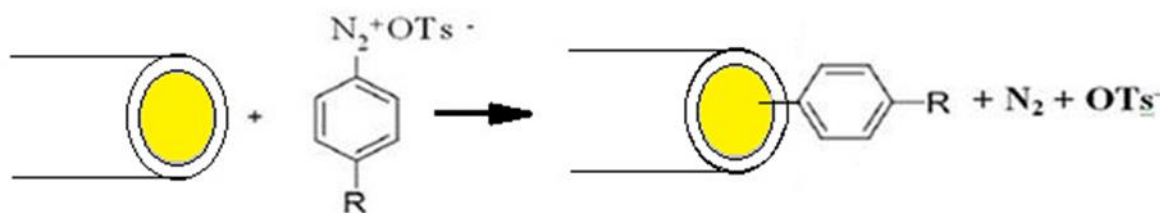


Рисунок 7 - Схема поверхностной модификации электродов солями аренидiazония

Ковалентная модификация поверхности, в отличие от нековалентных взаимодействий, позволяет получать химически стойкие в различных условиях материалы [81-83]. Исследование процесса мультислойной модификации представлен в работе [84]. Процесс электрохимического восстановления проводился в течение 10, 20 и 30 мин (5 mM 4-диазо-N,N-диэтиланилин тетрафторборат, 0,1 M $\text{NBu}_4^+\text{BF}_4^-$ /ацетонитрил, 1,2 В). Толщина образующегося слоя измерялась с помощью сканирующей силовой микроскопии (SFM). Авторами было показано, что толщина слоя возрастает (данные SFM) с увеличением времени электрохимического восстановления от 0,8 нм до 20 нм (при 30 мин). Увеличение толщины слоя также коррелирует с увеличением площади характеристических полос колебаний в ИК-спектрах полученных материалов.

Исследователи также обнаружили полный блокирующий эффект органической пленки.

В 2001 году было обнаружено, что соли диазония при электрохимическом восстановлении способны образовывать ковалентные связи с металлами [85]. Авторами исследовалась активность 11 арилдиазоний тетрафторборатов и 1 одного образца «fast red AI salt» при электрохимическом восстановлении в присутствии железного (99,999% Fe) электрода. Все соли диазония показали сходную активность при модификации поверхности железа в ходе электрохимического восстановления. Авторами при изучении ИК-спектров модифицированных поверхностей были обнаружены характеристические частоты колебаний функциональных групп ароматических радикалов соединений. Кроме того, в ИК-спектрах были обнаружены частоты колебаний в районе $800\text{--}860\text{ см}^{-1}$, а также 682 см^{-1} и 762 см^{-1} , характерные для деформационных колебаний C-H связей 1,4-замещенного бензольного кольца. По данным XPS были обнаружены энергетические пики, характеризующие ковалентную связь между углеродом и металлом.

В 2011 году группой профессора McDermott, исследовались вопросы модификации одного из самых инертных металлов - золота [86]. Авторы провели исследования взаимодействия НБДТ и коммерчески доступных наночастиц золота размером 40 нм методами спектроскопии комбинационного рассеивания. На спектрах гигантского комбинационного рассеивания света (SERS) очевидно появление новой полосы колебания после взаимодействия наночастиц золота и соли диазония в области 412 см^{-1} . Данная полоса отсутствует на спектре соли диазония и немодифицированных наночастиц. Авторы показали, что появление нового пика наблюдалось и в случае использования солей диазония, и с другими заместителями (для нитроазобензолдиазония 410 см^{-1} и 410 см^{-1} для диазопроизводного ацетофенона) (рисунок 9). Наиболее близкой частотой колебания обладала связь Au-C на 375 см^{-1} для цианидов золота [87], благодаря чему авторы предположили, что полоса в исследуемых образцах соответствует связи Au-C_{Ar} для привитых фенильных слоев (412 см^{-1}).

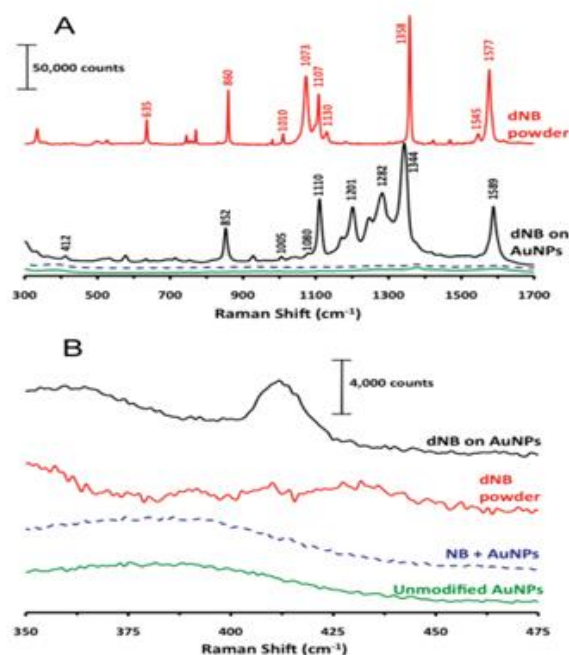


Рисунок 8 - А) Рамановский спектр порошка НБДТ и SERS спектров Au-НЧ модифицированных 4-НБДТ;

В) Увеличенная область спектров Au-НЧ, модифицированных НБДТ (черный), порошка НБДТ (красный), Au -НЧ смешанных с нитробензолом (синий) и немодифицированных НЧ (зеленый)

Copyright © 2011 American Chemical Society (DOI: 10.1021/nn201110r)

Сравнение экспериментально полученных спектров гигантского рассеивания света с данными квантово-химических расчетов методом функционала плотности (DFT) доказали наличие ковалентных связей Au-C.

В дальнейшем полученные данные были подтверждены и в работах Depau, где была обнаружена ковалентная связь Au-C с алкильным радикалом на поверхности [88]. С использованием расчетных методов была оценена прочность связи Au-C(Alk) – 14,2 кДж/моль, что является значительной величиной, предопределяющей прочность связывания ОФГ с поверхностью [89].

Таким образом, исследователями подтверждено, что ароматические соли диазония также могут являться реагентами для модификации металлических поверхностей в ходе электрохимического восстановления.

Одним из основных применений электрохимической модификации является создание сенсорных систем для различных аналитических методов. Например, не так давно был предложен multifunctional сенсор - золотой электрод,

модифицированный двумя солями диазония (4-НБДТ и диазопроизводным фенилбор пиколината) [90]. При оптимальном подборе условий, модифицированная пленка может оставаться электрохимически активной для дальнейшего использования в качестве сенсора. Описанные multifункциональные пленки, которые сохраняют проводимость для последующих электрохимических измерений, являются потенциальными субстратами для электрохимических платформ для исследований клеток, биодетектирования.

В [91] приведены результаты определения водорастворимых витаминов В₁, В₂ и С в соках и нектарах с использованием модифицированными АДТ солями графитовых электродов. Применение данных типов электродов позволяет повысить чувствительность определения в 3-4 раза в сравнении с немодифицированными электродами, и понизить погрешность определения до 14%.

В статье [92] приведены результаты по выбору условий вольтамперометрического определения витаминов и флавоноидов методом инверсионной вольтамперометрии в фармацевтических препаратах. С использованием референтных методов доказано, что разработанные условия адекватны и могут быть применены для определения изучаемых компонентов в БАД.

Учитывая успешный опыт применения данного типа модификаторов при разработке сенсоров для целей аналитического контроля содержания органических веществ, предлагается расширить область использования модифицированных сенсоров для изучаемых веществ.

ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Приборы, электроды, применяемые ячейки

Вольтамперометрические измерения производятся с использованием высокочувствительных приборов, регистрирующих силу тока, протекающего в электролитической ячейке, в зависимости от приложенного поляризующего напряжения.

В работе использовали комплекс аналитический вольтамперометрический СТА (ТУ 4215-001-20694097-98), содержащий три электрохимические ячейки, в комплекте с компьютером с установленным программным обеспечением «Анализатор СТА». В данном комплексе имеется возможность реализации различных режимов регистрации вольтамперограмм: постоянноточковый, ступенчатый, дифференциально-импульсный, позволяющие выбрать оптимальные рабочие условия получения аналитических сигналов определяемых компонентов.

Для получения данных для хемометрической обработки и снятия циклических вольтамперограмм использовали потенциостат - гальваностат Palmsens 4 (PalmSens, Нидерланды) с использованием специализированного программного обеспечения PSTrace. Прибор обладает широким функционалом осуществляемых режимов регистрации и техник, включая хронопотенциометрию и хроноамперометрию. Полученные данные вольтамперометрических определений были перенесены и обработаны с использованием MS Office Excel.

Определение pH раствора проводили с использованием pH-метра-Эксперт-001-3 (0,1) с комбинированным pH стеклянным электродом (Эконикс-эксперт, Россия). Погрешность при определении pH фонового электролита не превышала $\pm 0,1$ pH.

В качестве электродов сравнения и вспомогательных электродов при определении лекарственных веществ использовали хлоридсеребряные электроды, представляющие собой спираль из серебряной проволоки, вкручиваемую в полый

полипропиленовый корпус, закрытый полупроницаемой мембраной, изготовленной из оксида алюминия. Электроды заполнялись 1 моль/дм³ раствором калия хлорида. Хранение хлоридсеребряных электродов осуществляли погружением их в раствор 1М KCl при комнатной температуре, перед началом работы электроды ополаскивали бидистиллированной водой.

Удаление кислорода и перемешивание раствора осуществляли путем барботирования азотом высшего сорта по ГОСТ 9293-74 с долей кислорода не более 0,001 %; подача газа осуществлялась под давлением в электрохимическую ячейку из баллона через силиконовый шланг, присоединенный к анализатору СТА.

В качестве индикаторных электродов (ИЭ) использовали стеклоуглеродный и графитовый электроды.

Стеклоуглеродный электрод представляет собой стеклоуглеродный стержень диаметром 1,5 – 2,0 мм, запрессованный во фторопластовый держатель диаметром 5 – 6 мм так, чтобы длина выступающей части стержня (рабочей поверхности) стеклоуглерода составляла 8 – 12 мм. Для подготовки стеклоуглеродного электрода к работе его обезжиривали этиловым спиртом или диметилформамидом и промывали бидистиллированной водой.

Графитовый электрод изготавливали из пропитанного графитового стержня с диаметром рабочей поверхности 3 – 5 мм. Перед работой электрод шлифовали на бумажном фильтре, обрабатывали электрохимически в 0,1М растворе серной кислотой и промывали бидистиллированной водой.

2.1.1 Методика поверхностной модификации углеродсодержащих электродов для определения мельдония и галодифа

Поверхность графитового торцевого электрода перед процедурой модификации шлифовали фильтровальной бумагой. Затем проводили

электрохимическую очистку в растворе 0,1М серной кислоты. Далее проводили накопление золота в режиме «in situ», с использованием модифицирующего раствора с содержанием золота 100 мг/дм³.

Модификацию графитовых электродов для определения мельдония осуществляли выдерживанием в водном растворе diazonиевой соли концентрацией 10 мг/дм³ при комнатной температуре в течение 5с после предварительного накопления золота в режиме «in situ». Затем модифицированный электрод промывали дистиллированной водой. Приготовленный таким образом электрод использовали для определения.

Полученные электроды сохраняют свою стабильность в работе в течение 15-20 опытов и устойчивы при хранении в бидистиллированной воде не менее 3-4 суток. По истечении срока службы электродов возможна их повторная модификация, по методике, описанной выше, после снятия слоя модификатора с поверхности электрода путем зачистки ее фильтровальной бумагой.

2.2 Приготовление растворов, подготовка посуды

Метод вольтамперометрии предъявляет повышенные требования к чистоте применяемых реактивов, очистке воды, материалам электродов и посуде.

Лабораторную стеклянную посуду, сменные наконечники дозаторов, пипетки протирали фильтром с пищевой содой, промывали многократно бидистиллированной водой и высушивали в сушильном шкафу. При анализе изучаемых лекарственных веществ для приготовления фоновых электролитов использовали бидистиллированную воду, перегнанную в присутствии серной кислоты (0,5 мл концентрированной серной кислоты на 1,0 л дистиллированной воды) и перманганата калия (3,0 мл 3%-ного раствора на 1,0 л дистиллированной воды).

Основной раствор, содержащий 1000,0 мг/дм³ галонала, готовили растворением навески сухого порошка (с содержанием основного вещества не менее 99,5%) в диметилформамиде.

Основные растворы галодифа (рацемата и энантиомерных форм) с концентрацией 100 мг/дм³, готовили растворением навесок сухого порошка (с содержанием основного вещества не менее 99,5%) в ацетонитриле. Для исследования электрохимической активности энантиомерных форм готовили смеси с различным содержанием энантиомеров. Чистота субстанций проверялась хроматографически.

Основной раствор, содержащий 100,0 мг/дм³ мельдония приготовлен путем разбавления фармацевтической лекарственной формы (состава: мельдония 100 мг, воды очищенной – до 1 мл, производство «Гриндекс», Латвия) в бидистиллированной воде. Основной раствор L-карнитина с концентрацией 100,0 мг/дм³ готовили растворением точной навески фармацевтической субстанции (предоставлена ООО «Арт-лайф», г. Томск) в бидистиллированной воде. Рабочие концентрации более низких концентраций готовили разбавлением основных растворов по общепринятой методике.

Растворы фоновых электролитов готовили из реактивов марки «х.ч» и «ос.ч» растворением навесок соответствующих солей в бидистиллированной воде. Боратный буфер с рН 9,18 был приготовлен из фиксаля (ТУ 2642-004-33813273-2006, соотв. ГОСТ 8.135-2004. Уралхиминвест, Россия, годен до 03.21). путем растворения содержимого ампулы 1 дм³ бидистиллированной воды. Для буферных растворов Бриттона-Робинсона с различным значением рН использовали смесь двух растворов: кислотный раствор, содержащий по 0,04М борной, ортофосфорной, уксусной кислот и основной раствор - 0,2М раствор гидроксида натрия, приготовленный растворением точной навески в бидистиллированной воде. Хранение буферного раствора – при комнатной температуре, в плотно закрытой стеклянной посуде. Срок хранения кислотного и основного раствора – 1 месяц [93].

Рабочие растворы диазониевых солей готовили растворением навески сухого порошка солей арендиазоний тозилатов в бидистиллированной воде при незначительном нагревании. Хранили готовые растворы модификаторов в холодильнике, в плотно закрытых пластиковых емкостях.

Для приготовления растворов использовали лабораторную мерную стеклянную посуду второго класса точности по ГОСТ 1770-74Е: колбы наливные вместимостью 25,0; 50,0; 100,0; 1000,0 см³; цилиндры вместимостью 10,0; 25,0 см³. Дозаторы пипеточные различной емкости типа ДПВ-1-5-40, ДПВ-1-40-200, ДПФ-1-200 или П1.

Для отбора проб биологических объектов использовали пробирки одноразовые из полипропилена (типа Эппендорф) вместимостью 1,5 см³.

2.3 Методика выполнения определений галонала, галодифа, мельдония

2.3.1 Вольтамперометрическое определение галогенпроизводных бензонала

Вольтамперометрическое определение производных галогенпроизводных бензонала выполняли на анализаторе СТА с двухэлектродной системой, состоящей из индикаторного стеклоуглеродного электрода и хлоридсеребряного электрода сравнения (1М KCl). Изначально в электрохимическую ячейку помещали раствор фонового электролита 0,1М раствор Na₂SO₃ (или 0,1М NaH₂PO₄) объемом 10 см³, и осуществляли проверку электрохимической системы на чистоту регистрацией вольтамперных кривых в катодной области потенциалов от – 0,8 до -1,5 В в дифференциально-импульсном режиме со скоростью развертки 50 мВ/с, перемешивание и подготовку раствора осуществляли путем барботирования азотом в течение 60 секунд, время накопления 30 секунд, время успокоения - 10 секунд. Запись вольтамперограмм фонового электролита повторяли не менее трех раз. Отсутствие посторонних пиков на вольтамперных кривых свидетельствует о чистоте электрохимической системы и всех ее

составляющих. С помощью дозатора количественно переносили в электрохимическую ячейку исследуемый образец, содержащий изучаемое вещество, и регистрировали вольтамперные кривые в соответствии с параметрами, указанными выше. По появлению пика в области от -1,30 до -1,45 В судили о присутствии галогенпроизводных бензонала в системе. При добавлении с использованием дозатора аликвоты основного раствора и регистрации вольтамперных кривых по описанным выше условиям, увеличение полученного аналитического сигнала позволяет количественно определить содержание искомого вещества в пробе.

2.3.2 Вольтамперометрическое определение галодифа с использованием золото-графитового электрода

Вольтамперометрическое определение галодифа выполняли на анализаторе СТА с трехэлектродной электрохимической системой, состоящей из индикаторного графитового электрода, модифицированного по методике, описанной в 2.1.1; в качестве электрода сравнения и вспомогательного электрода использовали хлоридсеребряные электроды, заполненные 1М хлоридом калия. В электрохимическую ячейку помещали раствор фонового электролита – боратный буфер с рН 9,18 объемом 10 см³ и осуществляли проверку на чистоту фона путем регистрации вольтамперных кривых в области потенциалов от 0,5 до 0,95 В в дифференциальном режиме со скоростью развертки 150 мВ/с, перемешивание и подготовку раствора осуществляли путем барботирования азотом в течение 60 секунд при потенциале -0,1В (относительно ХСЭ (1М KCl)). Запись вольтамперограмм фонового электролита повторяли не менее трех раз. Отсутствие посторонних пиков на вольтамперных кривых свидетельствует о чистоте электрохимической системы и всех ее составляющих и позволяет. Далее проводили модификацию поверхности графитового электрода золотом методом

«in situ». С помощью дозатора в электрохимическую ячейку помещали 0,02 см³ модифицирующего раствора золота с концентрацией 100 мг/дм³ и аликвоту исследуемого образца. Накопление определяемого вещества проводили в течение 15 секунд при потенциале -1,1В. Регистрацию вольтамперограмм проводили в дифференциальном режиме, в диапазоне потенциалов от 0,50 до 0,95В со скоростью поляризующего напряжения 150 мВ/с. По появлению пика при потенциале 0,7±0,05В судили о присутствии галодифа в образце. Количественное определение проводили методом добавок, путем добавления аликвоты основного раствора галодифа и последующей регистрации вольтамперных кривых.

2.3.3 Вольтамперометрическое определение мельдония в присутствии L-карнитина

Вольтамперометрическое определение мельдония в присутствии L-карнитина выполняли с использованием трехэлектродной электрохимической системы: индикаторный - золото-графитовый электрод, модифицированный солями АДТ (методика модификации представлена в 2.1.1), электрод сравнения и вспомогательный электрод – хлоридсеребряные электроды, заполненные 1М КСl. В электрохимическую ячейку помещали раствор фонового электролита 10 см³ буферного раствора Бриттона-Робинсона с рН 9,18, и регистрировали вольтамперные кривые в области потенциалов от 0,50 до 1,1 В в постоянно-токовом режиме со скоростью развертки 5 мВ/с, перемешивание и подготовку раствора осуществляли путем барботирования азотом в течение 60 секунд, время накопления 15 секунд, время успокоения - 110 секунд. Регистрацию вольтамперограмм фонового электролита повторяли не менее трех раз. Отсутствие посторонних пиков на вольтамперных кривых свидетельствует о чистоте электрохимической системы и всех ее составляющих и позволяет переходить к измерению. Далее проводили модификацию поверхности торцевого

графитового электрода золотом методом «in situ». С помощью дозатора в электрохимическую ячейку помещали 0,02 см³ модифицирующего раствора золота с концентрацией 100 мг/дм³. Далее проводили регистрацию вольтамперных кривых в соответствии с параметрами, указанными выше. Затем проводили модификацию солями АДТ путем выдерживания в водном растворе АДТ концентрацией 10 мг/дм³ при комнатной температуре в течение 5 – 7 с. Затем модифицированный электрод промывали дистиллированной водой. Приготовленный таким образом электрод использовали для определения мeldonия и карнитина методом добавок.

2.4 Хемометрическая обработка данных при оценке энантиомерного состава лекарственного вещества

Для увеличения степени дифференциации между получаемыми аналитическими сигналами и шумовыми применялись методы хемометрической обработки данных, такие как метод главных компонент, предназначенный для выделения полезной информации из достаточно большого массива данных путем методов сжатия данных. Для этого вводятся новые скрытые переменные, число которых существенно меньше, чем в исходном массиве. Использование сжатия представляет возможность более удобной визуализации и, как следствие, упрощает интерпретацию полученных результатов измерения. Краткая методология МГК приведена в [94].

Хемометрическая обработка данных проводилась с использованием программы MathCAD 15. Для разработки методики определения соотношения энантиомерных форм в каждой партии оптически активного вещества использовали дифференциальные вольтамперограммы, полученные на приборе PalmSens. Были сняты вольтамперные характеристики рабочих растворов, содержащих 2 компоненты (лево- и правовращающие формы галодифа) в

пропорциях 0, 20, 40, 60, 80, 100 процентов относительно друг друга. Для оценки воспроизводимости вольтамперных характеристик для каждой смеси были проведены повторные измерения не менее 7 раз. Таким образом, был сформирован массив данных измерения по каждой смеси растворов, который был хемометрически обработан.

2.5 Статистическая обработка данных

Для внедрения методики в дальнейшую практику, необходимо произвести процедуру валидации, с установлением приписанных характеристик. Для этого необходимо проведение статистической обработки данных для определения характеристик систематической и случайной погрешностей. Оценка качества разработанной методики определения позволяет определить ее адекватность. Статистическая обработка данных осуществлялась с использованием программы MS Office Excel на основании ряда нормативных документов.

Используя ряд нормативных документов [95-101] в работе рассчитаны следующие показатели качества методики анализа:

- среднеквадратичное отклонение (СКО);
- правильность;
- внутрिलाбораторная прецизионность;
- предел обнаружения;
- предел определения;
- систематическая и случайная погрешности.

ГЛАВА 3 НЕКОТОРЫЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПРОЦЕССОВ ОКИСЛЕНИЯ-
ВОССТАНОВЛЕНИЯ И ВЫБОР УСЛОВИЙ
ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИЗУЧАЕМЫХ ВЕЩЕСТВ

*3.1 Изучение вольтамперометрического поведения галонала и других
бензоилпроизводных барбитуровой кислоты на углеродсодержащих
электродах*

Первостепенно необходимо осуществить выбор электрохимической системы, позволяющей с аналитической достоверностью определять исследуемое вещество в пробах, при этом процесс, осуществляемый на поверхности рабочего электрода по возможности должен быть обратимым.

Рассмотрены двух- и трехэлектродные системы, в качестве рабочих электродов предлагались: торцевой графитовый и игольчатый стеклоуглеродный электроды. В качестве вспомогательного и электрода сравнения использовали 1М хлоридсеребрянные электроды. Преимуществами углеродсодержащих электродов являются: химическая устойчивость, нетоксичность, простота механического обновления поверхности. Электроды из стеклоуглерода обеспечивают наиболее широкий интервал потенциалов, доступный для изучения электрохимических процессов. На всех предложенных электродах был зафиксирован аналитический сигнал галонала. На рисунке 10 представлена градуировочная зависимость аналитического сигнала галонала от концентрации, полученные на разных типах электродов.

Как видно из рисунка, наибольшую величину аналитического сигнала и лучшую воспроизводимость сигналов наблюдали на стеклоуглеродном электроде, который и был выбран в качестве рабочего. При использовании вспомогательного (хлоридсеребряного) электрода значительного увеличения аналитического сигнала не наблюдали, поэтому далее в качестве основной рабочей системы использовали двухэлектродную ячейку.

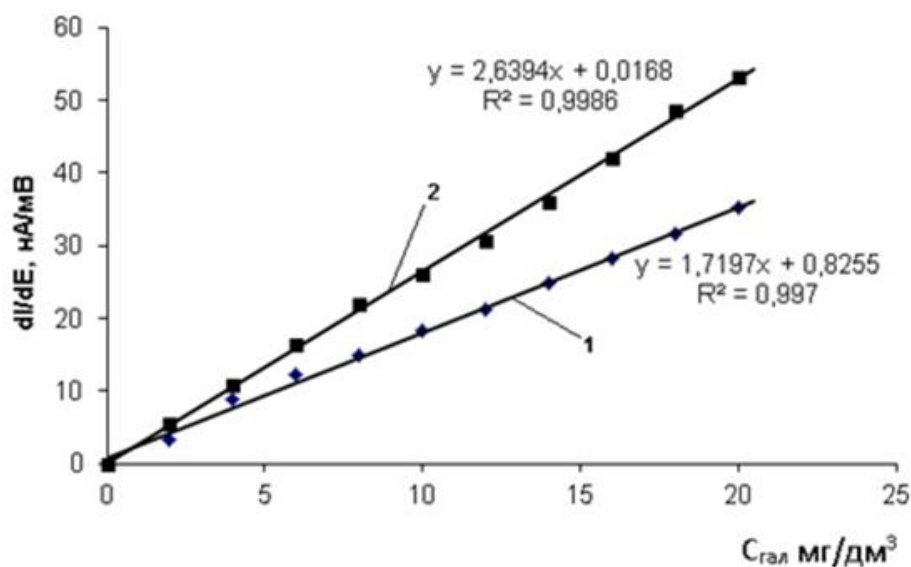


Рисунок 9 - Градуировочная зависимость галонала на различных типах электродов: 1 – ГЭ; 2 – СУЭ. Фон – 0,1М Na_2HPO_4 ; $E_{\text{нак}} = -0,8\text{В}$; $t_{\text{нак}} = 30\text{ с}$; $W = 50\text{ мВ/с}$

Учитывая органическую природу исследуемого соединения, немаловажным параметром, влияющим на электрохимический процесс, является значение рН фонового электролита. Изучение зависимости потенциалов пика галонала от кислотности фонового электролита проводили с использованием буферного раствора Бриттона-Робинсона в широком диапазоне рН от 4,0 до 12,0. Результаты представлены на рисунке 11.

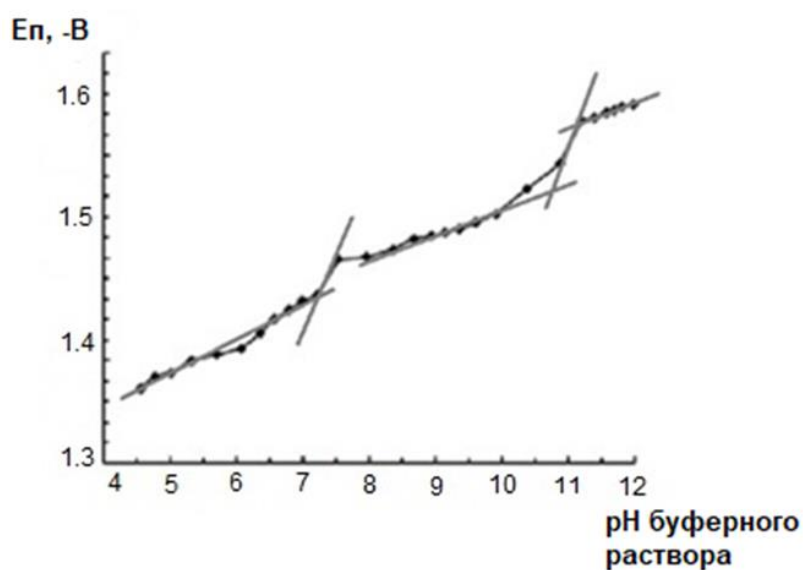


Рисунок 10 - Зависимость потенциала пика галонала от кислотности фонового электролита. Фон – буферные растворы Бриттона-Робинсона с диапазоном рН от 4,0 до 12,0

Установлено, что с увеличением pH более 8,0, потенциалы пиков электровосстановления смещаются в более катодную область потенциалов, то есть процесс восстановления исследуемых органических веществ затрудняется, что, по-видимому, связано с предшествующей протолитической реакцией депротонизации их молекулярных форм. Депротонизация может предшествовать стадии присоединения электрона от молекулы деполяризатора к электроду или протекать одновременно с ней. Кроме того, при pH больше 12,0 аналитические сигналы уменьшаются, а ширины их полупиков увеличиваются, что снижает разрешающую способность метода. В кислой среде при pH меньше 4,0 пик восстановления не регистрируется. Значения pH 5,0÷8,0 являются приемлемыми для количественного химического определения галонала.

Рассчитаны эффективные значения констант диссоциации (pKa) различных форм галонала и соответственно составляют 7,5 и 11,2. При этом отмечено, что полученные нами данные согласуются с литературными источниками [103].

Тангенс угла наклона изучаемой зависимости составляет 0,0589, следовательно, в электродном процессе участвует один протон. На представленной кривой наблюдается 3 плато, что свидетельствует о существовании бензоилпроизводных барбитуратов в виде двух форм. При значениях $\text{pH} > 11,2$ происходит гидролиз молекулы с образованием о-фторбензойной кислоты и диенольной формы 5-этил-5-фенилбарбитуровой кислоты, при этом наблюдается третье плато (рисунок 12).

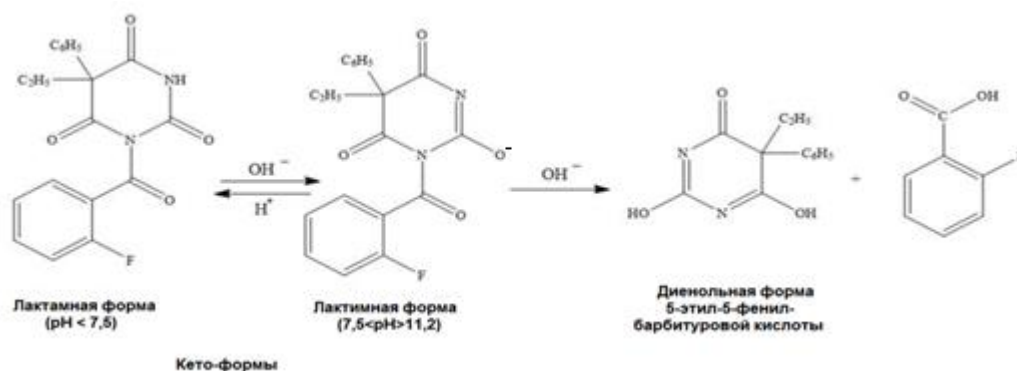


Рисунок 11 - Таутомерные формы бензоилбарбитуратов в зависимости от pH фонового электролита

После этого осуществляли выбор фонового электролита с учетом выбранного диапазона pH. Данные представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Потенциалы пиков (E) галонала и его стандартное отклонение (Sr) на разных фоновых электролитах. Рабочий электрод – СУЭ, $W = 50$ мВ/сек

Фоновый электролит	E, В	Sr
0,1M NaH_2PO_4	$-1,18 \pm 0,03\text{В}$	0,051
0,1M Na_2HPO_4	$-1,43 \pm 0,04\text{В}$	0,027
0,1M Na_2SO_3	$-1,38 \pm 0,04\text{В}$	0,013

В качестве фоновых электролитов предложены 0,1M Na_2SO_3 (подкисленный серной кислотой до pH 6,0) или 0,1M NaH_2PO_4 , значение pH которых соответствует выбранным ранее условиям, и на которых регистрируются четко выраженные пики электровосстановления галонала с хорошей воспроизводимостью ($Sr \leq 0,05$).

Для регистрации аналитического сигнала выбрана скорость развертки поляризующего напряжения 50 мВ/с. При увеличении скорости развертки потенциала увеличивается наклон остаточного тока, как и аналитический сигнал галонала, отношение ток пика/помеха уменьшается, что приводит к снижению чувствительности в полтора-два раза. Таким образом, вольтамперограмма галонала, полученная при выбранных условиях на СУЭ, представлена на рисунке 13.

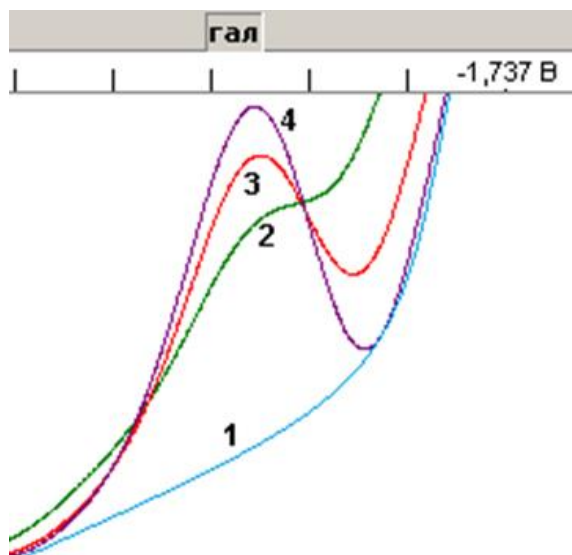


Рисунок 12 - Вольтамперограмма галонала на СУЭ:

$E_{\text{нак}} = -0,8\text{В}$; $t_{\text{нак}} = 30$ с; $W = 50$ мВ/с.

1 – фоновый электролит 0,1M Na_2SO_3 , подкисленного H_2SO_4 до pH 6,5;

2 – $C_{\text{гал}} 1,0$ мг/дм³

3 – $C_{\text{гал}} 6,0$ мг/дм³

4 – $C_{\text{гал}} 8,0$ мг/дм³

Изучение кинетики восстановления галонала на стеклоуглеродном электроде, а именно, зависимости аналитического сигнала от потенциала и времени накопления, позволили оценить характер электродных процессов. Эти критерии напрямую влияют на полноту протекания электрохимического процесса, проходящего в первой фазе инверсионной вольтамперометрии. Изучаемые зависимости представлены на рисунках 14,15. Установлено, что максимальное значение величин аналитических сигналов получены при потенциале накопления $-0,8\text{В}$. О роли адсорбционных процессов свидетельствует и характер зависимости величины токов электровосстановления от времени накопления веществ на поверхности электрода. При времени накопления более 35 секунд, аналитический сигнал снижается, что свидетельствует об адсорбционном характере аналитического сигнала. Потенциал накопления не оказывает существенного влияния на получаемый аналитический сигнал, что также свидетельствует об адсорбционном характере аналитического сигнала.

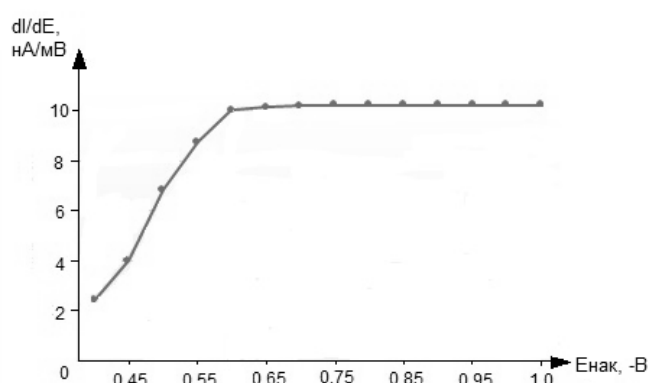


Рисунок 13 - Зависимость аналитического сигнала от потенциала накопления

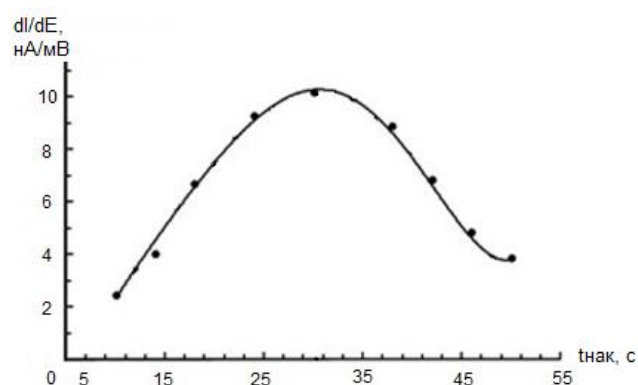


Рисунок 14 - Зависимость аналитического сигнала от времени накопления

На наличие адсорбционной составляющей также указывает линейная зависимость тока пика галонала от скорости развертки поляризующего напряжения [103];

Нами проведена оценка вклада физической адсорбции в электрохимический процесс. Для этого получена и проанализирована зависимость высоты

аналитического сигнала от времени выдержки без наложения и с наложением потенциала в фоновом электролите с добавкой определяемого вещества в дифференциально-импульсном режиме при определенных ранее условиях.

Как видно из рисунка 16, кривая 2 повторяет характер кривой 1 с наложением потенциала, что говорит о существенном вкладе физической адсорбции и составляет порядка 70%. При времени экспозиции от 30 до 40 с идет резкое увеличение высоты получаемых аналитических сигналов, в последующем увеличении времени выдержки электрода в растворе определяемого вещества не влияет на высоту аналитического сигнала.

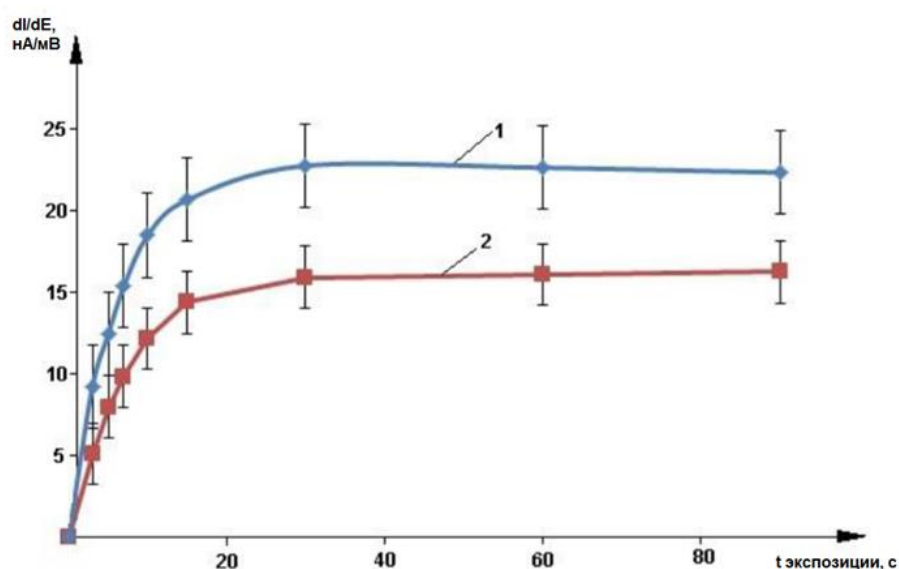


Рисунок 15 - Оценка вклада физической адсорбции в электрохимический процесс, 1- с наложением потенциала; 2 – без наложения потенциала

Адсорбция органических веществ на электроде может приводить к повышению энергии активации электродного процесса и смещению процесса в сторону необратимости [104].

Для понимания типа электродного процесса (обратимый или необратимый) была определены следующие критерии обратимости:

1. Расстояние между катодным и анодным пиками на циклической вольтамперограмме равно $0,058/z$.

Для проверки данного критерия была получена циклическая вольтамперограмма галонала, представленная на рисунке 17.

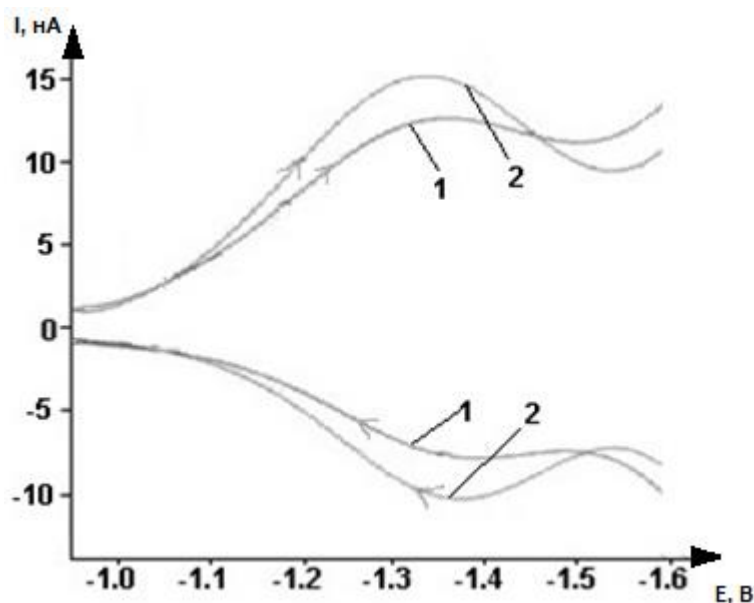


Рисунок 16 - Циклическая вольтамперограмма галонала, полученная на СУЭ, фоновый электролит - 0,1М Na₂SO₃, W = 50 мВ/с

На катодной и анодной вольтамперограммах наблюдали выраженные аналитические сигналы, а соотношение между высотами полученных сигналов составляет 2/1, при этом разница между максимумами составляет 0,060 В, что удовлетворяет данному критерию и свидетельствует о переходе 1 электрона в результате электрохимического процесса.

2. Расчет эффективного коэффициента переноса.

По зависимости потенциала катодного пика от логарифма изменения скорости поляризующего напряжения по формуле

$$\alpha' = \frac{2.3 \times RT}{2F \times \text{tg}\theta} \quad (1), \text{ где}$$

где θ – угол наклона прямой $E = f(\log W)$, определен эффективный коэффициент переноса катодного процесса – 0.018.

Для расчета значения коэффициента диффузии использовали уравнение Шевчика:

$$I_p = 2.69 \times 10^5 \times n^{\frac{3}{2}} A^{\frac{1}{2}} D^{\frac{1}{2}} \nu^{\frac{1}{2}} C \quad (2), \text{ где}$$

C – концентрация деполяризатора (моль/см³), ν – скорость развертки (мВ/с), A – площадь рабочей поверхности электрода (см²), n – число электронов,

участвующих в электрохимическом процессе, значение коэффициента составило $D = 0.82 \times 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$.

3.1.1 Зависимость аналитического сигнала производных бензоилбарбитуровой кислоты от вида и положения галоген-заместителя

Далее нами проведены исследования о возможности определения близких по структуре к галоналу веществ. Нами было изучено влияния вида и положения галогена в структуре производных бензоилбарбитуратов на потенциал пика. Исследование влияния природы галоген-заместителя необходимо для определения возможного механизма реакции и возможности определения нескольких галогенпроизводных в одной пробе. Рассмотрены следующие виды производных барбитуровой кислоты: фтор-, хлор-, бром-, йодзамещенные производные в различных положениях орто-, мета-, пара-. Также были рассмотрены димеризованные формы галонала (дигалонал) и дибензонал, их структуры представлены на рисунке 18.

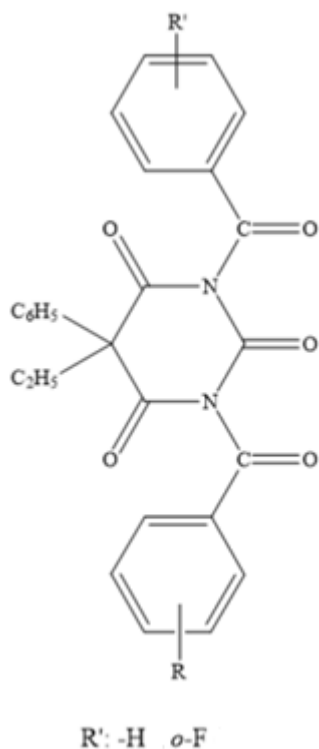


Рисунок 17 - Структурная формула димеризованных форм бензонала

Доказано, что при введении второго бензольного кольца в структуру молекулы, происходит смещение потенциала пика определения в катодную область (E бензонала: -1.34 В, E дибензонала: -1.38 В).

В ряду галоген-радикалов при увеличении электроотрицательности от $I\cdot$ к $F\cdot$, потенциал пика производных смещается в катодную область, что свидетельствует об облегчении процесса восстановления, и согласуется с литературными данными [105]. Положение галогена в бензольном остатке молекулы так же влияет на получаемый потенциал пика. Орто- и пара - положения усиливают восстановительные свойства молекулы, а присутствие галогена в мета - положении – ослабляет, что связано с более выгодным положением связи в пространстве для электронной «атаки». Отмечено, что при данных условиях аналитический сигнал фенобарбитала отсутствует, что связано с его химическим строением (структурная формула фенобарбитала представлена на рисунке 19), т.к. отсутствует заместитель у атома азота в 1 положении).

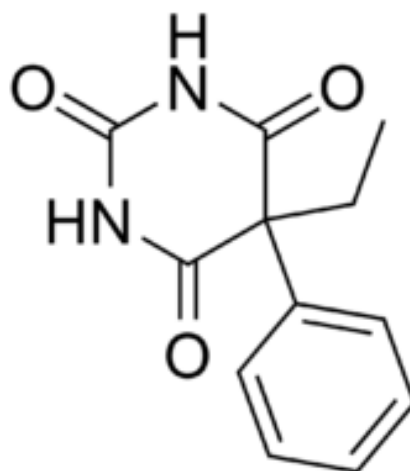


Рисунок 18 - Структурная формула фенобарбитала
5-Этил-5-фенил-2,4,6(1Н,3Н,5Н)-пиримидинтрион

Для лучшего понимания механизма электровосстановления бензоилбарбитуратов и объяснения обнаруженных закономерностей влияния их структур на параметры аналитических сигналов необходимо определить энергии низших вакантных молекулярных орбиталей (НВМО LUMO), принимающих электрон в стадии электровосстановления.

С этой целью проведены DFT квантово-химические расчеты методом B3LYP в базисе 6-311+G галогенпроизводных бензоилбарбитуровой кислоты, димеризованных форм и фенobarбитала. Полученные значения энергий НВМО и потенциалов электровосстановления приведены в таблице 4.

Таблица 4 - Значение потенциалов пика исследованных производных барбитуровой кислоты и рассчитанные значения энергии LUMO

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

Как следует из приведенных расчетов, 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 характеристики аналитического сигнала исследуемых производных фенобарбитала. Полученные данные показывают, что нижняя граница энергий LUMO для получения аналитического сигнала в используемых вольтамперометрических условиях лежит между -0.2041 и -0.20682 а.е. В ряду монобензоилбарбитуратов наблюдается закономерная тенденция повышения потенциала электровосстановления $E_{\text{пика}}$ с повышением энергии LUMO и удовлетворительной линейной корреляцией ($r=0.930$) между этими величинами, корреляция представлена на рисунке 20. Исключениями, выпадающими из данной корреляции, являются бензонал, его *м*-фторпроизводное и дибензонал.

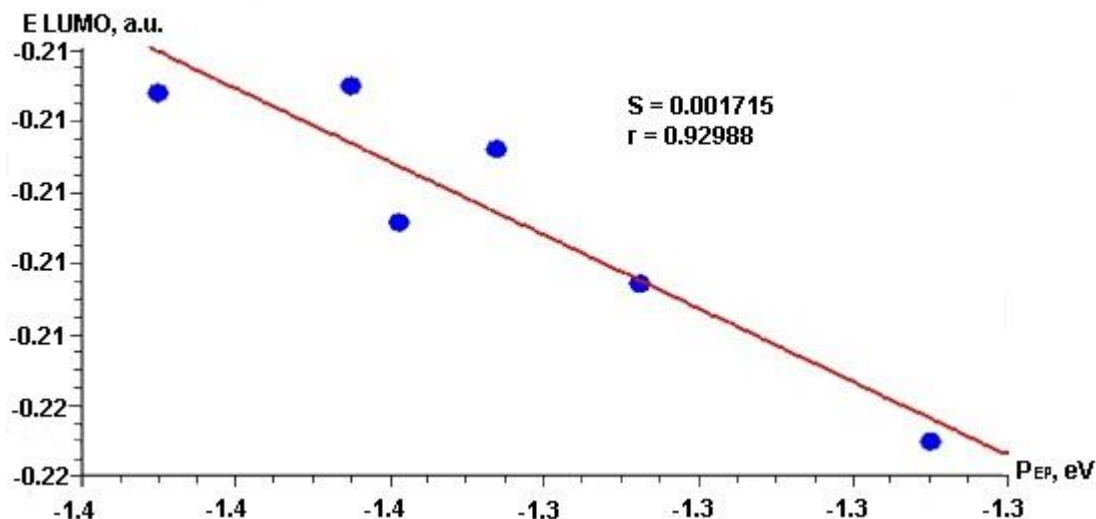


Рисунок 19 - Зависимость энергии LUMO от потенциала определения

При поиске возможных продуктов восстановления проведены анализы смывов с поверхности электрода после электронакопления и содержимого электрохимической ячейки методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Хроматограммы представлены на рисунке 21.

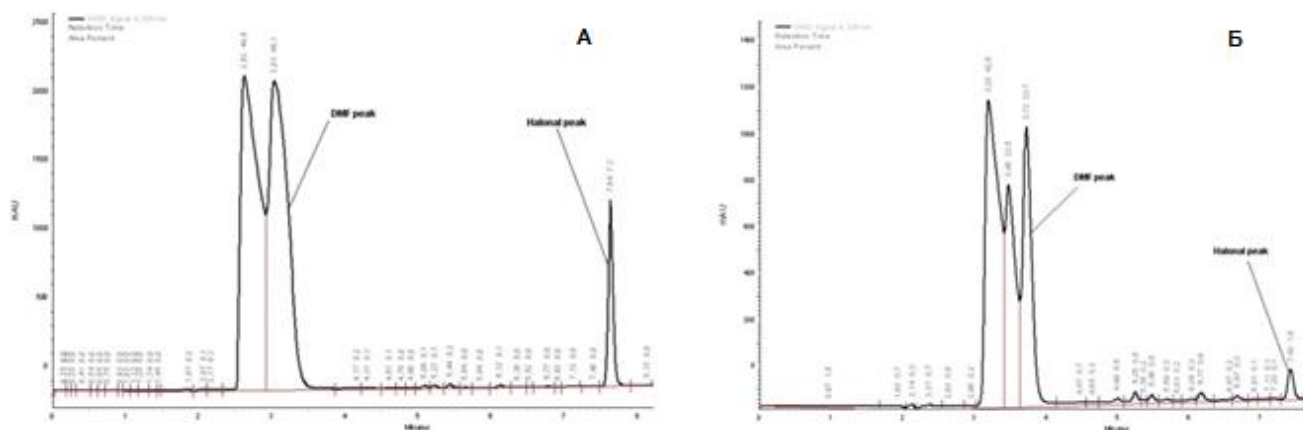


Рисунок 20 - ВЭЖХ смыва с поверхности электрода после электронакопления (а) и содержимого электрохимической ячейки (б). Условия ВЭЖ: НФ - колонка Zorbax Extend C18; ПФ – ацетонитрил:вода (в режиме градиентного элюирования). Детекция УФ-спектрометрия при длине волны 230 нм.

Установлено, что единственным веществом, обнаруженным в образцах, является галонал. Таким образом, возможный механизм реакции восстановления представлен на рисунке 22.

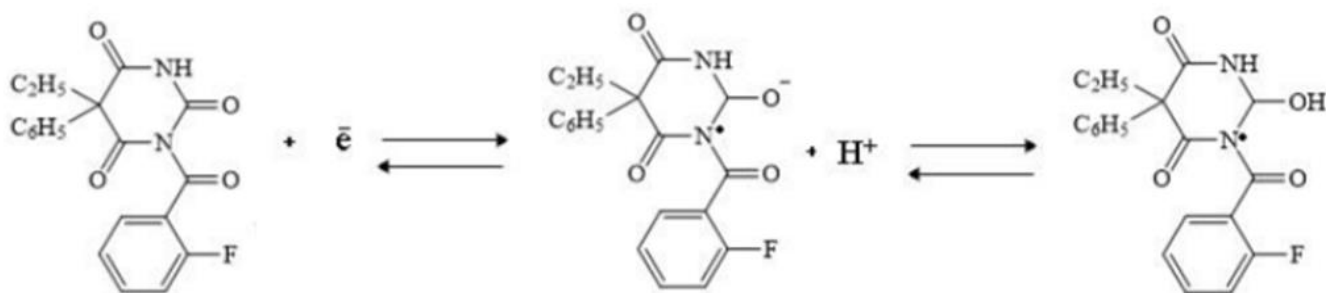


Рисунок 21 - Возможный механизм реакции восстановления галонала на поверхности СУЭ, фоновый электролит - 0,1M Na₂SO₃, E_{нак} - -0,8В, t_{нак} – 30 с

3.1.2 Применение АДТ для модификации поверхности электрода для вольтамперометрического определения галонала

Далее была оценена возможность использования солей АДТ для расширения линейного диапазона определяемых концентраций, увеличения чувствительности. На практике это позволит уменьшить объем пробы, необходимой для анализа, что приведет к значительному сокращению времени, затраченного на анализ одной пробы, что позволит использовать методику вольтамперометрического определения для потоковых исследований с микрообъемами, для целей фармакологического и фармакокинетического контроля.

Для исследования оценки влияния модификатора на аналитический сигнала использовали следующие виды модификаторов: с карбоксильным, нитро- и амино-заместителями в бензольном кольце арендиазония. Полученные градуировочные зависимости определяемого вещества на различных типах модификаторов и без него позволяет определить вид заместителя в соли диазония, применение которого обеспечивает достаточную чувствительность определения. Как видно из рисунка 23, электрод, модифицированный арендиазоний тозилатом с карбоксильным заместителем удовлетворяет всем требованиям (линеен в

данном диапазоне определяемых концентраций, тангенс угла наклона меньше, что свидетельствует об увеличении чувствительности).

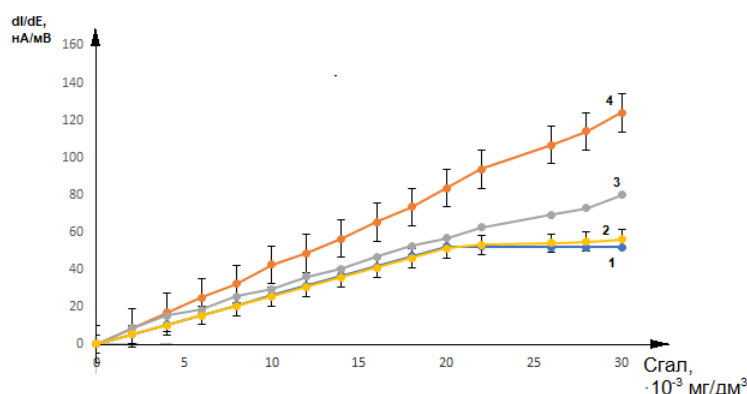


Рисунок 22 - Градуировочные зависимости галонала на различных типах модифицированных АДТ стеклоуглеродных электродах: 1 – СУЭ без модификации, 2 – СУЭ - АДТ с NO_2 -заместителем; 3 – СУЭ - АДТ с NH_2 -заместителем; 4 – СУЭ - АДТ с COOH -заместителем

На рисунке 24 представлены вольтамперограммы галонала, полученные без модификации поверхности (а), и модифицированные раствором арендиазония с карбоксильным радикалом (б). При анализе вольтамперограмм видно, что аналитический сигнал на модифицированном электроде имеет более выраженную форму пика и значительно выше, чем аналитический сигнал на немодифицированном СУЭ, что позволяет нам сделать заключение о целесообразности использования данного типа модифицированных электродов для определения галонала в биологических объектах.

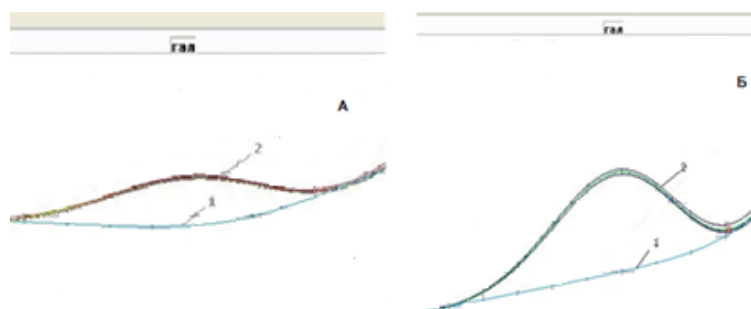


Рисунок 23 - Вольтамперограммы галонала, полученные на немодифицированном СУЭ (а) и на модифицированном $\text{ArN}_2^+\text{Ts}^-$ с COOH -заместителем в бензольном кольце (б). Время накопления – 30 сек, потенциал накопления - $-0,8\text{В}$;

1 – фоновый электролит $0,1\text{М}$ раствор Na_2SO_3 , 2 – $C_{\text{гал}} 1 \text{ мг/дм}^3$

В таблице 5 представлены результаты определения методом «введено-найденно» в сопоставлении немодифицированного и модифицированного АДТ стеклоуглеродного электрода. Анализ модельных растворов с различной концентрацией галонала в растворе с применением модифицированного арендиазоний тозилатом СУЭ, и немодифицированного показал, что наблюдается значительное увеличение чувствительности на 3 порядка.

Таблица 5 - Результаты определения содержания галонала с использованием модифицированного и немодифицированного СУЭ методом «введено-найденно»

Концентрация определяемого вещества в пробе, мг/дм³	СУЭ без модификации	СУЭ, модифицированный АДТ с СООН - заместителем
0,0100	Отсутствует сигнал	0,0099±0,0030
2,00	2,02±0,30	2,00±0,30

Таким образом, использование модифицированного электрода целесообразно при анализе биологических объектов, содержащих следовые количество бензоилбарбитуратов.

3.2 Выбор рабочих условий определения галодифа с использованием золотого графитового электрода и изучение некоторых закономерностей электродного процесса

3.2.1 Некоторые особенности вольтамперометрического поведения галодифа и выбор рабочих условий

Циклические вольтамперограммы, полученные на графитовом электроде при различных значениях рН фонового электролита (использовался буферный раствор Бриттона-Робинсона) показали, что галодиф не обладает собственной

окислительно-восстановительной активностью, поэтому дальнейшей стратегией определена необходимость выбора модификатора. На основании литературных данных известно, что производные мочевины могут образовывать комплексные соединения с ионами металлов [106]. В качестве модификатора применили раствор золота, модифицирование проводилось методом «in situ». Зависимость аналитического сигнала от концентрации иона-модификатора представлена на рисунке 25.

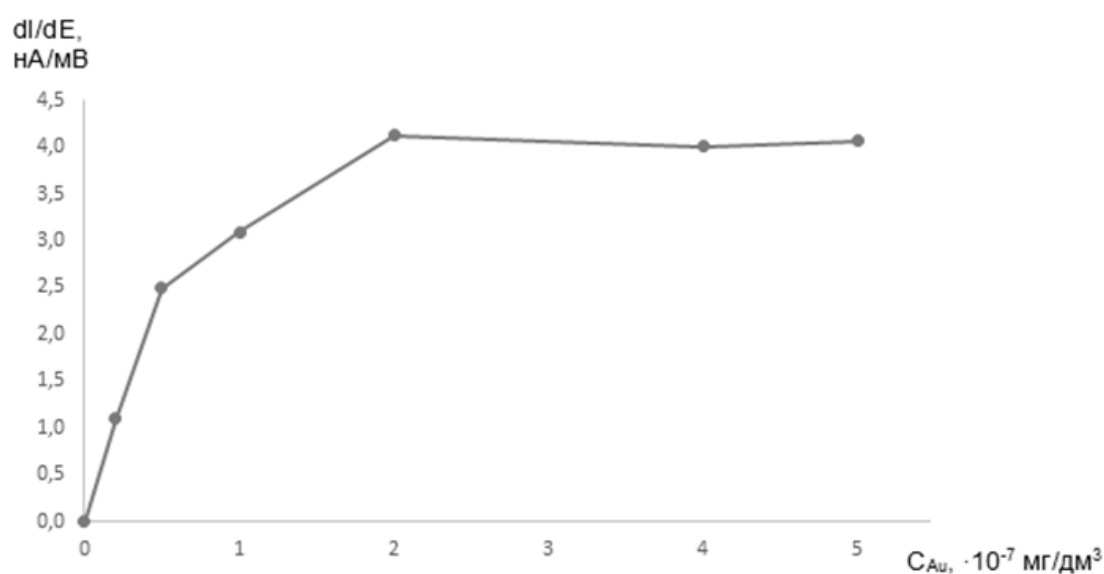


Рисунок 24 - Зависимость аналитического сигнала галодифа от содержания золота

Далее осуществлен выбор условий вольтамперометрического определения, а именно потенциал и время накопления. Установлено, что максимальное значение величин аналитических сигналов получены при потенциале накопления -1,1В. Отмечено, что при времени накопления более 45 сек (рисунок 26), аналитический сигнал снижается, что свидетельствует об адсорбционном характере аналитического сигнала.

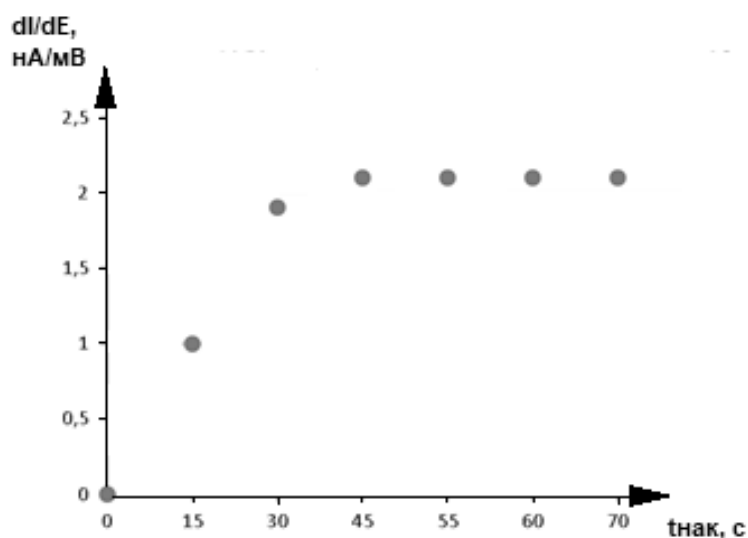


Рисунок 25 -
Зависимость
аналитического
сигнала галодифа от
времени накопления,
фон – боратный буфер
с рН 9,18

Вольтамперограмма галодифа, полученная при выбранных рабочих условиях, и градуировочная зависимость представлена на рисунке 27.

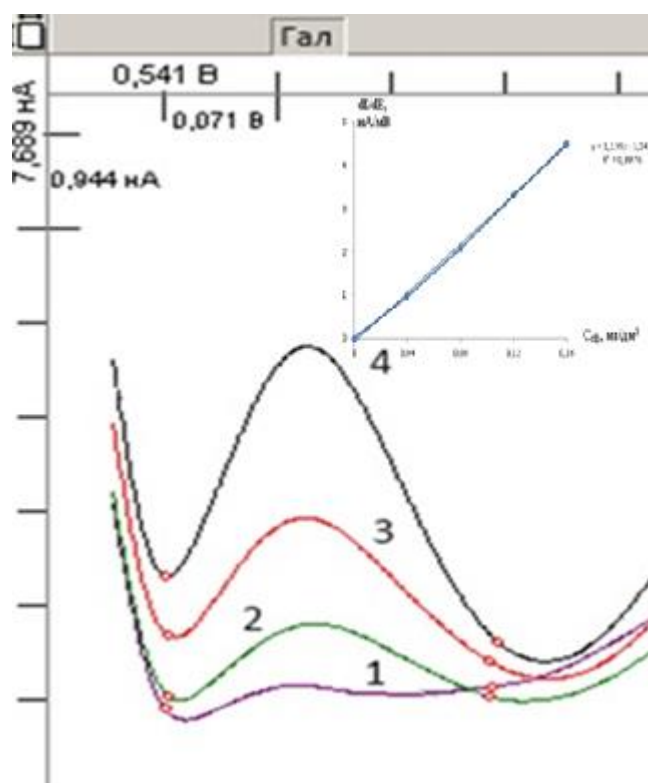


Рисунок 26 - Вольтамперограмма галодифа, при выбранных рабочих условиях:
 $E_{\text{нак}} = -1,1\text{В}$; $T_{\text{нак}} = 15\text{ с}$; $W = 35\text{ мВ/с}$. 1 – фон боратный буфер с рН 9,18; 2 – $C_{\text{гф}}$ 0,02 мг/дм³; 3 – $C_{\text{гф}}$ 0,04 мг/дм³; 4- $C_{\text{гф}}$ 0,08 мг/дм³

Отмечено, что линейный диапазон определяемых концентраций находится в пределах 2 порядков.

При изучении физико-химических закономерностей, установлено, что кривая зависимости тока пика от квадратного корня скорости развертки поляризующего напряжения линейна, что свидетельствует о необратимости протекаемого процесса. Изучая зависимости, представленные на слайде, ввиду линейности $I_{p.a.}-W$ и значению углового коэффициента по критерию Семерано $\geq 0,5$, можно сделать вывод об осложнении электрохимического процесса явлением адсорбции. Таким образом, электрохимический механизм является необратимым и носит адсорбционный характер. Зависимости аналитического сигнала галодифа от выбранных параметров представлены на рисунках 28-30.

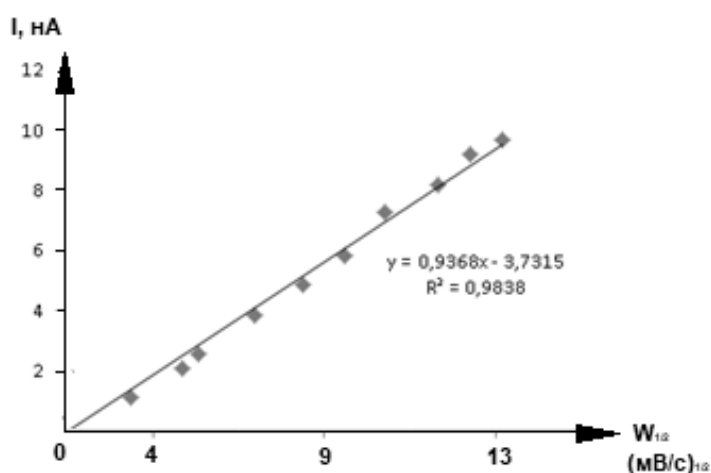


Рисунок 27 - Зависимость тока пика галодифа от квадратного корня скорости развертки поляризующего напряжения на ЗГЭ при pH 9,18

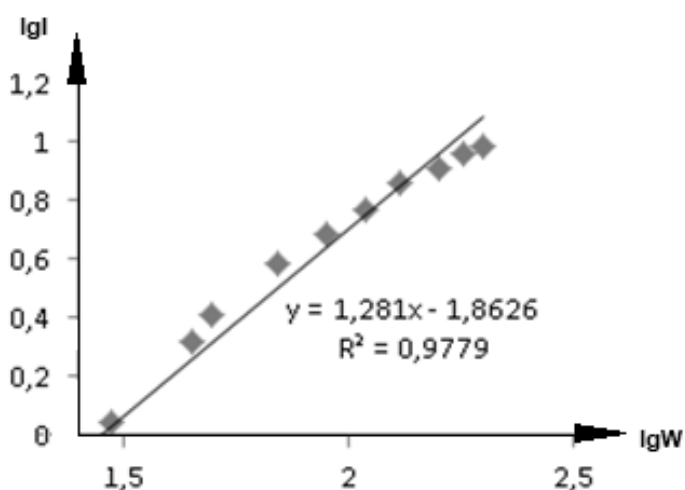


Рисунок 28 - Логарифмическая зависимость тока ЭО галодифа от логарифма скорости развертки поляризующего напряжения (Критерий Семерано)

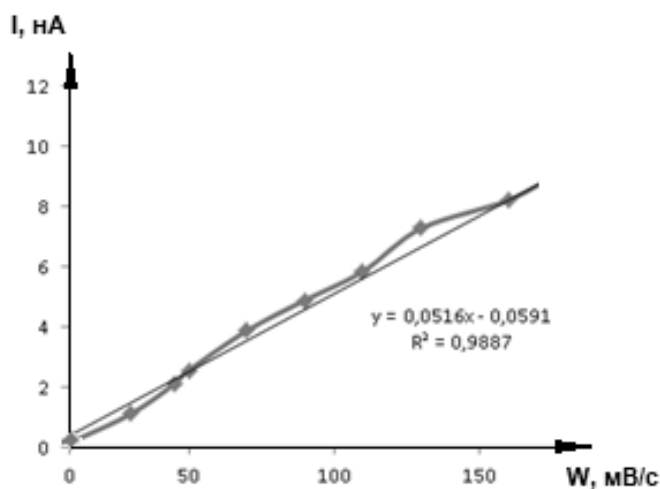


Рисунок 29 - Зависимость тока пика ЭО галодифа от скорости сканирования потенциала

На основании полученных данных определены:

Согласно уравнению Левича (3), тангенс угла наклона прямой равен:

$$\frac{dI_{na}}{d\sqrt{\omega}} = 0.62 * zFD^{2/3} \nu^{-1/6} * S * c_0 = 0.3 * 10^{-4} \quad (3)$$

Откуда коэффициент диффузии равен:

$$D = \left(\frac{tg\theta * (0.01)^{1/6}}{0.62 * zFS * c_0} \right)^{3/2} = \frac{0.3 * 10^{-7} * 0.463}{0.62 * 1 * 96500 * 0.3 * 1.5 * 10^{-6}} = 5.2 * 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}.$$

3.2.2 Распознавание энантиомерных форм галодифа с использованием хемометрической обработки данных

Как было отмечено в главе 1, определение содержания энантиомерных форм является важной аналитической задачей, позволяющей обеспечить стабильность качества каждой партии синтезированного лекарственного вещества.

Как было указано выше, основными методами определения энантиоселективности органических веществ являются: хироптические методы, т.е. определения угла удельного вращения, методы ЯМР и хроматографические методы. В работе [63] для детектирования энантиомеров галодифа использовали

метод хиральной хроматографии с использованием колонки Ultron ES-OVM-C. Хроматограмма, при определенных условиях представлена на рисунке 31.

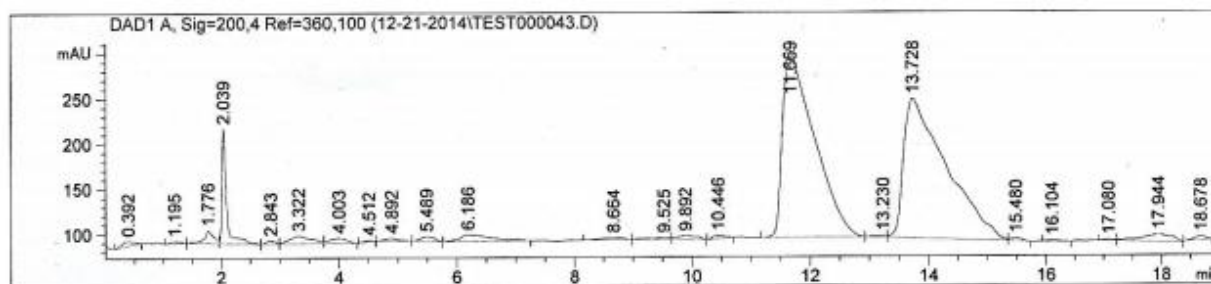


Рисунок 30 - ВЭЖХ рацемического Галодифа на хиральной колонке Ultron ES-OVM-C. Условия хроматографирования: подвижная фаза – MeCN: фосфатный буфер (0,02 М, pH = 4,4) в соотношении 1:9; скорость потока 1 мл/мин; температура колонки 30 °С; объём и концентрация пробы 10 мкл 40%- ного раствора БГМ; УФ-детектирование при длине волны 200 нм.

Нами поставлена задача определения соотношения энантиомерных форм в образце с использованием методов вольтамперометрии. На рисунке 32 представлены вольтамперограммы левовращающей (А) и правовращающей (Б) форм галодифа. Как видно при параллельном анализе двух вольтамперограмм, наблюдается незначительное смещение потенциалов пика, при этом процесс электроокисления правовращающей формы протекает легче, ввиду меньшего значения потенциала максимума.

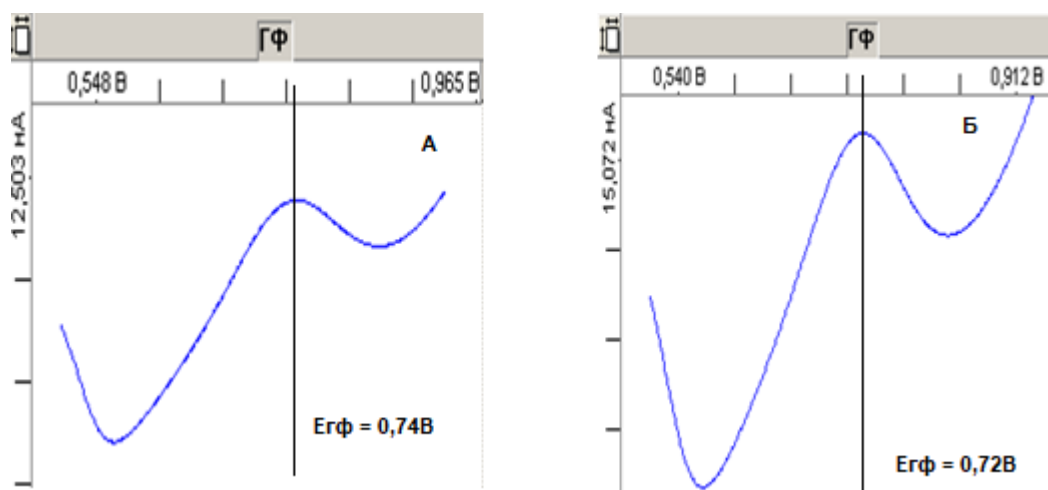


Рисунок 31 - Параллельные опыты регистрации вольтамперограмм энантиомеров галодифа на ЗГЭ на фоне боратного буфера с pH 9,18. А – левовращающая форма, Б – правовращающая форма.

Разность между потенциалами пиков составляет около 20 - 30 мВ, что не позволяет однозначно дифференцировать сигналы энантиомеров. Поэтому нами проведена хемометрическая результатов эксперимента с использованием программы MathCAD.

Первоначально были получены данные о потенциалах максимумов пика смесей энантиомеров при различном содержании правовращающей формы 0,20,40, 60,80, 100%. Полученные результаты представлены на рисунке 33.

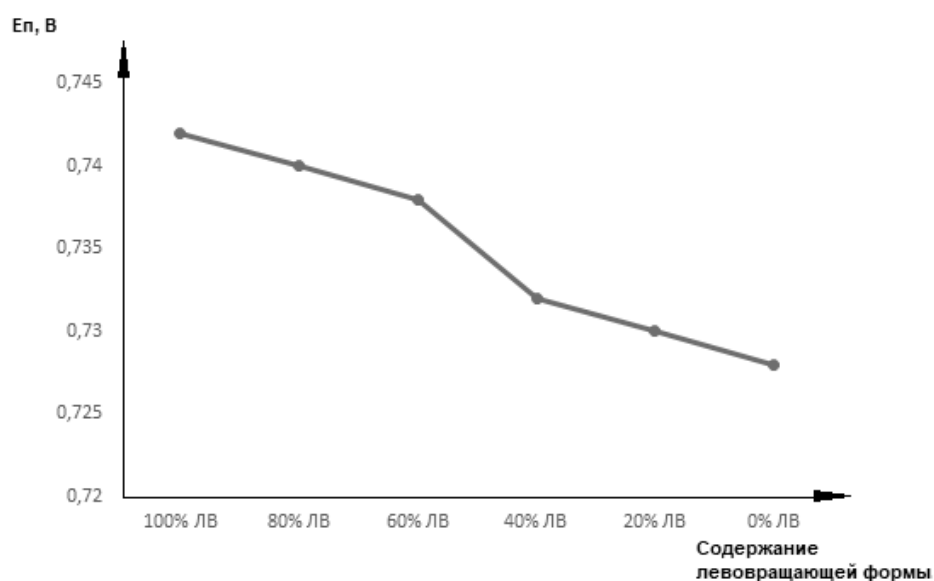


Рисунок 32 - Зависимость потенциалов максимума пика от состава энантиомерной смеси

Как видно из графика, при увеличении содержания правовращающей формы в смеси наблюдается смещение потенциала максимума в анодную область, закономерность линейного характера, и следовательно, данный параметр можно использовать для оценки состава энантиомерной смеси.

С целью выбора метода анализа были рассчитаны средние значения вольтамперных характеристик mc каждого состава по формуле:

$$mc_v = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n c_v^{(i)} \quad (4),$$

Где c_v – массив повторных измерений ВАХ при каждом значении потенциала v ; i – индекс повторных измерений; n – число измерений (в нашем случае 7).

Были рассчитаны также среднеквадратичные отклонения по формуле:

$$dc_v = \sqrt{\frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (mc_v - c_v^{(i)})^2} \quad (5)$$

На рисунке 34а приведены средние значения вольтамперных характеристик и среднеквадратичные отклонения полученных аналитических сигналов раствора левовращающей формы, а 34б – аналитические сигналы, полученные при вольтамперометрическом детектировании проб раствора правовращающей формы.

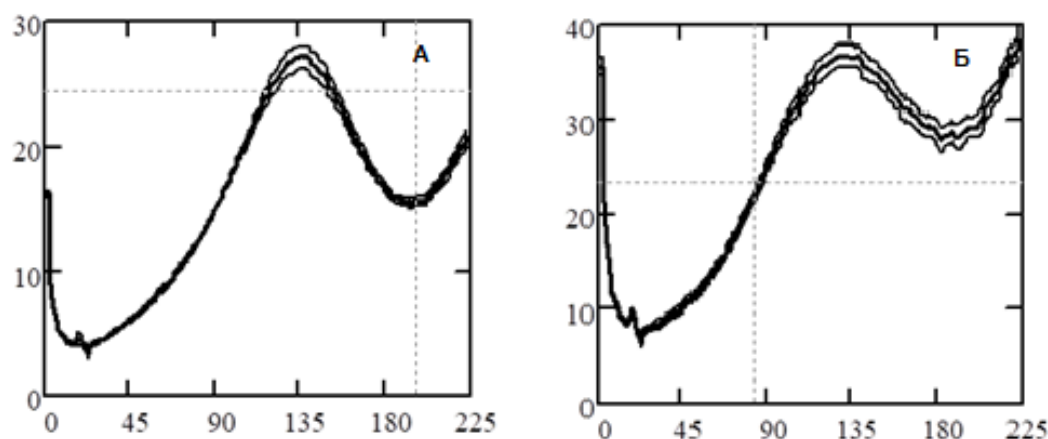


Рисунок 33 - Вольтамперные характеристика средних значений растворов чистых энантиомеров: А – раствор левовращающей формы; Б – раствор правовращающей формы. Сверху и снизу средних значений тонкими линиями показаны среднеквадратичные отклонения в каждой точке реализации

Как видно из графиков, среднеквадратичные отклонения составляют не более 4% от среднего уровня сигнала, что свидетельствует о высокой детерминированности процесса при неизменных условиях эксперимента (качество и тип электродов и др.).

Для оценки изменчивости формы сигналов были рассчитаны матрицы взаимной корреляции фрагментов ВАХ каждого состава растворов с фрагментом того же размера ВАХ заданного состава. Фрагмент ВАХ выбран в диапазоне (50 – 175) мкв, в котором наблюдается наибольшая изменчивость сигнала. 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.

На основании полученных результатов предварительной обработки в основу метода оценки процентного соотношения растворов был положен сравнительный анализа форм кривых вольтамперных характеристик, суть которого состоит в получении эталонных кривых ВАХ и сравнения с ними формы ВАХ раствора с неизвестного процентного соотношения с использованием корреляционного анализа.

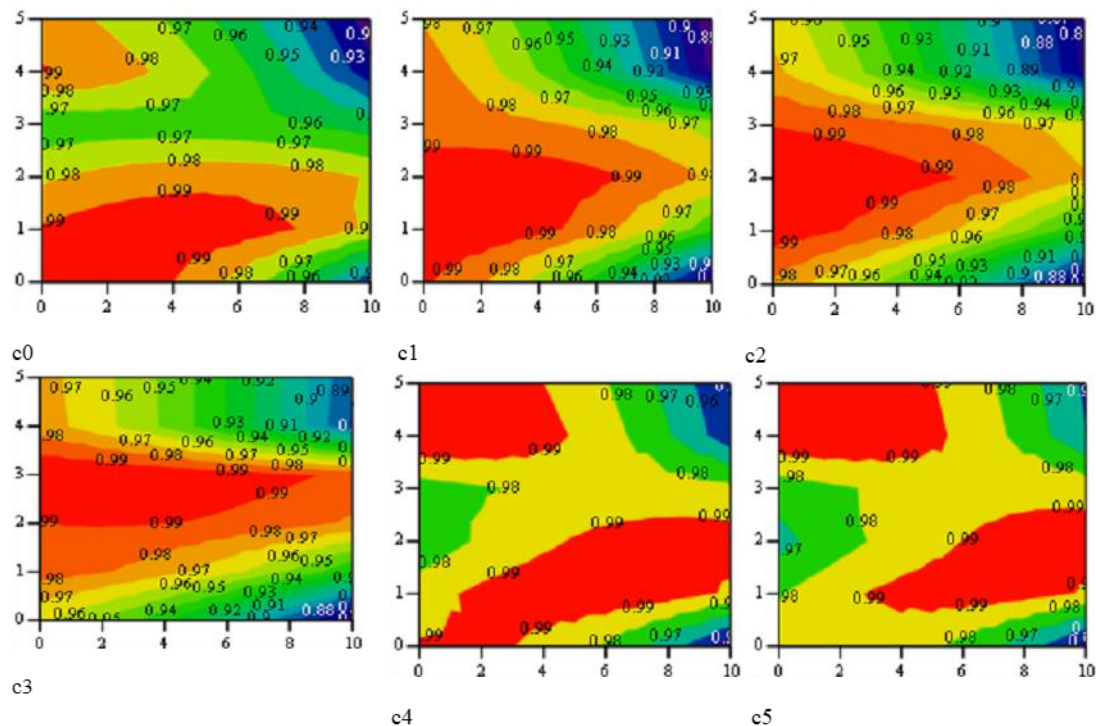


Рисунок 34 - Графики уровней корреляционных матриц при сравнении форм вольтамперных характеристик всех составов с одним из составов

На рисунке 35 приведены графики уровней корреляционных матриц при сравнении форм вольтамперных характеристик всех составов с одним из составов. График c1 – корреляционная матрица ВАХ всех составов с ВАХ состава 100 – 0, c2 -с 80 – 20 и т.д. Из рисунков видно, что имеет место заметная изменчивость форм вольтамперных кривых.

Основным параметром может быть 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 напряжения.

На рисунке 36 показаны средние значения вольтамперных характеристик для растворов, содержащих правовращающую форму в смеси в процентах 0, 20, 40, 60, 80, 100%.

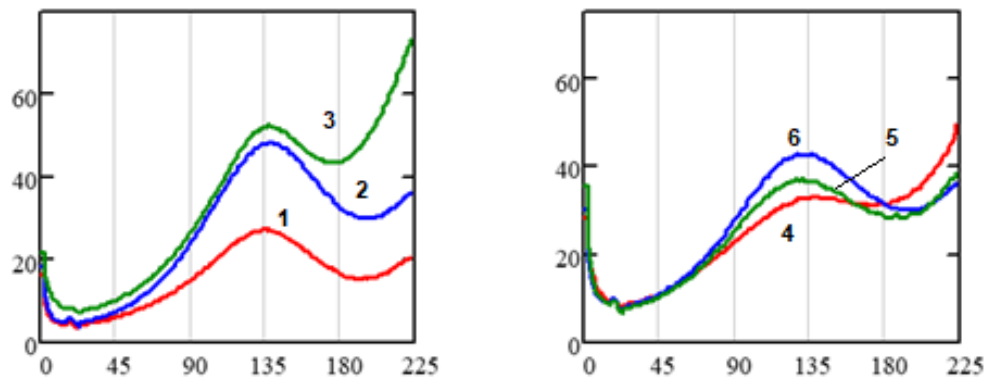


Рисунок 35 - Средние значения вольтамперных характеристик: 1 – раствор левовращающей формы; 2 – раствор смеси ЛВ и ПВ соотношение 80%:20%; 3 – раствор смеси ЛВ и ПВ соотношение 60%:40%; 4 – раствор смеси ЛВ и ПВ соотношение 40%:60%; 5 – раствор правовращающей формы; 6 – раствор смеси ЛВ и ПВ соотношение 20%:80%

Как видно из рисунков все они имеют разные наклоны по отношению к оси абсцисс. Причем для концентраций смесей от 0 до 40% изменение наклона направлено в одну сторону, что можно использовать для оценки концентрации раствора.

Были рассчитаны тангенсы угла наклонов k вольтамперных характеристик для всех концентраций смесей mc по формуле:

$$k_u = \frac{mc^{(u)}_{v1_u} - mc^{(u)}_{v0_u}}{v1_u - v0_u} \quad (6), \text{ где}$$

где u – индекс концентрации смеси ($u=0\dots5$); v – значения потенциалов в милливольтках ($v=0\dots233$); $v1_u$ и $v0_u$ конечные и начальные точки касаний линий наклонов с соответствующими кривыми вольтамперных характеристик;

Для всех средних значений смесей mc были рассчитаны линии наклонов по формуле:

$$line_{v,u} = k_u \cdot (v - v_{0_u}) + mc^{(u)}_{v_{0_u}} \quad (7)$$

На рисунке 37 в качестве примера приведены вольтамперные характеристики раствора левовращающей формы, а также линия наклона.

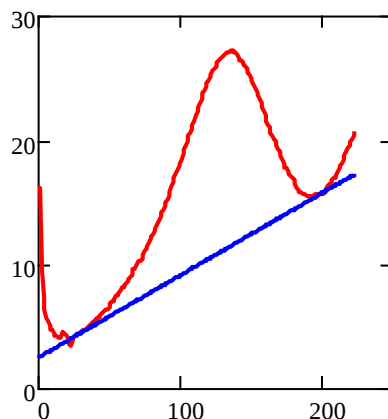


Рисунок 36 - Вольтамперная характеристика раствора левовращающей формы и линия наклона к оси потенциалов

Таким образом, на рисунке 38 приведены линии наклонов для опорных смесей растворов 0, 20, 40, 60, 80, 100%

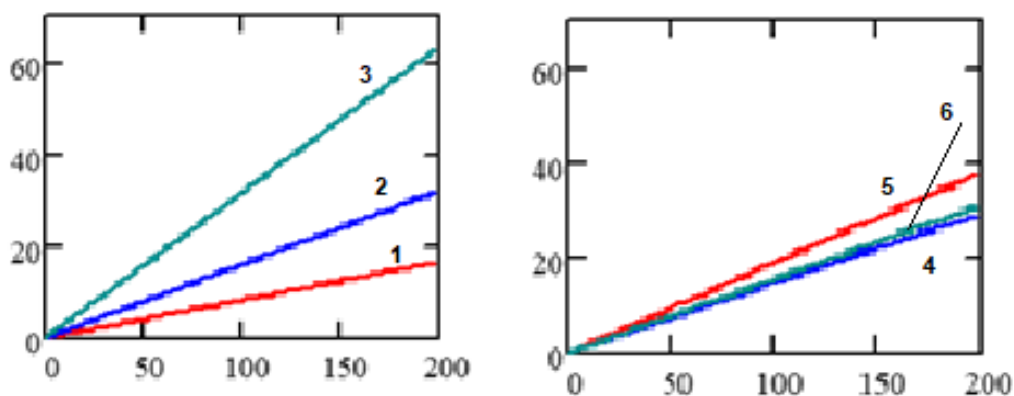


Рисунок 37 – Линии наклонов средних значений ВАХ

Из рисунка 38 следует, что имеет место закономерное возрастание наклонов при увеличении содержания правовращающей формы до 50%.

Физически прямая линия зависимости тока электрической цепи электролита от приложенного напряжения свидетельствует о выполнении закона Ома. В этом случае тангенсы углов наклона прямых является электрическими сопротивлениями системы электрод - электролит.

В таблице 6 приведена зависимость сопротивления составляющей тока, подчиняющейся закону Ома.

Таблица 6 - Зависимость составляющих, сопротивления электрической цепи системы «электроды – электролит» от содержания правовращающей формы.

Содержание правовращающей формы в смеси, %	Сопротивление, Ом
0	66
20	146
40	246
60	148
80	125
100	124

Из таблицы следует, что до уровня 50% зависимость сопротивления от концентрации раствора практически лежит на одной прямой, что позволяет легко рассчитать концентрации растворов неизвестного состава в пределах от 0 до 50%. При таких условиях доля примеси в процентах x при этих условий выражается формулой:

$$x = \frac{40\%}{246 - 66} \cdot R_x \quad (8), \text{ где}$$

где R_x – сопротивление для неизвестной смеси. Для концентраций выше 50 процентов закономерной связи концентраций с коэффициентами наклона не наблюдается. Причем, для концентраций от 0 до 40 процентов диапазон коэффициентов наклона перекрывается коэффициентами наклона при концентрациях выше 50%, что создает неопределенность в оценке концентраций.

Для снятия неопределенности были рассмотрены смещения максимумов кривых вольтамперных характеристик.

На рисунке 39 показаны остаточные кривые ВАХ за вычетом линий наклонов.

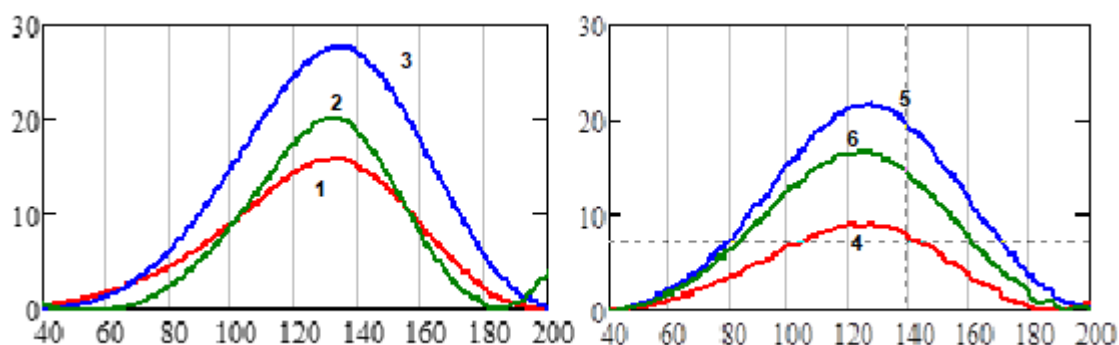


Рисунок 38- кривые ВАХ от содержания правовращающей формы в энантиомерной смеси за вычетом наклонов. 1 - 0% ПВ в смеси; 2 - 20%; 3 - 40%; 4 – 60%; 5 - 80%; 6 - 100%

Из рисунков видно, что при концентрациях смеси выше 50 % максимумы кривых лежат левее максимумов при более низких концентрациях.

В таблице 7 приведены положения максимумов при всех концентрациях смеси.

Таблица 7 - Значение положений максимумов для оценки соотношения энантиомерных форм в образце галодифа

Содержание правовращающей формы, %	Положение максимумов, мВ
0	110
20	108
40	106
60	96
80	101
100	98

Как видно из таблицы положение максимумов обеспечивает снятие неопределенностей в определении концентраций смесей по коэффициентам наклонов кривых вольтамперных характеристик.

При значении коэффициента больше 100 можно проводить количественную оценку соотношений энантиомерных форм ввиду линейной корреляции зависимости, а при значении менее 100 можно сделать заключение о качественном соотношении энантиомеров в смеси, т.е. более 60% правовращающей формы в смесях.

3.3 Выбор условий вольтамперометрического определения мельдония с использованием комбинированных модифицированных электродов

Условия вольтамперометрического определения с использованием золото-графитового электрода были определены ранее – трехэлектродная электрохимическая система: ЗГЭ в качестве индикаторного электрода, хлоридсеребряные электроды (1М KCl) в качестве электрода сравнения и вспомогательного электрода. Одной из задач работы являлась оценка возможности увеличения чувствительности определения с использованием сложных металлоорганических электродах.

В литературном обзоре приведены данные о перспективности использования солей АДТ для увеличения эффективной площади поверхности электрода. Установлен механизм ковалентной пришивки АДТ к металлическим поверхностям, в частности золота. В качестве модификатора применяли соли арендиазония с различными заместителями, которые ковалентно связываются с поверхностью золото-графитового электрода с выделением азота. Механизм ковалентной пришивки продемонстрирован ранее в литературном обзоре.

Изначально осуществляли выбор модификатора, обеспечивающий увеличение получаемого аналитического сигнала. Рассмотрены соли арендиазония с карбоксильным, амино-заместителями и без заместителя. Химические структуры исследованных модификаторов представлены на рисунке 40.

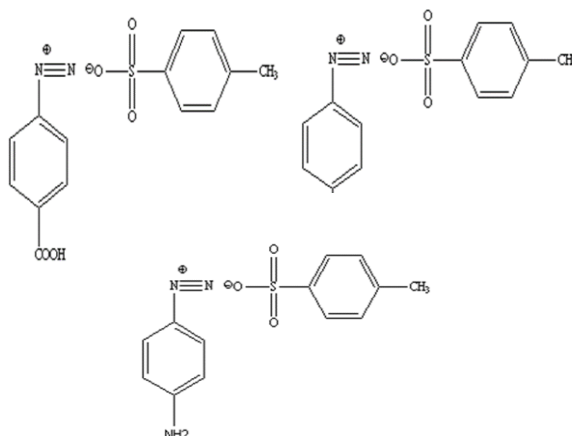


Рисунок 39 - Структурные формулы используемых модификаторов

Концентрация модификатора была выбрана на основании данных зондовой микроскопии, представленных на рисунке 41.

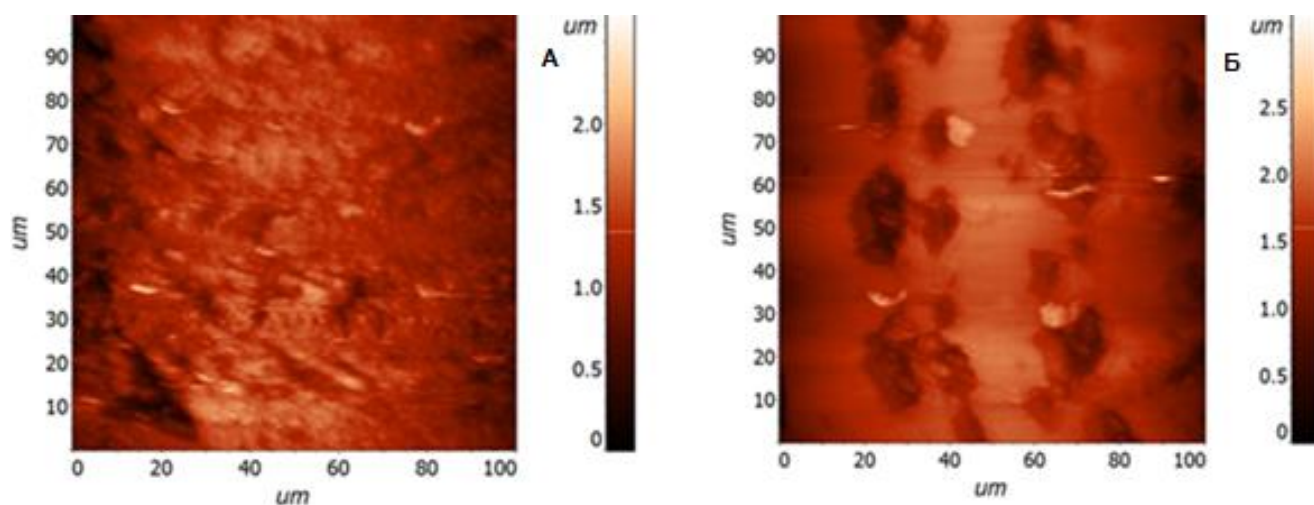


Рисунок 40 - Изображения зондовой микроскопии поверхности модифицированных АДТ графитовых электродов: А – $C_{\text{модиф}}$ 10 мг/дм³, Б – $C_{\text{модиф}}$ 60 мг/дм³

Установлено, что при концентрации 10 мг/дм³ на поверхности формируется система ансамблевых ультрамикроэлектродов, что существенно увеличивает эффективную площадь поверхности электрода.

По полученной градуировочной зависимости тока пика от концентрации мельдония установлено, что чувствительность модифицированного электрода с арендиазоний тозилатом без заместителя выше в сравнении с немодифицированным электродом, поэтому в дальнейшем его использовали для разработки методики вольтамперометрического определения, рисунок 42.

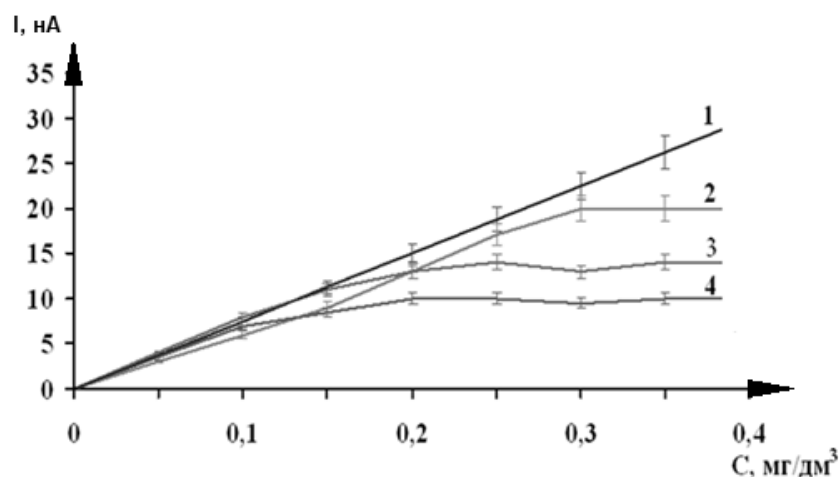


Рисунок 41 - Градуировочные зависимости получаемых аналитических сигналов от вида модификатора на золото-графитовом электроде: 1- АДТ без заместителя; 2 - АДТ с – NH_2 ; АДТ с – COOH ; 4 - ЗГЭ без модификации

Далее осуществляли выбор условий модифицирования, а именно время экспозиции в растворе модификации. Для этого получена зависимость аналитического сигнала от определяемого параметра, представленная на рисунке 43.

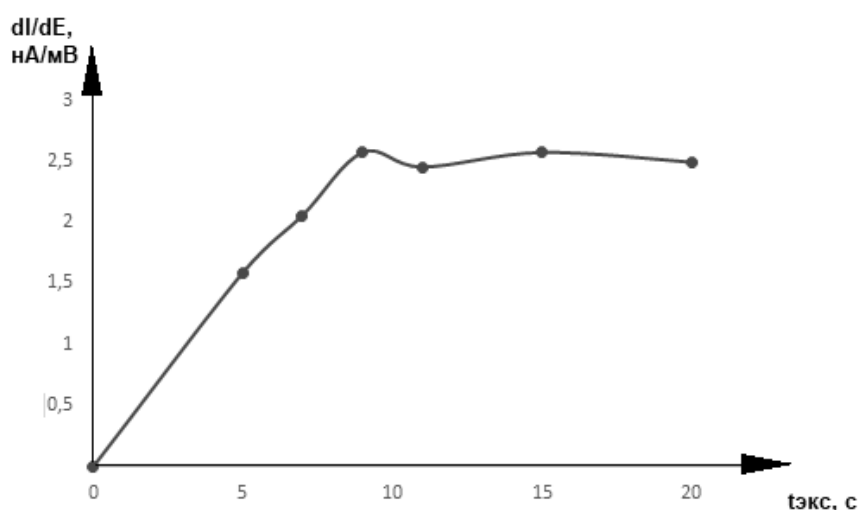


Рисунок 42 - Зависимость аналитического сигнала мелидония от времени экспозиции электрода в растворе модификатора

Как видно из рисунка 43, при увеличении времени экспозиции электрода более 10 секунд (при концентрации модификатора 10 мг/дм^3), значение аналитического сигнала уменьшается, что связано с блокировкой рабочей

поверхности, время экспозиции электрода в растворе определено в диапазоне 5-7 секунд. При изменении порядка модифицирования поверхности электрода (сначала экспозиция в растворе модификатора, затем модификация в растворе золота) приводит к уменьшению аналитического сигнала.

Далее проводилось определение рабочих потенциала накопления и времени накопления мельдония с использованием золото-графитового электрода, модифицированного солями арендиазония. Изучаемые зависимости представлены на рисунках 44,45.

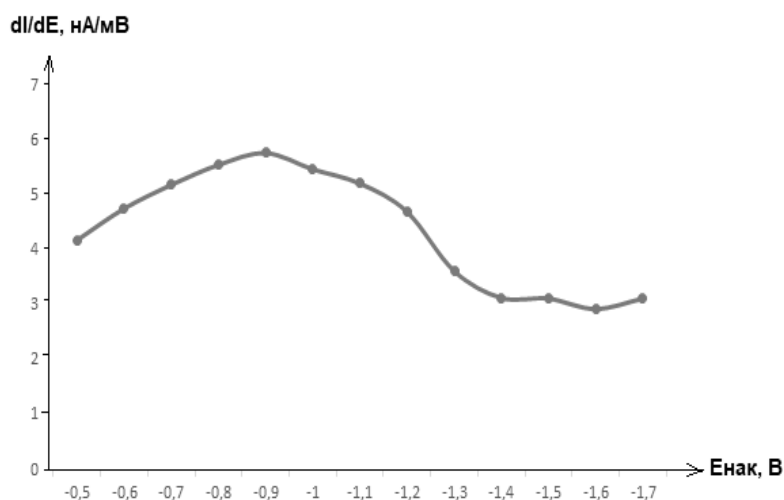


Рисунок 43 - Зависимость аналитического сигнала мельдония от $E_{нак}$ на МЗГЭ

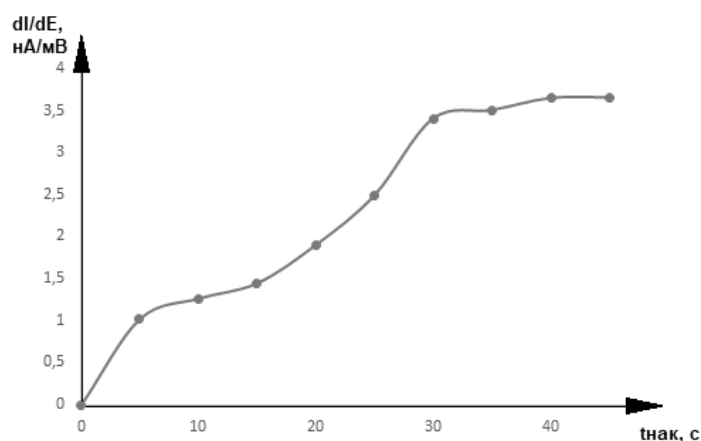


Рисунок 44 - Зависимость аналитического сигнала мельдония от времени накопления на МЗГЭ

Установлено, что максимальное значение аналитического сигнала при потенциале накопления $-0,9$ В, и времени накопления 30 секунд.

Вольтамперограмма, полученная при выбранных условиях, представлена на рисунке 46.

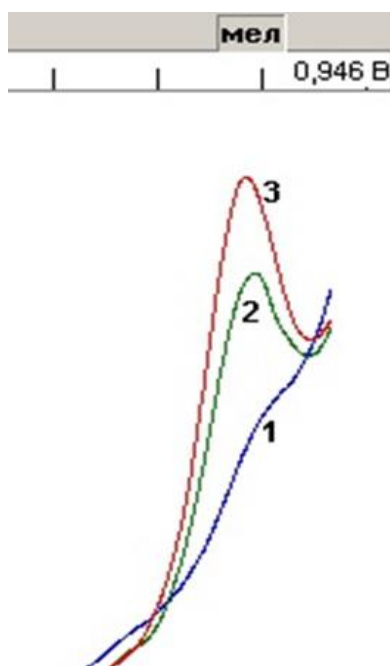


Рисунок 45 - Вольтамперограмма мельдония на МЗГЭ:

1 – фоновый электролит буферный раствор Бриттона-Робинсона с рН 9,2;

2 – С мел 0,04 мг/дм³

3 – С мел 0,06 мг/дм³

$E_{\text{нак}}$ -0,9В; $t_{\text{нак}}$ 30 с;

$W = 35$ мВ/с

Исследование циклической вольтамперограммы показало, что значительное смещение потенциалов максимумов, что 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, что подтверждается также характером зависимости аналитического сигнала от времени накопления. Изучаемые зависимости приведены на рисунке 47.

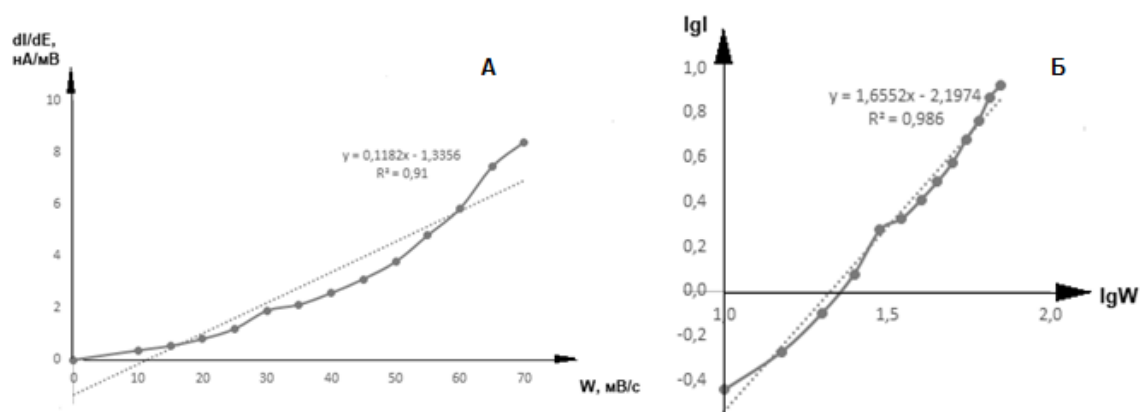


Рисунок 46 - Зависимость аналитического сигнала мельдония на МЗГЭ от скорости развертки поляризующего напряжения (А) и логарифмическая зависимость АС от логарифма скорости развертки (Б)

Таким образом, определен необратимый характер электрохимического процесса, осложненный адсорбционными процессами.

ГЛАВА 4 РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

4.1 Определение галонала, галодифа и мельдония в лекарственных формах

4.1.1 Изучение мешающего влияния вспомогательных веществ на аналитические сигналы изучаемых веществ

Лабораторией изучения механизмов нейропротекции научно-образовательного центра им. Н.М. Кижнера предоставлена пробная партия готовой таблетированной лекарственной формы «Галонала», составом: галонала (действующее вещество) – 0,10 г; крахмала – 0,002 г; 5% слизь крахмала в пересчете на сухое вещество - 0,005; твин-80 (полисорбат 80) – 0,0005 г, магния стеарат – 0,0005 г на одну таблетку [100].

Фирмой «Синтегал» (г.Томск, Россия; серия 040813) была предоставлена таблетированная лекарственная форма, согласно нормативной документации имеющая состав: галодиф (действующее вещество) – 100 мг, крахмала картофельного - 15,6 мг, аэросила – 2,0 мг, магний стеарата – 1,2 мг, твин-80 – 1,2 мг.

Для исследования мешающего влияния компонентов твердой лекарственной формы приобретена упаковка капсул «Милдронат, капсулы 500 мг №60» (1960916, годен до 09.2020, АО «Гриндекс», Латвия), состав в пересчете на 1 капсулу: мельдоний (действующее вещество) - 500 мг, крахмал картофельный высушенный – 27,2 мг, оксид кремния коллоидный (аэросил) – 10,8 мг, кальция стеарат 5,4 мг. Капсульная оболочка состоит из диоксида титана в качестве красителя и желатина.

Поэтому первоначальной задачей являлось провести оценку мешающего влияния вспомогательных веществ на аналитический сигнал галонала, галодифа и мельдония в твердых лекарственных формах при рабочих условиях и, если мешающее влияние будет выявлено, разработать методику пробоподготовки в соответствии с физико-химическими свойствами вспомогательных компонентов.

В таблице 8 представлены результаты исследования мешающего влияния вспомогательных компонентов на аналитический сигнал галонала и галодифа.

Таблица 8 - Влияние вспомогательных веществ таблетированной формы на аналитический сигнал галонала и галодифа

Мешающий компонент	Отношение концентраций мешающий компонент: основное вещество	Содержание галонала, мг/дм ³	Содержание галодифа, мг/дм ³
До введения мешающих компонентов		1,99±0,20	2,02±0,22
Крахмал	10:1	2,23±0,22	2,02±0,22
	50:1	2,20±0,22	2,07±0,22
	100:1	2,27±0,23	2,10±0,23
Стеарат магния	10:1	2,15±0,21	2,05±0,21
	50:1	2,15±0,21	2,08±0,21
	100:1	2,17±0,22	2,08±0,22
Твин-80 (повидон)	10:1	2,05±0,21	2,10±0,21
	50:1	2,08±0,21	2,11±0,21
	100:1	2,12±0,21	2,15±0,21
Аэросил (коллоидный диоксид кремния)	10:1	*	2,11±0,21
	25:1	*	2,15±0,21
	50:1	*	2,15±0,21

* - вспомогательное вещество отсутствует в составе таблетированной формы

Концентрация галонала и галодифа в модельных растворах 2 мг/дм³. Исследуемые концентрации значительно превышают массы мешающих компонентов в таблетированной форме. В присутствии крахмала и стеарата магния, диапазон определяемых концентраций сохранился. Исходя из полученных данных, 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%.

4.1.2 Методика количественного химического анализа лекарственных форм «Галонал, таблетки 0,1» и «Галодиф, таблетки 0,1» на их содержание

На основе литературных данных о физико-химических свойствах мешающих компонентов предложено для выделения действующего вещества использовать экстракцию со сменой растворителя. При растворении навески в воде и интенсивном перемешивании, из таблетированных форм высвобождается твин-80 (полисорбат 80). На следующем этапе проводится фильтрование раствора обеззоленным бумажным фильтром «белая лента». Далее проведено элюирование галонала из осадка с поверхности фильтра диметилформамидом. Алгоритм методики определения галонала в таблетированной форме на рисунке 48.

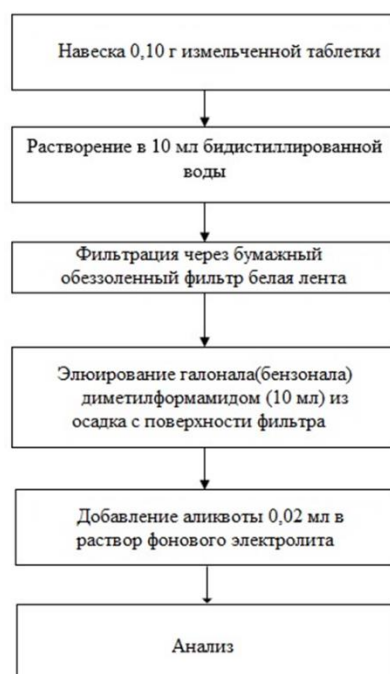


Рисунок 47 - Алгоритм пробоподготовки лекарственной формы для определения галонала и галодифа в таблетированных формах

По разработанному алгоритму методики проведен анализ таблеток «Галонал» и проверка правильности методом «введено-найдено», данные которых представлены в таблице 9. Можно отметить удовлетворительные результаты определения лекарственных субстанций и погрешность их определения не превышает 18%. Время анализа, включая пробоподготовку – 15 минут.

Таблица 9 - Результаты определения содержания галонала в таблетированной форме методом «введено-найдено»

Проба	Содержание галонала, г/г (n =3, l=5, p=0,96)		
	В пробе	Введено	Найдено
Таблетки «Галонал, 100 мг»	0,10	-	0,11±0,02
		0,10	0,19±0,03

Для определения галодифа таблетки растирали до порошкообразного состояния. После чего на аналитических весах брали навеску порошка массой 0,1г с точностью до 0,0001 г, вносили в мерную пробирку объемом 10 мл, растворяли навеску пробы в 10 мл ацетонитрила. Полученную суспензию фильтровали через бумажный фильтр. Содержимое фильтра промывали в другую мерную пробирку объемом 10 мл. Далее полученный раствор центрифугировали. Вольтамперометрическое определение проводилось при потенциале накопления - 1,1 В, в течение 15 с, в дифференциально-импульсном режиме. Проверка правильности определения проводилась методом «введено-найдено», данные представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Результаты определения содержания галодифа в таблетированной форме методом «введено-найдено»

Проба	Содержание Галодифа, г/г (n=3, l=5, p=0,96)		
	В пробе	Введено	Найдено
Таблетки «Галодиф, 100 мг» (серия 040813)	0,100	-	0,098±0,020
		0,200	0,301±0,030

Как видно из таблицы 10, результаты согласуются с данными, заявленными производителями, а в ходе проверки правильности методом "введено-найдено" получили удовлетворительные значения.

4.1.4 Методика вольтамперометрического определения мельдония в лекарственных формах «Милдронат, капсулы 0,5» и «Милронат, раствор для внутривенного, внутримышечного и парабульбарного введения 100 мг/мл»

На основании проведенных нами исследований предложен алгоритм методики определения мельдония в лекарственных препаратах (раствор милдроната). Подготовку проб, содержащих мельдоний, проводили следующим образом. Точную навеску пробы милдроната помещали в колбу вместимостью 100,0 мл, растворяли в 100 мл бидистиллированной воды. Полученный раствор интенсивно помешивали. Для анализа брали аликвоту полученного раствора объемом 1,0 мл.

В чистый кварцевый стаканчик вместимостью 15,0 -25,0 см³ вносят 10,0 см³ раствора фонового электролита Бриттона-Робинсона pH = 9,2 и помещают в электрохимическую ячейку вольтамперометрического анализатора. Опускают в раствор электроды: графитовый, модифицированный золотом и хлоридсеребряный, деаэрируют азотом и проводят процесс электронакопления при потенциале – 0,9 В течение 30 с. По окончании электролиза регистрируют

анодную вольтамперограмму мельдония в диапазоне потенциалов от $-1,1$ до $0,8$ В при ступенчатом наложении потенциала и скорости развертки 35 мВ/с. Затем в стаканчик с фоновым раствором вносят аликвоту подготовленного раствора анализируемой пробы объемом $0,02$ мл и вновь регистрируют вольтамперограмму в тех же условиях. Измерив высоту пика при потенциале $(0,59 \pm 0,05)$ В, находят содержание мельдония методом добавок аттестованного раствора с учетом коэффициента разбавления пробы. Время анализа одной пробы не превышает $10 - 15$ минут.

Проверку правильности определения проводили методом «введено-найденно», данные представлены в таблице 11.

Таблица 11 - Результаты определения содержания мельдония в готовых лекарственных формах методом «введено-найденно»

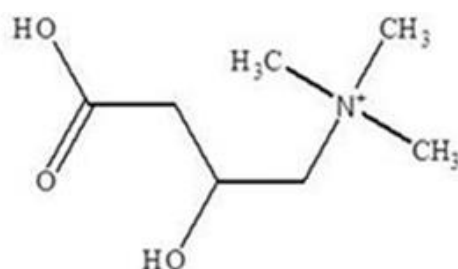
Образец мельдония	Содержание мельдония, мг/мл ($n=5$, $l = 3$, $P = 0,95$)		
	В пробе	Введено	Найдено
Милдронат, раствор для инъекций, 100 мг/мл	$10,00$	$2,00$	$11,9 \pm 1,8$
		$4,00$	$13,9 \pm 1,4$
Милдронат, капсулы 500 мг	$5,00$	$10,00$	$14,9 \pm 1,5$
		$20,00$	$25,0 \pm 2,5$

Таким образом, разработанная методика является адекватной и может быть использована в рутинной практической деятельности для контроля качества готовых лекарственных форм.

4.2 Вольтамперометрическое определение мельдония биологических жидкостях

4.2.1 Изучение мешающего влияния L-карнитина на аналитический сигнал мельдония

Следующим этапом проводилась оценка мешающего влияния на аналитический сигнал близкого по химическому строению L-карнитина, так как в биологических объектах, таких как моча, эти два вещества могут находиться вместе. Химическая структура L – карнитина представлена на рисунке 49.



(3R)-3-гидрокси-4-триметиламмонийбуаноат
(Карнитин)

Рисунок 48 - Структурная формула картинина

Для разделения аналитических сигналов мельдония и карнитина проводили изучение влияния времени успокоения на аналитические сигналы изучаемых веществ, результаты представлены на рисунке 50.

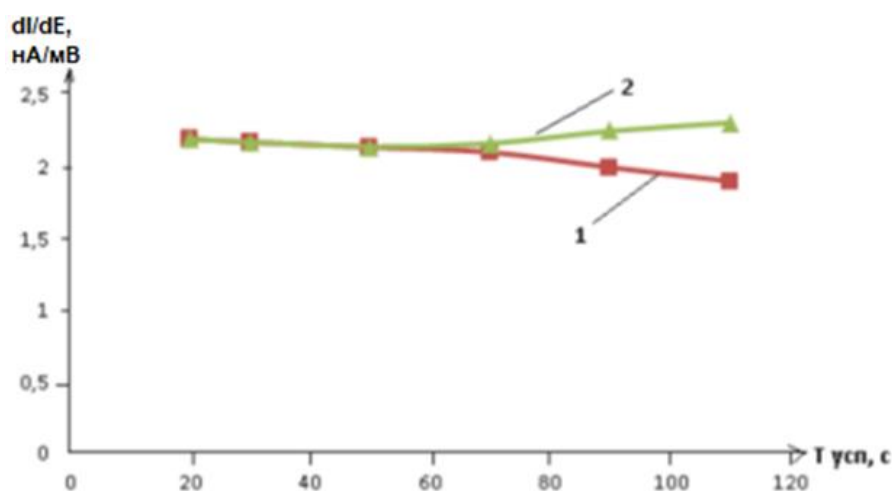


Рисунок 49 - Зависимость высоты аналитического сигнала мельдония (1) и L-карнитина (2) от времени успокоения

Установлено, что разделение аналитических сигналов мельдония и карнитина возможно при времени успокоения от 110 секунд и более. На вольтамперограмме, представленной на рисунке 51 видна четкая дифференциация получаемых аналитических сигналов, при увеличении времени успокоения до 110 секунд и уменьшении скорости развертки поляризующего напряжения до 5 мВ/с.

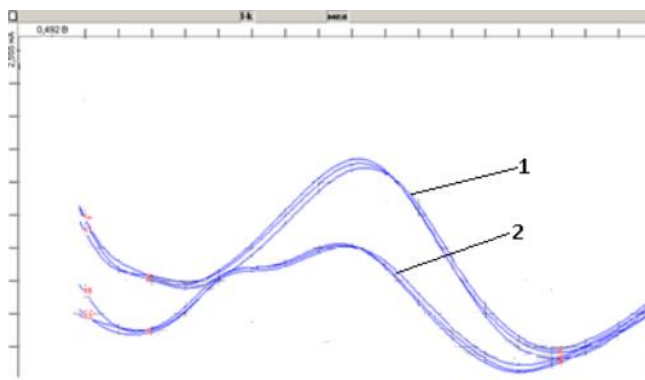


Рисунок 50 - Вольтамперограмма одновременного определения мельдония и карнитина на фоне буферного раствора Бриттона-Робинсона при рН 9,2 на МЗГЭ. 1 - время успокоения 30 с, 2 - время успокоения 110 с

4.2.2 Выбор условий для ТСХ-скрининга мельдония в биологических объектах

Для предварительной оценки установления факта присутствия мельдония в биологическом образце нами предложено использование скрининг-систем с применением метода тонкослойной хроматографии. Для этого были разработаны условия, позволяющие получить аналитически удовлетворительную хроматограмму. В качестве неподвижной фазы использовали пластинки Silufol, проявление хроматограмм проводили в йодной камере, универсальном абсорбционном проявителе. Был осуществлен выбор подвижной фазы. Результаты представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Значение коэффициента распределения R_f мельдония и L-карнитина при выбранных подвижных фазах

Подвижная фаза/определяемое вещество	Значение R_f		
	Этанол 96%: вода: аммиак (5:1:1 по объему)	Метанол: аммиак (5:1 по объему)	Метанол: этилацетат: аммиак (5:1:1 по объему)
Мельдоний	0,78	0,64	0,49
Карнитин	0,76	0,59	0,56

Как видно из данных в таблице, удовлетворительные значения R_f получены при использовании системы метанол:этилацетат:аммиак, которая в дальнейшем и применялась для анализа реальных объектов.

4.2.3 Методика одновременного определения мельдония и L-карнитина в моче методом инверсионной вольтамперометрии

При разработке алгоритма пробоподготовки подобраны условия высаливания, центрифугирования, фильтрования.

Разработаны условия выделения мельдония из сложной многокомпонентной матрицы до проведения собственного электрохимического определения с использованием стадии высаливания из пробы 3М сульфатом аммония с последующим центрифугированием.

А) Влияние природы высаливателя и его концентрации на полноту выделения мельдония

На основании литературных данных определено, что в качестве высаливателя предпочтительнее использовать соли, содержащие сульфат- или цитрат- ионы. Сульфаты более удобны из-за лучшей растворимости (например, при нормальной температуре растворимость аммонийных солей цитрата и сульфата равны примерно 2.5М и 4.1М); низкой цены и стабилизирующего

влияния, которое он оказывает на большинство белков при концентрациях выше 0.5М. Нами выбран сульфат аммония. Концентрация высаливателя подбиралась экспериментально и составила 3М.

Б) Выбор условий центрифугирования

Основной уровень, а также нижние и верхние пределы параметров были определены опытным путем. Оценено влияние основных параметров центрифугирования на количество выделяемого мельдония из органической матрицы. Данный эксперимент является дробным факторным экспериментом и проводился по двум факторам в зависимости от времени и скорости. Диапазон параметров центрифугирования: скорость - от 1500 до 4500 об/мин, время: от 5 до 15 мин. Обработка результатов матрицы планирования двухфакторного эксперимента показала, что оптимальными условиями для пробоподготовки является скорость центрифугирования 1600 об/мин, время центрифугирования 7 минут. Оценку характеристики случайной составляющей погрешности проводили при варьировании внешних влияющих факторов (масса навески, время центрифугирования, объем аликвоты и т.д.) по среднеквадратическому отклонению результатов измерений.

Выяснено, что наиболее существенный вклад оказывает скорость центрифугирования, чем время, эффект взаимодействия влияет слабо. Статистическая обработка результатов эксперимента указывает на адекватность полученной корреляционной зависимости. Полученная зависимость имеет вид $y = 2,96 + 1,63x_1 + 1,31x_2 + 0,017x_1x_2$.

Оценку характеристики систематической составляющей погрешности (показатель правильности) проводили методом добавок определяемого вещества в пробу. Результаты проверки правильности доказывают, что систематическая составляющая погрешности определения мельдония не значима на фоне случайного разброса данных. Таким образом, разработанный алгоритм пробоподготовки представлен на рисунке 52.



Рисунок 51 - Алгоритм пробоподготовки проб биологических объектов для вольтамперометрического определения мельдония

В) Проведение процедуры валидации разработанной методики определения мельдония

Для подтверждения возможности использования данной методики в лабораторной практике для количественного определения мельдония в условиях реальных объектов проведена процедура валидации. Установлены следующие характеристики: специфичность определения, линейность и диапазон измерений, предел обнаружения. Метрологические характеристики оценены на основании расчетов проведенных согласно РМГ 61-2010 «Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа»[99]. Показатель правильности методики анализа оценен с применением метода добавок.

Специфичность. Согласно [100], специфичность – это способность методики определять анализируемое вещество в присутствии компонентов, которые могут

быть в пробе. Установление специфичности методики проводилось по методике, описанной в [101]. Проводились исследования 6 образцов чистой (не содержащей определяемого вещества) мочи и, параллельно, проб мочи с добавлением раствора мельдония с точно известной концентрацией. Объем добавки рассчитывали таким образом, чтобы она находилась в пределах диапазона определяемых концентраций. В таблице 13 показаны результаты проверки специфичности методом «введено-найдено».

Таблица 13 - Результаты проверки специфичности методики определения методом «введено-найдено»

Проба	Содержание мельдония мг/дм ³	
	Введено	Найдено
Моча (содержание мельдония <0,0001)	0,0020	0,0021±0,0004
	0,0040	0,0039±0,0008

На всех вольтамперограммах чистых проб отсутствовал аналитический сигнал, соответствующий мельдонию. Таким образом, данный алгоритм можно использовать для определения мельдония в присутствии мешающих компонентов, таких как карнитин.

Линейность и диапазон измерений. Проведенные исследования показали, что зависимость величины аналитического сигнала от концентрации вещества в растворе в диапазоне от 0,02 до 2 мг/дм³ описывается функцией линейной зависимости. При этом стандартное отклонение результатов не превышало 10 %.

Предел обнаружения. Для нахождения нижней границы определяемых содержаний мельдония в образцах биологических объектов строили кривые зависимости относительного стандартного отклонения (S_r) от содержания компонента, определяемого по данной методике. Для оценки предела обнаружения (C_{min}) был использован трехсигмовый критерий Кайзера, для оценки предела определения математически находили значение концентрации при $S_r =$

0,5. Получены значения: $C_{\min} = 0,02 \text{ мг/дм}^3$ ($P = 0,95$), $C_{\lim}$ (предел определения) = $0,05 \text{ мг/дм}^3$

Г) Исследование реальных проб биологических объектов

Далее выполняли определение мельдония в реальных объектах. На анализ были получены образцы мочи спортсменов, предположительно содержащих мельдоний. В результате предварительного ТСХ-скрининга установлено, что в двух сериях проб (серия соответствует одному спортсмену) содержится мельдония. Проведены отбор и подготовка проб, по алгоритму, изложенному выше.

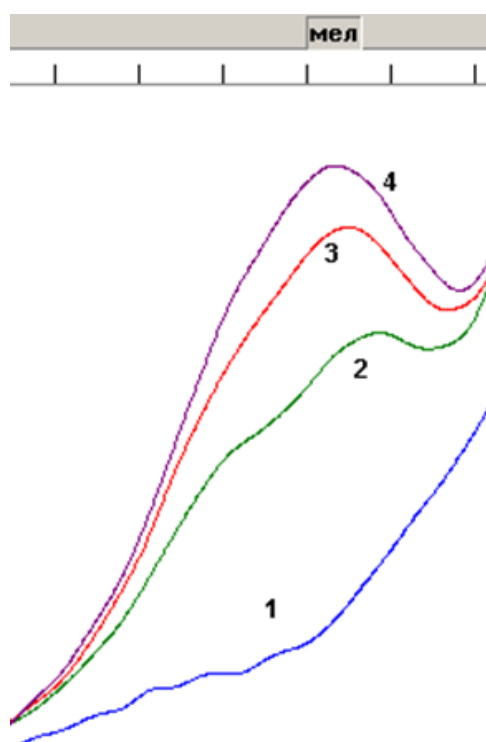


Рисунок 52 - Вольтамперограмма пробы мочи спортсмена, содержащего мельдоний. ВАГ получена на фоне буферного раствора Бриттона-Робинсона с рН 9,2, рабочий электрод – МЗГЭ. 1 – фоновый электролит; 2 – аликвота образца мочи после пробоподготовки; 3 – добавка $0,02 \text{ см}^3$ рабочего раствора мельдония с концентрацией 100 мг/дм^3 ; 4 – добавка $0,04 \text{ см}^3$ рабочего раствора мельдония с концентрацией 100 мг/дм^3

На рисунке 53 представлена вольтамперограмма образца мочи спортсмена, содержащего мельдоний, в концентрациях, превышающих допустимый предел (на 07.2016). Установлено, что в серии проб одного из спортсменов выявлено

содержание мельдония, что подтверждает данные анализа образца в лаборатории WADA.

В таблице 14 приведены данные о результатах исследования.

Таблица 14 – Результаты определения содержания мельдония в реальных пробах – образцах мочи спортсменов

№ образца	Содержание мельдония в пробе, мг/дм³
1 – моча	2,61±0,05
2 – моча	0,0010±0,0003
3 – моча	Менее 0,0001

Отмечено, что результаты, полученные по разработанной методике, согласуются с результатами из лаборатории WADA.

Д) Метрологическая оценка разработанный методики

Оценка повторяемости и воспроизводимости разработанных методик количественного химического анализа проводилась согласно алгоритму, описанному в приложении Б.

1) Для спортсмена 1.

В таблицах 15 -18 представлены данные о метрологической оценке результатов определения мельдония в образцах мочи спортсмена 1.

Таблица 15 - Условия комбинации факторов для оценки повторяемости и воспроизводимости (пробы спортсмена 1)

Номер серии результатов единичного анализа	Комбинация факторов		
L =6			
1	В тот же день	Оператор 1	спортсмен 1
2	На след день	Оператор 2	спортсмен 1
3	На след день	Оператор 1	спортсмен 1
4	В тот же день	Оператор 2	спортсмен 1
5	В тот же день	Оператор 1	спортсмен 1
6	На след день	Оператор 2	спортсмен 1

Таблица 16 - Полученные результаты определения содержания мельдония в пробе мочи

Результаты единичного анализа, полученные в условиях повторяемости		Среднее значение	Дисперсия	Степень извлечения
X ₁	X ₂	X _{ср}	S ²	
		мкг/мл		%
2,63	2,57	2,60	0,0018	104,033333
2,61	2,59	2,60	0,0002	
2,59	2,63	2,61	0,0008	
2,6	2,59	2,60	5E-05	
2,62	2,61	2,62	5E-05	
2,61	2,56	2,59	0,00125	
2,61	2,61	2,61	0	
2,59	2,64	2,62	0,00125	
2,62	2,63	2,63	5E-05	
2,6	2,63	2,62	0,00045	

Таблица 17 - Значение статистически важных критериев

Критерий Кохрена	Критерий Граббса		Критерий Стьюдента	
G _{max}	G _{rmax}	G _{rmin}	t	
0,788	2,68	2,68	2,571	табл.
0,305	1,521277659	1,85933936	2,007320925	факт.
соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	

Таблица 18 - Оценка показателей правильности, точности, внутрилабораторной прецизионности

Стандартная неопределенность в условиях повторяемости	Стандартная неопределенность в условиях промежуточной прецизионности	Общее среднее	Отн.стандартная неопределенность в условиях повторяемости, %	Отн. стандартная неопределенность в условиях промежуточной прецизионности, %	
Sr	SRл	Xсрср	Sgotнл	SRотнл	
		мг/г			
0,024289916	0,01183216	2,60	0,933928187	0,454937247	
Оцененное смещение	Стандартная неопределенность оценки смещения	Расширенная неопределенность оценки смещения	Суммарная стандартная неопределенность	Относительная суммарная стандартная неопределенность	Относительная расширенная неопределенность
				%	%
0,100833333	0,029268869	0,057366982	0,031570028	1,213842793	2
Предел повторяемости для 2-х результатов, %	Предел промежуточной прецизионности, %	Показатель правильности (относительная стандартная неопределенность оценки смещения), %			
2,586981079	1,260176174	1,12536502			

1) Для спортсмена 2.

В таблицах 19 - 22 представлены данные о метрологической оценке результатов определения мельдония в образцах мочи спортсмена 2. Выявленное содержание меньше, чем у первого спортсмена.

Таблица 19 - Условия комбинации факторов для оценки повторяемости и воспроизводимости (пробы спортсмена 2)

Номер серии результатов единичного анализа	Комбинация факторов			
L =				
6				
1	В тот же день	Оператор 1	спортсмен 2	
2	На след день	Оператор 2	спортсмен 2	
3	На след день	Оператор 1	спортсмен 2	
4	В тот же день	Оператор 2	спортсмен 2	
5	В тот же день	Оператор 1	спортсмен 2	
6	На след день	Оператор 2	спортсмен 2	
			спортсмен 2	

Таблица 20 - Полученные результаты определения содержания мельдония в пробе мочи спортсмена 2

Результаты единичного анализа, полученные в условиях повторяемости		Среднее значение	Дисперсия	Степень извлечения
X ₁	X ₂	X _{ср}	S ²	
		мкг/мл		%
0,0018	0,0019	0,00	5E-09	107,22222
0,0015	0,0017	0,002	0,000000002	
0,0015	0,0015	0,002	0	
0,0014	0,0015	0,001	5E-09	
0,0014	0,0015	0,001	5E-09	
0,0018	0,0018	0,002	0	
0,0017	0,0014	0,002	0,0000000045	
0,0015	0,0017	0,002	0,000000002	
0,0014	0,0016	0,002	0,000000002	
0,0018	0,0016	0,002	0,000000002	

Таблица 21 - Значения статистически важных критериев

Критерий Кохрена	Критерий Граббса		Критерий Стьюдента	
$G_{\max}$	$G_{\max}$	$G_{\min}$	t	
0,788	2,68	2,68	2,571	табл.
0,321	1,767766953	1,060660172	1,665025439	факт.
соответствует	соответствует	соответствует	соответствует	

Таблица 22 - Оценка показателей правильности, точности, внутрилабораторной прецизионности

Стандартная неопределенность в условиях повторяемости	Стандартная неопределенность в условиях промежуточной прецизионности	Общее среднее	Отн.стандартная неопределенность в условиях повторяемости, %	Отн. стандартная неопределенность в условиях промежуточной прецизионности, %	
Sr	SRл	Xсрср	Srотнл	SRотнл	
		мг/г			
0,000118322	0,000141421	0,00	7,35678315	8,793037694	
Оцененное смещение	Стандартная неопределенность оценки смещения	Расширенная неопределенность оценки смещения	Суммарная стандартная неопределенность	Относительная суммарная стандартная неопределенность	Относительная расширенная неопределенность
				%	%
0,000108333	6,02771E-05	0,000118143	0,000153731	9,558426991	19
Предел повторяемости для 2-х результатов, %	Предел промежуточной прецизионности, %	Показатель правильности и (относительная стандартная неопределенность оценки смещения), %			
20,37828933	24,35671441	3,74780131			

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная работа позволяет расширить методологию определения органических веществ, в том числе и лекарственных, с использованием методов вольтамперометрии.

В ходе выполнения работы были выполнены:

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 (HOMO 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 Шевчика 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;

4. 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.

5. Разработана методика количественного химического анализа методом вольтамперометрии проб лекарственных препаратов (таблетки, капсулы, раствор для инъекций) на содержание галонала, галодифа и мельдония.

6. Разработана методика количественного химического анализа методом вольтамперометрии проб мочи на содержание мельдония в присутствии карнитина. Проведена метрологическая аттестация.

В дальнейшем возможно внедрение разработанных методик в доклиническую и клиническую практику, а также учитывать наработанный материал для создания общей фармакопейной статьи «Вольтамперометрия».

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ОВР – окислительно-восстановительные реакции;

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота;

ОСТN2 – транспортер эндогенного карнитин-катиона 2 (organic carnitine/cation transporter 2);

АТФ – аденозинтрифосфат;

ИФА – иммуноферментный анализ;

УНТ – углеродные нанотрубки;

НБДТ – нитробензолдiazоний тетрафторборат

ПФ – подвижная фаза;

АДТ – арендиазоний тозилаты;

ОФГ – органические функциональные группы;

ГЭ – графитовый электрод;

СУЭ – стеклоуглеродный электрод;

МЗГЭ – модифицированный золото-графитовый электрод;

ПВ – правовращающая форма;

ЛВ – левовращающая форма;

$E_{\text{нак}}$ – потенциал накопления, В;

$t_{\text{нак}}$ – время накопления, с;

W – скорость развертки поляризующего напряжения, мВ/с;

$E_{\text{п}}$ – потенциал пика, В.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Малахова, Н.А. Вольтамперометрия в фармацевтическом анализе [Текст] / Н.А. Малахова, А.В. Иванова, А.Н. Козицина, А.И. Матерн // Разработка и регистрация лекарственных средств. - 2014. - № 2(7). - С. 90-99.
2. Gupta, V.K. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals -A review [Текст] / Vinod K. Gupta, Rajeev Lain, Keisham Radhapiari, Nimisha Jadon, Shilpi Agarwal // Analytical biochemistry. - 2011. - Vol. 408. - P. 179-196.
3. Пат. 2058295-96 Российская Федерация, МКИ С 07 С 51 / 363, С 07 С 63 / 68. Способ получения о-фторбензойной кислоты [Текст] / Арбит Г.А., Филимонов В.Д.; заявитель и патентообладатель Томский политехнический университет. - № 2058295-96. Заявл. 27.05.94; опубл. 20.04.96, Бюл. №12.
4. Орос, Г.Ю. Применение производных барбитуровой кислоты в качестве лекарственных средств (обзор) [Текст] / Г.Б. Орос, В.Ю. Селеменев, Т.В. Елисеева, Е.В. Крисилова, Н.Я. Мокшина // Сорбционные и хроматографические процессы. - 2007. - Т.7. - Вып.2. - С. 315-323.
5. Новожеева, Т.П. Средства активации систем детоксикации среди циклических и линейных производных мочевины [Текст]: дис. ... докт. биол. наук: 14.00.25 : защищено – 01.05.1998 ; утверждено – 01.12.1998 / Новожеева Татьяна Петровна. - Томск, 1998. - 358 С.
6. Саратиков, А.С. Регуляторы ферментативных систем детоксикации среди азотсодержащих соединений [Текст] / А.С. Саратиков, Р.Р. Ахмеджанов, А.А. Бакибаев, А.И. Хлебников, Т.П. Новожеева, Е.Л. Быстрицкий. – Томск : Сибирский издательский дом, 2002. – 264 С.
7. Новожеева, Т.П. Влияние бензонала, галонала и галодифа на антитоксическую функцию печени при внепеченочном холестазах [Текст] / Т.П. Новожеева, И.Э. Чурсина, А.В. Новожеева, А.С. Саратиков // Химико-фармацевтический журнал. - 2004. - Т. 38. - № 1. - С. 3-4.

8. Новожеева, Т.П. Влияние бензонала, галонала и галодифа на развитие постишемических расстройств печени у крыс [Текст] / Т.П. Новожеева, А.С. Саратиков // Химико-фармацевтический журнал. - 2003. - Т. 37. - № 12. - С. 3-4.
9. Арзамасцев, А.П. Методы анализа и стандартизации лекарственных средств производных барбитуровой кислоты [Текст] /А.П. Арзамасцев, Т.Ю. Лутцева, Н.П. Садчикова // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – №8. – С. 47– 51.
10. Пат. № 2361854 Российская Федерация, МПК С 07 С 49/813, С 07 С 45/65. Способ получения м-хлорбензофенона [Текст] / Штрыкова В.В., Трусова М.Е., Филимонов В.Д.; заявитель и патентообладатель Томский политехнический университет. - № 2008109669/04. Заявл. 11.03.2008; опубл. 20.07.2009, Бюл. №20.
11. ФСП «Галодиф, субстанция-порошок», согласовано с МЗ РФ 00860-170614, разработчик ООО «Синтегал».
12. Новожеева, Т.П. Фармакологические свойства галодифа и перспективы его клинического применения [Текст] / Т.П. Новожеева, В.К. Горшкова, М.И. Смагина, С.Н. Фатеева, З.З. Алуغيшвили, Н.Б. Олейник, Р.Р. Ахмеджанов // Бюллетень сибирской медицины. - 2006. – Прил. 2. - С. 41-43.
13. Итоги клинического изучения препарата галодиф в таблетках по 0,1 г. [Текст] : Справка по итогам клинического изучения. - Купавна, 1977: НИИ по биологическим испытаниям химических соединений. 3 С.
14. Шушпанова, Т.В. Влияние антиконвульсанта мета-хлорбензидрилмочевины (м-хБГМ) на бензодиазепиновую рецепторную систему мозга крыс при экспериментальном алкоголизме [Текст] / Т.В. Шушпанова, А.В. Солонский, Т.П. Новожеева, В.В.Удуд // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2013. - Т. 156. - № 12. – С. 779-785.
15. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. - XIV изд. - Т.3 Лекарственные средства синтетического и минерального происхождения. Москва, 2018. - ФС.2.1.0128.18. - Стр. 4320
16. Dambrova, M. Pharmacological effects of meldonium: Biochemical mechanisms and biomarkers of cardiometabolic activity [Текст] / Maija Dambrova, Marina

- Makrecka-Kuka, Reinis Vilskersts, Elina Makarova, Janis Kuka, Edgars Liepinsha // Pharmacological Research. – 2016. – Vol.113. – Part B. – P. 771-780.
17. Maksimova, M. Experience with Mildronate in ischemic stroke [Текст]/ M.Yu. Maksimova, M.M. Tanashyan, T.N. Fedorova, O.E. Guryanova // Medica mente. - 2019. – Vol. 5(1). – P. 22–27. DOI: 10.25697/MM.2019.01.05
 18. Grigat, S. The carnitine transporter SLC22A5 is not a general drug transporter, but it efficiently translocates mildronate [Текст] / S. Grigat, C. Fork, M. Bach, S. Golz, A. Geerts, E. Schömig, D.Gründemann // J. Drug Metab. Dispos. - 2009. – Vol. 37. - №2. – P. 330-337.
 19. Sjakste, N. Mildronate: an antiischemic drug for neurological indications [Текст] /N. Sjakste, A. Gutcaits, I. Kalvinsh // J. CNS Drug Rev. – 2005. – Vol. 11, № 2. – P. 151-168.
 20. Стаценко, М.Е. Возможности применения милдроната у больных хронической сердечной недостаточностью с сахарным диабетом 2 типа и автономной кардиальной нейропатией [Текст] / М.Е. Стаценко, С.В. Туркина, С.В. Беленкова // Российский кардиологический журнал. – 2009. - № 3(77). – 68-74.
 21. Ivanova, S. Meldonium, the “novel” doping in professional sport [Текст]/ S. Ivanova, K. Ivanov, V. Ivanov, G. Peteva // Oxidation communications. – 2017. - Vol. 40. No 2. - P. 986-992.
 22. <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/meldonium-notice>, reached May 2016 [Электронный ресурс, дата обращения: 12.03.2018].
 23. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. - XIV изд. - Т.3 Лекарственные средства синтетического и минерального происхождения. Москва, 2018. - Стр. 4979.
 24. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. - XIV изд. - Т.1. Введение, общие положения, методы анализа лекарственных средств, реактивы. Москва, 2018. – ОФС 1.2.3.0011.15. Стр. 101. Метод 1.
 25. Орос, Г.Ю. Идентификация и количественное определение барбитуратов и их солей (обзор) [Текст] / Г.Ю. Орос, В.Ф. Селеменев, Е.И. Крисилова // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2006. – Т.6, вып.2. – С. 277-283.

26. Егоров, А.М. Теория и практика иммуноферментного анализа / А.М. Егоров, А.П. Осипов, Б.Б.Дзантиев, Е.М. Гаврилова. – М: Высш. Шк., 1991 – 288 с.
27. Есин, Г.В. Обследование пациентов и диагностика при отравлении барбитуратами [Текст] / Есин Г.В.// Аспирант. - 2015. - №26-2(11). - С. 9-15.
28. Жебентяев, А.И. Иммуноферментные методы анализа [Текст] / А.И. Жебентяев, Е.Н. Каткова // Вестник фармации. – 2013. - №2(60). С. 90-97.
29. Борисевич, С.Н. Лабораторная диагностика острых отравлений барбитуратами [Текст] / С.Н. Борисевич, О.М. Вергун, А.А. Шмигельский // Здоровоохранение. – 2011. - №4. С. 52-55.
30. Данилова, Н.П. Определение фенобарбитала методами твердофазного иммуноферментного анализа. Выбор оптимальной стратегии [Текст] / Н.П. Данилова // Биоорганическая химия. – 1995. - Т.21. - №8, С. 632-635.
31. Солодухина, Н.М. Анализ наркотических веществ в физиологических жидкостях человека методом латексной агглютинации [Текст] /Н.М. Солодухина, М.А. Мягкова // Вестник МИТХТ. – 2011. - Т.6. - №4. С. 93-96.
32. https://www.piluli.ru/product471322/product_info.html [электронный ресурс; дата обращения 04.04.2019].
33. Namera, A. Automated preparation and analysis of barbiturates in human urine using the combined system of PrepStation and gas chromatography–mass spectrometry [Текст] / A. Namera, M. Yashiki, K. Okada, Y. Iwasaki, M. Ohtani, T. Kojima // J.Chromatogr.B., Biomed. Sci. Appl. – 1998. -Vol.706. – No 2. - P. 253—259.
34. Мелентьев, А.Б. Определение фенобарбитала и циклобарбитала в крови методом газовой хроматографии – масс спектрометрии с использованием микроэкстракции [Текст] / А.Б. Мелентьев // Известия Челябинского научного центра. 2004. - № 2 (23). - С. 138-142.
35. Арзамасцев, А.П. Использование хроматомасс-спектрометрического метода для идентификации примесных продуктов в промышленных образцах бензонала [Текст] / А.П. Арзамасцев, Т.Ю. Лутцева, Н.А. Ключев, Н.П. Садчикова // Химико-фармацевтический журнал. 1999. – Т. 33. - №10. С. 568-572.

36. Арзамасцев, А.П. Валидация методики количественного определения бензонала в таблетированной лекарственной форме [Текст] / А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Т.Ю. Лутцева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2001. - №4. – С. 29-34.
37. Арзамасцев, А.П. Продукты фоторазложения лекарственного препарата «Бензонал» [Текст] / А.П. Арзамасцев, Т.Ю. Лутцева, Н.А. Ключев, С.П. Садчикова // Аналитика и контроль. 2000. - Т. 4. - №4. С. 339-346.
38. Valentine, J.L. (1982) Gas Chromatographic Determination of Secobarbital in Human Plasma and Urine [Текст] / J. L. Valentine, Everett D. Thompson, Satanand Sharma, Herbert Moskowitz // Analytical Letters. 1982. -Vol. 15. – Is. 4. – P. 343-361. DOI: 10.1080/00032718208064387.
39. Roveri, F.L. Determination of phenobarbital in hair matrix by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) [Текст] / Flavia Lopes Roveri, Beatriz Aparecida Passos Bismara Paranhos, Mauricio Yonamine // Forensic Science International. 2016. – Vol. 265. - P. 75–80.
40. Vosough, M. Chemometrics enhanced HPLC–DAD performance for rapid quantification of carbamazepine and phenobarbital in human serum samples [Текст] / Maryam Vosough, Shiva Ghafghazi, Masoumeh Sabetkasaei // Talanta. 2014. – Vol. 119. - P.17–23.
41. Wang, M. Improved compatibility of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry for tracing occurrence of barbitol homologous residues in animal tissues [Текст] / Meiling Wang, Bin Guo, Zhiqiang Huang, Junmin Duan, Zhanfang Chen, Bo Chen, Shouzhuo Yao // Journal of Chromatography A. 2010. – Vol. 1217. – P. 2821–2831.
42. Quieroz, R. Quantification of carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, phenytoin and phenobarbital in plasma samples by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography [Текст] / Regina Helena Costa Queiroz, Carlo Bertucci, Wilson Roberto Malfara, Sonia Aparecida Carvalho Dreossi, Andrea Rodrigues Chaves, Daniel Augusto Rodrigues Valerio, Maria Eugenia Costa Queiroz // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2008. – Vol. 48. – P. 428–434.

43. Кокорина, Н.О. Определение лекарственных препаратов в биожидкостях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [Текст] / Н.О. Кокорина, В.П. Новоселов, М.А. Ханина // Сибирский медицинский журнал. 2008. - №4 (Выпуск 2). - С. 51-53.
44. Vermeij, T.A.C. Robust isocratic high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of seven antiepileptic drugs including lamotrigine, oxcarbazepine and zonisamide in serum after solid-phase extraction [Текст] / T.A.C. Vermeij, P.M. Edelbroek // Journal of chromatography B. 2007. - №857. - P. 40-46.
45. Saka, K. Determination of amobarbital and Phenobarbital in serum by gas chromatography–mass spectrometry with addition of formic acid to the solvent [Текст] / Kanju Saka, Kaichi Uemura, Kaori Shintani-Ishida, Ken-ichi Joshida // Journal of chromatography B. 2008. - №869. - P. 9-15.
46. Welton, B. Analysis of nanogram levels of barbiturates [Текст] / B. Welton // Chromatographia. 1970. - №3. - P. 211-215.
47. Киричек, А.В. Исследование производных барбитуровой кислоты в застарелых пятнах крови на тканях [Текст] / А.В. Киричек, А.Э. Шабалина, Л.А. Рассинская // Судебно-медицинская экспертиза. 2017. - №2. - С. 27-29.
48. ФСП «Галодиф, таблетки 100 мг», утвержденная 17.12.12 ООО «Синтегал»
49. Чернышев, А.И. Идентификация и количественное определение примесей в галодифе спектральными методами и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [Текст] / А.И. Чернышев, А.А. Сорокин, В.П. Шамшина, М.М. Каганский, М.С. Юбочникова, С.В. Кузьмин, В.А. Алешина // Химико-фармацевтический журнал. 1996. - Т.30. - №8. - С. 54-56.
50. Окуджава, В.М. Одновременное количественное определение галодифа, бензонала, фенобарбитала и карбамазепина методом ВЭЖХ [Текст] / В. М. Окуджава // Фармация. - 1989. - Т. 38. - № 5. - С. 44-47.
51. Азарян, А.А. Определение мельдония в моче человека методом ВЭЖХ с tandemным масс-спектрометрическим детектированием [Текст] / А.А. Азарян,

- А.З. Темердашев, Е.В. Дмитриева // Журнал аналитической химии. 2017. -Т. 72. - № 10. - С. 885–889. DOI: <https://doi.org/10.7868/S0044450217100048>
52. Forsdahl, G. Urinary excretion studies of meldonium after multidose parenteral application [Текст] / Guro Forsdahl, Biljana Jancic-Stojanovica, Marija An-delkovic, Nenad Dikic, Tomas Geisendorfer, Veronika Jeitler, Günter Gmeiner // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2018. - Vol. 161. – P. 289–295. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.08.053>.
53. Peng, Y. Determination of mildronate by LC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in healthy Chinese volunteers [Текст] / Y. Peng, J. Yang, Z. Wang, J. Wang, Y. Liu, Z. Luo, A.Wen // J. Chromatogr. B. 2010. - Vol. 878. - P. 551. DOI:10.1016/j.chromb.2009.12.030.
54. Lv, Y.-F. Determination by of mildronate in human plasma and urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry [Текст] / Y. -F. Lv, X. Hu, K.-S. Bi // J. Chromatogr. B. 2007. - Vol. 852. - P. 35. DOI: 10.1016/j.chromb.2006.12.031.
55. Морозова, Т.Е. Сравнение точности метода абсолютной градуировки и модифицированного метода последовательных стандартных добавок на примере определения 3-(2,2,2-три метил гидразиний)-пропионовой кислоты в моче в условиях нелинейности детектирования (электроспрей) [Текст] /Т.Е. Морозова, Г.В. Каракашев, П.И. Сорокоумов, Е.И. Савельева, И.Г. Зенкевич // Аналитика и контроль. 2013. - Т. 17. - №2. - С. 184-189.
56. Сорокоумов, П.Н. Определение мельдония, гамма-бутиробетаина и карнитина в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-селективным детектированием [Текст] / П.Н. Сорокоумов, Е.И. Савельева, Г.В. Каракашев, В.А. Копейкин, А.С. Радилов // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. - №1. С. 176-183.
57. Сумина, Е.Г. Сравнительное определение мельдония методом ТСХ в водно-органических, водных мицеллярных и циклодекстриновых подвижных фазах [Текст] / Е.Г. Сумина, А.О. Устюгова, В.З. Углова, О.Н. Сорокина // Бутлеровские чтения. 2018. - Т. 56. - №11. - С. 38-46.

58. Беликов, В.Г. Анализ лекарственных веществ фотометрическими методами. Опыт работы отечественных специалистов [Текст] / В. Г. Беликов/ /Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). 2002. – Т. XLVI. - № 4. - С. 52-56.
59. Aman, T. Spectrophotometric Determination of Barbituric Acid [Текст] /Tehseen Aman, Islam-Ullah Khan, Zahida Parveen // Analytical Letters.1997. – Vol. 30. – Is.15. - P. 2765-2777. DOI: 10.1080/00032719708001820.
60. Ding, F. Spectroscopic studies on the binding of barbital to bovine serum albumin [Текст] / Fei Ding, Hong Pan, Zhi-Yuan Li, Feng Liu, Ying Sun // Journal of Luminescence.2009. – Vol.129. – P. 650–655. doi:10.1016/j.jlumin.2009.01.011
61. Канов, Е.В. Фармакокинетика галодифа при различной продолжительности его введения [Текст] /Е.В. Канов, Т.П. Новожеева, А.С. Саратиков // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2002. - Т. 65. - №2. С. 56-58.
62. Galeev, R. Peak window correlation method for drug screening using Raman spectroscopy [Текст] / Roman R. Galeev, Dmitry A. Semanov, Ekaterina V. Galeeva, Tatyana S. Falalleeva, Ilshat R. Aryslanov, Anatoly A. Saveliev, Rustam R. Davletshin // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2018. - Vol.163. - P. 9-16.
63. Куксёнок В. Ю. Синтез производных мочевины, содержащих бензгидрильные и уреидные фармакофоры. Первый пример получения энантиомерно обогащённых форм препарата Галодиф : автореферат диссертации на соискание учёной степени кандидата химических наук : спец. 02.00.03 / В. Ю. Куксёнок ; Национальный исследовательский Томский политехнический университет (ТПУ) ; науч. рук. В. Д. Филимонов. — Томск, 2016.
64. Slampova, A. Rapid determination of meldonium in urine samples by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection [Текст] /Andrea Slampová, Pavel Kubán // Journal of chromatography A.2016. - №1468. – P.236-240. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.09.027.
65. Ивановская Е.А. Электрохимическое поведение кардиопрепаратов и разработка методик определения в биологических средах: автореф.дисс на соиск.учен.степ.канд.хим.наук(02.00.02) – Томск: ТПУ, 1993 – 16с.

66. Воронова, К.Р. Изучение полярографических и адсорбционных свойств бензоильных производных некоторых барбитуратов [Текст] / К.Р. Воронова, А.Г. Стромберг // Журнал общей химии. 1961. - Т. 31. - Вып.8. - С.2786-2792.
67. Мискиджьянб С.П. Полярография лекарственных препаратов. Мискиджьян С.П., Кравченко Л.П. Издательское объединение «Вища школа». 1976. 232 стр.
68. Patel, A.K. Voltammetric sensor for barbituric acid based on a sol-gel derivatives molecularly imprinted polymer brush grafted to graphite electrode [Текст] / Amit Kumar Patel, Pigush Sindhu Sharma, Bhim Bali Prasad // International journal of pharmaceutics. 2009. - Vol. 37. - P. 47-55.
69. Yu, H. Ch. Molecularly imprinted electrochemical sensor based on nickel-nanoparticle-modified electrodes for phenobarbital determination [Текст] / Hui Cheng Yu, Xue Yi Huang, Fu Hon Hi, Xue Cai Tan, Yi Chun Wei, Hao Li. // Electrochimica acta. 2014. - Vol. 141. – P. 45-50.
70. Raoof, J.B. A high sensitive voltammetric sensor for qualitative and quantitative determination of phenobarbital as an antiepileptic drug in presence of acetaminophen [Текст] / Jahon Bakhsh Raoof, Mehdi Baghayeri, Reza Ojani // Colloids and surface B: biointerfaces. 2012. - Vol. 95. – P. 121-128.
71. Ni, Yo. Differential pulse stripping voltammetric determination of paracetamol and phenobarbital in pharmaceuticals assisted by chemometric [Текст] / Yongnian Ni, Yuerong Wang, S. Kokot // Analytical letters. 2004. - Vol. 37. - P. 3219-3235.
72. Будников Г.К., Майстренко В.Н., Вяселев М.Р. Основы современного электрохимического анализа. М.: Мир, 2003. 486 с.
73. Ozcelikay, G. A review: New Trends in electrode systems for sensitive drug and biomolecule analysis [Текст] / Goksu Ozcelikay, Leyla Karadurmus, S. Irem Kaya, Nurgul K. Bakirhan, Sibel A. Ozkan // Critical reviews in analytical chemistry. 2019 (published online 20.05.2019)
74. Будников Г.К., Евтюгин Г.А., Майстренко В.Н. Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010.

75. Izake, E.L. Chiral discrimination and enantioselective analysis of drugs: an overview [Текст] / E.I. Izake // J.Pharm.Sci. 2007. - V.96. – No 7. - P. 1659.
76. Тюкавкина, Н.А. Биоорганическая химия/ Н.А. Тюкавкина, Ю.И. Бауков. – М: Дрофа. 2004 – 544С
77. Смирнова, И.Г. Оптическая изомерия и биологическая активность лекарственных средств [Текст] / И.Г. Смирнова, Г.Н. Гильдеева, В.Г. Кукес // Вестник московского университета. Серия 2. Химия. 2012. - Т.53. - №3. – С. 147.
78. Химия привитых поверхностей / под ред. Г.В. Лисичкина. М.:Физматлит, 2003. 592 с.
79. Delamar, M. Covalent modification of carbon surface by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts [Текст] / M. Delamar, R. Hitmi // J. Am. Chem. Soc. 1992. – Vol. 114. – P. 5883–5884.
80. Mesnage, A. Understanding the redox-induced polymer grafting process: A dual surface-solution analysis [Текст]/ A. Mesnage, S. Esnouf, P. Jégou, G. Deniau, S. Palacin // Chemistry of Materials. 2010. – Vol. 22(23). P. 6229-6239.
81. D.J. Guo, F. Mirkhalaf, Modification of nano-objects by aryl diazonium salts, in: M.M. Chehimi (Ed.), Aryl Diazonium Salts: New Coupling Agents in Polymer and Surface Science, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2012, pp. 10;
82. Buell, A. K. Surface attachment of protein fibrils via covalent modification strategies [Текст] / Buell, A. K., White, D. A., Meier, C., Welland, M. E., Knowles, T. P., Dobson, C. M. // The Journal of Physical Chemistry B. 2010. - Vol.114(34). – P. 10925-10938.
83. Griffete, N. Amino covalent binding approach on iron oxide nanoparticle surface: Toward biological applications [Текст] / Griffete, N., Clift, M. J., Lamouri, A., Digigow, R. G., Mihut, A. M., Fink, A., Dietsch, H. // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2012. – Vol. 415. – P. 98-104.
84. Kariuki, J.K. Formation of multilayers on glassy carbon electrodes via the reduction of diazonium salts / Kariuki J.K., McDermott // Langmuir. 2001. – Vol.17. – P. 5947–5951.

85. Adenier, A. Covalent modification of iron surfaces by electrochemical reduction of aryldiazonium salts [Текст] / Adenier A., Bernard M.-C., Chehimi M.M. // J. Am. Chem. Soc. 2001. – Vol. 123. – P. 4541–4549.
86. Laurentius, L. Diazonium-derived aryl films on gold nanoparticles: Evidence for a carbon–gold covalent bond [Текст] / Laurentius, L., Stoyanov, S. R., Gusarov, S., Kovalenko, A., Du, R., Lopinski, G. P., McDermott, M. T.// ACS nano. 2011. - Vol. 5(5). – P. 4219-4227.
87. Baltruschat, H. On the potential dependence of the CN stretch frequency on Au electrodes studied by SERS [Текст] / Baltruschat, H., Heitbaum, J.// Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry. 1983. – Vol. 157(2). – P. 319-326.
88. Mesnage, A. Spontaneous grafting of diazonium salts: chemical mechanism on metallic surfaces [Текст] / Mesnage, A. Lefèvre, X., Jégou, P., Deniau, G., Palacin, S.// Langmuir. 2012. – Vol. 28(32). – P. 11767-11778.
89. de la Lave, E. Binding between Carbon and the Au (III) Surface and What Makes It Different from the S– Au (III) Bond [Текст] / de la Lave, E., Ricci, A., Calvo, E. J., Scherlis, D. A. // The Journal of Physical Chemistry C. 2018. – Vol. 112(45). P. 17611-17617.
90. Harper, J.C. A multifunctional thin film au electrode surface formed by consecutive electrochemical reduction of aryl diazonium salts [Текст] / Harper, J. C., Polsky, R., Wheeler, D. R., Lopez, D. M., Arango, D. C., Brozik, S. M. // Langmuir. 2009. – Vol. 25(5). – P. 3282-3288.
91. Мартынюк, О.А. Возможности применения новых органо-модифицированных электродов в контроле качества соков и нектаров [Текст] / Мартынюк О.А., Слепченко Г.Б., Приходько В.А., Постников П.С., Трусова М.Е. // Известия ТПУ. 2011. - Т. 318. - №3. С. 65-68.
92. Слепченко, Г.Б. Новые возможности вольтамперометрического определения фармацевтических препаратов на органо-модифицированных электродах [Текст] / Г.Б. Слепченко, О.А. Мартынюк, П.С. Постников, М.Е.

- Трусова, А.А. Бондарев, И.В. Смирнов, Е.Л. Быстрицкий // Сибирский медицинский журнал. 2009. - Т. 24. - №2-2. С. 21-24.
93. Лурье, Ю.Ю. Справочник по аналитической химии / Ю.Ю. Лурье. – М. Химия, 1971. – 456 с.
94. Родионова, О.Е. Хемометрика: достижения и перспективы [Текст] / О.Е. Родионова, А.Л. Померанцев // Успехи химии. 2006. - №4(75). - С. 302-321.
95. ГОСТ Р 8.563-2009 Государственная система обеспечения единства измерений. Методики (методы) измерений. М.: Стандартинформ, 2011. – 16 с.
96. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 1. Основные положения и определения. – М. : Стандартинформ, 2009. – 33 с.
97. ГОСТ Р ИСО 5725-2–2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений. М: Госстандарт России, 2002. – 51 с.
98. ГОСТ Р ИСО 5725-6-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике. – М. : Стандартинформ, 2009. – 50 с.
99. РМГ 61-2010 Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки – М. : Стандартинформ, 2013. – 62 с.
100. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств, подготовленное Федеральным Союзом Фармпроизводителей Германии (ВАН). Пер. Аладышевой Ж.И. и Спицкого О.Р. Под ред. Береговых В.В. — М., Литерра, 2008. — 70 с.
101. Раменская, Г.В. Обзор требований к валидации биоаналитических методик [Текст] / Г.В. Раменская, И.Е. Шохин, К.С. Давыдова, В.Г. Кукес // Ремедиум. 2011. - №12. С. 60-63.

102. Zuman, P. Determination of pK-values of some barbituric acid derivatives [Текст] / P. Zuman, J.A. Vida, A. Kardos, M. Romer // *Analytical letters*. 1976. – Vol. 9. - P.849-861. doi: 10.1080/00032717608059150.
103. Bamford, C. H. *Electrode kinetics: Principles and methodology* / C. H. Bamford, R. G. Compton. – Elsevier, 1986. – V. 26. - 449p
104. Моделирование кинетики электрохимических реакций/ Н.А. Колпакова. Учеб. Пособие. ТПУ- 1-е издание, Томск, 2010. 202 с
105. Н. Lund, О. Hammerich, *Organic electrochemistry*, 2001. (4th edition, revised and expanted). New York, USA: Marcel Dekker
106. Ибрагимова, Ю.Э. Синтез и исследование комплексных соединений гексаметилен-бис-[N, N1 - бензотриазолил]мочевины с хлоридами меди и цинка [Текст] / Ю.Э. Ибрагимова Ю.Э, Д.С. Рахмонова, М.А. Кадирова, И.Д. Бабаев // *European research*. 2016. - С. 22-23;
107. Баулина Татьяна Викторовна. Фосфорлмочесвины. Синтез, комплексообразующие и экстракционные свойства. Дис. ...канд. хим. наук: 02.00.03. Москва - 2006. 138с.

Приложение А (патент на изобретение)



Таблица 1 - Образец таблиц «Результаты измерений содержания мельдония в биологических объектах вольтамперометрическим методом»

[illegible]

В целях последующего оценивания дисперсии повторяемости, методики измерений проводят измерения содержания мельдония в исследуемом материале по следующей схеме: каждый оператор проводит по 2 параллельных измерения массовой доли основного вещества в субстанции для 6 проб в течение 3 дней.

Оценка показателей качества методики измерений

На основании полученных результатов измерений проводят оценку показателей точности $\sigma(\Delta_{\text{л}})$, $[\pm\Delta]_{\text{л}}$, правильности $[\sigma_{\text{(с,л)}}, \pm\Delta]_{\text{(с,л)}}$, повторяемости $\sigma_{\text{r,g}}$ и внутрилабораторной прецизионности $\sigma_{\text{(Rл)}}, R_{\text{л}}$ методики измерений в соответствии с алгоритмами, изложенными в разделах 5, 7 и 11 РМГ 61-2010 «Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки».

1. Оценка показателя повторяемости методики анализа

По результатам параллельных определений рассчитывают среднее арифметическое значение X_i , являющееся результатом анализа и выборочную дисперсию S_i^2 результатов единичного измерения содержания мельдония в рабочих пробах, полученных в условиях повторяемости.

$$\overline{X_i} = \frac{\sum_{n=1}^{N=2} X_i}{N} \quad (1),$$

$$S_i^2 = \frac{\sum_{n=1}^{N=2} (X_i - \overline{X_i})^2}{N-1} \quad (2),$$

где $m = (1, \dots, M)$ – количество проб ($m = 1$); $l = (1, \dots, L)$ – количество результатов анализа; $n = (1, \dots, N)$ – количество параллельных определений ($n = 2$).

На основании полученных значений выборочной дисперсии проверяют гипотезу о равенстве генеральных дисперсий, используя критерий Кохрена.

Величину $G_{m(\max)}$ рассчитывают по формуле:

$$G_{m(\max)} = \frac{(S_i^2)_{\max}}{\sum_{l=1}^L S_i^2} \quad (3),$$

и сравнивают ее с $G_{\text{табл}}$, приведенной в таблице И.1 МИ РМГ 61-2010 (Приложение И), для числа степеней свободы $\nu = N-1$, соответствующего максимальной дисперсии $f = L$ и принятой доверительной вероятности $P=0,95$;

Неисключенные из расчетов S_i^2 считают однородными и по ним оценивают СКО, характеризующее повторяемость результатов единичного анализа для определяемого содержания мельдония в рабочих пробах. СКО рассчитывают по формуле:

$$S_{r,m} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L S_i^2}{L}} \quad (4),$$

где в числе слагаемых нет отброшенных значений.

Показатель повторяемости методики анализа в виде среднего квадратического отклонения - σ_r для массовой доли элементов в рабочих пробах устанавливают, принимая равным S_r ,

$$\sigma_{rл} \sim S_r \quad (5)$$

Показатель повторяемости методики анализа в виде предела повторяемости - r_m для содержания мельдония в рабочих пробах, рассчитывают по формуле

$$r_m = Q(P,n) \sigma_r, \quad (6)$$

где n – число параллельных определений, равное 2, $Q(P,n) = 2,77$ при $n = 2$, $P=0,95$.

2. Оценка показателя внутрилабораторной прецизионности методики анализа

Рассчитывают общее среднее арифметическое результатов анализа

$$\theta_m = \frac{\sum_{l=1}^L \bar{X}}{L} \quad (7)$$

Рассчитывают СКО результатов единичного анализа, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности:

$$S_m = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L (\theta_m - \bar{X}_i)^2}{L-1}}, \quad (8)$$

где среди результатов нет отброшенных.

Проводят проверку средних значений, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности (X_m), на наличие выбросов по критерию Граббса и сравнивают их с критическим значением $GR_{табл}$ для числа степеней свободы $f=L$ соответствующего числу серий результатов анализа и принятой доверительной вероятности $P=0,95$ (значения $CR_{табл}$ приведены в таблице И.2, Приложения И РМГ 61-2010).

Рассчитывают СКО результатов анализа, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности $S_{Rл}$ по формуле

$$S_m = S_{Rл} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L (\bar{X}_i - X_m)^2}{L-1}}, \quad (9)$$

Показатель внутрилабораторной прецизионности анализа в виде СКО – $\sigma_{Rл}$ для содержания, соответствующего содержанию мельдона в рабочих пробах, устанавливают, принимая равным $S_{Rл}$:

$$\sigma_{Rл} \sim S_{Rл} \quad (10)$$

Показатель внутрилабораторной прецизионности методики анализа в виде предела внутрилабораторной прецизионности - $R_{л}$ для содержания мельдона в рабочих пробах, рассчитывают по формуле

$$R_{л} = Q(P,m) \sigma_{Rл}, \quad (11)$$

$$Q(P,m) = 2,77 \text{ при } m = 2, P=0,95.$$

3. Оценка показателя правильности методики

Образцами для оценивания показателя правильности являются рабочие пробы и рабочие пробы с измененной навеской мельдона. Отношение массы пробы к массе пробы с измененной навеской должны соответствовать требованиям к коэффициенту разбавления (РМГ 61, Приложение Л). Приготовленные пробы должны отвечать условиям однородности, погрешность их приготовления не вносит дополнительной значимой погрешности в приписанную характеристику систематической погрешности методики. Концентрация мельдона в пробе с измененной навеской не должна превышать верхней границы диапазона, в котором принято постоянство показателя внутрилабораторной прецизионности.

Проведение эксперимента по оценке показателя правильности осуществляют в соответствии с п. 10 РМГ 61. Анализ пробы и пробы с измененной навеской проводят в одинаковых условиях. Количество L результатов анализа пробы и пробы с измененной навеской одинаково. Расчет проводят в соответствии с п.10.3.1-10.3.6 РМГ 61.

Рассчитывают значения следующих величин:

среднее значение результатов анализа пробы:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{l=1}^L x_l}{L}, \quad (12)$$

среднее значение результатов анализа пробы с измененной навеской:

$$\bar{x}' = \frac{\sum_{l=1}^L x'_l}{L}, \quad (13)$$

среднее квадратическое отклонение, характеризующее случайный разброс результатов анализа пробы:

$$S_1 = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L (x_l - \bar{x})^2}{L-1}}, \quad (14)$$

среднее квадратическое отклонение, характеризующее случайный разброс результатов анализа пробы с измененной навеской:

$$S_2 = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^L (x'_l - \bar{x}')^2}{L-1}}, \quad (15)$$

значение смещения:

$$\Theta = \bar{x} - \bar{x}', \quad (16)$$

рассчитанное значение t -критерия:

$$t = \frac{|\Theta|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{L} + \frac{S_2^2}{L}}}, \quad (17)$$

Расчетное значение t сравнивают с $t_{\text{табл.}}$ при числе степеней свободы $f=L-1$ и доверительной вероятности $P=0,95$ (значения $t_{\text{табл.}}$ приведены в таблице И.3, Приложения И, РМГ 61).

По результатам проверки устанавливают, значимость систематической погрешности на фоне случайного разброса.

Показатель правильности методики анализа (верхнюю ($\Delta_{с.в.}$) и нижнюю ($\Delta_{с.н.}$) границы, в которых неисключенная систематическая погрешность методики анализа находят с принятой вероятностью $P=0,95$) рассчитывают по формуле:

$$\Delta_{с.в.} = |\Delta_{с.н.}| = \Delta_c = 1,96 \sqrt{\frac{S_1^2}{L} + \frac{S_2^2}{L}} = 1,96 \sigma_{сл}, \quad (18)$$

Расширенную неопределенность, принятую для любого из результатов анализа, получаемых по данной методике, рассчитывают по формуле:

$$U(\hat{\theta}) = 2 \sqrt{\frac{S_1^2}{L} + \frac{S_2^2}{L}} = 2u(\hat{\theta}) \quad (19)$$

4. Оценка показателя точности методики измерений

Показатель точности методики измерений (границы, в которых погрешность результата анализа находится с принятой доверительной вероятностью $P=0,95$) рассчитывают по формуле:

$$\Delta_{B/L} = |\Delta_{B/L}| = \Delta_{/L} = 1,96\sqrt{\sigma_R^2 + \sigma_C^2} = 1,96\sigma(\Delta_{/L}), \quad (20)$$

Расширенную неопределенность (коэффициент охвата $k=2$) при оценке показателя точности рассчитывают по формуле:

$$U = 2\sqrt{u_{R/L}^2 + u^2(\hat{\theta})} = 2u_c, \quad (21)$$

Перевод показателей качества методики измерений из абсолютных единиц в относительные единицы проводят по формулам:

$$\delta_{R/L} = \sigma_{R/L} 100/X_m, \quad (22)$$

$$\delta_{/L} = \Delta_{/L} 100/X_m. \quad (23)$$

Приложение В (акт внедрения результатов измерений)

Общественная организация
«Федерация альпинизма Кемеровской
области»

ОГРН: 1064200004329. ИНН: 4205109359

Юридический адрес: 650000, г. Кемерово,
ул. Весенняя, 19.

Сайт: www.alp42.ru.

Тел.: +7(913)331-52-25.

E-mail: stark_velik@mail.ru.

Исх. № 252/19 от 11 сентября 2019 г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ
МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕЛЬДОНИЯ В МОЧЕ МЕТОДОМ
ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ**

Разработаны аспирантом Мезенцевой О.Л. и магистрантом
Крюковским В.П.

Настоящим актом подтверждаем, что с использованием данной методики проанализированы моча спортсменов Федерации альпинизма Кемеровской области (г. Кемерово) в межсоревновательный период. Полученные данные удовлетворительно совпадали с заключением лаборатории WADA. Отмечено, что данная методика обладает высокой чувствительностью, селективностью и невысокой стоимостью проведения анализа, что очень важно для контроля спортсменов в соревновательный период.

Председатель
ОО «Федерация альпинизма
Кемеровской области»
К. Г. Дмитриев

