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

На правах рукописи

Вишенкова Дарья Александровна

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕПАРИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЯДА СИНТЕТИЧЕСКИХ КАТИОННЫХ КРАСИТЕЛЕЙ

02.00.02 – аналитическая химия

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, доцент
Короткова Елена Ивановна

Томск-2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Сердечно-сосудистые патологии в XXI в. остаются в списке ведущих причин смертности населения в большинстве индустриально развитых стран мира. Ведущими этиопатогенетическими факторами данных патологий на сегодняшний день признаются атеросклеротическое поражение коронарных сосудов и тромбоз [1]. Для предотвращения тромбообразования при хирургических вмешательствах и рассасывания имеющихся тромбов применяются средства, снижающие свертываемость крови. В настоящее время эти средства широко используются в кардиологической практике для профилактики тромбообразования у больных, перенесших инфаркт миокарда, синдром диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови и других патологических состояний. Основным представителем антикоагулянтов прямого действия является гепарин.

Применяют гепарин не только с целью предупреждения и лечения тромбоэмболических заболеваний, а также при использовании аппаратов искусственного кровообращения, в лабораторной практике для предотвращения свертывания проб крови, и в качестве противовоспалительного и противотромботического средства локально в виде мазей [2]. Гепарину также присущ ряд отрицательных свойств, таких как тромбоцитопения и аллергические реакции немедленного типа (крапивница, ангионевротический отёк или бронхоспазм), а при передозировке – возможность развития геморрагии [3].

На сегодняшний день широко обсуждается вопрос о качестве лекарственных препаратов, необходимости его обеспечения и строгого контроля. Результаты измерений содержания гепарина в субстанциях, полупродуктах и целевых лекарственных средствах позволяют обеспечить продуктивность производства и в дальнейшем дают возможность предлагать клинике качественные и безопасные препараты. Однако количественное определение гепарина представляется сложной задачей из-за неоднородности размера молекулы полимера и распределения в ней заряда [4].

В настоящее время для определения гепарина чаще всего применяют спектрофотометрический метод, с использованием синтетических хромогенных субстратов специального состава. Несмотря на широкое применение данного метода, с аналитической точки зрения он является косвенным и даёт результаты, необязательно соответствующие общему количеству гепарина.

Таким образом, существует необходимость разработки специфических методов определения гепарина. Для решения этой задачи целесообразно использовать электрохимические методы анализа, которым характерны высокая чувствительность и селективность, быстрота отклика на изменение состава анализируемого объекта, легкость автоматизации и, наконец, невысокая стоимость аналитического оборудования [5].

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось изучение электрохимического поведения гепарина в комплексе с синтетическими катионными красителями различных классов и разработка методики его количественного определения в лекарственных препаратах в форме инъекций.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

– изучить электрохимические свойства ряда синтетических катионных красителей (метиленового голубого, малахитового зеленого и толуиленового синего), относящихся к различным классам (тиазинового, трифенилметанового и индаминового) и выбрать рабочие условия для вольтамперометрического определения гепарина в комплексе с ними;

– исследовать физико-химические закономерности электрохимического поведения комплексов «гепарин-краситель» и оценить их адсорбционную способность;

– исследовать влияние гепарина на ток электровосстановления кислорода и провести оценку его антиоксидантных свойств;

– разработать методику количественного вольтамперометрического определения гепарина в лекарственных препаратах с использованием толуиленового синего и рассчитать основные метрологические характеристики.

Научная новизна.

Получена новая информация о электрохимических свойствах метиленового голубого и малахитового зеленого на различных материалах индикаторных электродов (стеклоуглеродный (СУЭ), ртутно-пленочный (РПЭ), углеродсодержащий, модифицированный углеродными чернилами (МЭ) электроды). Исследованы свойства комплексов гепарин–метиленовый голубой на СУЭ, гепарин–малахитовый зеленый на РПЭ.

Впервые методом циклической вольтамперометрии изучены электрохимические свойства толуиленового синего на МЭ и предложены возможные механизмы протекания редокс-процессов. Исследованы свойства комплекса гепарин–толуиленовый синий и установлено, что для вольтамперометрического определения гепарина наиболее рационально его использование.

Проведено исследование антиоксидантной активности гепарина методом катодной вольтамперометрии по отношению к процессу электровосстановления кислорода. Показано, что антиоксидантные свойства наиболее выражены у высокомолекулярного гепарина.

Предложен новый подход для вольтамперометрического определения гепарина, заключающийся в использовании красителя индаминового класса – толуиленового синего на МЭ и позволяющий проводить анализ лекарственных препаратов без предварительной пробоподготовки, при условии отсутствия посторонних примесей в анализируемых образцах (дерматан сульфата и гиперсульфатированного хондроитин сульфата), наличие которых можно выявить методом капиллярного электрофореза.

Практическая значимость.

Разработана методика количественного определения гепарина в лекарственных препаратах методом вольтамперометрии на МЭ с использованием толуиленового синего и установлены ее основные метрологические характеристики. Вольтамперометрическая методика не требует сложной пробоподготовки, позволяет исключить использование дорогостоящих реагентов и сократить время анализа по сравнению со спектрофотометрической методикой.

Разработанная методика может быть рекомендована к использованию в аналитических лабораториях фармацевтической промышленности для контроля содержания гепарина в сырье и готовых лекарственных препаратах в форме инъекций.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследования электрохимических свойств метиленового голубого, малахитового зеленого и толуиленового синего в зависимости от ряда факторов (pH раствора, материал электрода, природа фонового электролита, скорость развертки потенциала);

2. Экспериментальные данные по исследованию электрохимического поведения и адсорбции комплексов «гепарин-краситель» на поверхности индикаторных электродов;

3. Рабочие условия количественного вольтамперометрического определения гепарина с использованием красителей;

4. Результаты исследования антиоксидантной активности гепарина методом катодной вольтамперометрии по отношению к процессу электровосстановления кислорода;

5. Методика количественного вольтамперометрического определения гепарина в лекарственных препаратах с использованием толуиленового синего и результаты ее метрологической оценки.

Апробация работы. Основные результаты диссертации докладывались и обсуждались на III Международной научно-технической конференции молодых учёных, аспирантов и студентов «Высокие технологии в современной науке и технике» (Томск, 2014); XV Международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулева студентов и молодых учёных «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2014); VI Международной научной конференции «Современные методы в теоретической и экспериментальной электрохимии» (Плёс, 2014); Международной научно-практической конференции

«Интеграция науки, образования и производства – основа реализации Плана нации (Сагиновские чтения № 7)» (Караганда, Казахстан, 2015); XIX Международном симпозиуме имени академика М. А. Усова студентов и молодых ученых, посвященном 70-летнему юбилею Победы советского народа над фашистской Германией (Томск, 2015); 54-й Международной научной студенческой конференции МНСК-2016 (Новосибирск, 2016); 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); 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); XVI Международной научно-технической конференции с элементами школы молодых ученых «Наукоемкие химические технологии – 2016» (Москва, 2016); 55-ой Международной научной студенческой конференции «МНСК-2017» (Новосибирск, 2017); XVIII Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых имени профессора Л.П. Кулева «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2017); 10th International Conference on "Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications" (Heraklion, Greece, 2017); 6th International Chemical Technology Conference (Mikulov, Czech Republic, 2018); XIX Международной научно-практической конференции имени профессора Л.П. Кулёва «Химия и химическая технология в XXI веке» (Томск, 2018).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 30 работ, в том числе 2 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК и 2 статьи в журналах, входящих в базы данных Web of Science и Scopus.

Личный вклад автора состоит в выполнении эксперимента, обработке, систематизации, интерпретации, обсуждении и обобщении полученных результатов.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, д.х.н., профессору Коротковой Е.И. за постановку цели и помощь при написании диссертации. Особая благодарность д.х.н., профессору Г. Б. Слепченко, д.х.н., профессору Н. А. Колпаковой, д.х.н., профессору А. А. Бакибаеву, к.х.н., доценту Е. В. Дорожко за ценные советы и интерес к работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта РФФИ на 2014-2015 г. № 14-03-31562 мол_а (1.1259.С.2014); Государственного задания «Наука» № 4.1619.2014/к от 11.06.2014 на 2014-2017 г.; Государственного задание «Наука» № 4.5752.2017/БЧ на 2017-2019 г.; Фонда Михаила Прохорова договор № АМ–273/17 от 07.02.2018 г.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 146 страницах машинописного текста, содержит 45 рисунков, 34 таблицы, состоит из введения, пяти глав, заключения, списка цитируемой литературы, включающего 169 наименований, и четырех приложений.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 История открытия и изучение строения гепарина

В древние времена существовало убеждение, что судьба и здоровье человека зависят от свойств его крови. Упоминания о крови и её свертываемости датируются, начиная с 400 г. до нашей эры Гиппократом, а затем Аристотелем, Галеном и Авиценной [6-9]. На протяжении столетий врачи ставили диагноз и назначали лечение, учитывая вязкость, цвет и скорость свертывания крови. Для лечения заболеваний крови использовали растения с антикоагулирующими свойствами: донник лекарственный, каштан, черника, смородина, облепиха, одуванчик [10]. И только во второй половине XIX столетия после того как был выяснен механизм свертывания крови начался целенаправленный поиск эффективных антикоагулянтов [7].

Одним из самых старых лекарственных средств, широко распространенным в клинической практике по сей день, является основной представитель антикоагулянтов прямого действия – гепарин [11]. История гепарина началась примерно за 20 лет до конца 19 века. Впервые об антикоагулянтных свойствах экстрактов из тканей млекопитающих организмов сообщил немецкий ученый Шмидт в 1880 г [12]. В 1905 г. Моравитц оценил открытие Шмидта как «наиболее тщательно изученное исследование в области свертывания крови» [13]. Однако, аналитические методы того времени исключали идентификацию, расшифровку и целенаправленное выделение антикоагулянта [14]. Дальнейших успехов в области исследования ингибиторов свертывания крови достигли Маклин и Хауэлл. В 1916 году студент-медик Джей Маклин, работавший в лаборатории профессора Уильяма Хауэлла в университете Джонса Хопкинса в Балтиморе, занимаясь выделением тканевого тромбопластина из экстрактов сердца, мозга и печени, отметил, что тромбопластическая активность экстрактов печени снижается по мере хранения, а после долгого хранения экстракт печени может даже удлинять продолжительность свертывания [15]. В этом же году Маклин написал о своем открытии, назвав соединения, несущие антикоагулянтную активность «фосфатидами из сердца и печени» [16]. В 1918 г. Уильям Хауэлл совместно с Холтом произвели детальное исследование антикоагулянтной субстанции из тканей печени, обнаруженной Д. Маклином, и назвали её гепарином (от греческого «ἧπαρ» — «печень») [11]. В дальнейшем оказалось, что это вещество содержится почти во всех тканях животного организма, наибольшее количество его находится в печени, печеночной капсуле, легких, мышцах, в сосудистых стенках. В меньших количествах гепарин обнаруживается в тканях селезенки, сердца, почек, кишечника. В настоящее время есть основания считать, что источником гепарина в тканях являются тучные клетки [17].

Клиническое применение гепарина началось только через 20 лет после его открытия. До этого из-за выраженного токсического действия и высокой стоимости он не был востребован в медицине. Эти трудности удалось преодолеть благодаря накопленному массиву экспериментальных данных, а также усовершенствованию техник выделения и очистки гепарина. Именно, результаты многолетних исследований позволили гепарину в 1937 г. шагнуть в клиническую медицину и на долгое время сделали его одним из основных антикоагулянтных и антитромботических средств [15].

На сегодняшний день гепарин применяют не только для предупреждения и лечения тромбоэмболических заболеваний (преимущественно внутривенно для быстрого снижения свертывания крови), а также при использовании аппаратов искусственного кровообращения, в лабораторной практике для предупреждения свертывания проб крови и в качестве противовоспалительного и противотромботического средства локально в виде мазей [2].

Изучение нативной химической структуры гепарина – весьма сложная задача. По своей природе гепарин относится к гликозаминогликанам – биополимерам полисахаридного типа. До момента выделения из тканей строение любого природного биополимера обычно неизвестно. Существенно изменить нативную структуру таких веществ могут различные воздействия, происходящие в процессе их выделения и очистки. Процесс получения гепарина из животного сырья предусматривает последовательную очистку препарата от сопутствующих природных соединений. Постадийно выделенные образцы гепарина являются многокомпонентными системами, включающими неорганические соли, белки, нуклеиновые кислоты, мукополисахариды (имеющие сходное строение с гепарином), зачастую не удаётся полностью избежать деструкции макромолекулы полисахарида и удалить примеси. Так, при его гидролизе вместе с уменьшением молекулярной массы за счет расщепления гликозидных связей происходит отрыв ряда групп неуглеводного происхождения [18].

На ранних этапах исследования строения гепарина к весьма далеким от истины выводам привело изучение не очищенных в должной мере образцов с помощью небезукоризненных методов анализа, существующих к тому времени. Представление о химическом строении гепарина до 1968 г. базировалось на том, что остатки 2-сульфат α-D-глюкуроновой кислоты и 6-сульфат 2-дезокси-2-сульфоамино-α-D-глюкозы являются чередующимися составляющими макромолекулы биополимера [19].

Метаморфоза представлений о химическом строении антикоагулянта крови природного происхождения произошла после применения метода ЯМР для его анализа. Данные исследования позволили сделать наиболее полное заключение о пространственном и химическом строении многих элементов структуры макромолекулы гепарина [20-23].

Накопленная на сегодняшний день совокупность информации о структуре гепарина не позволяет представить строение всего его семейства с использованием единой формулы. Причина этому то, что гепарин построен из моносахаридных структурных фрагментов (рисунок 1 А), составляющих основную повторяющуюся дисахаридную часть и дисахариды, присутствующие в небольшом количестве (рисунок 1 Б, В). Уроновая кислота в повторяющемся дисахаридном звене уроновая кислота-(1→4)-D-глюкозамин может быть либо α-L-идуроновой кислотой (IdoA), либо β-D-глюкуроновой кислотой (GlcA), в свою очередь обе могут быть 2-O-сульфатированными (Ido (2S) и GlcA (2S)). β-D-глюкозамин (GlcN) может быть либо N-сульфатированным (GlcNS), либо N-ацетилированным (GlcNAc), оба из которых могут быть

6-О-сульфатированными (GlcNS (6S) и GlcNAc (6S)) или 3-О-сульфатированными (GlcNS (3S) и GlcNS (3,6 S)) [24, 25].

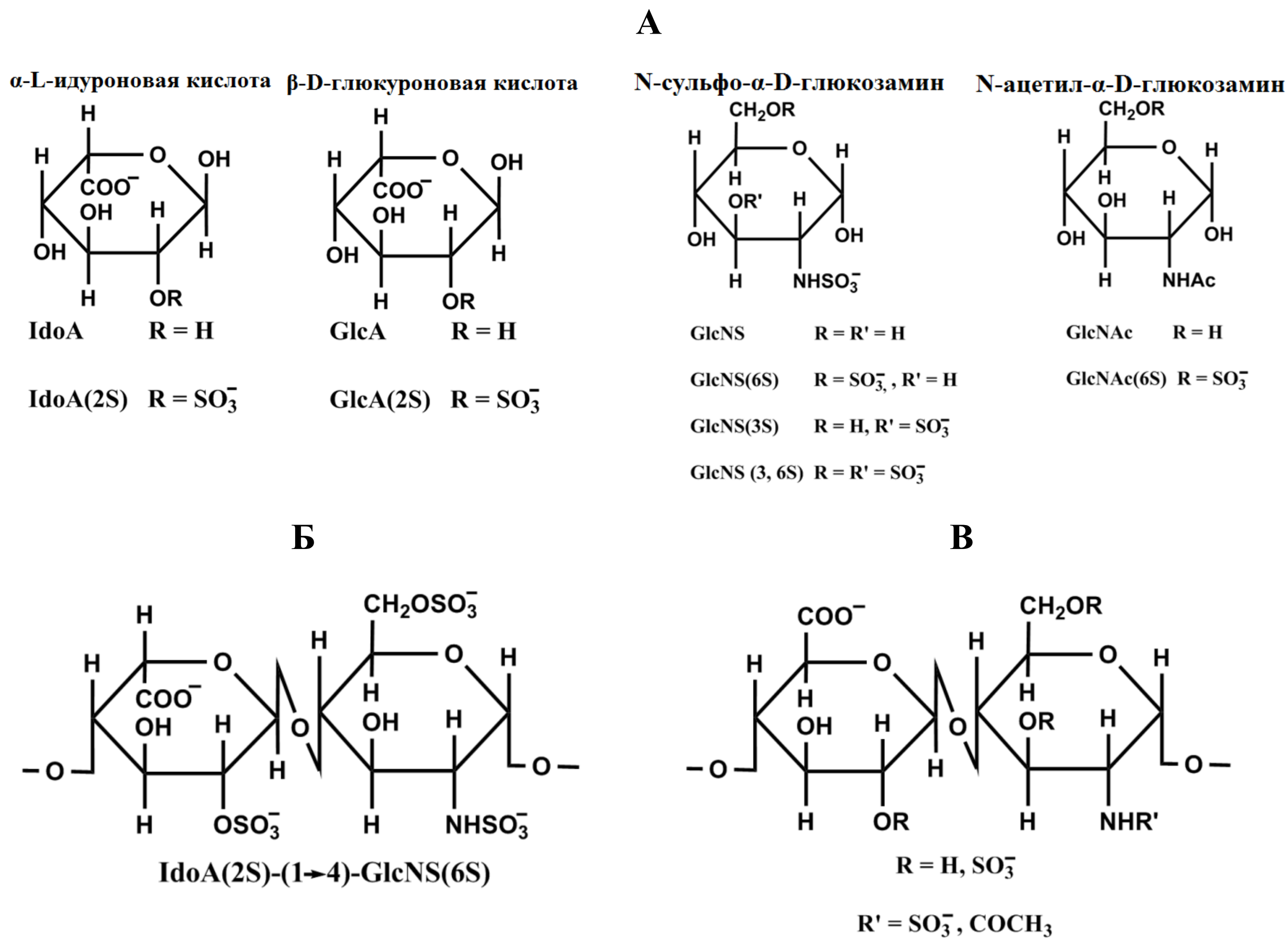


Рисунок 1 – Структурные составляющие гепарина. А – моносахаридные фрагменты гепарина; Б – основной повторяющийся дисахаридный фрагмент гепарина; В – дисахаридный фрагмент, встречающийся в структуре гепарина в малом количестве.

Таким образом, молекулу природного глюкозаминогликана (GAG) – гепарина формально можно представить как линейную неразветвленную цепь гетерополисахарида, состоящего из повторяющихся дисахаридных звеньев уроновой кислоты GlcA или IdoA и глюкозамина GlcN, соединенных посредством α-1-4-гликозидных связей [26, 27]. Данные исследований последних лет указывают, что основным повторяющимся дисахаридом в молекуле гепарина является биозная часть из остатков IdoA(2S)-(1→4)-GlcNS(6S) (доля дисахарида около 68 %) (рисунок 1 Б) [25]. Об отсутствии разветвлений в молекуле гепарина свидетельствует факт образования только ненасыщенных соединений при его деградации под действием ферментов. Ниже изображен уникальный пентасаридный фрагмент (место связывания с антитромбином III), являющийся основным структурным центром, определяющим антикоагулянтную способность гепарина (рисунок 2) [28].

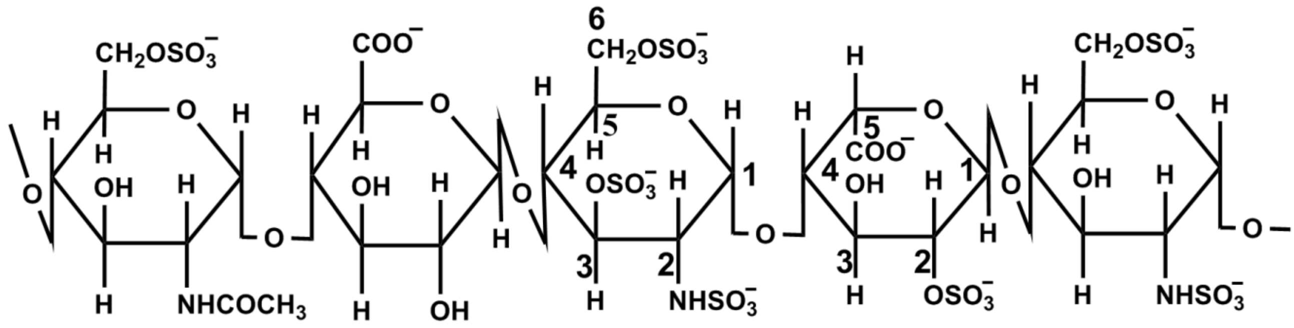


Рисунок 2 – Схематическое изображение пентасахаридной последовательности в структуре гепарина (место связывания для антитромбина III)

Исследования позволили установить, что источник биохимического синтеза гепарина в живом организме оказывает влияние на его строение. Источниками сырья для получения гепарина в настоящее время служат лёгкие крупного рогатого скота (гепарин В) и слизистая оболочка тонких кишок свиней (гепарин А). Макромолекула гепарина В включает свыше 90 %, а гепарина А – около 70-75 % дисахаридных остатков 2-сульфат-α-L-идопиранозилуроновой кислоты и 6-сульфат-2дезокси-2-сульфамино-α-D-глюкпиранозы, соединенных 1–4-гликозидными связями. В макромолекуле гепарина А, помимо указанных фрагментов, присутствуют также остатки 2-ацетамидо-2дезокси-α-D-глюкопиранозы и β-D-глюкуроновой кислоты [24, 29].

1.2 Классификация гепаринов по спектру действия и химической структуре

Образцы гепарина, выделенные из разных источников, полидисперсны и характеризуются высокой вариабельностью молекулярной массы от 2 до 30 кДа. В зависимости от молекулярной массы различают высокомолекулярный (нефракционированный) гепарин (ВМГ или НФГ) и низкомолекулярный гепарин (НМГ) (рисунок 3[30]) [31].

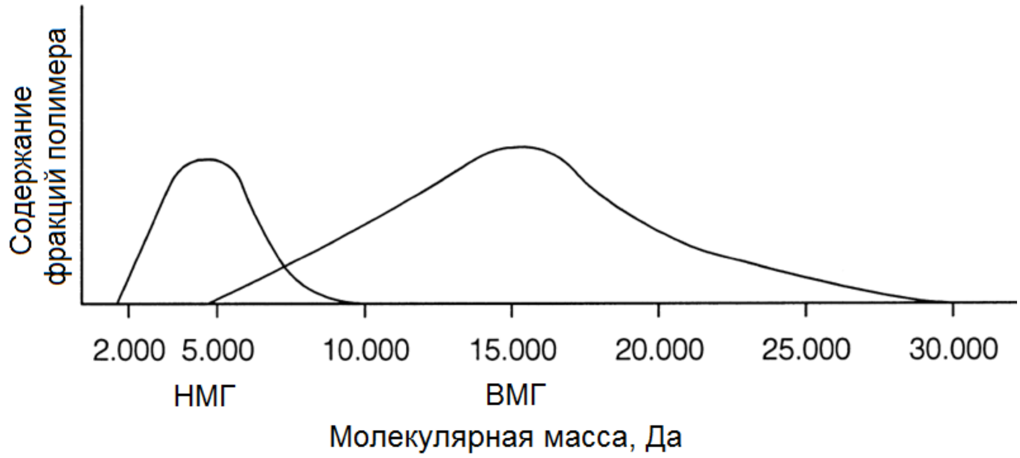


Рисунок 3 – Дифференциальные кривые молекулярно-массового распределения гепарина (НМГ и ВМГ)

Средняя молекулярная масса коммерческих препаратов мукозного ВМГ составляет примерно 12-15 кДа [32]. Фармакодинамический профиль НФГ обусловлен его способностью активировать молекулу естественного антикоагулянта – антитромбина III (AT-III). Комплекс «НФГ + AT-III» ингибирует тромбин (фактор II) и активированный фактор Xa, а также факторы свёртывания крови IX, XI, XII [33, 34].

Несмотря на широкое применение НФГ в клинической практике, препарату свойственен ряд существенных недостатков [35], в связи с чем в начале 70-х годов XX века было начато получение низкомолекулярного гепарина в результате фракционирования НФГ путем химической или ферментативной деполимеризации. Молекулярная масса НМГ колеблется от 2 до 9 кДа [36]. Уменьшение длины цепей гепарина снижает его способность связываться с белками крови, матриксами сосудов, эндотелиальными клетками, макрофагами и тромбоцитами. Это повышает время существования НМГ в плазме крови больных, обеспечивает более прогнозируемый лечебный эффект назначенной дозировки. Показано, что снижение молекулярной массы до 5,4 кДа (18-19 моносахаридных остатков) вызывает значительные качественные изменения активности гепарина. Фракции гепарина с молекулярной массой ниже этой величины после комплексообразования с АТ III ингибируют фактор Ха (т.е. обладают только анти-Ха активностью) в то время как гепарины с большей молекулярной массой инактивируют и тромбин (анти-IIa) и фактор Ха (анти-Ха). Для препаратов НМГ отношение анти-Ха: анти-IIa составляет 2:1 или 4:1, а для НФГ – 1:1 [31, 37, 38]. В таблице 1 приведена сравнительная характеристика НМГ И ВМГ (НФГ) [39].

Таблица 1 – Сравнительная характеристика препаратов высоко- и низкомолекулярных гепаринов

Показатель	ВМГ (НФГ)	НМГ	Комментарии
Средняя молекулярная масса, Да	15000	5000	НМГ имеет короткие полисахаридные цепи (менее 18 моносахаридов), что значительно увеличивает биодоступность препарата при подкожном введении [40].
Инактивация факторов свертывания крови	IIa, Xa, IXa, XIa и XIIa	IIa и Xa	Для НМГ в гепаринотерапии отсутствует необходимость в лабораторном контроле показателей свертывающей системы [41].
Отношение анти-Xa: анти-IIa	1:1	2:1 или 4:1	НМГ в меньшей степени инактивируют тромбин, и меньше влияют на сосудистую проницаемость, что снижает риск кровотечений [42].
Биодоступность, %	30	90	Позволяет назначать подкожное применение НМГ
Период полувыведения, ч	1	4	Благодаря продолжительности действия НМГ назначают 1-2 раза в день [43].

Окончание таблицы 1

Возможность возникновения тромбоцитопении, %	<5	<1	Факторами риска гепарининдуцированной тромбоцитопении являются продолжительность применения и тип гепарина, популяция пациентов, тяжесть травмы, пол [44].
Антидот при передозировке	Протамина сульфат (100 %)	Протамина сульфат (≤60-75%)	Недостаток НМГ – отсутствие специфичного антидота, при возникновении кровотечений протамина сульфат только частично устраняет его активность [43].
Стоимость 1 мл, руб	84	780	Широкое использование НМГ в нашей стране ограничено ввиду высокой стоимости этих препаратов [45].

На сегодняшний день в клинической практике применяются как ВМГ (НФГ) так и НМГ, однако, в последнее десятилетие гепарины с более узким молекулярно-массовым распределением стали вытеснять НФГ как лекарственный препарат [46]. Однако, несмотря на достоинства НМГ в лечении острого коронарного синдрома и в профилактике тромбозов, их широкое использование в нашей стране ограничено ввиду высокой стоимости этих препаратов [45].

1.3 Физико-химические свойства гепарина

В рамках протолитической теории Бренстеда-Лоури гепарин может рассматриваться как сильная сопряженная кислота. Легкость отрыва протона от OH– группы карбоксила обусловлена влиянием ацильной группы R–CO–, приводящая к распределению заряда карбоксилат аниона между двумя атомами кислорода [47].

Высокая степень ионизации сульфогрупп в молекуле гепарина связана с влиянием изолированной π-электронной системы сульфонильной группы. Делокализация π-электронов в сопряженной системе этого ионогена способствует рассредоточению отрицательного заряда в сульфонат-ионе между тремя атомами кислорода. Наличие третьего электродефицитного атома кислорода в сульфогруппе, обуславливая высокую поляризуемость гепарина, способствует его хорошей растворимости не только в воде и физиологическом растворе хлористого натрия, но и в некоторых полярных растворителях, включая неорганические кислоты. Нерастворимость гепарина в органических растворителях дает возможность произвести его фракционированное переосаждение 95 % этанолом с целью отделения от сопутствующих примесных компонентов (хондроитинсульфаты, нуклеиновые кислоты и др.) на стадиях выделения и очистки [48]. Гепарин термостабилен, его растворы могут стерилизоваться кипячением (до 120 °С) [17]. Константа диссоциации гепарина по карбоксильной группе идуроновой кислоты равна 5,1 [49].

Из-за высокого содержания сульфонатных и карбоксильных групп, молекула гепарина имеет высокий отрицательный заряд, плотность которого превышает плотность любой другой известной биологической молекулы [50]. Высокая плотность отрицательного заряда на макромолекуле позволяет рассматривать гепарин как типичный полиэлектролит (изоэлектрическая точка (pI) составляет 3,2-4,2) , гидродинамические свойства которого в растворе будут чувствительны к изменению концентрации, ионной силы, pH [19].

Гепарин является оптически активным соединением и характеризуется положительной величиной удельного оптического вращения. Например, водные растворы гепарина имеют $[\alpha]_D^{20\,^0C}$ = +55 град. [51].

Структурные особенности гепарина, а именно: степень сульфатирования, диссоциации, величина и конформация макромолекул, обусловливают наличие специфической антикоагулянтной активности [35]. В организме человека и животных гепарин разрушается в печени и почках при влиянии фермента гепариназы. Фермент действует на такие важные для противосвертывающих свойств компоненты молекулы, как сульфатные группы, в результате чего снижается антикоагулянтная активность [2].

1.4 Полифункциональные свойства гепарина

Гепарин, кроме антикоагулянтных, обладает и рядом других фармакологических свойств: повышает устойчивость организма к гипоксии, умеренно расширяет сосуды сердца и почек, снижает уровень сахара и холестерина в крови, оказывает мочегонное действие, повышает сопротивляемость организма к вредным внешним воздействиям, способен регулировать активность многих ферментов [52], снижает токсичность некоторых ядовитых веществ [53, 54], выступает протектором клеток от свободных радикалов [55, 56]. Доказаны обменно-трофические, противовоспалительные, иммунодепрессивные свойства гепарина [2].

Многие биологические свойства гепарина в организме основаны на его комплексообразующей способности, реализующейся за счет электростатического взаимодействия катионных групп белков, пептидов и других соединений с анионными группировками полисахарида [48]. Методом электрофореза в геле агар-агара и на бумаге установлено, что гепарин образует комплексы с белками плазмы крови при физиологической концентрации водородных ионов [57]. С помощью указанного выше метода было выявлено комплексообразование гепарина с фибрином, антитромбином III, протромбином, альбумином. Формирование подобных комплексов лежит в основе антикоагулирующего действия гепарина. Известно о существовании комплекса адреналин-гепарин, обладающего способностью лизировать нестабилизированные сгустки фибрина, доказано, что образование этого комплекса имеет значение для сохранения жизни организма при физиологическом выбросе адреналина в кровоток при реакциях перенапряжения [58]. Связываясь с серотонином, гепарин способен проявлять антигипоксическое действие [59]. Комплексные соединения АТФ, АДФ и АМФ с гепарином обладают антикоагулянтными свойствами, отчетливо выраженной неферментативной фибринолитической активностью при действии на нестабилизированный фибрин [60]. Благодаря способности гепарина взаимодействовать с липопротеидлиазой и хиломикронами с образованием комплексов из кровотока удаляются триглицериды, что имеет важное физиологическое значение при атеросклерозе [61]. Известно, что антикоагулянтными свойствами обладают макромолекулярные комплексы гепарина с рядом аминокислот [62-64].

Большой интерес представляют исследования по комплексообразованию гепарина с важнейшими биометаллами, позволяющие оценить его влияние на баланс ионов в плазме крови [65].

Таким образом, полифункциональные свойства гепарина во многом связаны с тем, что его молекулы могут вступать во взаимодействие с молекулами химических веществ, относящихся к различным классам соединений [66].

Антиоксидантные свойства гепарина.

В природе существуют вещества, способные замедлять процессы окисления путём связывания свободных радикалов, такие вещества называются антиоксидантами (антиокислителями) [67]. Избыточная деятельность свободных радикалов нарушает цепочку окислительных реакций, что приводит к повреждению клеток организма. Показателем присутствия веществ, нейтрализующих деятельность свободных радикалов является антиоксидантная активность (АОА) [68].

Впервые о возможности проявления антиоксидантных свойств у гепарина упоминается в работе [55], где авторы рассматривали околоклеточный гепарин как протектор клеток от свободных радикалов.

Однако, спустя 5 лет, в результате своих исследований группа ученых поставила под сомнение антиоксидантное действие гепарина in vivo [69]. Эксперименты, проводимые на модельных растворах, показали, что даже при концентрации гепарина 80 Ед – в 25 раз превышающей содержание его в крови после гепаринотерапии (инъекция 10000 Ед), антиоксидантного действия по отношению к стабильному радикалу 1,1-дифенил-2-пикрилгидразина, кислородным радикалам (супероксидному, гидроксильному, пероксидному) он не проявлял. Также при окислении линоленовой кислоты, катализируемом Fe^{2+}, с образованием $RO_2^{-\cdot}$, введение гепарина не привело к изменению полосы поглощения при 310 нм, что также свидетельствовало об отсутствии у него антиоксидантных свойств.

Параллельно с предыдущим исследованием в свет вышли статьи [70, 71], в которых авторы подробно изучали связывание ионов переходных металлов с гепарином. Так, в организме ионы железа участвуют в одноэлектронных реакциях, приводящих к образованию свободных радикалов по реакции Фентона. Они активируют расщепление образующихся в организме липидных гидропероксидов (LOOH), которые превращаются в другие свободные липидные радикалы, такие как пероксильные (LOO·) и алкоксильные (LO·). В результате накапливающиеся свободные низкомолекулярные и липидные радикалы могут повреждать практически все органические молекулы (белки, липиды, нуклеиновые кислоты и т.д.) и все биологические структуры. Учеными методом УФ-спектроскопии было выявлено, что гепарин, связанный с ионами железа, является частью массива антиоксидантного механизма организма, введение его в систему, содержащую Fe^{2+} и Fe^{3+} приводило к значительным изменениями спектров при низких длинах волн (195-275 нм). Кроме того, замечено, что гепарин ингибирует образование диенов и тиобарбитуровой кислоты из раствора незаменимой жирной омега-3-ненасышенной гамма-линоленовой кислоты с ионами железа.

В 90-х годах XX века Грант с коллегами проводили исследования с помощью спектроскопии по методу [72], результаты которых позволили им позиционировать гепарин как жизненно-необходимый антиоксидант [73, 74].

В работе [56] ученые доказали, что гепарин уменьшает степень глико-окислительных процессов в человеческом сывороточном альбумине вследствие антиоксидантного воздействия на радикалы продуцируемые глюкозой.

Авторы [75] изучали влияние гепарина и дальтепарина на окислительный стресс во время гемодиализа у больных с терминальной стадией хронической почечной недостаточности. Суммарное содержание антиоксидантов до и после гемодиализа оценивалось с помощью ферментного иммуносорбентного анализа.

Результаты исследований показали, что гепарин и дальтепарин проявляют антиоксидантные свойства.

На основании вышеизложенного, можно сделать вывод, что, антикоагулянт гепарин, являющийся основным веществом, используемым во время гемодиализа, проявляет ряд фармакологических свойств, среди которых не последнее место занимают антиоксидантные свойства.

1.6 Методы определения гепарина

Благодаря широкому спектру применения гепарина его мониторинг в различных объектах вызывает большой интерес для многих ученых в области медицины и химии. Так, эффективность и безопасность антикоагулянтной терапии во многом зависит от правильного подбора доз и качества применяемого гепарина. Это положение показывает необходимость его определения как в фармацевтических препаратах, так и в крови больных.

Ввиду неоднородности и размера молекулы гепарина, а так же распределения заряда в гетерогенной полидисперсной системе биополимера, его количественное определение представляется сложной задачей [4].

Существует достаточно много методов определения гепарина в разных объектах природного происхождения (биологические жидкости, клетки печени и легких животных, лекарственные препараты). В клинической практике определение гепарина основано на измерении времени свертывания крови (коагулологические методы) или выявлении протеолитической активности некоторых факторов свертывания с использованием синтетических субстратов (хромогенные методы) [31]. Количество гепарина, определенное данными методами обычно измеряется в единицах действия (Ед) по его физиологической активности (одна единица действия равна 0,0077 мг международного стандарта гепарина), вследствие чего эти методы относят к биологическим [76]. Кроме этого, определение и анализ гепарина выполняют с использованием современных инструментальных методов анализа (хроматографических, спектральных, электрохимических, капиллярного электрофореза).

1.6.1 Комбинированные инструментальные методы определения гепарина

К группе комбинированных методов анализа гепаринсодержащих препаратов, в которых объединены два основных процесса: предварительное разделение компонентов сложной смеси и их детектирование относятся капиллярный электрофорез и хроматография. Важными характеристиками разделения являются разрешение, эффективность и селективность. Для конечного определения наиболее актуален параметр чувствительности, в первую очередь зависящий от типа используемого детектора [77].

В работе [78] гепарин определяли методом обращенно-фазовой ион-парной хроматографии с флуориметрическим детектированием с использованием 2-цианоацетамида ($\lambda_{возб}$=364 нм, $\lambda_{эм}$=410 нм). Гепарин предварительно расщепляли гепаринлиазой, и полученные ненасыщенные дисахариды отделяли в течение 15 мин. Разделение проводили при 50 °С на колонке C_8 (с пористым силикагелем толщиной 2 мкм). По полученным результатам были построены градуировочные кривые, позволяющие определять дисахаридные фрагменты гепарина в диапазоне концентраций от 1 мкг/дм^3 до 1 мг/дм^3.

Компания «Sepax» разработала ионообменную колонку для жидкостной хроматографии- Glycomix^{TM} SAX. В работе [4] авторы выполнили разделение гепарина и его примесей, дерматансульфата (DS) и гиперсульфатированного хондроитин сульфата (OSCS) с использованием Glycomix^{TM} SAX. Предложенная методика может быть использована при количественном анализе гепарина в диапазоне концентраций от 0,5 мг/см^3 до 10 мг/см^3 (R^2 = 0,9997) и выявления фальсификата, содержащего примеси.

Авторы [79] предложили использовать метод мицеллярной электрокинетической капиллярной хроматографии (МЭКХ) с анионным ПАВ и УФ-детектором (270 нм) для разделения и прямого определения гепарина в плазме крови. Площадь пика и, следовательно, концентрация гепарина были линейными в диапазоне 0,6–54 мг/дм^3 с пределом обнаружения 0,2 мг/дм^3 (y = 131253,1x-13895,6, R^2 = 0.998).

Ученые [80] использовали эксклюзионную хроматографию для отделения гепарина от примесей с последующим детектированием по рассеянию и преломлению света, а также на масс-спектрометре с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС). Данное исследование позволило определить молекулярную массу гепаринов, выполнить качественный и количественный анализ.

Метод капиллярного электрофореза с УФ-детектированием зачастую используется не для количественного определения гепарина, а для идентификации примесей (дерматан сульфата, сульфатированного хондроитин сульфата, гиперсульфатированного хондроитин сульфата) в лекарственных препаратах, содержащих его в качестве основного действующего вещества [81-83]. Наличие этих примесей может приводить к летальному исходу в процессе гепаринотерапии. Так, с 1 января 2007 г. по 13 апреля 2008 г. появились сообщения о 131 смертельном случае, связанном с использованием гепарина. Причинами смерти стали анафилактические реакции (отек Квинке, аллергический стеноз гортани) или острая гипотензия [84]. Подобные побочные реакции были связаны с присутствием в составе препарата контаминанта – гиперсульфатированного хондроитин сульфата.

1.6.2 Спектральные методы определения гепарина

Среди спектральных методов определения гепарина известны: флуориметрический, колориметрический, спектрофотометрический, спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

Впервые идентификация и прямое количественное определение гепарина и примесных полисахаридов в сложных смесях стали возможными благодаря использованию Фурье-спектроскопии ЯМР ^{13}C. Для регистрации спектра гепарина с активностью 20 Ед/см^3 (0,15 мг/см^3) ученым потребовалось около 15 часов. Данный способ позволил идентифицировать гепарин в сложных смесях с сопутствующими соединениями и провести количественное определение гепарина при содержании его в смесях более 10 % [85].

В видимой области, а также средней и ближней областях УФ-спектра гепарин не поглощает. УФ-спектрофотометрия может быть использована только для детектирования примесных веществ в гепарине, в частности нуклеиновых кислот, которым соответствует полоса поглощения с максимумом около 258 нм. По мере отчистки гепарина интенсивность этой полосы уменьшается вплоть до полного исчезновения в спектре конечного продукта [86].

В ряде случаев для спектрофотометрического определения гепарина используют метахроматический эффект основных красителей в присутствии хромотропных веществ. Резонанс в молекуле красителя сопровождается изменением электронной плотности и образованием избыточного положительного заряда на конце димера, электростатическое взаимодействие которого с отрицательно заряженными группами гепарина приводит к делокализации π-электронов сопряженной системы хромофора, т.е. к поглощению молекул красителя при меньших длинах волн [19]. В качестве красителей используют азур А [87, 88], толуидиновый синий [89], нейтральный красный [90], тионин [91] и др. Условием правильного проведения метода является отсутствие в анализируемой системе белков, высоких концентраций солей, изменяющих спектр поглощения. Метод чувствителен к присутствию 10 мкг гепарина в 1 см^3 [31].

Авторы [92] предложили спектрофлуориметрический метод определения следовых количеств гепарина с использованием тербий-данофлоксацина (Tb^{3+}-Dano) в качестве флуоресцентного зонда. В присутствии гепарина происходит усиление флуоресценции комплекса Tb^{3+}-Dano при длине волны 545 нм, при этом интенсивность флуоресценции иона Tb^{3+} пропорциональна концентрации гепарина. Оптимальные условия определения гепарина данным методом: pH 7,2; концентрация Tb^{3+} равна $4{,}0\cdot10^{-5}$ моль/дм^3, концентрация Dano – $2{,}5\cdot10^{-5}$ моль/дм^3. Динамический диапазон определения гепарина составляет 0,1–1,5 мкг/см^3 при пределе обнаружения (n = 3) 24,62 нг/см^3.

В работе [93] авторами был разработан спектрофлуориметрический метод для определения следовых количеств гепарина с использованием доксициклина

(DC) иона европия (Eu^{3+}) в качестве флуоресцентного зонда, в буферном растворе с pH = 8,9. Гепарин может заметно повысить интенсивность флуоресценции комплекса DC-Eu^{3+} с длиной волны 612 нм и при этом интенсивность флуоресценции иона Eu^{3+} пропорциональна концентрации гепарина. По предложенной методике предел определения и обнаружения составляют 0,04 мкг/см^3 и 19,7 нг/см^3, соответственно.

Рассеяние светом субмикроскопических частиц, таких как металлические частицы и частицы другого состава имеют высокий выход энергии и могут быть использованы в качестве флуоресцентных аналогов и индикаторов в клинических и биологических исследованиях. Их сигналы рассеянного света не склонны к подавлению и фотообесцвечиванию. Таким образом, использование легких рассеянных частиц при скрещивании ДНК и анализе белка приводит к существенному увеличению чувствительности по флуоресцентным меткам. Авторы [94] в своей работе проводили исследования по определению гепарина методом резонансного рассеяния света. Лазерно-индуцированное резонансное рассеяние света – визуальный метод для определения гепарина, основанный на высоком рассеянии света с сильным излучением при агрегации гепарина с α, β, γ, δ-тетра (4-триметиламинониумфенил)порфирином в растворе. При получении изображений сигналов рассеяния света в случае агрегации видов, предложили способ определения гепарина с линейным диапазоном от 0,02 – 0,6 мкг/см^3 и пределом обнаружения (n=3) от 1,3 нг/см^3.

Авторы [95] заметили, что введение гепарина в систему приводит к усилению флуоресценции данзилпротамина. Этот явление они применили к микроопределению сульфатированных полисахаридов. Интенсивность флуоресценции смеси полисахарида с данзилпротамином измеряли при длине волны возбуждения 365 нм и длине волны испускания 525 нм. Градуировочные кривые для гепарина, сульфат целлюлозы и сульфат декстрана были линейными в интервале концентраций от 0,5 до 10,0 мкг/см^3.

1.6.3 Электрохимические методы определения гепарина

На сегодняшний день широко обсуждается вопрос о качестве лекарственных препаратов, необходимости его обеспечения и строгого контроля. В связи с чем возникает необходимость разработки специфических методов качественного и количественного определения гепарина. Для решения этой проблемы возможно использование электрохимических методов анализа, которым характерны высокая чувствительность и селективность, быстрота отклика на изменение состава анализируемого объекта, лёгкость автоматизации и, наконец, недорогостоящее аналитическое оборудование [5].

На данный момент опубликован ряд методик, посвященных определению гепарина в различных объектах с использованием электрохимических методов, а именно: полярографии, потенциометрии, постоянно-токовой и дифференциально-импульсной вольтамперометрии на различных материалах индикаторных электродов, в том числе на электродах, в состав которых входят катионные красители, способные образовывать комплексы с гепарином.

Так Лангмайер с соавторами [96-98] разработали электрохимический способ обнаружения гепарина на вращающемся дисковом стеклоуглеродном электроде, покрытом мембраной, представляющей собой пластифицированный поливинилхлоридом раствор 1,1-диметилферроцена в тетрагидрофуране и тетракис-(4-хлор-фенил)борат тетрадодециламмония в о-нитрофенилоктиловом эфире. Показана возможность применения этого электрода для амперометрического и кулонометрического обнаружения гепарина в водных образцах в диапазоне концентраций, соответствующих его содержанию в биообъектах с медицинской точки зрения (7,7-77 мкг/см^3), с пределом обнаружения 1,08 мкг/см^3.

Чаргафф и Олсен еще в 1937 году обнаружили, что при смешивании гепарина с протамином формируется нерастворимый комплекс [99], что в последствии привело к использованию протамин сульфата в клинической практике в качестве эффективного антидота гепарину (1 мг протамина нейтрализует 80-120 Ед (0,6-0,9 мг) гепарина) [100]. Примерно 67 % аминокислотного состава протамина составляет аргинин, который делает его сильно основным поликатионом с молекулярной массой примерно в 4,5 кДа. При добавлении к нему полианионного гепарина за счет ионного взаимодействия происходит образование стабильного преципитата [101]. Именно это положение легло в основу разработок ряда методик электрохимического детектирования гепарина [102-106].

Научная группа Мейерхоффа разработала одноразовые гепарин-селективные электроды на основе технологии «проволока с покрытием». Покрытие представляет собой полимерную мембрану с хлоридом тридодецилметиламмония [102, 103]. Электроды успешно использованы для количественного определения гепарина потенциометрическим титрованием протамина в образцах цельной крови [104, 105]. Результаты на различных этапах исследований хорошо согласовались с данными, полученными с использованием стандартной методики определения гепарина «Hepcon Hemostasis Management System» [107].

В работе [106] методом хронопотенциометрии изучено связывание гепарином ионов протамина на поверхности ионселективной мембраны. Протомин-селективную мембрану толщиной 200 мкм формировали погружением в раствор, содержащий смесь инертной липофильной соли динонилнафталинсульфонат тетрадодециламмония (10 % по массе) и раствора поливинилхлорид – о-нитрофенилоктиловый эфир (1 : 2) в тетрагидрофуране. С помощью полученных электродов определяли гепарин и протамин в образцах крови после десятикратного разбавления.

Особый интерес представляют работы по прямому электрохимическому определению гепарина [108-110]. В работе [108] предложена проточно-инжекционная методика определения гепарина на субмолекулярном уровне с электрохимическим детектированием. Электрохимическое окисление и определение гепарина проводили на электродах, модифицированных оксидом меди в щелочных растворах и различными формами оксида рутения в кислых средах. Результаты циклической вольтамперометрии позволили предположить, что на модифицированном рутением стеклоуглеродном электроде в 1 М водном растворе H_3PO_4 гепарин окисляется, причем при низких pH окисление высокомолекулярного гепарина включает расщепление C_2–C_3 связей на остатки D-глюкуроновой кислоты. Такое возможно, когда остатки кислоты окружены N-ацетилированными аминосахарами. Если такие смежные участки являются незамещенными или N-сульфатированными, то окисление исключено. Данный подход позволил осуществить определение гепарина в проточно-инжекционном режиме. Предел обнаружения высокомолекулярного гепарина составил 9 нМ и 20 нМ для гепарина с низкой молекулярной массой.

В методе дифференциально-импульсной вольтамперометрии (ДИВА) на линейную развертку потенциала с определенной скоростью непосредственно перед отрывом каждой капли подают дополнительный импульс потенциала фиксированной величины. Широкое применение ДИВА обусловлено низкими значениями отношения емкостного/фонового токов. Это достигается двойной выборкой тока: перед наложением импульса и в его конце, что позволяет обнаружить определяемое вещество в растворе при концентрации ниже 0,05 мкМ/дм^3 [111]. Авторы работы [109] учли все достоинства данного метода и предложили новый способ определения следовых количеств гепарина с использованием катодной ДИВА в простых электролитах. Были подобраны и оптимизированы такие факторы, как время и потенциал концентрирования, амплитуда импульса, шаг измерения потенциала и состав фонового электролита. Таким образом, для индикаторного ртутного электрода типа «висячая капля» с площадью 1,45 мм^2 предел обнаружения гепарина при времени концентрирования 120 с составил 1,1 мг/дм^3 (в боратном буферном растворе с добавлением NaCl) и 1,7 мг/дм^3 (в HCl с добавлением NaCl).

В 2012 г. в Индии для мониторинга антикоагулянтной терапии у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями определение гепарина предложено выполнять методом дифференциально-импульсной полярографии [110] по высоте пика при –0,25 В на фоне 2 М раствора NaOH. Уравнение регрессии

$y = 0{,}3117x + 0{,}8069$ линейно в диапазоне концентраций гепарина от 0,77 до 15,4 мг/дм^3 гепарина. Указанным методом определяли гепарин в образцах плазмы крови человека и фармакологических препаратах. Интересно, что для образцов плазмы крови, взятых у мужчин, среднее тромбиновое время и диффузионный ток увеличивались в зависимости от возраста, что указывает на увеличение антикоагуляционного действия гепарина с повышением возраста. При исследовании образцов плазмы крови, взятых у женщин, значения среднего тромбинового времени и диффузионного тока позволили заключить, что женщины, достигшие или находящиеся вблизи менопаузы, требуют особого внимания во время антикоагулянтной терапии, а отклик гепарина в таких случаях наблюдается крайне низкий.

Большое число работ [112-122] посвящено электрохимическому определению гепарина с использованием синтетических катионных красителей, основанному на комплексообразующей способности гепарина за счет электростатического взаимодействия катионных групп природных и синтетических соединений с анионными группировками полисахарида [48].

В работе [112] гепарин определяли косвенно методом полярографии, измеряя уменьшение катодной волны метиленовой сини на фоне фосфатного буферного раствора (pH 6,24) после одночасового выдерживания с добавленным раствором гепарина при комнатной температуре.

Метиленовый голубой также применяли и в работе [113] для электрохимического определения гепарина в лекарственных препаратах на пьезокварцевом золотом электроде. Диапазон определяемых концентраций от 0,66 мкг/см^3 до 64,5 мкг/см^3, предел обнаружения 270 нг/см^3. Достаточно полно изучены процессы, протекающие на электроде, стехиометрия комплекса метиленовый голубой–гепарин: одна молекула гепарина может связать две молекулы метиленового голубого при выбранных условиях.

Тионин – другой тиазиновый краситель, с помощью которого модифицировали стеклоуглеродный электрод для определения гепарина [114]. Тонкопленочный модифицированный политионином стеклоуглеродный электрод получали путем электрохимической полимеризации методом циклической вольтамперометрии в интервале от 0 до +1,4 В (отн. Ag/AgCl) в 0,1 мМ растворе тионина в присутствии $HClO_4$. Этот электрод позволил определять гепарин в диапазоне концентраций от 4,0 до 22,0 мкг/см^3.

Цикл работ Сан Вэя с соавторами [115-121] посвящен определению гепарина методом полярографии на ртутном капающем электроде с использованием различных красителей (светло-зеленого, бриллианткрезил блау, феносафранина, акридинового оранжевого, малахитового зеленого, нейтрального красного, кристаллического фиолетового). Определение гепарина основано на уменьшении тока пика красителя при добавлении гепарина в систему за счет образования ионных электроактивных комплексов. Снижение тока прямо пропорционально концентрации гепарина в диапазоне, зависящем от используемого красителя.

Толуидиновый синий дает метахроматический эффект и часто применяется для абсорбционно-спектроскопического определения гепарина [89], поэтому авторы работы [122] решили использовать этот краситель при электрохимическом определении гепарина. По понижению тока пика толуидинового синего на поверхности стеклоуглеродного электрода возможно определение гепарина в диапазоне концентраций от 1,0 до 20 мкг/см^3 с пределом обнаружения 0,44 мкг/см^3.

В таблице 2 приведены обобщенные данные по электрохимическому определению гепарина с использованием синтетических красителей.

Таблица 2 – Электрохимические методы определения гепарина с использованием синтетических красителей

№	Используемый краситель	Материал индикаторного электрода	Линейный диапазон, мг/дм^3	Предел обнаружения, мг/дм^3	pH	$E_{п.к.}$, В	$E_{п.а.}$, В	Ссылка на литературу
1	Метиленовый голубой	пьезокварцевый золотой электрод	0,666–64,5	0,27	7	-0,245	-0,182	[113]

Окончание таблицы 2

2	Тионин	стеклоуглеродный электрод	4,0 – 22,0	0,28	1	0,25	0,18	[114]
3	Светло-зелёный	ртутный капающий электрод	0,8–20	0,28	2	-0,41	–	[115]
4	Бриллиант-крезил блау	ртутный капающий электрод	1,5–20	0,2	3	-0,14	–	[116]
5	Феносафра-нин	электрод в виде висячей капли ртути	0,7–2	0,08	1,5	-0,256	-0,231	[117]
6	Акридиновый оранжевый	ртутный капающий электрод	0,8–6,0	0,13	2,3	-0,94	–	[118]
7	Малахитовый зеленый	ртутный капающий электрод	3,0–10	0,28	1,5	-0,618	–	[119]
8	Нейтральный красный	электрод в виде висячей капли ртути	2,0–10	0,34	1,5	-0,24	–	[120]
9	Кристалли-ческий фиолетовый	ртутный капающий электрод	0,1–8,0	0,092	3,0	-0,74	–	[121]
10	Толуидино-вый синий	стеклоуглеродный электрод	1,0–20	0,44	5,8	-0,21	-0,11	[122]

Таким образом, анализ публикаций показал, что определению гепарина с использованием различных инструментальных методов анализа, в том числе и электрохимических, уделяется достаточно большое внимание. Однако для реализации многих из указанных выше методов, зачастую необходимо использование дорогостоящих реактивов и оборудования, а некоторые не обладают достаточной селективностью по отношению к определяемому компоненту. В связи с этим, разработка новых методик определения гепарина с улучшенными метрологическими характеристиками представляет актуальную задачу. Возможно, что в ближайшем будущем на современном фармацевтическом рынке появятся экспресс анализаторы на гепарин, в основе работы которых будут лежать электрохимические процессы.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Оборудование, химическая посуда

Для разработки электрохимической методики определения гепарина в лекарственных препаратах использовался простой, экспрессный, точный и высокочувствительный метод вольтамперометрии, основанный на регистрации и последующей расшифровке вольтамперограмм. Вольтамперограммы представляют собой зависимости тока, протекающего в цепи электрохимической ячейки, от величины приложенного к ее электродам напряжения. Из полученных зависимостей можно узнать качественную и количественную информацию о присутствующих в растворе веществах, окисляющихся или восстанавливающихся на индикаторном электроде, а также охарактеризовать протекающие электродные процессы [5].

Регистрацию вольтамперных кривых проводили на анализаторах ТА-2 и TA-Lab (производство ООО «НПП «Томьаналит», г Томск), соединенных с персональным компьютером (ПК). Вольтамперометрические анализаторы ТА-2 и TA-Lab относятся к анализаторам жидкости по ГОСТ 227229 и предназначены для измерения концентраций элементов, анионов, катионов в природных, питьевых, сточных водах, пищевых продуктах, растворах проб почв, лекарственных препаратах, биологических и других объектах. Анализаторы содержат по три электрохимические ячейки, в которых одновременно с одинаковыми условиями измерений происходит регистрация вольтамперограмм. Электрохимические ячейки, представляют собой стаканчики из кварцевого стекла объемом 20 см^3, в которые налит раствор электролита и опущены по три электрода: индикаторный, вспомогательный и сравнения. Перемешивание растворов в ячейках анализаторов осуществляется с помощью вибрации индикаторных электродов. Управление режимами работы (постоянно-токовый, ступенчатый, дифференциально-импульсный, квадратно-волновой), подготовка электрохимических ячеек к измерениям, ввод параметров, и проведение измерений возможно благодаря специальному программному обеспечению, установленному на ПК.

В случае катодной и циклической вольтамперометрии возникает необходимость устранения мешающего влияния кислорода, присутствующего в растворенном виде в исследуемом растворе. Для его удаления из исследуемого раствора использовали газообразный азот высшего сорта по ГОСТ 9293-74 с объемной долей кислорода не более 0,001 %, подаваемый под давлением в электрохимическую ячейку из баллона через силиконовый шланг, присоединенный к анализатору Ta-Lab.

В качестве электрода сравнения и вспомогательного использовались хлоридсеребряные электроды (ХСЭ), представляющие собой спираль из серебряной проволоки, вкручиваемую в полый полипропиленовый корпус, заполненный раствором хлорида калия с концентрацией 1 моль/дм^3 и закрытый полупроницаемой мембраной, изготовленной из оксида алюминия. Готовые ХСЭ хранили при комнатной температуре в стакане с раствором хлорида калия (1 моль/дм^3), перед использованием ополаскивали дистиллированной водой.

Используемые в работе стационарные индикаторные электроды были изготовлены из различных материалов (ртутно-пленочный, стеклоуглеродный, углеродсодержащий) и имели торцевую или цилиндрическую форму.

Рабочая поверхность ртутно-плёночного электрода (РПЭ) представляет собой серебряный цилиндрический стержень длинной 7 мм, диаметром 1,1 мм, на котором формируется амальгама серебра в результате механического нанесения тонкого слоя ртути. При механическом способе серебряную проволоку амальгамируют путем растирания по ее поверхности металлической ртути фильтровальной бумагой. Площадь рабочей поверхности РПЭ при этом составляет 0,27 см^2. Процедуру амальгамирования электрода проводят повторно, если рабочая поверхность РПЭ потеряла металлический блеск (стала матовой). РПЭ с нанесенной пленкой амальгамы серебра хранили, погрузив на 2/3 части электрода в дистиллированную воду.

Стеклоуглеродный электрод (СУЭ) представляет собой цилиндрический стержень из стеклоуглерода, длиной 16 мм, диаметром 2 мм, запрессованный в инертную полимерную трубку. Площадь рабочей поверхности СУЭ равна 1,07 см^2. Перед работой поверхность электрода шлифовали фетром и выдерживали в этиловом спирте в течение 5 минут для удаления поверхностно-активных веществ (ПАВ), а также проводили электрохимическую обработку (поляризацию) в области потенциалов от +2 В до –2 В. Электрохимически обработанный СУЭ хранили на воздухе.

Углеродсодержащий (УСЭ) электрод состоит из полиэтиленового корпуса, заполненного электропроводящей смесью высокодисперсного технического углерода марки N220 (30 %) и термостабилизированного полиэтилена высокого давления (70 %). Данный тип электрода представляет собой разновидность торцевых графитовых электродов и имеет легко обновляемую поверхность. Обновление рабочей поверхности УСЭ площадью 0,13 см^2 осуществляется путем срезания тонкого слоя (0,1–0,3 мм) специальным резаком (устройством для обновления поверхности).

Для увеличения электроактивной площади поверхности индикаторные электроды, используемые в работе, подвергались модифицированию. Ввиду наличия легко обновляемой поверхности торцевой формы для этой цели наиболее подходящими являются УСЭ. Модификацию поверхности УСЭ проводили методом капельного испарения, при котором с помощью пипеточного дозатора на торцевую поверхность электрода наносили 0,001 см^3 раствора модификатора (углеродных чернил) и выдерживали 3-5 секунд при комнатной температуре в вертикальном положении до полного испарения растворителя. После данной процедуры, приготовленный углеродсодержащий электрод, модифицированный углеродными чернилами (МЭ), использовали в работе. При приготовлении углеродных чернил использовали мешалку вортекс ELMI V-3 SkyLine. Модификация углеродсодержащего электрода углеродными чернилами приводит к увеличению электроактивной площади поверхности в 4 раза [123].

Анализ субстанции гепарина на наличие примесей выполняли с помощью системы капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ-105М» (производство ООО «Люмэкс-маркетинг», г. Санкт-Петербург) с УФ-детектором, управляемой от компьютера. Перед электрофоретическим анализом анализируемые пробы, промывочные и буферные растворы предварительно центрифугировали в пробирках типа Эппендорф объемом 1,5 мл на лабораторной центрифуге MPW-5 («MPW Med.instruments Spoldzielnia Pracy», Польша) со скоростью 8000 об/мин.

Установление состава комплекса гепарин-краситель проводили методом УФ-видимой спектроскопии на спектрофотометре Cary 60 (производство «Agilent Technologies», США).

Для определения водородного показателя (pH) в работе использовали pH-метр/иономер «ИТАН» (производство ООО «НПП «Томьаналит», Томск).

Взвешивание навесок осуществляли на аналитических весах Acculab ALC-210d4 (производство «Sartorius Weight Technology GmbH», Германия) с I классом точности по ГОСТ 24104-2001.

Для получения дистиллированной воды использовали электрический аквадистиллятор ДЭ-4 (производство «Электромедоборудование», Санкт-Петербург).

Химическая посуда. При выполнении экспериментальной части в работе использовали следующую стеклянную лабораторную посуду:

– колбы 2-1000-2, 2-100-2, 2-50-2, 2-25-2, 2-10-2 ГОСТ 1770;
– цилиндр 2-50-1 ГОСТ 1770;
– пробирки П-1-10-0,1 ХС ГОСТ 1770;
– мензурка 250 ГОСТ 1770;
– пипетки 2-2-1-10, 1-2-1-5, 1-1-1-1 ГОСТ 29227;
– воронки В-56-80 ХС, В-36-50 ХС ГОСТ 25336;
– стаканы для взвешивания (бюксы) СВ-14/8 ГОСТ 25336;
– стаканы В-1-50 ТС ГОСТ 25336;

– пробирки одноразовые из полипропилена (типа Эппендорф) вместимостью 1,5 $см^3$, 0,2 $см^3$.

Забор и дозирование точных объемов жидкостей также осуществляли с помощью одноканальных пипеточных дозаторов переменного объема (1-10 мкл, 10-100 мкл, 20-200 мкл, 100-1000 мкл, 0,5-5 мл) Thermo Scientific серии Блэк и Лайт (производство АО «Термо Фишер Сайентифик», г. Санкт-Петербург) в комплекте с одноразовыми наконечниками из полипропилена.

Вследствие того, что вольтамперометрический метод анализа предъявляет высокие требования к чистоте используемых реактивов, химической посуде, электродам, качеству воды, возникает необходимость проверки всей системы на чистоту. Для этого перед началом каждой серии экспериментов методом циклической вольтамперометрии проводили «холостой» опыт в растворе фонового электролита. Отсутствие посторонних пиков на циклических вольтамперных кривых свидетельствует о чистоте электрохимической системы и всех ее составляющих.

2.2 Реактивы, приготовление растворов

Для приготовления растворов при выполнении экспериментальной части исследования использовали следующие реактивы:

– вода дистиллированная (ГОСТ 6709);

– натрий тетраборнокислый, стандарт-титр для pH-метрии, pH 9,18 (ГОСТ 8.135, «Уралхиминвест», Россия);

– эквимолярная смесь дигидрофосфата калия и гидрофосфата натрия, стандарт-титр для pH-метрии, pH 6,86 (ГОСТ 8.135, «Уралхиминвест», Россия);

– калий фталевокислый кислый, стандарт-титр для pH-метрии, pH 4,01 (ГОСТ 8.135, «Уралхиминвест», Россия);

– калий тетраоксалат, стандарт-титр для pH-метрии, pH 1,65 (ГОСТ 8.135, «Уралхиминвест», Россия);

– натрия гидроокись, х.ч. (ГОСТ 4328, «Химмед», Россия);

– соляная кислота, х.ч. (ГОСТ 3118, «Сигма Тек», Россия);

– борная кислота, х.ч. (ГОСТ 18704, «Реахим», Россия);

– ледяная уксусная кислота, х.ч. (ГОСТ 61, «Вектон», Россия);

– ортофосфорная кислота, х.ч. (ГОСТ 6552, «Компонент-реактив», Россия);

– азотная кислота, х.ч. (ГОСТ 4461 , «Биомедхим», Россия);

– калий хлористый, х.ч. (ГОСТ 4568, «Химмед», Россия);

– однозамещенный фосфат натрия, моногидрат, ч.д.а. (ГОСТ 200, «Химмед», Россия);

– аммиак водный, х.ч. (ГОСТ 3760, «Сигма Тек», Россия);

– DL-глутаминовая кислота, х.ч. (ТУ 6-09-4312-76, «Вектон», Россия);

– L- валин, х.ч. (ТУ 72-18-4, «Вектон», Россия);

– L-лейцин, ч. (ТУ 6-09-05-242-75, «Вектон», Россия);

– малахитовый зеленый, ч.д.а. (ТУ 6-09-1551, «Химреактив», Россия);

– метиленовый голубой, ч.д.а. (ТУ 6-09-40-5171, «Крезол», Россия);

– толуиленовый синий, ч.д.а. («Chemapol», Чехия);

– толуиленовый красный, ч.д.а. (ТУ 6-09-4120, «Вектон», Россия);

– микрокристаллический графит ос.ч. (размер частиц <150 мкм, Sigma-Aldrich, США);

– полистирол, вспенивающийся, гранулированный, ч. (ОСТ 301-05-202-92Е, «Himreakt», Россия);

– 1,2-дихлорэтан, х.ч. (ТУ 2631-093-44493179, «ЭКОС-1», Россия);

– натриевая соль гепарина из слизистой оболочки кишечника свиней, х.ч. (Sigma-Aldrich, США);

– набор реагентов «Ренапарин-тест» (НПО «Ренам», Москва);

– гиперсульфатированный хондроитинсульфат, х.ч. (Sigma-Aldrich, США);

– дерматансульфат, х.ч. (Sigma-Aldrich, США).

Рабочие эталоны pH готовили растворением содержимого стандарт-титров в дистиллированной воде. Приготовленные растворы хранили в плотно закрытой стеклянной или полиэтиленовой посуде в затемненном месте при температуре не выше 25 °С. Срок хранения рабочих эталонов – 1 месяц с момента приготовления.

Для обеспечения электропроводности и поддержания необходимого значения pH в качестве фонового электролита использовали универсальный буферный раствор Бриттона-Робинсона (pH от 1,81 до 11,98), состоящий из кислотной и основной частей. Кислотная часть представляет собой смесь фосфорной, борной и уксусной кислот с концентрацией 0,04 М. Для получения желаемого значения pH к некоторому объему смеси указанных кислот приливали необходимый объём 0,2 н раствора гидроксида натрия (основной части), приготовленного путем растворения его точной навески в дистиллированной воде. Кислотную часть раствора Бриттона-Робинсона хранили при комнатной температуре в плотно закрытой посуде из тёмного стекла, а основную – в плотно закрытой непрозрачной полиэтиленовой посуде. Срок хранения кислотной и основной частей универсального буферного раствора Бриттона-Робинсона – 1 месяц [124].

Растворы красителей и гепарина готовили растворением их точных навесок в дистиллированной воде. Серии растворов красителей и гепарина с меньшими концентрациями, необходимые для построения градуировочных графиков, готовили непосредственно перед выполнением измерений посредством последовательного разбавления их исходных растворов. Исходные растворы красителей хранили при комнатной температуре в плотно закрытой посуде из темного стекла в течение 2 недель. Растворы гепарина хранили в стеклянной посуде при температуре не выше 18 °С сроком 1 месяц.

Углеродные чернила (УЧ), необходимые для модификации поверхности индикаторного электрода, готовили путем растворения точных навесок микрокристаллического графита и полистирола в процентном соотношении 90:10 в растворе 1,2-дихлорэтана, с последующим перемешиванием на мешалке вортекс ELMI V-3 SkyLine в течение 3 минут. Углеродные чернила хранили в плотно закрытых одноразовых полипропиленовых пробирках (типа Эппендорф) вместимостью 0,2 см^3 сроком не более трех дней.

2.3 Объекты анализа

Поиск аналитических сигналов гепарина и подбор условий его определения осуществляли на модельных растворах, приготовленных из натриевой соли гепарина, полученной из слизистой оболочки кишечника свиней.

В качестве объектов исследования, содержащих ВМГ, использовали фармакологические растворы для внутривенного и подкожного введения, упакованные во флаконы по 5 мл, различных производителей (ФГУП «Московский эндокринный завод», г. Москва; ЗАО «Брынцалов-А», г. Минск; ОАО «Акционерное Курганское общество медицинских препаратов и изделий «Синтез», г. Курган; «Белмедпрепараты», г. Минск) и биологический стандартный препарат гепарина (производство Sigma-Aldrich, США). В 1 миллилитре этих растворов содержится по 5000 Ед (1 Ед = 0,0077 мг) гепарина в форме тетранатриевой соли (Na_4Hep).

Объектом исследования, имеющим в своем составе НМГ, стал фармакологический раствор для внутривенного и подкожного введения – фраксипарин, содержащий 5700 Ед в 0,6 см^3 (производство Санофи Винтроп Индустрия, Франция).

Для исследования антиоксидантных свойств гепарина также использовали негепаринизированную и гепаринизированную сыворотку, а также плазму крови, полученную путём забора крови из локтевой вены в специальную стерильную вакуумную систему «BD Vacutainer®» с добавлением 4 % цитрата натрия и последующим центрифугированием в течение 15 минут при скорости 3000 об/мин при комнатной температуре.

2.4 Методика эксперимента

2.4.1 Методика вольтамперометрического определения гепарина в комплексе с метиленовым голубым

Вольтамперометрическое определение гепарина в комплексе с метиленовым голубым (МГ) выполняли на анализаторе ТА-2 с трехэлектродной системой, состоящей из индикаторного стеклоуглеродного электрода, хлоридсеребряного электрода сравнения и вспомогательного хлоридсеребряного электрода. Изначально в электрохимическую ячейку помещали раствор фонового электролита (фосфатный буфер Na_2HPO_4 с pH=6,86) объемом 10 см^3, и начинали проверку всей системы на чистоту путем регистрации вольтамперных кривых в анодной области потенциалов от –0,6 до 0,4 В в потостоянно-токовом режиме со скоростью сканирования, 60 мВ/с временем перемешивания раствора посредством вибрации индикаторного электрода 50 с и успокоения 20 с. Запись анодной вольтамперограммы фонового электролита повторяли не менее трех раз. Отсутствие посторонних пиков на анодных вольтамперных кривых свидетельствовало о чистоте электрохимической системы и всех ее составляющих и позволяло проводить дальнейший эксперимент по определению гепарина. С помощью дозатора количественно переносили в электрохимическую ячейку краситель МГ и гепарин и начинали регистрацию вольтамперных кривых в соответствии с параметрами, указанными выше. По уменьшению высоты анодного пика МГ при –0,19 В со смещением потенциала в более положительную область, определяли количество гепарина в системе.

2.4.2 Методика вольтамперометрического определения гепарина в комплексе с малахитовым зеленым

Вольтамперометрическое определение гепарина в комплексе с малахитовым зелёным (МЗ) выполняли на анализаторе ТА-2 с трехэлектродной системой, состоящей из индикаторного ртутно-пленочного электрода, хлоридсеребряного электрода сравнения и вспомогательного хлоридсеребряного электрода.

Изначально в электрохимическую ячейку помещали раствор фонового электролита (0,05 М тетраоксалат калия с pH 1,65) объемом 10 $см^3$ и начинали проверку всей системы на чистоту. Для этого регистрировали вольтамперные кривые в катодной области потенциалов от 0 В до –1 В в потостоянно-токовом режиме со скоростью сканирования 60 мВ/с, временем предварительной подготовки раствора путем пропускания через него газообразного азота с целью устранения мешающего влияния кислорода в течение 600 с (перед серией экспериментов), перемешивания раствора посредством вибрации индикаторного электрода и пропускания газообразного азота 60 с и успокоения 20 с. Запись катодной вольтамперограммы фонового электролита повторяли не менее трех раз. Отсутствие посторонних пиков на катодных вольтамперных кривых свидетельствовало о чистоте электрохимической системы и всех ее составляющих и позволяло проводить дальнейший эксперимент по определению гепарина. С помощью дозатора количественно переносили в электрохимическую ячейку гепарин и краситель МЗ и начинали регистрацию вольтамперных кривых в соответствии с параметрами указанными выше. По уменьшению высоты катодного пика комплекса гепарин–МЗ при –0,87 В определяли количество гепарина в системе.

2.4.3 Методика вольтамперометрического определения гепарина в комплексе с толуиленовым синим

Вольтамперометрическое определение гепарина в комплексе с толуиленовым синим (ТС) выполняли на анализаторе TA-Lab с трехэлектродной системой, состоящей из индикаторного углеродсодержащего электрода, модифицированного углеродными чернилами, хлоридсеребряного электрода сравнения и хлоридсеребрянного вспомогательного электрода. Изначально в электрохимическую ячейку помещали раствор фонового электролита (буферная смесь Бриттона-Робинсона с pH=1,9) объемом 10 $см^3$ и начинали проверку всей системы на чистоту. Для этого регистрировали вольтамперные кривые в анодной области потенциалов от 0,1 В до 0,35 В в потостоянно-токовом режиме с дифференцированием со скоростью сканирования 60 мВ/с, временем перемешивания раствора посредством вибрации индикаторного электрода 30 с и успокоения 10 с. Запись анодной вольтамперограммы фонового электролита повторяли не менее трех раз. Отсутствие посторонних пиков на анодных вольтамперных кривых свидетельствовало о чистоте электрохимической системы и всех ее составляющих и позволяло проводить дальнейший эксперимент по определению гепарина. С помощью дозатора количественно переносили в электрохимическую ячейку краситель ТС и гепарин и начинали регистрацию вольтамперных кривых в соответствии с параметрами, указанными выше. По увеличению интенсивности анодного пика комплекса гепарин–ТС при 0,24 В определяли количество гепарина в системе.

2.4.4 Определение антиоксидантной активности гепарина методом вольтамперометрии

Антиоксидантную активность (АОА) гепарина определяли методом катодной вольтамперометрии по отношению к процессу электровосстановления кислорода (ЭВ O_2). Исследования проводили на вольтамперометрическом анализаторе ТА-2 с трехэлектродной системой, состоящей из индикаторного стеклоуглеродного электрода, хлоридсеребряного электрода сравнения и вспомогательного хлоридсеребряного электрода. Использовали постоянно-токовый режим катодной вольтамперометрии со скоростью развертки потенциала 60 мВ/с в рабочем диапазоне потенциалов от 0,0 до –1,4 В при времени перемешивания раствора посредством вибрации индикаторного электрода 30 сек и последующем успокоении системы в течение 10 сек. В качестве фонового электролита применяли фосфатный буферный раствор с pH 6,86, близким к физиологическому значению, объемом 10 см^3.

АОА гепарина по отношению к ЭВ O_2 определяли по следующей методике: снимали вольтамперограммы тока ЭВ O_2 в отсутствии исследуемого вещества (фоновая кривая) по указанным выше параметрам. При отсутствии посторонних пиков электрохимическая система считалась чистой. После чего в электрохимическую ячейку добавляли гепарин с известной концентрацией объемом 0,02 см^3 и регистрировали катодную вольтамперограмму ЭВ O_2 при тех же условиях. Измерения повторяли не менее 5 раз через 3 минуты и каждый раз оценивали значение предельного тока ЭВ O_2. Степень уменьшения тока ЭВ O_2 являлась показателем антиоксидантной активности гепарина. Используя полученные экспериментальные данные строили зависимость изменения тока ЭВ O_2 от времени взаимодействия гепарина с активными кислородными радикалами и по тангенсу угла наклона рассчитывали коэффициент АОА гепарина – K, мкг/(дм^3·мин) согласно формуле:

$$K = \frac{C^0_{O_2}}{t}\left(1 - \frac{I_i}{I_0}\right),$$

где $C^0_{O_2}$ – концентрация кислорода в исходном растворе без вещества, мкг/дм^3;

I_i –значение предельного тока ЭВ O_2 в присутствии гепарина, мкА;

I_0 - значение предельного тока ЭВ O_2 в отсутствии гепарина, мкА;

t - время взаимодействия гепарина с активными кислородными радикалами, мин.

2.4.5 Спектрофотометрическая методика определения гепарина

Для количественного определения гепарина в препаратах и субстанциях использовали набор специальных реагентов с хромогенными субстратами.

Активность исследуемых образцов гепарина определяли после добавления к ним избытка антитромбина III и фактора Xa. При этом происходило ингибирование фактора Xa, образовавшимся комплексом AT III-гепарин, пропорционально количеству гепарина в препарате. Затем в пробирки с испытуемыми растворами вносили по 0,1 см^3 хромогенного субстрата для факторов Xa. Оставшееся количество фактора Xa катализировало отщепление паранитроанилина (pNA) от синтетических хромогенных субстратов. Методом УФ-видимой спектроскопии на спектрофотометре Cary 60 измеряли оптическую плотность свободного pNA в растворе при длине волны 405 нм, количество которого обратно пропорционально анти-Xa активности гепарина.

2.5 Статистическая обработка результатов измерений

Все усилия химиков-аналитиков направлены на разработку методик анализа, обеспечивающих правильные и воспроизводимые результаты. Вследствие чего, завершающей стадией количественного анализа вещества любым методом является статистическая обработка результатов измерений, которая включает в себя оценку систематических и случайных погрешностей измерений, контроль правильности и прецизионности результатов анализа [125].

Используя ряд нормативных документов [126-128] в работе рассчитаны следующие показатели качества методики анализа:

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

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ЭЛЕКТРООКИСЛЕНИЯ-ВОССТАНОВЛЕНИЯ РЯДА КАТИОННЫХ КРАСИТЕЛЕЙ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ И ИХ ПОСЛЕДУЮЩЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРИ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ ГЕПАРИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

Анализ литературы позволяет сделать вывод, что за последние два десятилетия основное внимание авторов по определению гепарина в различных объектах с использованием электрохимических методов анализа сосредоточено на исследовании и применении для этой цели комплексов гепарина с различными низко- и высокомолекулярными соединениями [102-106, 112-122].

Большой интерес с научной и прикладной точек зрения в рамках настоящего исследования представляют комплексы гепарина с красителями катионной природы, которые образуются при их взаимодействии с отрицательно заряженными полимерными цепями полисахарида. Перспективность использования именно синтетических красителей среди широкого круга органических модификаторов, применяемых в электроаналитической химии, заключается в их легкодоступности, распространенности (ежегодно их выпускается около 10000 видов) и наличии нуклеофильных и электрофильных групп, способных к электроокислению и восстановлению.

В настоящее время модификацию электродной поверхности синтетическими красителями проводят как in situ [129, 130] так и ex situ [131-134] способами. Несмотря на большое количество работ, посвященных изучению и последующему применению электрохимических систем, имеющих в своем составе синтетические красители, до сих пор не проводилось обобщающего, полного исследования (с учётом всех физико-химических закономерностей) по электрохимическому поведению красителей различных классов, позволившего бы систематизировать и выявить класс красителей, применение которых будет более рациональным и безопасным для модификации электродной поверхности и последующего использования в определении биологически-активного вещества – гепарина.

Настоящая глава посвящена исследованию электрохимических свойств ряда красителей (метиленового голубого, малахитового зеленого, толуиленового синего) методами циклической, катодной и анодной постоянно-токовой вольтамперометрии, последующему определению гепарина в комплексе с ними («in situ») и выявлению наиболее подходящего красителя для вольтамперометрического определения гепарина в лекарственных препаратах.

3.1 Исследование электрохимических свойств синтетического красителя тиазинового класса – метиленового голубого и его комплекса с гепарином

Метиленовый голубой (МГ) – тиазиновый краситель, относится к классу биологически активных веществ, способных связываться с молекулами биополимеров, в частности, с вирусными нуклеиновыми кислотами, способен избирательно окрашивать внутри клетки определенные виды микробов и вирусов, т.е. образовывать комплексы с их белками [135]. На рисунке 4 изображена структурная формула МГ.

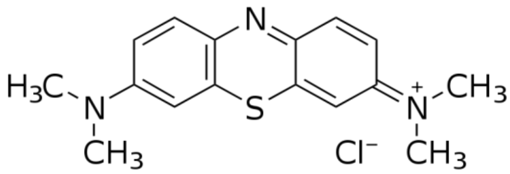


Рисунок 4 – Структурная формула МГ

Наличие донорных ($–N(CH_3)_2$, =N–) и акцепторных (=S) групп в структуре МГ свидетельствует о возможности протекания редокс-реакций.

Для исследования электрохимических свойств метиленового голубого записаны циклические вольтамперограммы на разных материалах электродов (РПЭ, СУЭ, МЭ) в области потенциалов для СУЭ от 1,2 В до –1,2 В, для МЭ от 1,0 до –1,0 В, для РПЭ от 0,05 В до –1,2 В со скоростью разверти 40 мВ/с в фоновых электролитах с различным значением pH в диапазоне концентраций от 10 мг/дм^3 до 40 мг/дм^3. Полученные результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Параметры вольтамперометрического определения МГ, полученные методом циклической постоянно-токовой вольтамперометрии с использованием различных материалов электродов

Определяемое вещество	Материал индикаторного электрода	Фоновый электролит		Значение потенциала Е, В		Диапазон определяемых концентраций, мг/дм^3	Уравнение регрессии по $E_{п.а}$	Квадрат коэффициента корреляции
		Состав	pH	$E_{п.к.}$	$E_{п.а.}$			
Метиленовый голубой	РПЭ	Оксалатный	1,65	-0,08	–	10-40	y=0,0119x+ +0,2832	0,9825
		Фосфатный	6,86	-0,19	-0,09		y =0,0267x+ +0,4331	0,995
		Боратный	9,18	-0,32	-0,19		y= 0,0278x+ +1,0421	0,9873
	СУЭ	Оксалатный	1,65	0,1	0,23		y =0,1691x- -0,234	0,9924
		Фосфатный	6,86	-0,25	-0,16		y = 0,443x+ +3,524	0,9959
		Боратный	9,18	-0,33	-0,24		y =0,4355x+ +6,9877	0,9998
	МЭ	Оксалатный	1,65	0,11	0,17		y= 0,0591x- -0,1465	0,9968
		Фосфатный	6,86	-0,16	-0,13		y =0,1475x+ +0,476	0,9995
		Боратный	9,18	-0,28	-0,19		y= 0,1748x+ +0,54	0,9953

Анализируя данные представленные в таблице 3 можно сделать вывод, что наиболее подходящий материал электрода для последующих исследований, на котором протекают редокс-процессы МГ – СУЭ, ввиду большей чувствительности.

Кислотность фонового электролита – важный параметр, оказывающий влияние на электрохимическое поведение различных соединений. Из таблицы 3 видно, что при изменении pH электролита от кислого к щелочному значению, наблюдается смещение потенциала пика в более электроотрицательную область, которое свидетельствует об участии протонов в электрохимической реакции. С целью исключения влияния природы фонового электролита на сигнал МГ записаны циклические вольтамперные кривые в универсальном буферном растворе Бриттона-Робинсона с pH в диапазоне от 2,1 до 8,6 на СУЭ (рисунок 5).

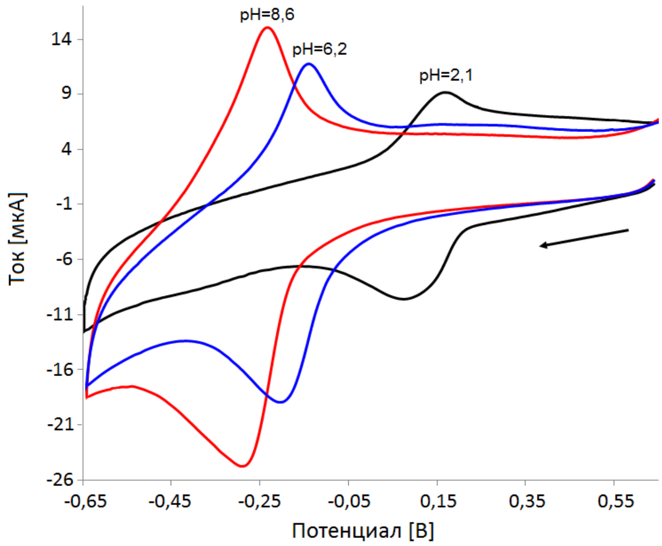


Рисунок 5 – Циклические вольтамперные кривые МГ в универсальном буферном растворе Бриттона-Робинсона с pH в диапазоне от 2,1 до 8,6 на СУЭ. $C_{мг}$=20 мг/дм^3, W=40 мВ/с

На вольтамперных кривых, изображенный на рисунке 5 наблюдается аналогичное смещение потенциала пика в более электроотрицательную область, что еще раз подтверждает участие протонов в редокс-процессе и исключает влияние природы фонового электролита на сигнал МГ.

Увеличение тока пика при изменении pH от кислого к щелочному (рисунок 5) можно объяснить тем, что при pH 9,18 происходит образование лейко-формы МГ (II) (рисунок 6) без предшествующей химической стадии, которая наблюдается для кислой и нейтральной сред.

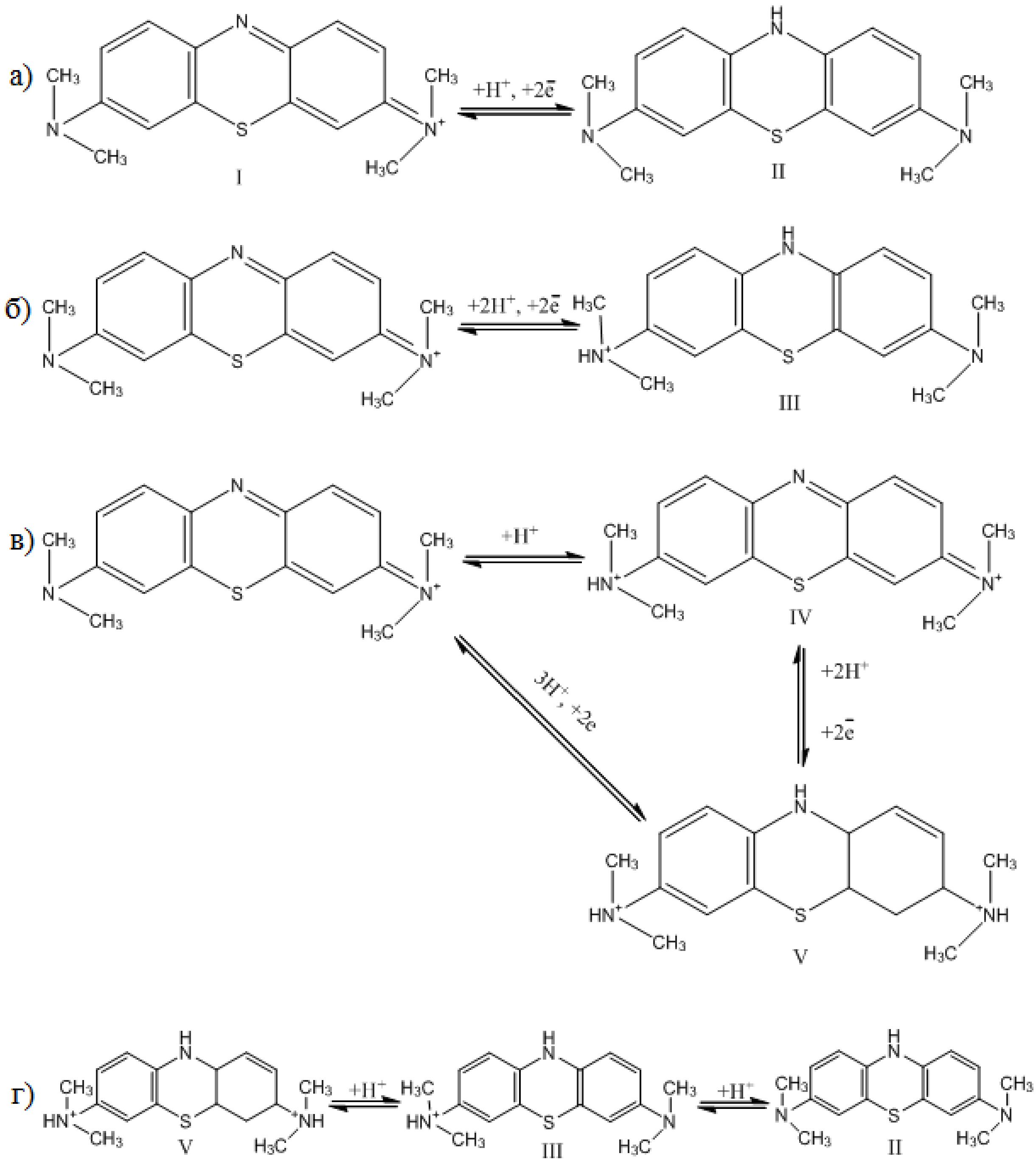


Рисунок 6 – Механизм редокс-процесса МГ на СУЭ при различных значениях рН: а) щелочная среда, б) нейтральная среда, в) кислая среда, г) превращения получившихся продуктов V, III и II при изменении рН от кислой к щелочной среде

Из схемы, показанной на рисунке 6 видно, что количество протонов, участвующих в электрохимической реакции уменьшается с увеличением рН (три для кислых сред, два – для нейтральных и один для щелочных), что еще раз подтверждает данные, представленные на рисунке 5 и согласуется с литературой [136]. Также подобная зависимость количества протонов от значения pH позволяет предположить, что редокс-процесс МГ носит необратимый характер [137].

В случае обратимой электродной реакции разность между потенциалами катодного и анодного пиков [111] равна:

$$E_{п.к} - E_{п.а} = 2\left(1{,}1\frac{RT}{nF}\right) = \frac{57}{n}\text{мВ при } 25^{0}\text{C} \quad (1)$$

Представленное выше выражение является одним из критериев обратимости электродной реакции. На основании данных [138], электровосстановление МГ – это двухэлектронный процесс, следовательно, в случае обратимого электродного процесса разность между потенциалами катодного и анодного пиков не должна превышать 28,5 мВ. Подставляя значения потенциалов катодного и анодного пиков МГ на СУЭ при pH 6,86, полученные в ходе эксперимента (таблица 3), в уравнение 1, вычислили, что $E_{п.к} - E_{п.а}$ составляет 90 мВ, что существенно отличается от 28,5 мВ. Согласно рассчитанному значению разности потенциалов катодного и анодного пиков можно предположить, что процесс электроокисления-восстановления МГ на СУЭ носит необратимый характер.

Также для изучения протекания механизма электроокисления-восстановления МГ на СУЭ исследовали влияние скорости развертки потенциала на интенсивность сигналов (токов пиков) и положения их максимумов (потенциалов пиков) (рисунок 7).

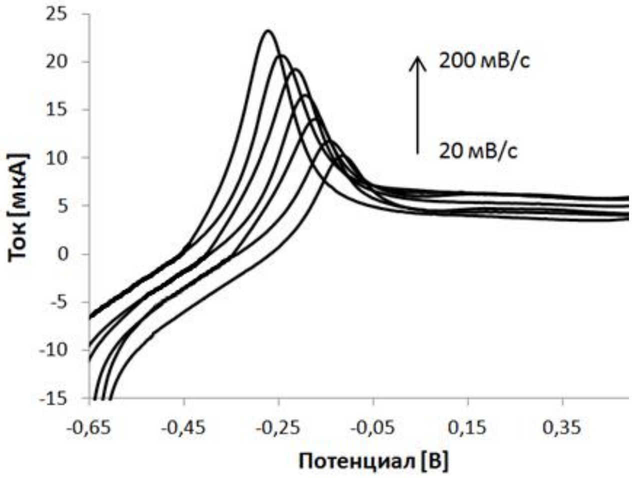


Рисунок 7 – Вольтамперные кривые электроокисления МГ в зависимости скорости развертки потенциала в буферном растворе Бриттона-Робинсона (pH 8,9). $C_{МГ}$ = 10 мг/дм^3, СУЭ. W = 20-200 мВ/с

Смещение потенциала пика в область более отрицательных значений с увеличением скорости развертки (рисунок 7) указывает изменение протекания кинетики электродного процесса [5]. Также для подтверждения необратимости построена зависимость тока пика МГ от квадратного корня скорости развертки потенциала (рисунок 8).

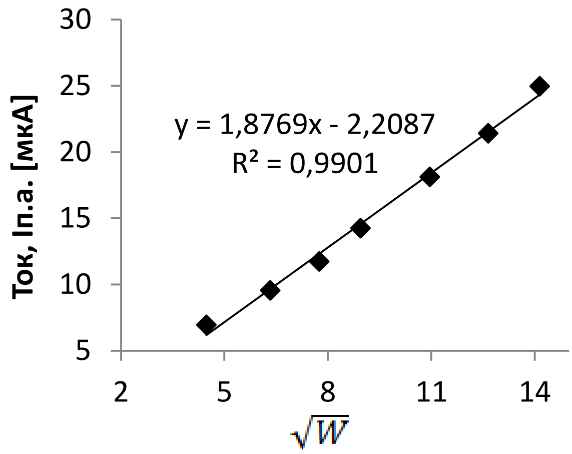


Рисунок 8 – Зависимость тока пика МГ от квадратного корня скорости развертки потенциала на СУЭ при pH=8,9

Пропорциональное изменение тока от квадратного корня скорости развертки потенциала (рисунок 8) указывает на необратимость протекания процесса [111].

При увеличении скорости сканирования помимо смещения потенциала наблюдается увеличение интенсивности тока пика электроокисления (рисунок 9).

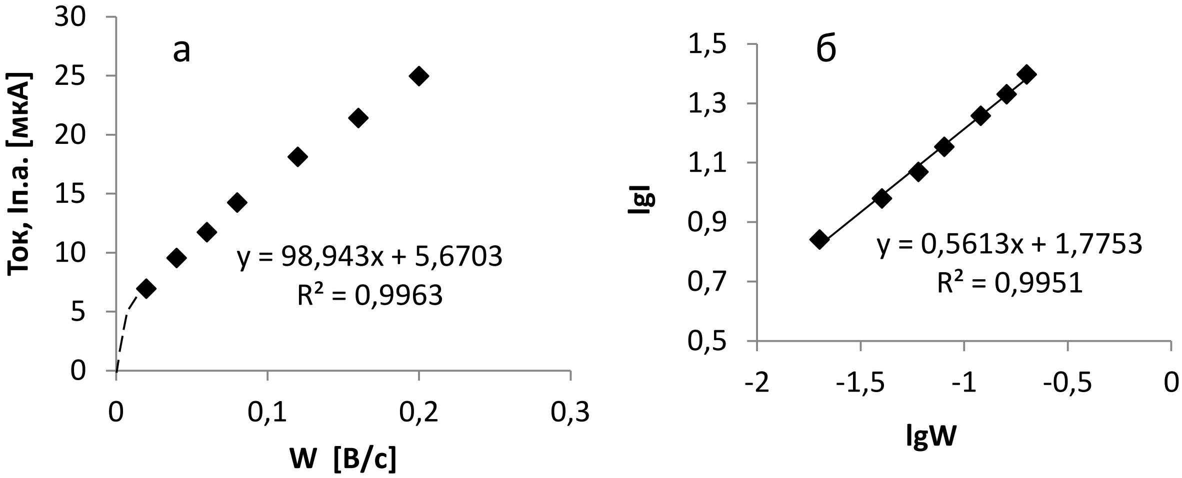


Рисунок 9 – Влияние скорости развертки потенциала на ток пика МГ на СУЭ при pH=8,9: а) зависимость тока электроокисления МГ от скорости сканирования потенциала; б) логарифмическая зависимость тока электроокисления МГ от скорости сканирования потенциала (W-критерий Семерано)

Изучая зависимости, представленные на рисунке 9, ввиду линейности $I_{п.а.}$–W [111] (рисунок 9 а) и значению углового коэффициента по критерию Семерано $\geq$ 0,5 [139] (рисунок 9 б), можно сделать вывод об осложнении электрохимического процесса явлением адсорбции МГ на поверхности СУЭ в фоновом электролите Бриттона-Робинсона с pH 8,9.

При исследовании влияния скорости развертки потенциала на ток пика МГ в фоновых электролитах с pH от 1,65 до 7 по зависимостям $I_{п.а.}$–W (отсутствие линейности), $lgI_{п.а.}$–lgW (W-критерий $\leq$ 0,5) выявлено отсутствие адсорбционной составляющей. Также замечено, что значительное увеличение концентрации МГ (более 35 мг/дм^3) приводит к адсорбции лейко-формы красителя на поверхности электрода при любом значении pH фонового электролита с появлением предпика на вольтамперограмме.

Основываясь на исследованиях авторов [140] некоторые красители способны образовывать полимерные плёнки на поверхности углеродных материалов электродов.

При исследовании электрохимического поведения МГ на СУЭ в щелочных средах выявлено увеличение сигналов электровосстановления и электроокисления МГ в среднем примерно в 2 раза в течение 15 минут без увеличения его концентрации в электрохимической ячейке. Такой прирост токов катодного и анодного пиков можно объяснить реакцией электрополимеризации МГ на поверхности СУЭ с образованием полимерной плёнки. Предположительный механизм электрополимеризации МГ представлен на рисунке 10 [141]:

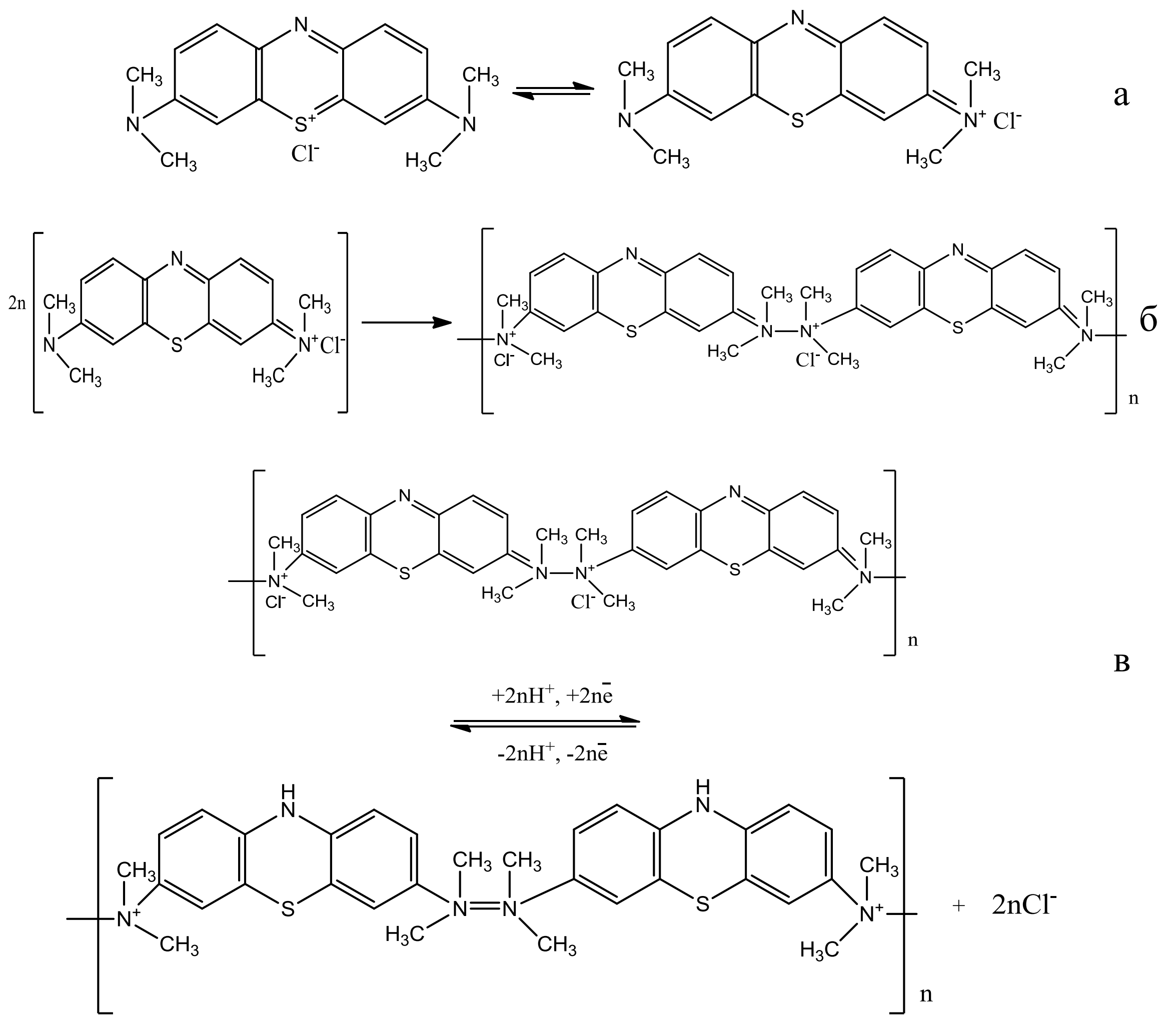


Рисунок 10 – Механизм электрополимеризации МГ: а - перераспределение заряда; б - реакция полимеризации МГ; в – реакция электрополимеризации МГ

Несмотря на бóльшую чувствительность при pH 9,18 (таблица 3), для последующего применения МГ (in situ) в определении гепарина использовали фоновый электролит с pH 6,86, вследствие явления электрополимеризации и адсорбции МГ при щелочных значениях pH.

Таким образом, по результатам изучения электрохимических свойств МГ, выявлено, что при щелочных значениях pH происходит адсорбция и электрополимеризация МГ на СУЭ с образованием полимерной плёнки на поверхности электрода. На основании чего, можно сделать вывод, что, для работы с его сигналом и последующем применении в определении гепарина наиболее рационально использовать нетоксичный СУЭ, на поверхности которого в фоновом электролите с pH 6,86 редокс-процесс МГ предположительно протекает необратимо с участием двух электронов [138] и протонов. Концентрация МГ должна быть не более 35 мг/дм^3.

Исследование электрохимических свойств гепарина в комплексе с метиленовым голубым.

Для изучения электрохимического поведения гепарина в комплексе с МГ проведен эксперимент в условиях постоянно-токовой вольтамперометрии на СУЭ в области потенциалов от 0,6 В до –0,65 В при скорости сканирования W=40 мВ/с, фоновым электролитом служил фосфатный буферный раствор с pH 6,86.

Изначально записаны циклические вольтамперные кривые и получены сигналы электроокисления и восстановления гепарина в комплексе с метиленовым голубым (Hep–МГ) на СУЭ (рисунок 11).

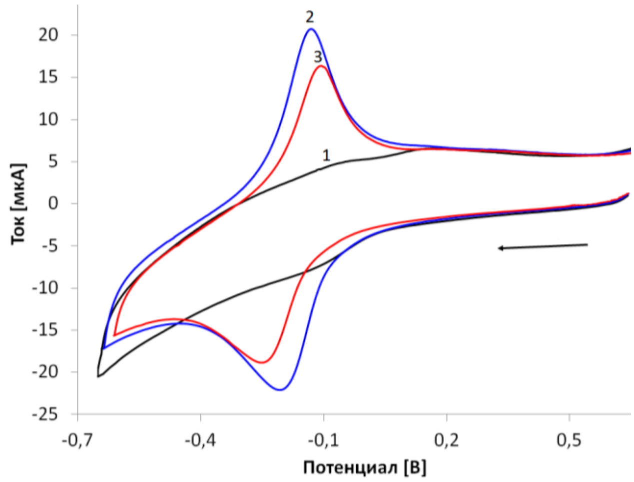


Рисунок 11 – Циклические вольтамперограммы МГ в отсутствии и присутствии гепарина на СУЭ 1 – фоновая кривая, 2 – $C_{МГ}$ = 30 мг/дм^3; 3 – C_{Hep} =5 мг/дм^3 W = 60 мВ/с, pH = 6,86

Из рисунка 11 видно, что введение добавки гепарина приводит к уменьшению сигналов электроокисления-восстановления МГ и смещению их потенциалов. Согласно [142] потенциал пика смещается в направлении отрицательных потенциалов в случае образования комплексного соединения при увеличении концентрации лиганда в растворе. Таким образом, подобное смещение потенциала (рисунок 11) можно объяснить связыванием гепарина с метиленовым голубым с образованием комплекса Hep–МГ (рисунок 12).

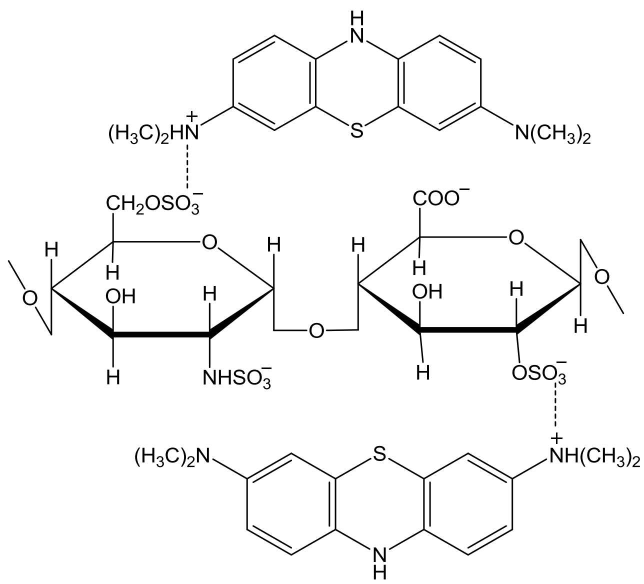


Рисунок 12 – Схема комплекса Hep–МГ

В дальнейших исследованиях для определения гепарина в лекарственных препаратах методом вольтамперометрии с использованием МГ на СУЭ (in situ, $C_{МГ}$=30 мг/дм^3) рабочей областью потенциалов выбрана анодная от -0,6 В до 0,4 В, так как в катодной области имеет место мешающее влияние кислорода на сигнал гепарина в комплексе с МГ, удаление которого из системы приводит к увеличению времени анализа.

При изучении влияния скорости развертки на сигнал электроокисления комплекса Hep-МГ выявлено наличие адсорбционной составляющей при любом значении pH фонового электролита, появление которой предположительно связано с большим молекулярным весом гепарина. Для регистрации вольтамперных кривых комплекса Hep-МГ выбрано значение скорости сканирования потенциала 60 мВ/с.

На рисунке 13 представлены вольтамперные кривые электроокисления метиленового голубого в отсутствии и присутствии гепарина.

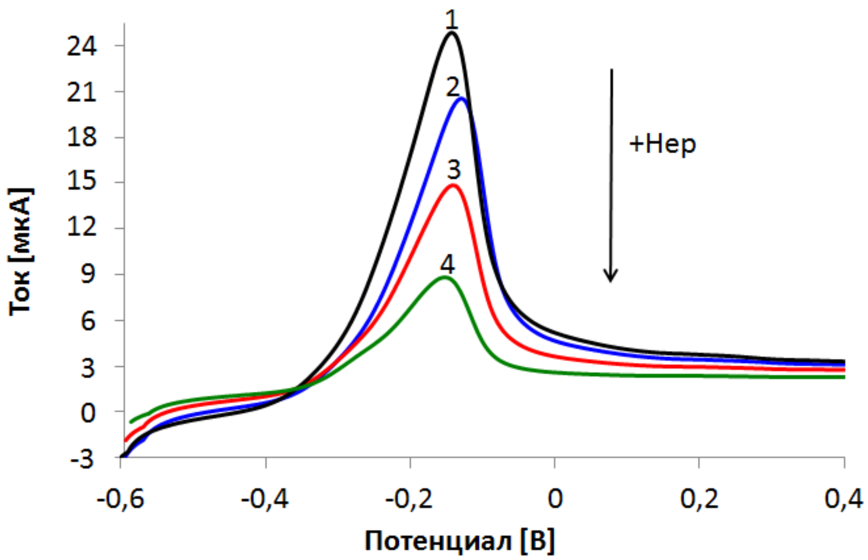


Рисунок 13 – Вольтамперограммы электроокисления МГ в отсутствии и присутствии гепарина на СУЭ: 1 – $C_{МГ}$ = 30 мг/дм^3; 2 – C_{Hep} = 8 мг/дм^3; 3 – C_{Hep} = 16 мг/дм^3;. 4 – C_{Hep} = 24 мг/дм^3. W = 60 мВ/с, pH = 6,86

По уменьшению тока пика электроокисления МГ со смещением потенциала, была построена градуировочная зависимость тока пика электроокисления комплекса Hep-МГ от концентрации гепарина в электрохимической ячейке (рисунок 14).

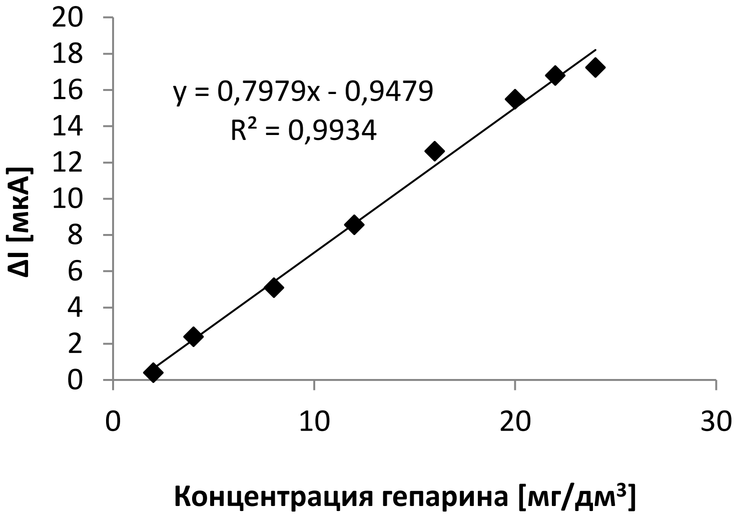


Рисунок 14 – Зависимость тока электроокисления комплекса Hep-МГ от концентрации гепарина в электрохимической ячейке. C_{Hep} от 2 до 24 мг/дм^3. W = 60 мВ/с. $\Delta \text{I} = \text{I}_{\text{МГ}} - \text{I}_{\text{Hep-МГ}}$

Из зависимости, представленной на рисунке 14 видно, что с увеличением концентрации гепарина в ячейке, уменьшается интенсивность сигнала электроокисления метиленового голубого в прямолинейной области концентраций от 2 до 24 мг/дм^3, что может быть использовано для определения гепарина в лекарственных препаратах после изучения влияния матричного эффекта на аналитический сигнал.

Таким образом, были исследованы электрохимические свойства МГ и комплекса Hep-МГ. Предложен предположительный механизм электроокисления-восстановления МГ. Подобраны рабочие условия для определения гепарина в лекарственных препаратах по уменьшению тока пика электроокисления МГ. В таблице 4 указаны параметры градуировочных характеристик для определения гепарина методом постоянно-токовой анодной вольтамперометрии с линейной разверткой потенциала в комплексе с красителем МГ.

Таблица 4 – Параметры градуировочных характеристик определения гепарина в комплексе с МГ методом анодной вольтамперометрии на СУЭ (n=3, P=0,95)

Линейный диапазон определяемых концентраций гепарина, мг/дм^3	Уравнение регрессии	Квадрат коэффициента корреляции	Предел обнаружения, мг/дм^3
2–24	y=0,7979x–0,9479	0,9934	0,31

3.2 Исследование электрохимических свойств синтетического красителя трифенилметанового класса – малахитового зелёного и его комплекса с гепарином

Малахитовый зеленый (МЗ) – катионный н-метилированный диаминотрифенилметановый краситель [143], используемый для окраски шелка, хлопка, кожи и бумаги, окрашивания микроскопических препаратов, как кислотно-основной индикатор, в криминалистике – для обнаружения пятен крови. Кроме того, соединение обладает мощными антигрибковыми, антибактериальными и антипаразитарными свойствами, в частности, демонстрируя эффективность в отношении ихтиофтириоза и грибка сапролегнии, поражающего икру рыб. Однако, несмотря на ряд положительных свойств, МЗ токсичен и опасен для многих живых организмов, включая млекопитающих, способен вызывать поражение печени, обладает мутагенными свойствами, вызывает хромосомные аномалии, и предположительно, является канцерогеном [144]. Структурная формула МЗ представлена на рисунке 15.

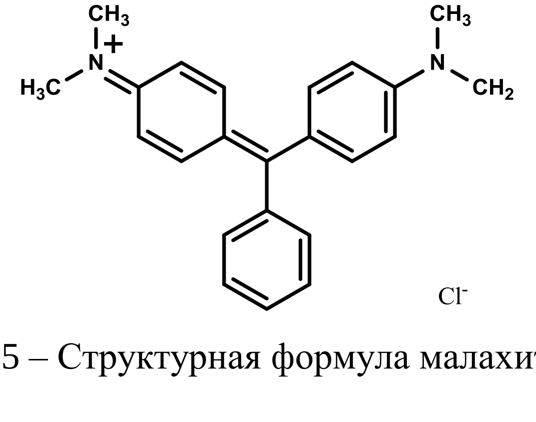


Рисунок 15 – Структурная формула малахитового зеленого

Изначально электрохимические свойства МЗ изучались методом циклической вольтамперометрии с постоянно-токовой разверткой потенциала на разных материалах электродов (РПЭ, СУЭ, МЭ) в области потенциалов для СУЭ от 1,2 В до –1,2 В, для МЭ от 1,0 до –1,0 В, для РПЭ от 0,0 В до –1,0 В со скоростью развертки 40 мВ/с в фоновых электролитах с различным значением pH в диапазоне концентраций от 10 мг/дм^3 до 40 мг/дм^3. Полученные результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Параметры вольтамперометрического определения МЗ, полученные методом циклической постоянно-токовой вольтамперометрии с использованием различных материалов электродов

Определяемое вещество	Материал индикаторного электрода	Фоновый электролит		Значение потенциала E, B		Диапазон определяемых концентраций, мг/дм^3	Уравнение регрессии по $E_{п.к.}$	Квадрат коэффициента корреляции
		Состав	pH	$E_{п.к.}$	$E_{п.а.}$			
Малахитовый зеленый	РПЭ	Оксалатный	1,65	-0,47	-	10-40	y=0,3015x--1,0333	0,9961
		Фосфатный	6,86	-0,39	-		y=0,1720x--0,5767	0,9924
		Боратный	9,18	-0,29	-		y=0,087x--0,011	0,9929
	СУЭ	Оксалатный	1,65	-0,39	-		y =0,1872x--0,325	0,9923
		Фосфатный	6,86	-0,21	-		y =0,0996x--0,1167	0,9939
		Боратный	9,18	-0,18	-		y =0,0452x++0,003	0,9958
	МЭ	Оксалатный	1,65	-0,4	-		y =0,0799x++0,4563	0,9918
		Фосфатный	6,86	-0,19	-		y =0,0345x++0,4003	0,9952
		Боратный	9,18	-0,16	-		y =0,0118x++0,0907	0,9918

На основании данных представленных в таблице 5 можно сделать вывод, что наиболее подходящий материал электрода для последующих исследований, на котором протекают электрохимические процессы МЗ – РПЭ, ввиду большей чувствительности. Также сигнал электровосстановления МЗ, полученный на РПЭ более стабилен.

Выявлено, что кислотность электролита оказывает влияние на значение потенциала пика: при изменении pH фонового электролита от щелочной среды (pH=9,18) к кислой (pH=1,65) наблюдается смещение потенциала пика МЗ в более отрицательную область, что свидетельствует об участии протонов в электрохимической реакции. Чтобы исключить влияние природы фонового электролита на сигнал МЗ были записаны циклические вольтамперные кривые в универсальном буферном растворе Бриттона-Робинсона с pH в диапазоне от 2,2 до 8,6 на РПЭ (рисунок 16).

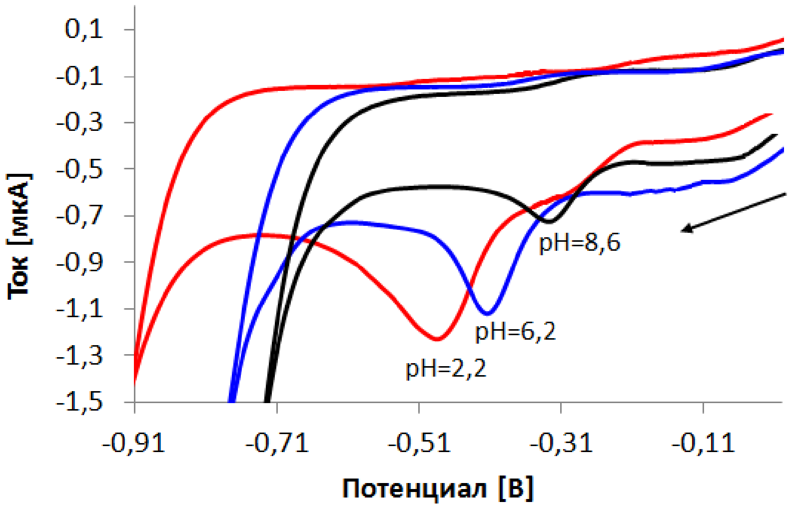


Рисунок 16 – Циклические вольтамперные кривые МЗ в универсальном буферном растворе Бриттона-Робинсона с pH в диапазоне от 2,2 до 8,6 на РПЭ. $C_{МЗ}$= 3 мг/дм^3, W=40 мВ/с

Кислотность фонового электролита влияет не только на потенциал пика МЗ, который смещается в более отрицательную область потенциалов при изменении pH от щелочного к кислому, но и на положение границ рабочей области потенциалов в целом (рисунок 16). В катодной области граница рабочих потенциалов обусловлена процессами восстановления катионов фона. При этом в кислых средах потенциал восстановления ионов H^+ сильно зависит от материала рабочего электрода. Наибольшее перенапряжение (сдвиг к более отрицательным потенциалам) достигается на ртутных материалах электродов [145].

Максимальный ток электровосстановления МЗ наблюдается при кислых pH фонового электролита, а в нейтральных и щелочных средах интенсивность сигнала МЗ уменьшается (рисунок 16). Это можно объяснить тем, что в кислой среде МЗ находится в более активной протонированной форме [146] (рисунок 17).

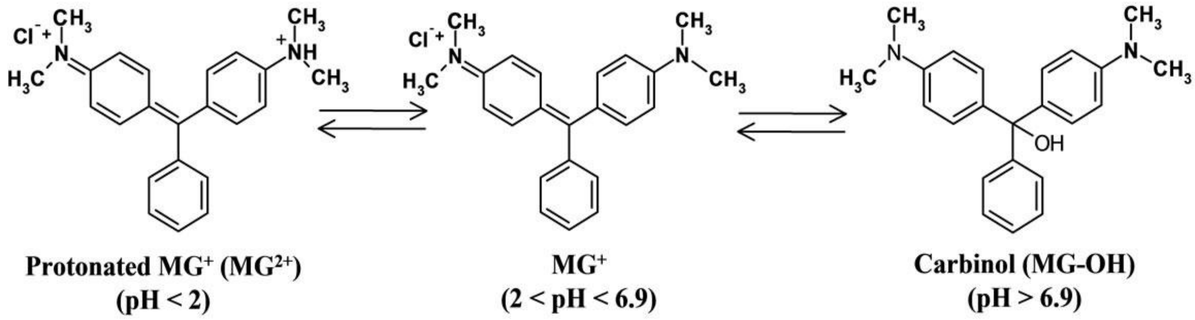


Рисунок 17 – Схема влияния pH на структуру МЗ в водных растворах

Формирование протонированной формы МЗ при кислых значениях pH, приводящее к увеличению интенсивности тока пика электровосстановления МЗ, послужило основанием для выбора оксалатного буферного раствора с pH 1,65 в качестве рабочего фонового электролита.

На основании данных, представленных на рисунке 16 и в таблице 5, МЗ электрохимически активен в катодной области потенциалов. Наличие только пика электровосстановления МЗ позволяет предположить, что электрохимический процесс при выбранных условиях, вероятнее всего, носит необратимый характер.

Для изучения протекания механизма электроокисления-восстановления МЗ на РПЭ исследовали влияние скорости развертки потенциала на интенсивность токов пиков электровосстановления МЗ и положения их максимумов (потенциалов пиков). По результатам исследований построены следующие зависимости (рисунок 18):

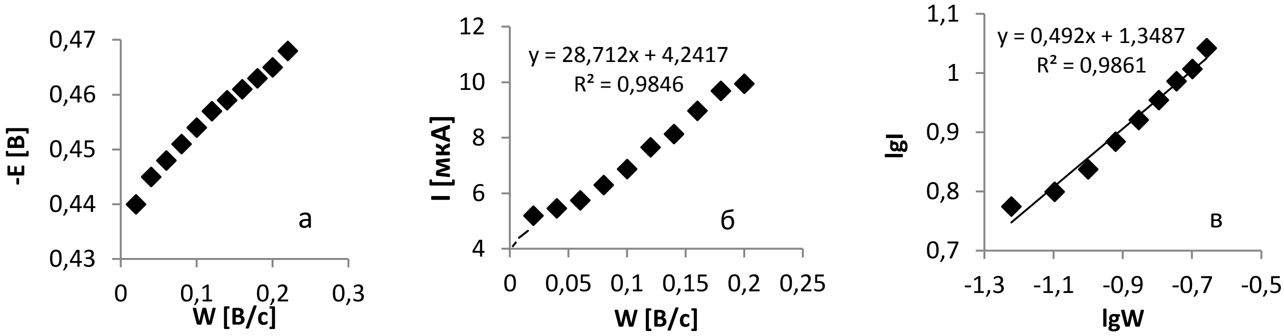


Рисунок 18 – Влияние скорости развертки потенциала на: а) потенциал пика электровосстановления МЗ; б, в) величину тока электровосстановления МЗ в простой и логарифмической форме соответственно

Анализируя рисунок 18 а, можно также предположить, что процесс электровосстановления МЗ носит необратимый характер, так как с увеличением скорости развертки поляризующего напряжения потенциал пика смещается в сторону более отрицательных значений.

Изучая зависимости, представленные на рисунках 18 б и в, ввиду нелинейности $I_{п.к.}$–W [111] (рисунок 18 б) и значению углового коэффициента по критерию Семерано $\leq$ 0,5 [139] (рисунок 18 в), можно сделать вывод об отсутствии адсорбции МЗ на поверхности РПЭ в фоновом электролите с рН 1,65. Кроме того, значение критерия Семерано $\leq$ 0,5, свидетельствует о том, что электровосстановление МЗ контролируется кинетикой электродного процесса.

Согласно [137] для необратимого процесса электровосстановления вещества разность потенциалов между потенциалом пика $E_п$ и значением потенциала, соответствующего половине высоты $E_{1/2}$, при 298 К равна:

$$\left|E_п - E_{1/2}\right| = \frac{47{,}7}{\alpha}\ мВ\ ,$$

где α – эффективный коэффициент переноса электронов катодного процесса.

Значение эффективного коэффициента переноса электронов можно вычислить из Тафелевских зависимостей [137] (рисунок 19).

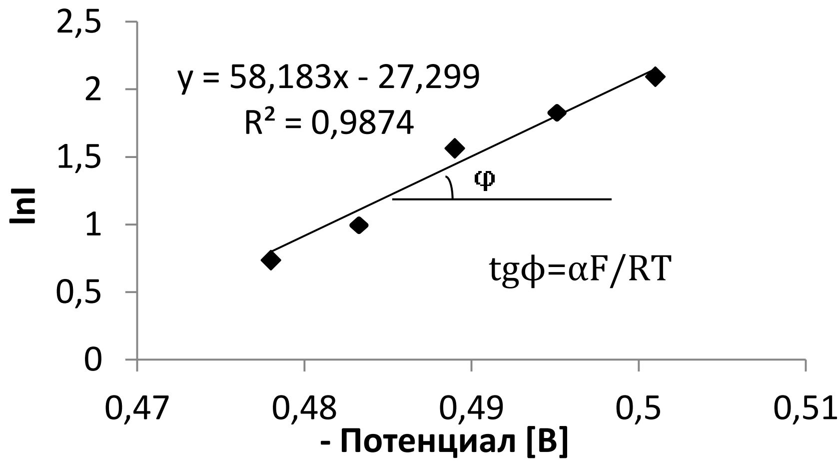


Рисунок 19 – Тафелевская зависимость процесса электровосстановления МЗ на РПЭ при рН=1,65

По тангенсу угла наклона (рисунок 19) значение эффективного коэффициента переноса электронов МЗ составило 1,45. Тогда:

$$\left|\mathrm{E_п} - \mathrm{E}_{1/2}\right| = \frac{47{,}7}{\alpha} = |475 - 442| = \frac{47{,}7}{1{,}45} \approx 33\ \text{мВ}$$

Полученное значение $\left|\mathrm{E_п} - \mathrm{E}_{1/2}\right|$ указывает на вероятность протекания необратимого процесса.

Кроме этого, значение эффективного коэффициента переноса электронов МЗ равное 1,45, говорит о том, что в лимитирующей стадии электродного процесса участвует второй электрон [147]. Таким образом, на основании литературных [148] и экспериментальных данных, можно предположить следующий суммарный механизм протекания процесса электровосстановления МЗ на РПЭ (рисунок 20):

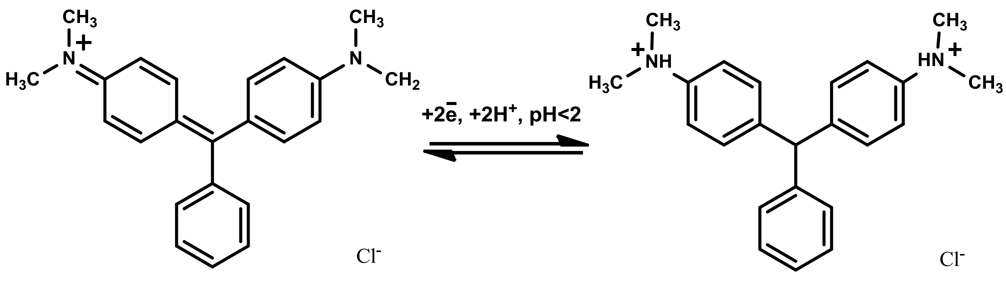


Рисунок 20 – Вероятный механизм протекания процесса электровосстановления МЗ на РПЭ в кислой среде

Из литературных данных известно, что МЗ является основным красителем с относительно невысокой светостойкостью (2 балла) [143]. Исходя из этого, в работе исследовались электрохимические свойства МЗ в зависимости от световых условий. На рисунке 21 изображены вольтамперные кривые электровосстановления МЗ в зависимости от световых условий.

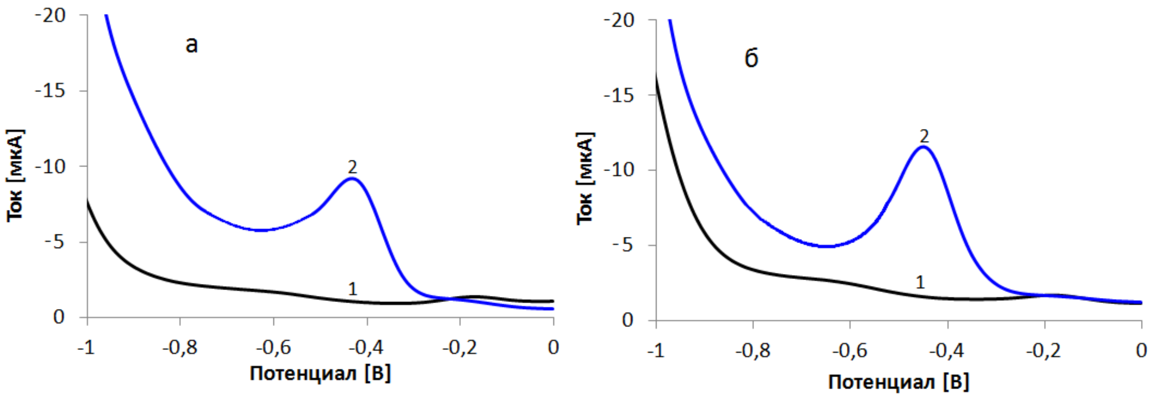


Рисунок 21 – Вольтамперные кривые электровосстановления МЗ в зависимости от световых условий: а) раствор МЗ, который перед началом эксперимента выдерживался на свету 10 мин; б) раствор МЗ в течение такого же промежутка времени выдерживался в темноте (электрохимическая ячейка, оборачивалась алюминиевой фольгой). 1 – фоновая кривая, 2 – $C_{МЗ}$ = 30 мг/дм^3

Из вольтамперограмм, представленных на рисунке 21 видно, что сигнал электровосстановления МЗ на свету имеет меньшую интенсивность, чем сигнал от раствора МЗ, находившегося в темноте. На основании чего все дальнейшие исследования с использованием МЗ проводились в электрохимической ячейке, обернутой алюминиевой фольгой.

Таким образом, были исследованы электрохимические свойства МЗ методом циклической и катодной постоянно-токовой вольтамперометрии, предложен предположительный механизм электровосстановления МЗ с участием двух электронов и двух протонов, изучено влияние светового воздействия на электрохимическое поведение МЗ, подобраны условия для работы с его сигналом при последующем определении гепарина: индикаторный РПЭ, оксалатный фоновый электролит с pH 1,65, рабочая область потенциалов от 0,0 до –1,0 В, концентрация красителя не должна превышать 35 мг/дм^3.

Исследование электрохимических свойств гепарина в комплексе с малахитовым зеленым на РПЭ

Для изучения электрохимического поведения гепарина в комплексе с МЗ (Hep-МЗ) проведен эксперимент в условиях постоянно-токовой катодной вольтамперометрии на СУЭ в области потенциалов от 0,0 В до –1,0 В при скорости сканирования W=40 мВ/с, фоновым электролитом служил оксалатный буферный раствор с pH 1,65.

При исследовании электрохимических свойств гепарина в комплексе с МЗ важным фактом оказалась последовательность введения гепарина в электрохимическую ячейку. На рисунке 22 представлены вольтамперограммы восстановления МЗ на РПЭ в комплексе с гепарином в зависимости от последовательности введения гепарина в исследуемую систему.

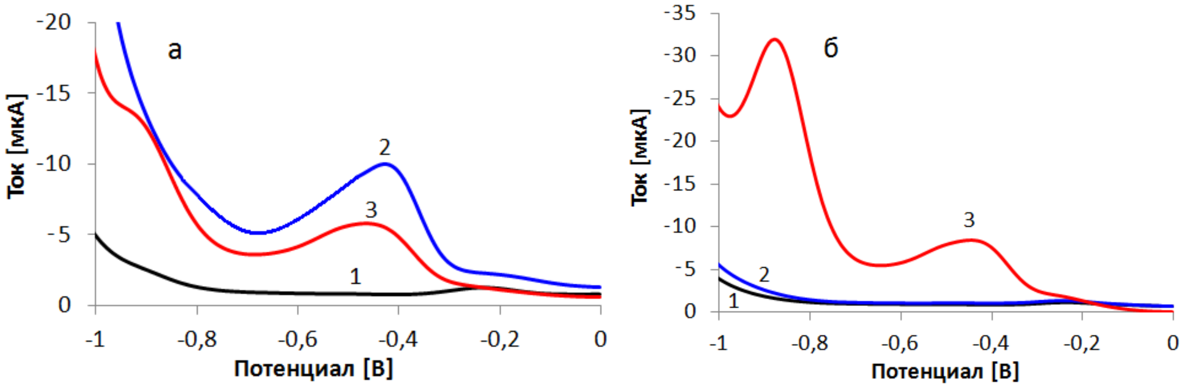
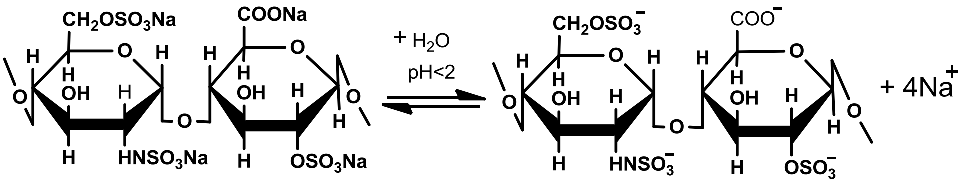


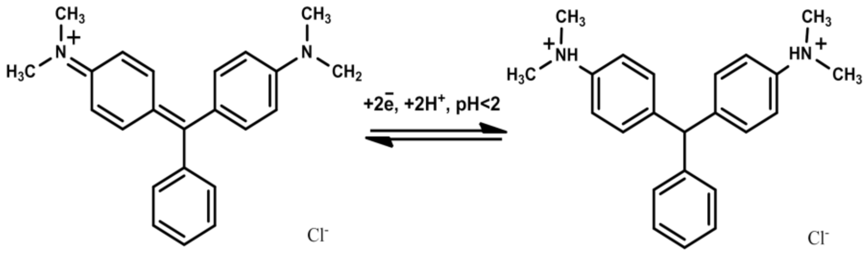
Рисунок 22 – Вольтамперные кривые электровосстановления МЗ на РПЭ в зависимости от последовательности введения гепарина в электрохимическую ячейку: а) гепарин вводился после добавления МЗ: 1 – фоновая кривая, 2 – $C_{МЗ}$ =30 мг/дм^3, 3 – C_{Hep} =5 мг/ дм^3; б) гепарин вводился до добавления МЗ: 1 – фоновая кривая, 2 – C_{Hep} =5 мг/ дм^3, 3 – $C_{МЗ}$ = 30 мг/дм^3. W=40 мВ/с, pH=1,65

На рисунке 22 (б) помимо сигнала восстановления красителя при E = –0,46 В появляется хорошо выраженный сигнал при E = –0,87 В, тогда как на рисунке 22 (а) в этой области можно наблюдать небольшую волну. Сигнал при E= –0,87 В предположительно соответствует восстановлению комплекса Hep-МЗ, который формируется в кислой среде (pH=1,65) после предварительной стадии гидролиза гепарина на поверхности РПЭ. Возможные продукты гидролиза гепарина (отрицательно заряженные частицы), вероятнее всего, связываются с положительно заряженными NH- группами МЗ, что приводит к образованию комплекса Hep-МЗ, который восстанавливается на РПЭ. Исходя из последовательности введения 1 – гепарин, 2 – МЗ, на рисунке 23 поэтапно представлен предположительный механизм протекания процесса:

а)

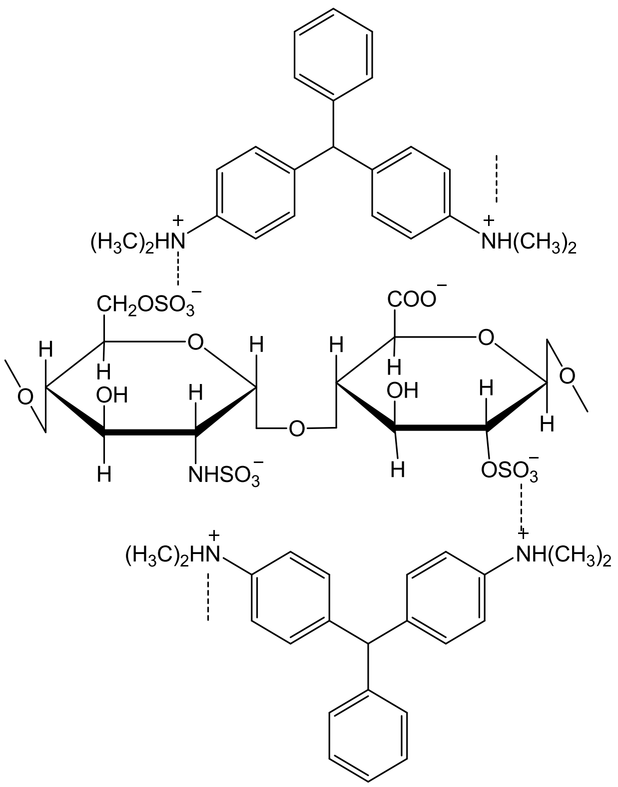


б)



E = -0.46 B

в)



E = -0.87 B

Рисунок 23 – Механизм восстановления комплекса Hep-МЗ на РПЭ при pH=1,65: а) гидролиз фармакологического раствора гепарина в форме тетранатриевой соли; б) электровосстановление МЗ; в) образование комплекса Hep-МЗ

При изначальном введении МЗ в электрохимическую ячейку (до добавления гепарина) процесс формирования комплекса подавляется (рисунок 22 а).

Для подтверждения наличия стадии образования комплекса Hep-МЗ на РПЭ записаны вольтамперограммы восстановления Hep-МЗ в зависимости скорости развертки потенциала (рисунок 24).

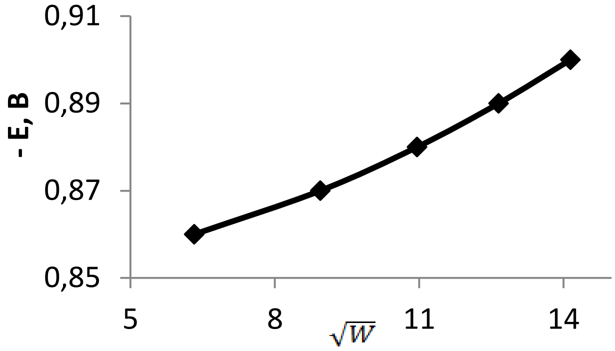


Рисунок 24– Зависимость потенциала электровосстановления комплекса МЗ-Hep на РПЭ от квадратного корня из скорости развертки

При увеличении скорости развертки от 20 до 200 мВ/с потенциал комплекса Hep–МЗ смещается в более отрицательную область (рисунок 24), что свидетельствует о стадии формирования комплекса Hep-МЗ.

При изучении влияния скорости развертки на сигнал электроокисления комплекса Hep-МЗ выявлено наличие адсорбционной составляющей при любом значении pH фонового электролита, появление которой, как и в случае с МГ, предположительно связано с большим молекулярным весом гепарина. Для регистрации вольтамперных кривых комплекса Hep-МЗ выбрано значение скорости сканирования потенциала равное 60 мВ/с.

При подобранных условиях записаны вольтамперограммы электровосстановления комплекса Hep-МЗ в зависимости от концентрации гепарина в электрохимической ячейке (рисунок 25).

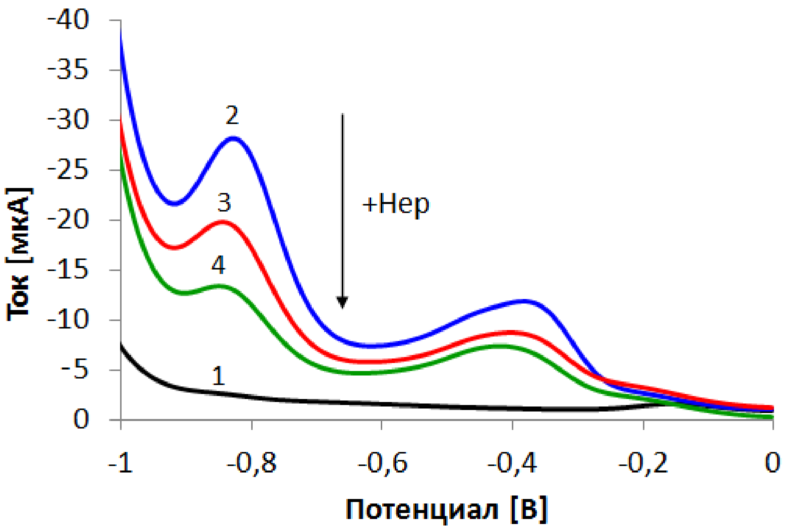


Рисунок 25 – Вольтамперные кривые электровосстановления комплекса Hep-МЗ в зависимости от концентрации гепарина. 1 – фоновая кривая; 2, 3, 4 – 30 мг/дм^3 малахитового зеленого с гепарином 5, 10, 20 мг/дм^3 соответственно. РПЭ, W = 60 мВ/с, pH=1,65

С увеличением концентрации гепарина на вольтамперограмме наблюдается пропорциональное уменьшение интенсивности тока пика при E = –0,87 В. Прямолинейная зависимость падения тока комплекса Hep-МЗ от концентрации гепарина представлена на рисунке 26.

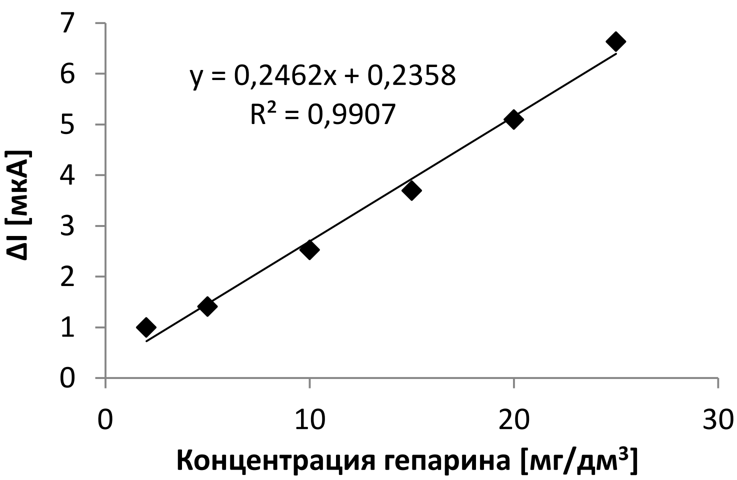


Рисунок 26 – Зависимость изменения тока электровосстановления комплекса Hep-МЗ от концентрации гепарина в электрохимической ячейке ($\Delta I = I_{Hep_1+МЗ}/I_{Hep_{1+n}+МЗ}$). C_{Hep} от 2 до 25 мг/дм^3. РПЭ,W = 60 мВ/с, pH=1,65. $C_{МЗ}$=30 мг/дм^3

Из зависимости, представленной на рисунке 26 видно, что с увеличением концентрации гепарина в ячейке, уменьшается интенсивность сигнала при –0,87 В в области концентраций от 2 до 25 мг/дм^3, что может быть использовано для определения гепарина в лекарственных препаратах после изучения влияния матричного эффекта на аналитический сигнал.

Таким образом, были исследованы электрохимические свойства МЗ и комплекса Hep-МЗ. Предложен предположительный механизм электровосстановления МЗ и формирования комплекса Hep-МЗ. Подобраны рабочие условия для определения гепарина в лекарственных препаратах по уменьшению тока пика при –0,87 В. В таблице 6 указаны параметры градуировочных характеристик для определения гепарина методом постоянно-токовой катодной вольтамперометрии с линейной разверткой потенциала в комплексе с красителем МЗ.

Таблица 6 – Параметры градуировочных характеристик определения гепарина в комплексе с МЗ методом катодной вольтамперометрии на РПЭ (n=3, P=0,95)

Линейный диапазон определяемых концентраций гепарина, мг/дм^3	Уравнение регрессии	Квадрат коэффициента корреляции	Предел обнаружения, мг/дм^3
2–25	y=0,2462x+0,2358	0,9907	0,48

3.3 Исследование электрохимических свойств синтетического красителя индаминового класса – толуиленового синего и его комплекса с гепарином

Толуиленовый синий (ТС) – основный краситель индаминового класса, хорошо растворимый в воде, используется в окислительно-восстановительном титровании в качестве индикатора [149]. На рисунке 27 изображена структурная формула ТС.

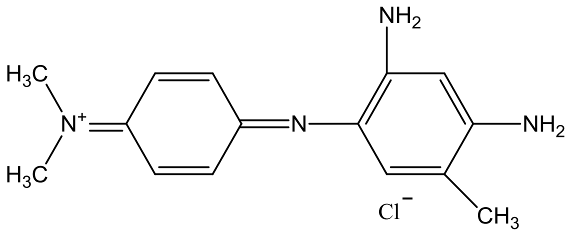


Рисунок 27 – Структурная формула толуиленового синего

Изучение электрохимических свойств ТС методом вольтамперометрии ранее не проводилось, в связи с чем, исследование его электрохимического поведения представляет интерес с научной точки зрения.

Изначально проводились исследования электрохимических свойств ТС методом циклической вольтамперометрии с постоянно-токовой разверткой потенциала на разных материалах электродов (РПЭ, СУЭ, МЭ) в фоновых электролитах с различным значением pH в диапазоне концентраций от 10 мг/дм^3 до 40 мг/дм^3. Вид полученных вольтамперных кривых позволил сделать вывод о многостадийности редокс-процессов ТС. На основании большей стабильности и линейности всех катодных и анодных пиков для исследования электрохимических свойств ТС выбран МЭ. На рисунке 28 приведена циклическая вольтамперная кривая ТС на МЭ в буферном растворе Бриттона-Робинсона с pH 2.

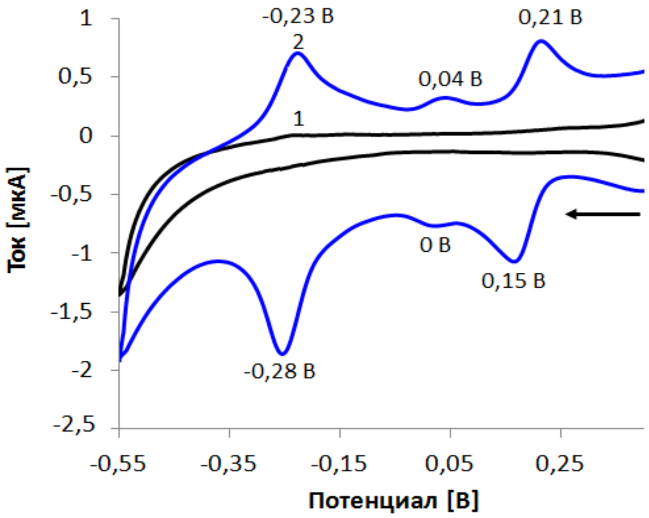
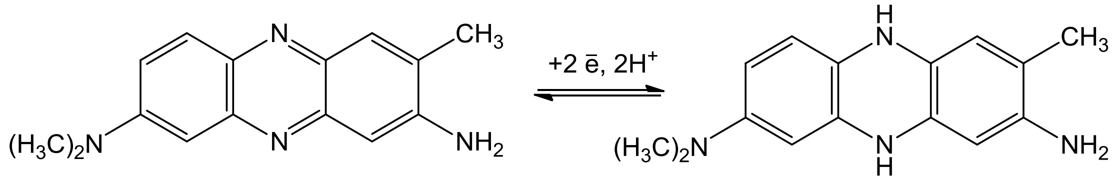


Рисунок 28 – Циклическая вольтамперная кривая ТС на МЭ в буферном растворе Бриттона-Робинсона с pH 2. 1 – фоновая кривая; 2 – $C_{ТС}$ = 5 мг/дм^3. W= 40 мВ/с

Известно, что ТС – неустойчивый краситель, и даже при комнатной температуре разлагается с образованием толуиленового красного (ТК) [150]. Согласно [151, 152], можно предположить, что катодный и анодный пики при –0,28 В и – 0,23 В соответственно относятся к взаимным переходам окисленной и восстановленной форм ТК, протекающим в феназиновом фрагменте с участием двух электронов и двух протонов [153]:



Для подтверждения, данного предположения записаны циклические вольтамперограммы ТК на МЭ в буферном растворе Бриттона-Робинсона с pH 2 (рисунок 29).

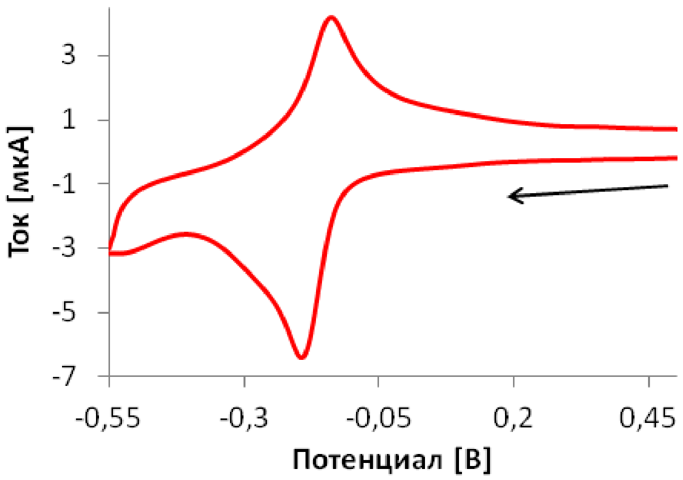


Рисунок 29 – Циклическая вольтамперная кривая ТК на МЭ в буферном растворе Бриттона-Робинсона с pH 2. $C_{ТК}$ = 15 мг/дм^3. W= 40 мВ/с

Вольтамперная зависимость, представленная на рисунке 29 подтверждает природу катодного и анодного пиков (рисунок 28) при –0,28 В и –0,23 В соответственно.

Окислительно-восстановительная пара на вольтамперной кривой (рисунок 28) при 0,15 В и 0,21 В, вероятнее всего, соответствуют редокс-процессам самого ТС. В процессе восстановления многих органических красителей образуются их лейко-формы [154]. Если предположить, что из исходного ТС в водной среде образуется его лейко-фома, то в соответствии [137] «предпики» на катодной и анодной кривых (рисунок 28) при 0 и 0,04 В, являются результатом адсорбции лейко-ТС. С целью подтверждения предположений о протекании процессов электроокисления-восстановления ТС и адсорбции лейко-ТС и установления их механизмов, в работе выполнены исследования по влиянию pH среды, скорости сканирования потенциала и температуры на сигнал ТС.

При изучении влияния pH фонового электролита на электрохимические процессы исследуемого раствора ТС были записаны циклические вольтамперные кривые в универсальном буферном растворе Бриттона-Робинсона с pH в диапазоне от 2 до 8,7 на МЭ (рисунок 30).

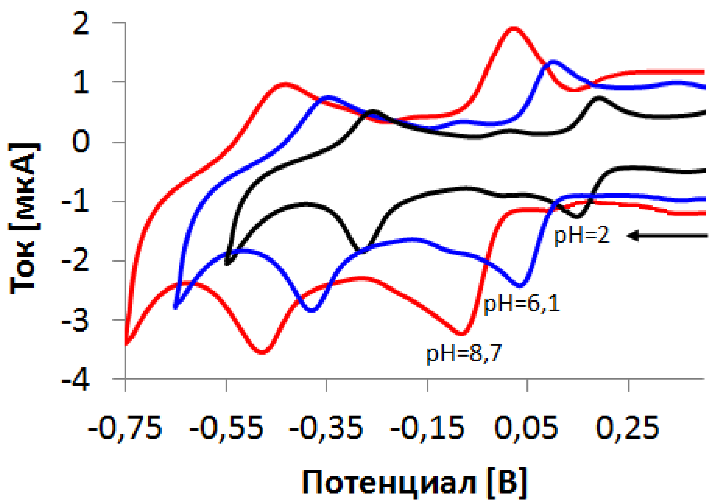


Рисунок 30 – Циклические вольтамперные кривые ТС в универсальном буферном растворе Бриттона-Робинсона с pH в диапазоне от 2 до 8,6 на МЭ. C_{TC} = 5 мг/дм^3, W=40 мВ/с

При изменении pH электролита от кислого к щелочному значению, наблюдается смещение потенциалов пиков в более электроотрицательную область.

В ходе исследований замечено, что при увеличении количества циклов в щелочных и нейтральных средах происходит уменьшение интенсивности сигнала ТС, вероятнее всего, вследствие явления электрополимеризации ТК на поверхности индикаторного электрода, которое на сегодняшний день довольно полно изучено и описано в литературе [152, 155]. Данное наблюдение позволило выбрать фоновый электролит с кислым значением pH для дальнейшего изучения электрохимических свойств ТС.

Для установления механизма протекания редокс-процесса ТС изначально по экспериментальным данным изменения пика электроокисления ТС (C_{TC}=const) на МЭ от скорости сканирования потенциала построена зависимость Тафеля (рисунок 31).

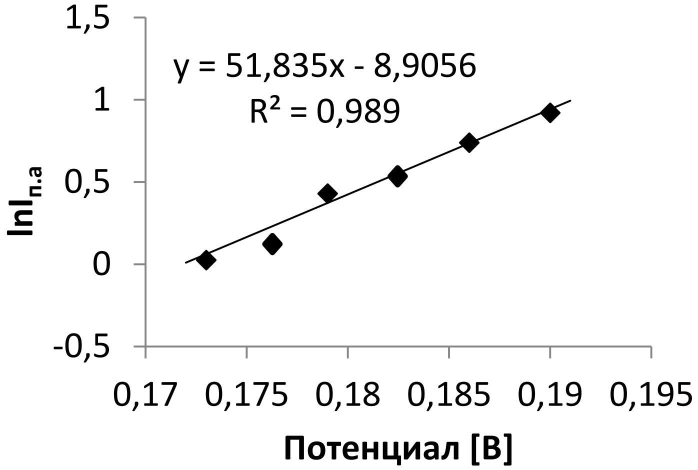


Рисунок 31 – Тафелевская зависимость процесса электроокисления ТС на МЭ при pH=2

При изучении зависимости $\ln I_{п.а}$–$E_{п.а.}$, представленной на рисунке 31, рассчитанное значение эффективного коэффициента переноса анодного процесса составило 1,3. Ввиду близости вычисленного значения эффективного коэффициента переноса к 1,5 по критериям Дамьяновича и Лосева можно предположить, что переход второго электрона лимитирует весь электродный процесс, который, исходя из этого, вероятнее всего, является двухэлектронным [147]. Таким образом, учитывая, что в ходе электроокисления-восстановления ТС участвуют протоны, можно предположить следующую схему протекания электродного процесса (рисунок 32):

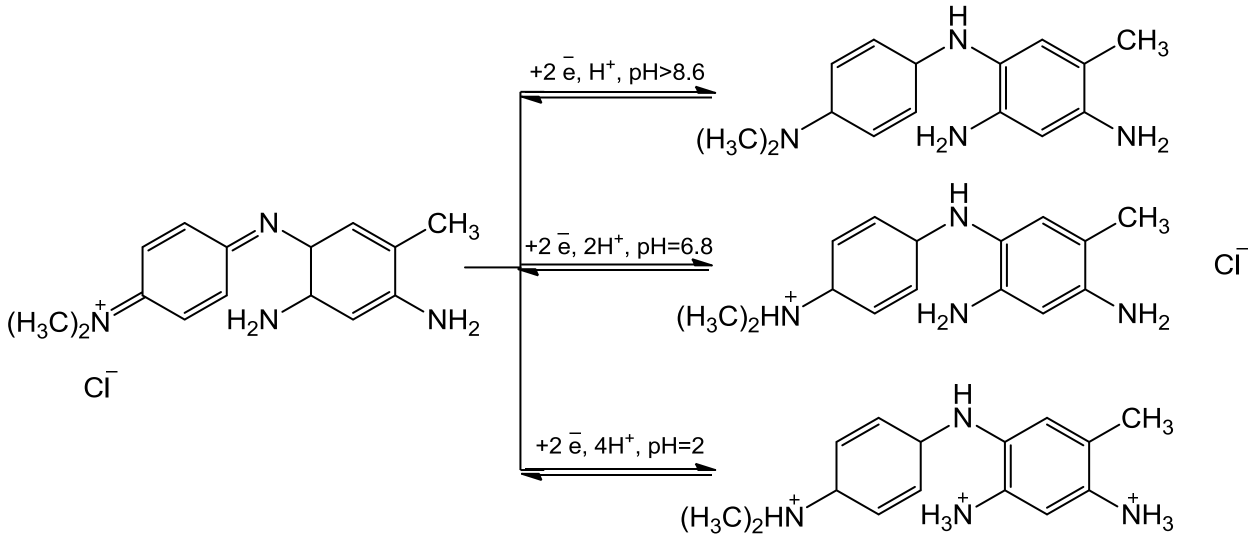


Рисунок 32 – Вероятный механизм протекания электродного процесса ТС на МЭ

Помимо установления механизма протекания электродного процесса и числа электронов, метод циклической вольтамперометрии использовался для определения кинетических характеристик (константы скорости, обратимости процесса, адсорбционной составляющей). В таблице 7 представлены результаты циклической вольтамперометрии ТС на МЭ при pH=1,9 в зависимости от скорости сканирования потенциала.

Таблица 7 – Результаты циклической вольтамперометрии ТС (C_{TC} = 10 мг/дм^3) на МЭ при pH=1,9 в зависимости от скорости сканирования потенциала (n=2, P=0,95)

W, В/сек	$\sqrt{W}$	$I_{п.к.}$, мкА	$I_{п.а.}$, мкА	$I_{п.к}/I_{п.а}$	$E_{п.а.}$, В	$E_{п.к.}$, В	$\Delta E_{п.}$, В
0,005	0,07	1,386	1,025	1,352	0,173	0,132	0,041
0,01	0,1	1,994	1,536	1,298	0,179	0,131	0,048
0,02	0,14	2,791	2,094	1,333	0,186	0,13	0,056
0,03	0,17	3,506	2,511	1,396	0,19	0,13	0,06
0,04	0,2	4,251	2,968	1,432	0,195	0,13	0,065
0,06	0,24	4,737	3,515	1,348	0,203	0,129	0,074
0,08	0,28	5,412	3,986	1,358	0,207	0,125	0,082
0,1	0,32	6,002	4,407	1,362	0,214	0,123	0,091

Окончание таблицы 7

0,14	0,37	7,477	5,621	1,33	0,242	0,118	0,124
0,18	0,42	8,308	6,413	1,295	0,257	0,111	0,146
0,22	0,47	9,64	7,024	1,372	0,276	0,102	0,174
0,26	0,51	9,825	7,405	1,327	0,289	0,094	0,195

Из таблицы 7 видно, что увеличение скорости развертки приводит к:

1 смещению $E_{п.к.}$ в катодную область потенциалов, $E_{п.а.}$ – в анодную;

2 увеличению $\Delta E_п$;

3 линейной зависимости $I_{п.к.}$ и $I_{п.а.}$ от квадратного корня из скорости развертки потенциала, при этом значение $I_{п.к}/I_{п.а}$ больше 1 при любой скорости сканирования.

Исходя из вышеизложенного, можно предположить, что редокс-процесс ТС при данных условиях эксперимента, скорее всего, носит квазиобратимый характер – протекает со смешанным диффузионно-кинетическим контролем. Согласно Матсуда и Айябэ [156] квазиобратимому поведению отвечают значения параметра Λ, лежащие в интервале от 10^{-3} до 15, что соответствует интервалу гетерогенной константы скорости реакции (k_s, см/с) от $2\cdot10^{-5}\cdot W^{1/2}$ до $0{,}3\cdot W^{1/2}$ (скорость развертки W в В/с). Параметр Λ рассчитывали по формуле [157]:

$$\Lambda = \frac{k_s}{D^{1/2}(nF/RT)^{1/2}W^{1/2}}$$

Коэффициент диффузии (D) красителя ТС вычисляли в соответствии с [158] по формуле:

$$log_{10}D = -0.3773 log_{10}M - 4.392,$$

где M – молярная масса ТС.

Рассчитанное значение коэффициента диффузии ТС составило $4{,}8\cdot10^{-6}$ см^2/с.

Расчет константы скорости гетерогенного переноса электрона производили по следующему уравнению [137]:

$$log_{10}\left(k_s\sqrt{\frac{RT}{nFWD}}\right) = 0.294\left(\frac{nF}{RT}\Delta E_п - 2.218\right)^{-1} - 0.0803 - 0.108\left(\frac{nF}{RT}\Delta E_п - 2.218\right),$$

где R – газовая постоянная 8,314 Дж/моль·К; T – температура, К; n – общее число переносимых электронов; F – постоянная Фарадея, 96485,3329 Кл/моль; W – скорость сканирования В/с; D – коэффициент диффузии, см^2/с; $\Delta E_п$ – найденная экспериментально разность потенциалов пиков, В.

Значение константы скорости k_s при скорости развертки потенциала 0,04 В/с получилось равным $2{\cdot}10^{-3}$ с$^{-1}$, а параметр Λ при такой константе составил 0,7. Рассчитанные по экспериментальным данным (таблица 7) величины Λ и k_s находятся в интервале значений, отвечающих квазиобратимому процессу.

При изучении зависимости предельного тока от температуры по уравнению Аррениуса [147] выявлено, что степень обратимости – понятие относительное, зависящее от скорости развертки потенциала. Так, по результатам анодной вольтамперометрии, построена зависимость логарифма тока пика электроокисления ТС от температуры при разных скоростях сканирования потенциала (рисунок 33).

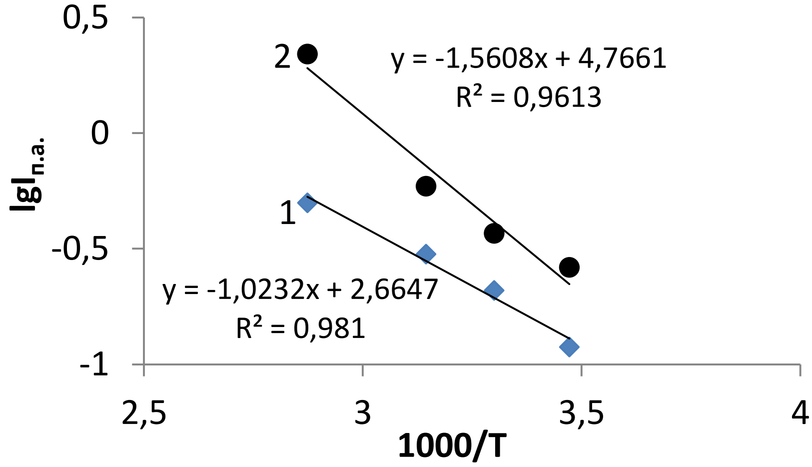


Рисунок 33 – Зависимость логарифма тока пика электроокисления ТС от температуры при разных скоростях сканирования потенциала: 1 – 40 мВ/с; 2 – 180 мВ/с. $C_{ТС}$= 5 мг/дм^3, МЭ, pH=1,9

Тангенс угла наклона прямой в координатах $lgI_{п.а}$–1000/T по уравнению Аррениуса в интегральной форме равен $tg\alpha = \frac{E}{2.3{\cdot}R}$, тогда энергию активации процесса можно вычислить по формуле $E = 2.3 \cdot R \cdot tg\alpha$. Используя значения $tg\alpha$ из рисунка 33, рассчитана энергия активации электроокисления ТС: при 40 мВ/с она равна 19,5 кДж/моль, при 180 мВ/с – 29,8 кДж/моль. Исходя из вычисленного значения энергии активации можно сделать вывод, что при скорости 40 мВ/с процесс электроокисления ТС носит обратимый характер, при увеличении скорости сканирования происходит увеличение значения энергии активации, что говорит о изменении хода протекания процесса в сторону необратимого и возможном появлении адсорбции ТС на электроде.

Предположительное наличие адсорбционной составляющей оценивали из зависимостей, изображенных на рисунке 33, построенных с использованием экспериментальных данных (таблица 7).

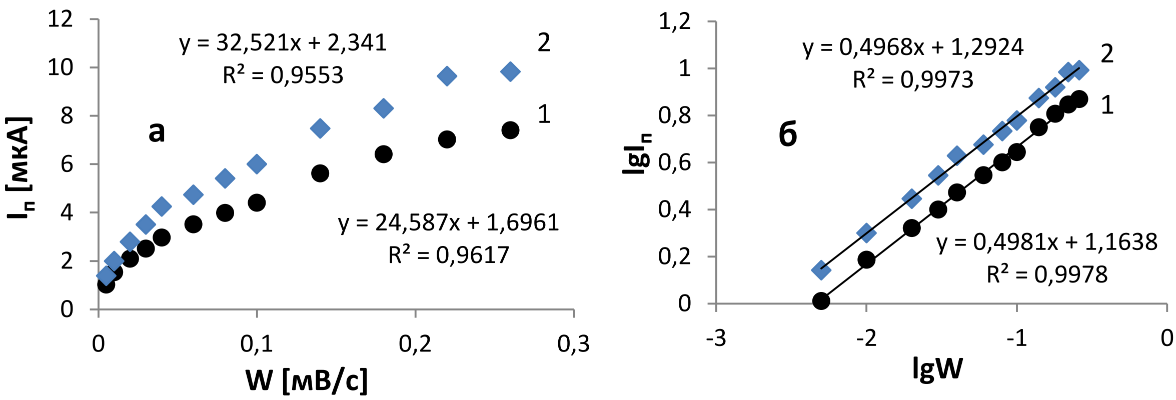


Рисунок 33 – Влияние скорости развертки потенциала на ток пика ТС: а) зависимость токов электроокисления (1) и электровосстановления (2) ТС от скорости сканирования потенциала; б) логарифмическая зависимость токов электроокисления (1) и электровосстановления (2) ТС от скорости сканирования потенциала (W-критерий Семерано). $C_{ТС}$ = 10 мг/дм^3, МЭ, pH=1,9

Ввиду нелинейности $I_{п.}$–W [111] (рисунок 33 а) и значению углового коэффициента по критерию Семерано ≤ 0,5 [139] (рисунок 33 б), можно сделать вывод об отсутствии адсорбции ТС на поверхности МЭ в фоновом электролите с pH 1,9. Кроме того, значение критерия Семерано ≤ 0,5, свидетельствует о том, что протекающий редокс-процесс ТС контролируется кинетикой электродного процесса. При исследовании влияния скорости развертки потенциала на токи пиков ТС в фоновых электролитах с нейтральным и щелочным значениями pH по зависимостям $I_{п.}$–W, $lgI_{п.}$–lgW выявлено наличие адсорбционной составляющей. Также замечено, что значительное увеличение концентрации ТС (более 30 мг/дм^3) приводит к адсорбции лейко-формы красителя на поверхности электрода при любом значении pH фонового электролита.

Для последующего применения ТС при определении гепарина, ввиду его неустойчивости, принято решение путем доведения раствора красителя до кипения переводить его в ТК и лейко-форму. На рисунке 34 представлена циклическая вольтамперограмма раствора ТС после кипячения.

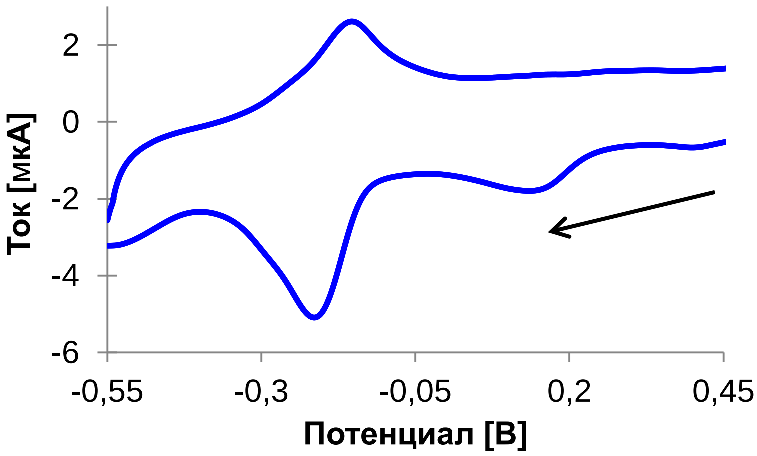


Рисунок 34 – Циклическая вольтамперная кривая раствора ТС после кипячения на МЭ в буферном растворе Бриттона-Робинсона с pH 2. $C_{ТС}$ = 15 мг/дм^3. W= 40 мВ/с

Из рисунка 34 видно, что кипячение раствора ТС действительно приводит к его переходу в ТК и лейко-форму, сигналы электроокисления и восстановления которых стабильны в течение месяца при хранении в плотно закрытой посуде из темного стекла.

Таким образом, были исследованы электрохимические свойства ТС методом циклической, катодной и анодной постоянно-токовой вольтамперометрии, предложен предположительный механизм квазиобратимого электроокисления-восстановления ТС с участием двух электронов и одного протона, показано, что ТС неустойчивое соединение, из которого образуется ТК и лейко-форма красителя, подобраны условия для работы с раствором ТС при последующем определении гепарина: индикаторный МЭ, фоновый электролит Бриттона-Робинсона с pH 1,9, скорость развертки потенциала 40 мВ/с, во избежание явления адсорбции красителя его концентрация не должна превышать 30 мг/дм^3. Выявлено, что при нейтральных и щелочных значениях pH происходит адсорбция ТС и электрополимеризация образующегося из него ТК на поверхности МЭ с образованием полимерной плёнки на поверхности электрода.

Исследование электрохимических свойств гепарина в комплексе с толуиленовым синим на МЭ

Для изучения электрохимического поведения гепарина в комплексе с ТС проведен эксперимент в условиях постоянно-токовой вольтамперометрии на МЭ в области потенциалов от 0,55 В до –0,45 В при скорости сканирования W=40 мВ/с, фоновым электролитом служил буферный раствор Бриттона-Робинсона с pH 1,9, с использованием раствора ТС, подвергшемуся кипячению.

Изначально были записаны циклические вольтамперные кривые и получены сигналы электроокисления и восстановления гепарина в комплексе с ТС на МЭ (рисунок 35)

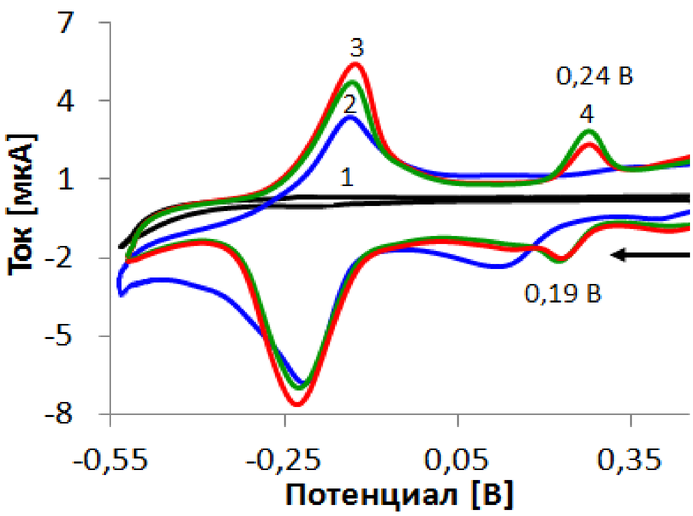


Рисунок 35 – Циклические вольтамперограммы электроокисления-восстановления ТС в отсутствии и присутствии гепарина на МЭ:

1 – фоновая кривая, 2 – C_{TC} = 29 мг/дм^3; 3 – C_{Hep} = 5 мг/дм^3; 4 – C_{Hep} = 10 мг/дм^3.

W = 40 мВ/с, pH = 1,9

Согласно данным из рисунка 35 введение добавки гепарина приводит к увеличению сигналов электроокисления-восстановления ТК с последующим их уменьшением с ростом концентрации гепарина и появлению катодного и анодного пиков при 0,19 В и 0,24 В, соответственно. Предположительно в результате добавки гепарина в систему происходит восстановление ТС из раствора, который подвергался кипячению, в свою очередь восстановленный ТС образует комплекс с гепарином, что приводит к появлению указанных выше катодного и анодного пиков (рисунок 36).

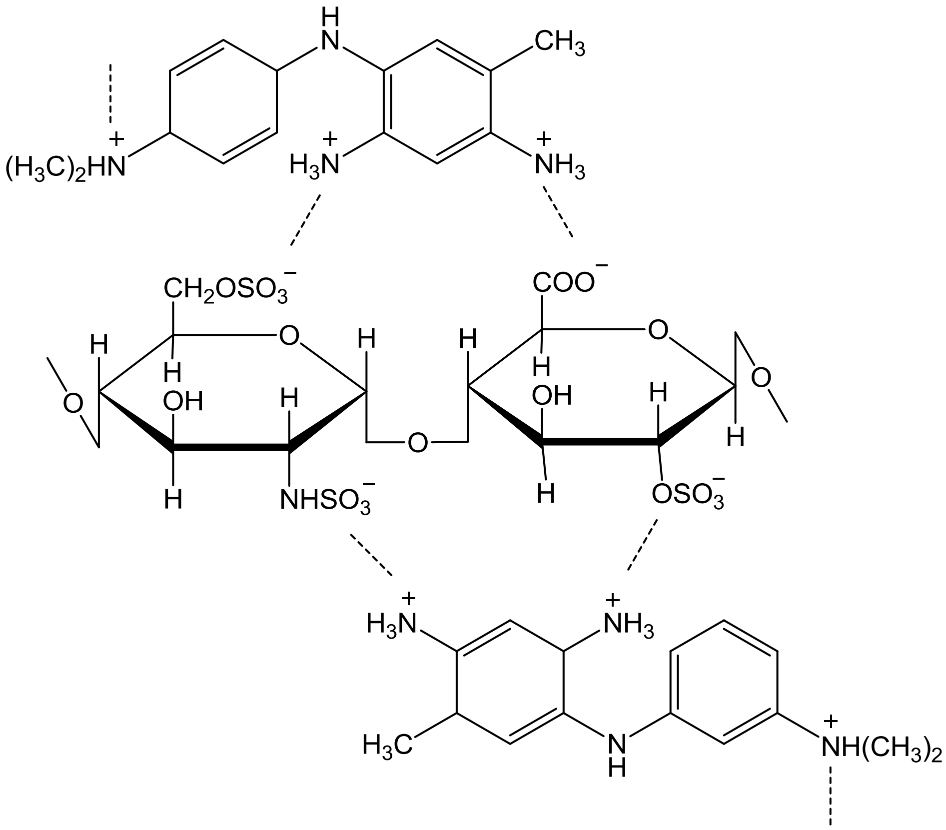


Рисунок 36 – Предположительная схема комплекса Hep–TC

Было замечено, что при добавлении гепарина к раствору ТС, происходит изменение окраски красителя от фиолетовой к бледно розовой. Данное наблюдение позволяет отнести ТС к основным красителям, способным к метахроматическому эффекту в присутствии хромотропных веществ, к которым относится и гепарин. Механизм метахромазии выяснен недостаточно. Считают, что полимерные свойства субстрата, с которым соединяется краситель, индуцируют полимеризацию последнего, что и приводит к возникновению метахромазии. Предполагают также, что метахромазия обусловлена образованием адсорбционного соединения катиона красителя с хромотропным полианионом [159].

При изменении окраски красителя после добавления гепарина меняется положение максимума спектра поглощения ТС (рисунок 37), что позволяет провести определение состава комплекса Hep–TC по методу молярных отношений («насыщения») [160].

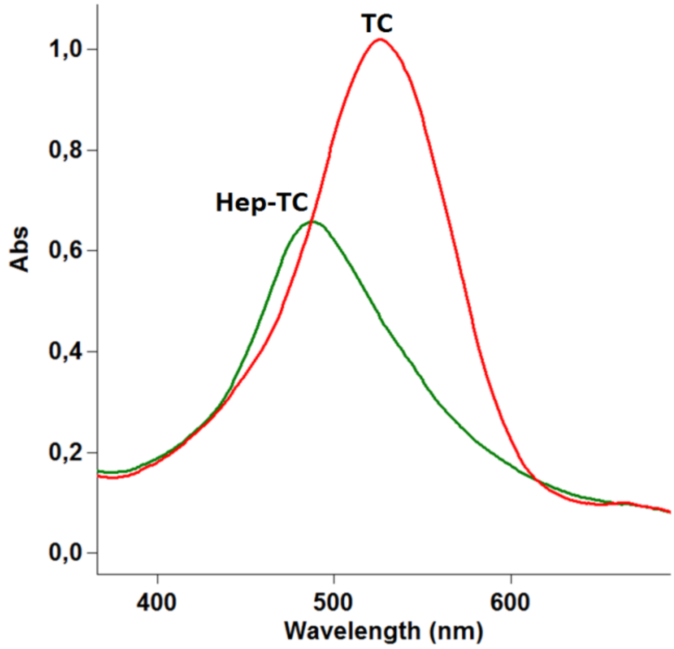


Рисунок 37 – Спектры поглощения водных растворов ТС и комплекса Hep–TC. C_{TC} = 25 мг/дм^3, C_{Hep} = 15 мг/дм^3

По экспериментальным данным спектрофотомерии построены зависимости величины светопоглощения раствора Hep-TC от отношения концентрации гепарина к концентрации ТС, причем концентрация ТС оставалась постоянной (рисунок 38).

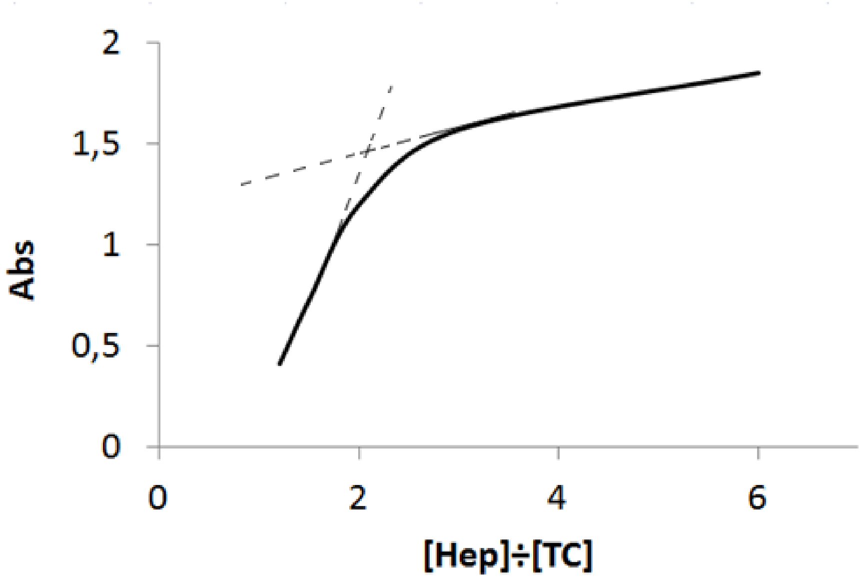


Рисунок 38 – Зависимость оптической плотности раствора Hep-TC от соотношения концентраций [Hep]÷[TC]

Исходя из кривой насыщения (рисунок 38), полученной по методу молярных отношений, состав комплекса Hep-TC равен 1:2 (Hep-TC_2).

На основании установленного состава комплекса Hep-TC_2, для последующего определения гепарина методом вольтамперометрии с использованием TC, концентрация TC должна превышать концентрацию гепарина как минимум в два раза.

При изучении влияния скорости развертки на сигнал электроокисления комплекса Hep-TC_2 выявлено наличие адсорбционной составляющей при любом значении pH фонового электролита. Её появление предположительно связано с механизмом протекания метахромазии, в ходе которого происходит образование адсорбционного соединения, состоящего из катиона красителя, связанного с хромотропным полианионом гепарина. Для регистрации вольтамперных кривых комплекса Hep-TC_2 выбрано значение скорости сканирования потенциала равное 60 мВ/с.

Возвращаясь к вольтамперометрическому определению гепарина в лекарственных препаратах с использованием TC на МЭ (in situ, C_{TC}=30 мг/дм^3) рабочей областью потенциалов выбрана анодная от 0,1 В до 0,35 В, так как в катодной области имеет место мешающее влияние кислорода на сигнал гепарина в комплексе с ТС, удаление которого из системы приводит к увеличению времени анализа. Для повышения чувствительности определения гепарина в комплексе с ТС регистрацию вольтамперных кривых проводили в дифференциальном режиме. На рисунке 39 изображены анодные вольтамперные кривые комплекса Hep-TC_2 в зависимости от концентрации гепарина в электрохимической ячейке.

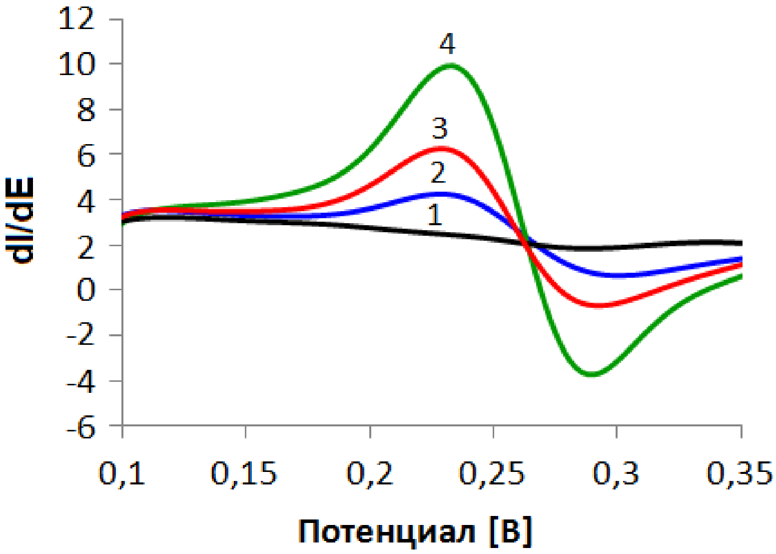


Рисунок 39 –Вольтамперограммы электроокисления Hep-TC_2 на МЭ при разной концентрации гепарина в электрохимической ячейке: 1 – C_{TC} =30 мг/дм^3; 2 – C_{Hep} = 5 мг/дм^3; 3 – C_{Hep} = 10 мг/дм^3;. 4 – C_{Hep} = 15 мг/дм^3.
W = 60 мВ/с, pH = 1,9

По увеличению тока пика электроокисления комплекса при E=0,24 В от концентрации гепарина в электрохимической ячейке построена градуировочная зависимость (рисунок 40).

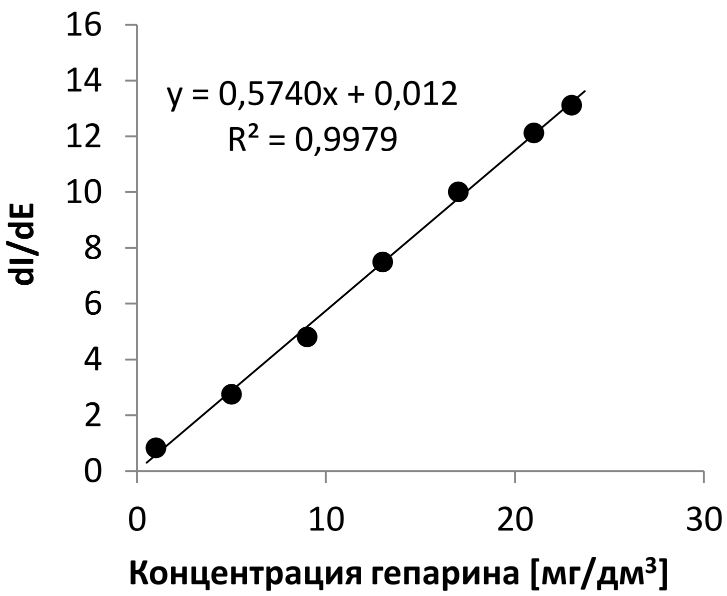


Рисунок 40 – Зависимость интенсивности тока электроокисления Hep-TC$_2$ от потенциала комплекса Hep-TC$_2$ при увеличении концентрации гепарина в электрохимической ячейке. C_{Hep} от 1 до 23 мг/дм^3. W = 60 мВ/с, pH=1,9

Из зависимости, представленной на рисунке 40 видно, что с увеличением концентрации гепарина в ячейке, увеличивается интенсивность сигнала электроокисления комплекса Hep-TC$_2$ при 0,24 В в прямолинейной области концентраций от 1 до 23 мг/дм^3, что может быть использовано для определения гепарина в лекарственных препаратах.

Таким образом, были исследованы электрохимические свойства TC и комплекса Hep-TC$_2$. Выявлено, что TC относится к основным красителям, способным к метахроматическому эффекту в присутствии хромотропных веществ, к которым относится и гепарин. Установлено, что в ходе процесса метахромазии происходит образование адсорбционного соединения, состоящего из катиона красителя, связанного с хромотропным полианионом гепарина, которое адсорбируется на поверхности МЭ. Методом молярных отношений определен состав комплекса Hep-TC$_2$. Предложен предположительный механизм образования комплекса Hep-TC$_2$. Подобраны рабочие условия для определения гепарина в лекарственных препаратах по увеличению тока пика электроокисления комплекса Hep-TC$_2$ при 0,24 В. В таблице 8 указаны параметры градуировочных характеристик для определения гепарина методом постоянно-токовой анодной вольтамперометрии с линейной разверткой потенциала в комплексе с красителем ТС.

Таблица 8 – Параметры градуировочных характеристик определения гепарина в комплексе с ТС методом анодной вольтамперометрии на МЭ (n=3, P=0,95)

Линейный диапазон определяемых концентраций гепарина, мг/дм^3	Уравнение регрессии	Квадрат коэффициента корреляции	Предел обнаружения, мг/дм^3
1–23	y = 0,5740x + 0,012	0,9979	0,2

В таблице 9 приведены обобщенные условия вольтамперометрического определения гепарина в комплексе с различными красителями.

Таблица 9 – Условия вольтамперометрического определения гепарина в комплексе с различными катионными красителями

Параметр	Краситель		
	МГ	МЗ	ТС
Используемый электрод	СУЭ	РПЭ	МЭ
Область развертки потенциала	от –0,6 до 0,4 В	от 0 В до –1 В	от 0,1 до 0,35 В
Линейный диапазон определяемых концентраций гепарина, мг/дм^3	2–24	2–25	1–23
Уравнение регрессии	y=0,7979x–0,9479	y=0,2462x+0,2358	y = 0,5740x + 0,012
Квадрат коэффициента корреляции	0,9934	0,9907	0,9979
Предел обнаружения, мг/дм^3	0,31	0,48	0,20

Анализируя данные, представленные в таблице 9 можно прийти к выводу, что все исследуемые в работе синтетические красители можно использовать для вольтамперометрического определения гепарина в лекарственных препаратах после изучения влияния матричного эффекта на аналитические сигналы. Однако наиболее рационально применять ТС, ввиду использования нетоксичного МЭ, анодной области развертки потенциалов, наличия собственного сигнала, интенсивность которого увеличивается с увеличением концентрации гепарина в электрохимической ячейке и более низкого значения предела обнаружения.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ГЕПАРИНА МЕТОДОМ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ

В литературе встречаются различные данные, касающиеся возможности проявления антиоксидантных свойств у гепарина. Так, некоторые авторы относят его к прооксидантам [161], другие к антиоксидантам [55, 70, 71, 73-75], а есть и такие, кто пишет об отсутствии антиоксидантных свойств у гепарина [69]. Вследствие чего, для отнесения гепарина к группе антиоксидантов, принято решение исследовать его антиоксидантную активность ранее не используемым для этих целей (относительно гепарина) методом вольтамперометрии.

4.1 Методика определения антиоксидантной активности гепарина

Антиоксидантную активность (АОА) образцов определяли, используя метод катодной вольтамперометрии, в частности процесс электровосстановления кислорода (ЭВ O_2) [162]. Он обладает рядом преимуществ, но главное – в его основе лежит модельная реакция ЭВ O_2, протекающая на электроде по механизму, аналогичному восстановлению кислорода в тканях и клетках организма:

$$O_2 + \bar{e} \rightleftarrows O_2^{\cdot -}$$

$$O_2^{\cdot -} + H^+ \rightleftarrows HO_2^{\cdot}$$

$$HO_2^{\cdot} + H^+ + \bar{e} \rightleftarrows H_2O_2$$

$$H_2O_2 + 2H^+ + 2\bar{e} \rightleftarrows 2H_2O$$

В данном способе рассматривается одноэлектронное восстановление кислорода с образованием активных кислородных радикалов: $O_2^{\cdot -}$, $HO_2^{\cdot}$. Предполагается, что вещества реагируют с кислородом и его активными радикалами на поверхности индикаторного электрода, что отражается в увеличении (каталитический эффект) или уменьшении (антиоксидантный эффект) катодного тока ЭВ O_2.

АОА гепарина определяли методом катодной вольтамперометрии по процессу ЭВ O_2. Исследования проводили на вольтамперометрическом анализаторе ТА-2 с трехэлектродной системой, состоящей из индикаторного стеклоуглеродного электрода, хлоридсеребряного электрода сравнения и вспомогательного хлоридсеребряного электрода. Использовали постоянно-токовый режим катодной вольтамперометрии со скоростью развертки потенциала 60 мВ/с в рабочем диапазоне потенциалов от 0,0 до – 1,4 В при времени перемешивания раствора посредством вибрации индикаторного электрода 30 сек и последующем успокоении системы в течение 10 сек. В качестве фонового электролита применяли фосфатный буферный раствор с pH 6,86, близким к физиологическому значению, объемом 10 $см^3$.

АОА гепарина по отношению к ЭВ O_2 определяли по следующей методике: записывали вольтамперограммы тока ЭВ O_2 в отсутствии исследуемого вещества (фоновая кривая) по указанным выше параметрам. При отсутствии посторонних пиков электрохимическая система считалась чистой. После чего в электрохимическую ячейку добавляли гепарин с известной концентрацией объемом 0,02 $см^3$ и регистрировали катодную вольтамперограмму ЭВ O_2 при тех же условиях. Измерения повторяли не менее 5 раз через 3 минуты и каждый раз оценивали значение предельного тока ЭВ O_2. Степень уменьшения тока ЭВ O_2 являлась показателем антиоксидантной активности гепарина. Используя полученные экспериментальные данные строили зависимость изменения тока ЭВ O_2 от времени взаимодействия гепарина с активными кислородными радикалами ($(1-\frac{I_i}{I_0}) = f(t)$) и по тангенсу угла наклона рассчитывали коэффициент АОА гепарина – K, мкг/($дм^3$·мин) согласно формуле:

$$K = \frac{C^0_{O_2}}{t}\left(1-\frac{I_i}{I_0}\right),$$

где $C^0_{O_2}$ – концентрация кислорода в исходном растворе без вещества, мкг/$дм^3$; I_i –значение предельного тока ЭВ O_2 в присутствии гепарина, мкА; I_0 - значение предельного тока ЭВ O_2 в отсутствии гепарина, мкА; t - время взаимодействия гепарина с активными кислородными радикалами, мин.

4.2 Результаты вольтамперометрического исследования антиоксидантной активности гепарина в различных образцах

Для исследования антиоксидантной активности взяты фармакологические растворы ВМГ и НМГ, стандартный фармакопейный раствор гепарина, а также сыворотка и плазма крови здоровых добровольцев и пациентов, проходящих гепаринотерапию.

Для оценки АОА гепарина рассмотрены зависимости предельного тока ЭВ O_2 от времени активного взаимодействия анализируемых объектов в электрохимической ячейке (рисунок 41).

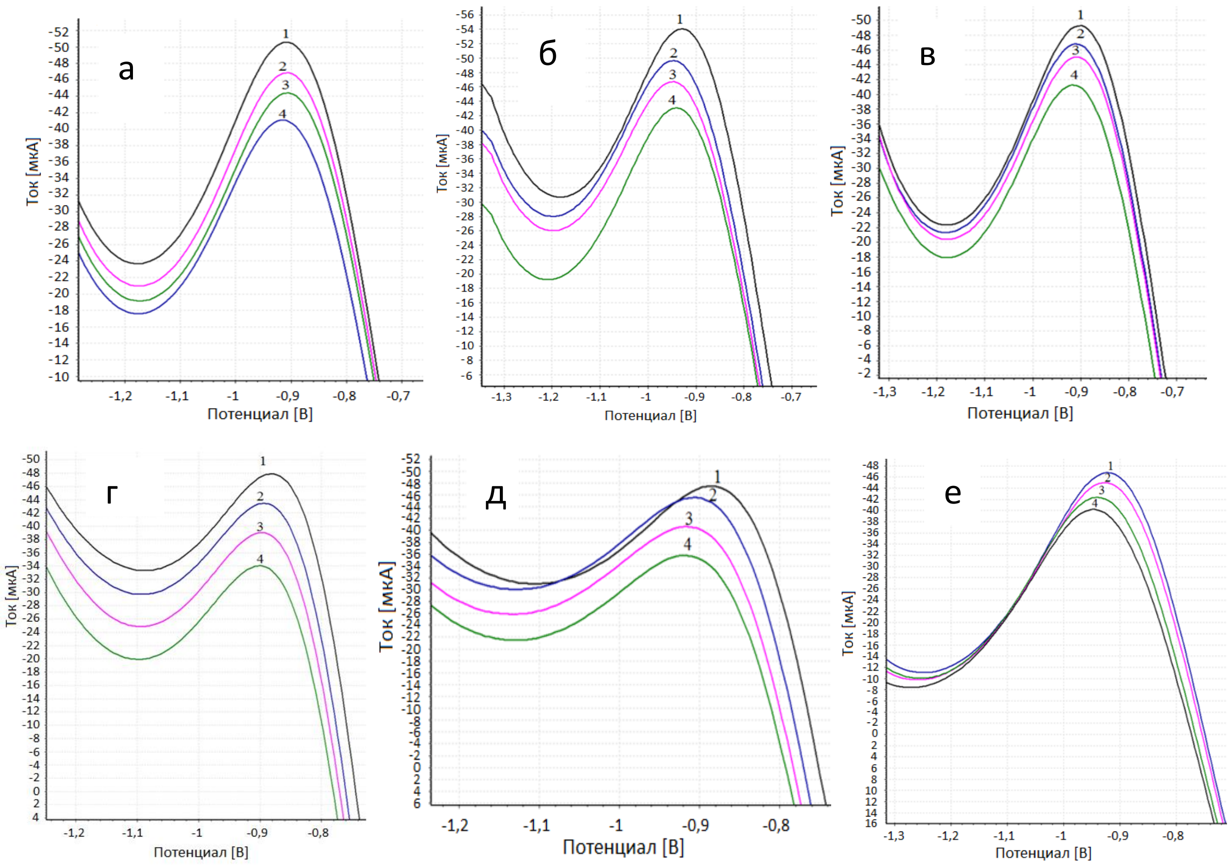


Рисунок 41 – Вольтамперограммы тока ЭВ O_2 на СУЭ в фосфатном буферном растворе (pH=6.86) в отсутствии (1) и присутствии аналита, содержащего гепарин а) раствор фармакопейного стандарта гепарина; б) раствор ВМГ для инъекций; в) раствор инъекционного фраксипарина; г) сыворотка крови с ВМГ; д) плазма крови с ВМГ; е) плазма крови с фраксипарином в зависимости от времени взаимодействия с активными формами кислорода:

2) t = 3 мин; 3) t = 6 мин; 4) t = 9 мин

Для всех гепаринсодержащих исследуемых образцов получены однотипные вольтамперограммы (рисунок 41), на которых наблюдалось уменьшение тока и сдвиг потенциала полуволны ЭВ O_2. Такое поведение вольтамперных кривых свидетельствует о проявлении активности гепаринов по отношению процессу ЭВ O_2.

При введении гепарина в электрохимическую ячейку на поверхности электрода, вероятно, протекает следующая реакция его взаимодействия с активной формой кислорода:

$$HepH_4 + 2O_2^{\cdot -} \rightleftarrows HepH_2^{\cdot} + 2HO_2^{\cdot}$$

$$HepH_2^{\cdot} + 2HO_2^{\cdot} \rightleftarrows Hep + 2H_2O_2$$

На рисунке 42 представлены катодные вольтамперные кривые образцов плазмы и сыворотки крови не содержащих гепарин.

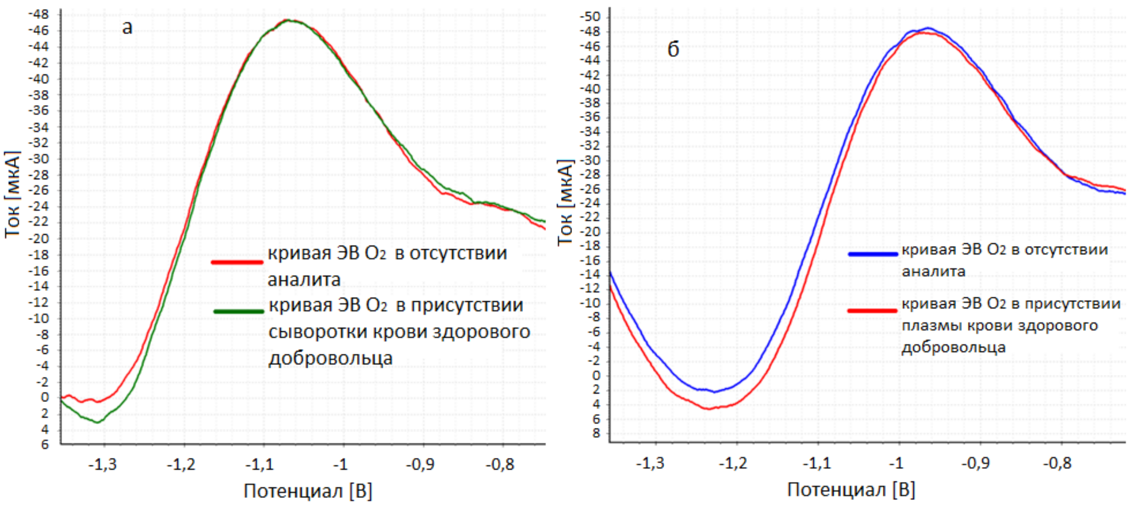


Рисунок 42 – Вольтамперограммы тока ЭВ O2 на СУЭ в фосфатном буферном растворе (pH=6.86) в отсутствии и присутствии аналита, не содержащего гепарин в зависимости от времени взаимодействия с активными формами кислорода: 2) t = 3 мин; 3) t = 6 мин; 4) t = 9 мин

Отсутствие сдвига потенциала полуволны и изменения интенсивности катодного тока (рисунок 42) говорит том, что анализируемые образцы плазмы и сыворотки крови не содержащие гепарин не проявляют активность по отношению к процессу ЭВ O_2.

Степень уменьшения тока ЭВ O_2 во времени является показателем АОА анализируемых веществ. В таблице 10 приведены значения показателя антиоксидантной активности (К, мкг/(дм^3·мин)) исследуемых образцов.

Таблица 10 – Значения показателя антиоксидантной активности (К) гепарина в различных образцах (P=0,95, n=3)

№	Наименование образца	Концентрация гепарина, мг/дм^3	К, мкг/(дм^3·мин)	Sr
1	Стандартный раствор фармакопейного гепарина	2,1 ± 0,17	3,86	0,19
2	Гепарин («Московский эндокринный завод»)	1,99 ± 0,10	3,67	0,14
3	Фраксипарин	2,16 ± 0,21	2,59	0,16
4	Сыворотка крови здорового добровольца	< определяемых концентраций	0,02	0,18
5	Плазма крови здорового добровольца		0,06	0,12
6	Сыворотка крови пациента после гепаринотерапии ВМГ	2,13 ± 0,15	3,94	0,07
7	Плазма крови пациента после гепаринотерапии ВМГ	2,08 ± 0,11	3,72	0,09
8	Сыворотка крови пациента после гепаринотерапии фраксипарином	2,21 ± 0,23	2,64	0,04
9	Плазма крови пациента после гепаринотерапии фраксипарином	2,17 ± 0,15	2,31	0,05
10	Сыворотка крови здорового донора с добавкой ВМГ	2,07 ± 0,13	3,78	0,08
11	Плазма крови здорового донора с добавкой ВМГ	2,14 ± 0,10	4,19	0,1
12	Плазма крови здорового донора с добавкой фраксипарина (НМГ)	2,23 ± 0,19	2,53	0,07

Проведенные исследования показали, что происходит ингибирование процесса катодного электровосстановления кислорода при изменении времени протекания процесса в присутствии образцов, содержащих гепарин в растворе. Таким образом, можно сделать вывод о том, что исследуемые гепаринсодержащие образцы, находясь в растворе, влияют на процесс ЭВ O_2, т.е., проявляют антиоксидантные свойства. Наибольшую активность по отношению к процессу ЭВ O_2 показал высокомолекулярный гепарин.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕПАРИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТС И УСТАНОВЛЕНИЕ ЕЕ МЕТРОЛОГИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК

5.1 Оценка специфичности вольтамперометрической методики определения гепарина с использованием ТС

Специфичность аналитической методики устанавливается ее способностью достоверно определять лекарственное вещество в присутствии примесных и вспомогательных соединений. Она может быть доказана путем добавления к лекарственному веществу соответствующих количеств примесей или вспомогательных компонентов для подтверждения того, что их присутствие не влияет на результат анализа [163, 164].

В соответствии с инструкцией по медицинскому применению в 1 дм^3 раствора гепарина для внутривенного и подкожного введения содержится гепарин натрия 5000000 Ед (38,5 г), бензиловый спирт 9 г, хлорид натрия 3,4 г, вода для инъекций до 1 дм^3. Помимо компонентов лекарственной матрицы, в препарате, так же могут находиться примеси (аминокислоты, дерматансульфат (DS), гиперсульфатированный хондроитин сульфат (OSCS)), которые зачастую не удается до конца удалить на стадиях выделения и отчистки. Для оценки специфичности методики в работе изучили влияние на аналитический сигнал комплекса Hep-TC$_2$ таких соединений как бензиловый спирт, дерматансульфат, гиперсульфатированный хондроитин сульфат и некоторых аминокислот, которые содержатся в глобулине человека в большем процентном соотношении [165] (таблица 11).

Таблица 11 – Влияние веществ различной природы на сигнал электроокисления комплекса гепарин–ТС при соотношении 1:1 ($C_{геп}$ = 15 мг/дм^3) ($t_{табл}$=4,3 при n=3, f=2, P=0,95)

Исследуемое вещество	Ток электроокисления комплекса Hep-TC_2 от потенциала, dI/dE, мкА/В		$t_{эксп.}$
	До введения исследуемого вещества в раствор	После введения исследуемого вещества в раствор	
Бензиловый спирт	8,83 ±0,54	8,96 ± 0,81	0,33
Дерматансульфат (DS)		16,11 ± 1,08	12,92
Гиперсульфатированный хондроитин сульфат (OSCS)		15,77 ± 1,12	12,31
Глутаминовая кислота		9,08 ± 0,66	0,51
Лейцин		8,98 ± 0,48	0,35
Валин		9,17 ± 0,76	0,56

Исследование показало, что DS и OSCS мешают определению гепарина по разработанной методике. Согласно [166], если методика недостаточно специфична, можно применять сочетание двух или более аналитических методик для достижения необходимого уровня избирательности. На основании чего, для выбора анализируемых объектов при вольтамперометрическом определении гепарина с использованием ТС, предложено проводить предварительный анализ образцов гепарина методом капиллярного электрофореза с УФ-детектированием [81] для идентификации этих примесей. Наличие бензилового спирта, валина, лейцина, глутаминовой кислоты не оказывает значительного влияния на величину тока электроокисления комплекса гепарин-ТС при подобранных условиях проведения анализа, и как результат, позволяет выполнять его без предварительной многостадийной пробоподготовки.

5.2 Определение посторонних примесей в препаратах гепарина методом капиллярного электрофореза

Определение посторонних примесей в препаратах гепарина выполняли согласно методике, изложенной в письме Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития от 8 сентября 2008 г [81].

Анализ проводили на системе капиллярного электрофореза «Капель-105М» с источником высокого напряжения отрицательной полярности, оснащенной кварцевым капилляром с внутренним диаметром 50 мкм, эффективной длиной 56 см, полной длиной 64 см. Для детектирования использовали косвенный метод, регистрируя поглощение в ультрафиолетовой области спектра при 200 нм. На рисунке 43 представлена полученная электрофореграмма раствора гепарина, приготовленного из фармакопейного стандарта натриевой соли гепарина, полученного из слизистой оболочки кишечника свиней.

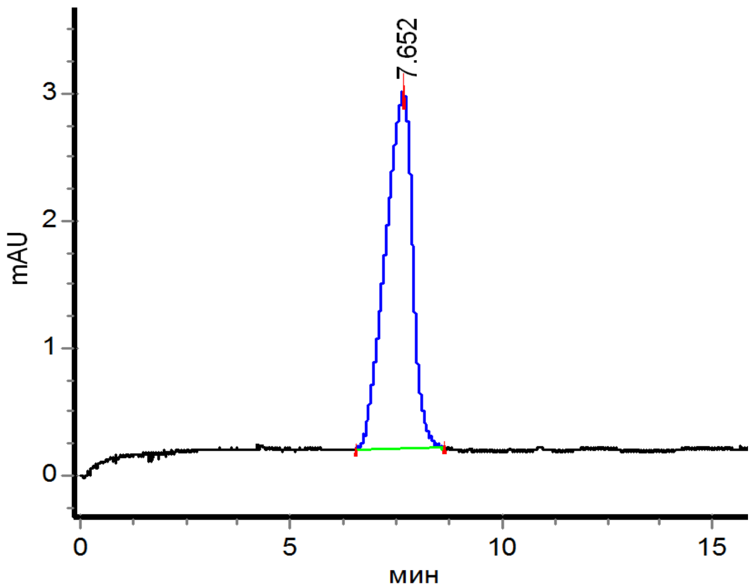


Рисунок 43 – Электрофореграмма раствора гепарина с С = 10 мг/см^3

Отсутствие на электрофореграмме посторонних пиков свидетельствует о чистоте используемого в работе гепарина, и как результат, позволяет выполнять его определение методом вольтамперометрии с использованием красителя ТС без предварительной пробоподготовки.

5.3 Определение гепарина в лекарственных препаратах с использованием спектрофотометрической методики

В качестве «независимой» методики выбрана спектрофотометрическая методика с использованием набора реагентов для определения анти Xa и анти-IIa активности гепарина «Ренапарин-тест» [167].

Метод определения активности гепарина основан на способности комплекса антитромбин III-гепарин (AT III-гепарин) нейтрализовать активированные факторы Xa и IIa. Препараты гепарина в комплексе с AT III ингибируют действие активированного фактора Xa в гораздо большей степени, чем тромбина. Вследствие чего, в настоящей работе использовали субстраты для определения анти-Xa активности.

Активность образцов гепарина в препаратах и субстанциях определяли, добавляя к ним избыток антитромбина III и фактора Xa. При этом происходит ингибирование факторов Xa комплексом AT III-гепарин пропорционально количеству гепарина в препарате или субстанции. Оставшееся количество фактора Xa катализирует отщепление pNA от синтетического хромогенного субстрата. Абсорбция свободного pNA, определяемая при длине волны 405 нм, обратно пропорциональна анти-Xa активности гепарина. Процесс идет по следующей схеме:

1) AT III (избыток) + гепарин →AT III-гепарин
2) AT III-гепарин + Xa (избыток)→AT III-гепарин-Xa+Xa (остаток)
3) Xa Субстрат-pNA + Xa (остаток) →Пептид + pNA.

На рисунке 44 изображен полученный спектр поглощения раствора стандартного образца гепарина с активностью в пересчете на концентрацию 0,31 мг/дм^3 в смеси с реагентами из набора для определения анти Xa активности гепарина.

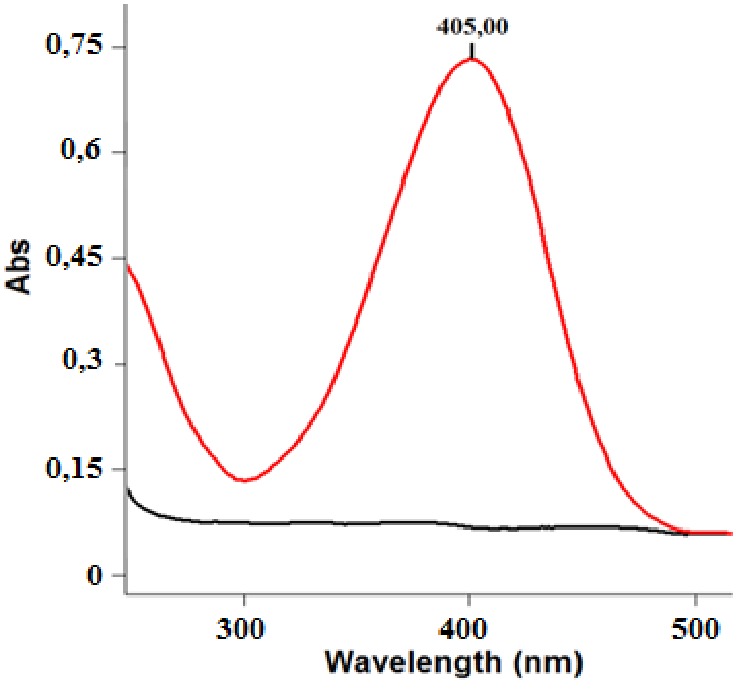


Рисунок 44 – Спектр поглощения раствора стандартного образца гепарина с с С=0,31 мг/дм^3 в смеси с реагентами из набора для определения анти Ха активности гепарина

Расчет концентрации образцов гепарина по анти Ха активности проводили методом градуировочного графика. Для этого в соответствии с инструкцией к набору реагентов «Ренапарин-тест», путем последовательного разбавления готовились растворы гепарина различной концентрации. Параметры градуировочных характеристик для определения гепарина с использованием спектрофотометрической методики представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Параметры градуировочных характеристик для определения гепарина с использованием спектрофотометрической методики

Линейный диапазон определяемых концентраций гепарина, мг/дм^3	Уравнение регрессии	Квадрат коэффициента корреляции
0,31-1,6	y = -0,4102x + 0,844	0,9904

5.4 Методика количественного определения гепарина в лекарственных препаратах

Вольтамперометрическое определение гепарина в комплексе с толуиленовым синим (ТС) выполняли на анализаторе TA-Lab с трехэлектродной системой, состоящей из индикаторного углеродсодержащего электрода, модифицированного углеродными чернилами, хлоридсеребряного электрода сравнения и хлоридсеребрянного вспомогательного электрода. Изначально в электрохимическую ячейку помещали раствор фонового электролита (буферная смесь Бриттона-Робинсона с pH=1, 9) объемом 10 см^3 и начинали проверку всей системы на чистоту. Для этого регистрировали вольтамперные кривые в анодной области потенциалов от 0,1 В до 0,35 В в потостоянно-токовом режиме с дифференцированием со скоростью сканирования 60 мВ/с, временем перемешивания раствора посредством вибрации индикаторного электрода 30 с и успокоения 10 с. Запись анодной вольтамперограммы фонового электролита повторяли не менее трех раз. Отсутствие посторонних пиков на анодных вольтамперных кривых свидетельствовало о чистоте электрохимической системы и всех ее составляющих и позволяло проводить дальнейший эксперимент по определению гепарина. С помощью дозатора количественно переносили в электрохимическую ячейку краситель ТС и гепарин и начинали регистрацию вольтамперных кривых в соответствии с параметрами, указанными выше. По увеличению интенсивности анодного пика комплекса Hep-ТС$_2$ при 0,24 В определяли количество гепарина в системе.

Правильность разработанной методики вольтамперометрического определения гепарина проверялась с использованием «независимого» спектрофотометрического метода (таблица 13).

Таблица 13 – Результаты определения гепарина (мг/см^3) вольтамперометрическим и спектрофотометрическим методами ($n = 6$, $p = 0,95$, $t_{таб} = 2,57$)

<table>
<tr><th>Объект анализа</th><th>Вольтамперометри-ческий метод</th><th>Спектрофотометрический метод</th><th>$t_{эксп.}$</th><th>Заявленное содержание, мг/см^3</th></tr>
<tr><td>Гепарин (ФГУП «Московский эндокринный завод»)</td><td>37,0±1,5</td><td>38,3±1,4</td><td>1,15</td><td rowspan="4">38,5</td></tr>
<tr><td>Гепарин-Ферейн (ЗАО «Брынцалов-А»)</td><td>36,9±1,9</td><td>38,3±2,8</td><td>0,77</td></tr>
<tr><td>Гепарин (ОАО «Акционерное Курганское общество медицинских препаратов и изделий «Синтез»)</td><td>38,7±2,2</td><td>37,0±1,4</td><td>1,22</td></tr>
<tr><td>Гепарин («Белмедпрепараты»)</td><td>37,8±2,1</td><td>36,1±2,2</td><td>1,02</td></tr>
<tr><td>Фраксипарин («Санофи Винтроп Индустрия»)</td><td>71,2±1,9</td><td>73,0±1,7</td><td>1,26</td><td>73,2</td></tr>
</table>

Из таблицы 13 видно, что количественное содержание гепарина в лекарственных препаратах соответствует заявленному в инструкции. Кроме того, можно отметить, что результаты количественного определения гепарина в лекарственных препаратах, полученные спектрофотометрическим и вольтамперометрическим методами хорошо согласуются между собой ($t_{эксп.} \leq t_{табл.}$). Также, разработанная вольтамперометрическая методика имеет ряд преимуществ по сравнению со спектрофотометрической: минимальный расход, не дорогостоящих реактивов с продолжительным сроком хранения, выполнение анализа на оборудовании с меньшей стоимостью, бóльшая линейность и чувствительность (таблица 14).

Таблица 14 – Сравнительная характеристика методов количественного определения гепарина

Параметр	Спектрофотометрическая методика	Разработанная вольтамперометрическая методика
Диапазон определяемых концентраций, мг/дм^3	3,1-1,6	1-23
Уравнение регрессии	$y = -0,4102x + 0,844$	$y = 0,5740x + 0,012$
Коэффициент корреляции	$R^2 = 0,9904$	$R^2 = 0,9979$
Используемые реактивы и их стоимость на 100 анализов.	Лиофильно высушенные антитромбин III, фактор Xa, тромбин и хромогенный субстрат для фактора Xa, стандартный образец гепарина, концентрированный буферный раствор, бычий сывороточный альбумин. 9 600 руб.	Толуиленовый синий, полистирол, 1,2-дихлорэтан, графит, борная кислота, уксусная кислота, ортофосфорная кислота, калий хлористый. 4 000 руб.
Используемое оборудование и его стоимость	Спектрофотометр с набором кювет. От 75 000 до 1 500 000 руб	Вольтамперометрический анализатор с набором электродов. От 70 000 до 500 000 руб.
Способ определения концентрации	Метод градуировочного графика	Метод градуировочного графика
Время анализа	25-30 минут	15-20 минут

5.5 Метрологическая оценка вольтамперометрической методики количественного определения гепарина в лекарственных препаратах с использованием красителя ТС

Важнейшими характеристиками любой методики химического количественного анализа являются её метрологические характеристики – показатели качества, которые включают в себя такие понятия, как погрешность, точность, воспроизводимость, правильность, диапазон определяемых содержаний, чувствительность, предел обнаружения и определения. Вследствие чего, завершающей стадией количественного определения гепарина в лекарственных препаратах посредством предложенной в настоящей работе вольтамперометрической методики с использованием красителя ТС стала статистическая обработка результатов измерений. При оценке метрологических характеристик набор статистических данных осуществляли экспериментально с использованием стандартного европейского фармакопейного раствора гепарина в качестве объекта анализа.

5.5.1 Установление предела обнаружения и нижнего предела количественного определения методики

Предел обнаружения (C_{min}) – это наименьшее содержание вещества, которое может быть обнаружено по данной методике с заданной степенью достоверности. Таким образом, предел обнаружения (как это и следует из определения) характеризует методику с точки зрения возможностей качественного анализа [168].

Для установления предела обнаружения гепарина в лекарственных препаратах разработанной вольтамперометрической методикой использовали 3σ критерий. Проводили анализ холостой пробы, при этом, предел обнаружения принимали равным утроенному значению стандартного отклонения шумового сигнала с учётом углового коэффициента градуировочного графика. Значение предела обнаружения вычисляли по уравнению:

$$C_{min} = \frac{3s_{фон}}{b},$$

где $s_{фон}$ – стандартное отклонение сигнала фона; b – коэффициент чувствительности, характеризующий отклик аналитического сигнала на содержание компонента.

Для характеристики возможностей методики с точки зрения количественного анализа используют величину, называемую пределом определения (C_{lim}). Предел определения – это минимальное содержание компонента, которое можно определить с заданной степенью точности, характеризуемой предельно допустимой величиной относительного стандартного отклонения $Sr(c)_{max}$.

Установление нижнего предела количественного определения гепарина в лекарственных препаратах по разработанной вольтамперометрической методике проводили по величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту калибровочного графика. Предел количественного определения рассчитывали по уравнению:

$$C_{lim} = \frac{10 s_{фон}}{b},$$

где $s_{фон}$ – стандартное отклонение сигнала фона; b – коэффициент чувствительности, характеризующий отклик аналитического сигнала на содержание компонента.

В таблице 15 указаны полученные значения предела обнаружения и нижнего предела количественного определения гепарина в лекарственных препаратах по разработанной вольтамперометрической методике с использованием красителя ТС.

Таблица 15 – Установление предела обнаружения и нижнего предела количественного определения методики (n=9, P=0,95)

Определяемое вещество	$s_{фон}$	b	Предел обнаружения, мг/дм^3	Нижний предел количественного определения, мг/дм^3
Гепарин	0,039	0,5740	0,2	0,7

5.5.2 Подтверждение линейности разработанной методики

Линейность – это способность методики (в пределах диапазона применения) получать результаты испытаний, прямо пропорциональные концентрации анализируемого вещества в образце [166].

В работе экспериментально проверяли линейность градуировочной характеристики зависимости высоты аналитического сигнала от концентрации гепарина в растворе по разработанной вольтамперометрической методике путем измерения аналитических сигналов проб с различными концентрациями гепарина. Зависимость тока пика комплекса Hep-TC$_2$ при потенциале 0,24 В от концентрации гепарина изучали на 7 уровнях концентраций: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 23 мг/дм^3. Анализировали 3 серии стандартных фармакопейных растворов гепарина с указанным выше концентрационным содержанием. Результаты анализа градуировочных растворов гепарина приведены в таблице 16.

Таблица 16 – Результаты анализа 3-х серий градуировочных растворов гепарина и параметры градуировочных зависимостей (Р=0,95)

№	Концентрация гепарина, мг/дм^3	Интенсивность тока пика комплекса Hep-TC$_2$, мкА/В			
		$(dI/dE)_1$	$(dI/dE)_2$	$(dI/dE)_3$	$(dI/dE)_{ср}$
1	1	0,996	0,711	0,801	0,836
2	5	2,992	2,593	2,687	2,757
3	9	4,951	4,685	4,806	4,814
4	13	7,927	7,225	7,351	7,501
5	17	10,283	9,794	9,967	10,015
6	21	12,276	11,892	12,217	12,128
7	23	13,293	13,002	13,072	13,122

В программе Microsoft Office Excel 2003 строили градуировочные зависимости интенсивности тока пика гепарина от его концентрации в растворе. Параметры градуировочных зависимостей приведены в таблице 17.

Таблица 17 – Параметры градуировочных зависимостей

№ градуировочной зависимости	Коэффициент корреляции (R^2)	Точка пересечения с осью ординат	Угловой коэффициент калибровочного графика
1	0,9969	0,2217	0,5128
2	0,9981	0,0810	0,5150
3	0,9977	0,2337	0,5036
Среднее значение	0,9979	0,012	0,5740

По экспериментальным данным, указанным в таблице 17 построен усредненный градуировочный график зависимости интенсивности тока пика гепарина от его концентрации в растворе (рисунок 45).

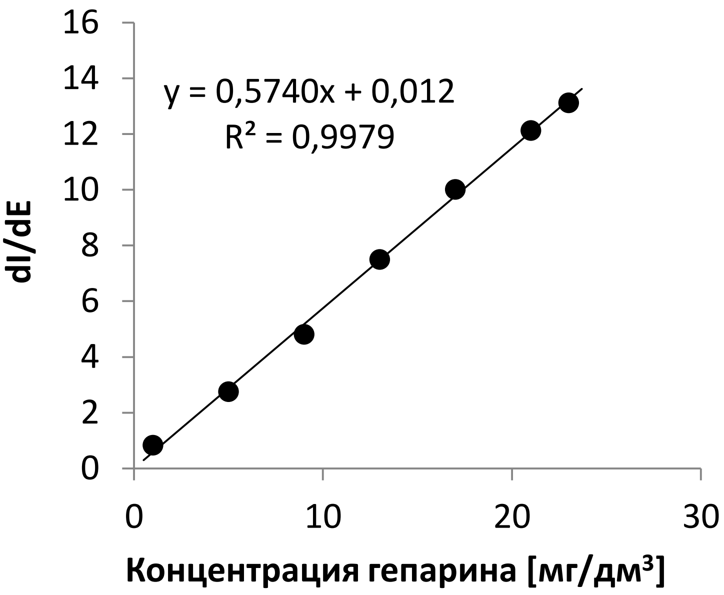


Рисунок 45 – Усредненный график зависимости интенсивности тока электроокисления Hep-TC$_2$ от потенциала комплекса Hep-TC$_2$ при увеличении концентрации гепарина в электрохимической ячейке. C_{Hep} от 1 до 23 мг/дм^3

Для проверки, правильно ли модель (в виде уравнения регрессии y = 0,5740x + 0,012) описывает процесс, необходимо оценить адекватность этой модели. Модель считается адекватной, если разброс между параллельными опытами при каждом уровне I_i больше, чем расхождения между рассчитанными по модели и экспериментальными значениями I_i [169].

Изначально оценим дисперсию воспроизводимости, используя данные параллельных определений каждого независимого опыта (таблица 16) по формуле:

$$S_{вос}^2 = \frac{\sum(\boldsymbol{I}_{\mathbf{i}} - \mathbf{I}_{\mathbf{cp}})^2}{N(n-1)} = 0{,}0499$$

где N – число независимых опытов, n – число параллельных определений.

Далее для оценки адекватности модели по экспериментальным данным (таблица 16) необходимо рассчитать дисперсию адекватности, которая характеризует степень отклонения экспериментальных значений I_i от рассчитанных по уравнению регрессии:

$$S_{ад}^2 = \frac{n\sum(\boldsymbol{I}^* - \mathbf{I}_{\mathbf{cp}})^2}{N-k} = 0{,}1417$$

где I* – значения токов, рассчитанные по уравнению регрессии y = 0,5740x + 0,012, n – число параллельных опытов, N – число независимых опытов, k – число значимых коэффициентов в уравнении регрессии.

Адекватность модели рассчитываем по критерию Фишера через отношение дисперсии адекватности к дисперсии воспроизводимости:

$$F_{расч} = \frac{S_{ад}^2}{S_{вос}^2} = 2{,}84$$

Находим табличное значение критерия Фишера для выбранного уровня значимости и чисел степеней свобод дисперсии адекватности (f_1) и дисперсии воспроизводимости (f_2):

f_1 = n – k=7 – 1 = 6

f_2 = N(n – 1) = 7(3 – 1)=14

=> $F_{табл}$ = 2,85

Сравнивая расчетное значение критерия Фишера с табличным, делаем вывод об адекватности модели, которая описывается уравнением регрессии y = 0,5740x + 0,012 (т.к. $F_{эксп} < F_{табл}$).

Таким образом, доказано, что градуировочные зависимости интенсивности тока пика гепарина от его концентрации в растворе носят линейный характер. Квадрат коэффициента корреляции составляет 0,9979. Следовательно, разработанная вольтамперометрическая методика обладает линейностью в диапазоне концентраций от 1,0 до 23,0 мг/дм^3 для построения градуировочных кривых, предназначенных для количественного определения гепарина в лекарственных препаратах.

5.5.3 Оценка правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности методики

Под правильностью методики понимается степень близости среднего значения, полученного на основании большой серии результатов измерений, к принятому опорному значению. Показателем правильности является систематическая погрешность. Повторяемость показывает степень близости друг к другу независимых результатов единичного анализа, полученных в условиях повторяемости (одним и тем же методом на идентичных объектах анализа, в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же оборудования, в пределах короткого промежутка времени). Внутрилабораторная прецизионность методики – прецизионность в условиях, в которых результаты анализа получают при вариации всех факторов, формирующих разброс результатов при применении методики анализа в конкретной лаборатории [126, 127].

Для оценки правильности и повторяемости разработанной вольтамперометрической методики проводили анализ 15 серий стандартных фармакопейных растворов гепарина, содержащих гепарин на 3 уровнях концентрации: 1, 11,5, 23 мг/дм^3. Анализ выполняли в одной лаборатории, на одном оборудовании, одним аналитиком, в течение одного дня. Количественное содержание гепарина в образцах определяли методом «введено-найдено». Для оценки внутрилабораторной прецизионности проводили анализ аналогичных образцов в другой день, на другом оборудовании.

Расчет всех метрологических характеристик производили согласно РМГ 61-2010 «Государственная система обеспечения единства измерений. Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки». Алгоритм вычисления показателей качества методики приведен в приложении 1, их расчет – в приложении 2.

Обобщенные результаты расчета метрологических характеристик для уровней концентрации гепарина в растворе, равных 1, 11,5, 23 мг/дм^3 представлены в таблице 18.

Таблица 18 – Обобщенные результаты расчета метрологических характеристик для концентрации гепарина в растворе, равной 1, 11.5, 23 мг/дм^3 (Р=0,95)

Концентрация гепарина в растворе, мг/дм^3	Показатель повторяемости, σ_r		Показатель внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{R\text{л}}$		Показатель точности, $\pm\Delta$	
	мг/дм^3	%	мг/дм^3	%	мг/дм^3	%
1,00	0,1	9,7	0,1	10,3	0,3	27,0
11,50	0,7	6,4	0,8	7,1	1,6	17,2
23,00	0,7	3,6	1,2	5,4	2,2	9,5

Рассчитанные выше показатели качества результатов анализа являются установленными характеристиками погрешности для совокупности результатов анализа, полученных при соблюдении требований методики в ходе ее реализации в отдельной лаборатории.

В приложениях 3 и 4 представлены акты внедрения разработанной вольтамперометрической методики определения гепарина.

Таким образом, найдены диапазоны линейных зависимостей аналитического сигнала комплекса Hep-TC$_2$ от концентрации гепарина в растворе, проверена линейность градуировочных зависимостей и оценена адекватность модели полученного уравнения регрессии по критерию Фишера. Установлены основные метрологические характеристики разработанной вольтамперометрической методики количественного определения гепарина в лекарственных препаратах с использованием красителя ТС (показатели точности, правильности, повторяемости и внутрилабораторной прецизионности).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали, что для электрохимического определения полианионного гепарина в лекарственных препаратах методом вольтамперометрии возможно применение синтетических красителей катионной природы. Разработанная методика определения гепарина в лекарственных препаратах в условиях постоянно-токовой анодной вольтамперометрии с дифференцированием на МЭ с использованием толуиленового синего выгодно отличается от существующей, широко применяемой спектрофотометрической методики, что указывает на перспективность и расширение возможностей электроаналитической химии.

На основании полученных результатов сформулированы следующие выводы:

1. Исследованы электрохимические свойства ряда синтетических катионных красителей (МГ, МЗ, ТС), относящихся к различным классам (тиазинового, трифенилметанового и индаминового). Изучено влияние некоторых факторов на сигналы красителей (pH раствора, материал электрода, природа фонового электролита, скорость развертки потенциала). Предложены возможные механизмы протекания электродных процессов с участием МГ, МЗ, ТС;

2. Изучены физико-химические закономерности электрохимического поведения комплексов «гепарин-краситель». По экспериментальным зависимостям $I_{п.}$–W и $lgI_{п.}$–lgW выявлено, что исследуемые комплексы адсорбируются на поверхности индикаторных электродов;

3. Подобраны рабочие условия для количественного вольтамперометрического определения гепарина в лекарственных препаратах с использованием красителей. При определении гепарина в комплексе с МГ на СУЭ в фоновом электролите с pH 6,86 область прямолинейной зависимости концентрации гепарина от тока электроокисления комплекса Hep–МГ при E = –0,19 В находится в диапазоне от 2 до 24 мг/дм^3, предел обнаружения 0,31 мг/дм^3. В случае определения гепарина в комплексе с МЗ на РПЭ в фоновом

электролите с pH 1,65 область прямолинейной зависимости концентрации гепарина от тока электровосстановления комплекса Hep–МЗ при E = –0,87 В находится в диапазоне от 2 до 25 мг/дм^3, предел обнаружения 0,48 мг/дм^3. При определении гепарина в комплексе с ТС на МЭ в фоновом электролите с pH 1,9 область прямолинейной зависимости концентрации гепарина от тока электроокисления комплекса Hep–ТС$_2$ при E = 0,24 В находится в диапазоне от 1 до 23 мг/дм^3, предел обнаружения 0,2 мг/дм^3. Выявлено, что для вольтамперометрического определения гепарина в лекарственных препаратах, наиболее рационально применять ТС;

4. Установлено, что при добавлении гепаринсодержащих образцов происходит ингибирование процесса катодного электровосстановления кислорода с изменением времени протекания процесса. Настоящее наблюдение указывает на проявление антиоксидантных свойств у гепарина;

5. Разработана методика количественного вольтамперометрического определения гепарина в лекарственных препаратах с использованием толуиленового синего. Оценена специфичность разработанной методики. Установлено что дерматан сульфат (DS) и гиперсульфатированный хондроитин сульфат (OSCS) мешают вольтамперометрическому определению гепарина. Для выбора анализируемых объектов при вольтамперометрическом определении гепарина с использованием ТС предложено проводить предварительный анализ образцов гепарина на наличие DS и OSCS методом капиллярного электрофореза с УФ-детектированием;

6. Рассчитаны метрологические характеристики вольтамперометрической методики количественного определения гепарина в лекарственных препаратах с использованием красителя толуиленового синего. Выполнена оценка правильности разработанной методики с использованием «независимого» спектрофотометрического метода.

УСЛОВНЫЕ ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АДФ – аденозиндифосфат

АМФ – аденозинмонофосфат

АОА – антиоксидантная активность

АТ-III – антитромбин III

АТФ – аденозинтрифосфат

ВМГ – высокомолекулярный гепарин

ДИВА – дифференциально-импульсная вольтамперометрия

Ед – единицы действия

ИСП-МС – масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой

МГ – метиленовый голубой

МЗ – малахитовый зелёный

МЭКХ – мицеллярная электрокинетическая капиллярная хроматография

НМГ – низкомолекулярный гепарин

НФГ – нефракционированный гепарин

ПАВ – поверхностно-активное вещество

РПЭ – ртутно-плёночный электрод

СУЭ – стеклоуглеродный электрод

ТК – толуиленовый красный

ТС – толуиленовый синий

УСЭ – углеродсодержащий электрод

МЭ – углеродсодержащий электрод, модифицированный углеродными чернилами

УЧ – углеродные чернила

ХСЭ – хлоридсеребряный электрод

ЭВ O_2 – электровосстановление кислорода

ЯМР – спектроскопия ядерного магнитного резонанса

D – коэффициент диффузии, см^2/с;

DC – доксициклин

DS – дерматансульфат

$E_{1/2}$ – потенциал, соответствующий половине высоты пика, В

$E_п$ – потенциал пика, В

F – постоянная Фарадея, 96485,3329 Кл/моль

GAG – глюкозаминогликан

GlcA – β-D-глюкуроновая кислота

GlcA (2S) – 2-O-сульфатированная β-D-глюкуроновая кислота

GlcN – β-D-глюкозамин

GlcNAc – N-ацетилированный β-D-глюкозамин

GlcNAc (6S) – 6-O-сульфатированный N-ацетилированный β-D-глюкозамин

GlcNS – N-сульфатированный β-D-глюкозамин

GlcNS (3S) – 3-O-сульфатированный N-сульфатированный β-D-глюкозамин

GlcNS (6S) – 6-O-сульфатированный N-сульфатированный β-D-глюкозамин

Hep–МГ комплекс гепарин–метиленовый голубой

Hep-МЗ – комплекс гепарин–малахитовый зеленый

Hep–ТС (Hep-TC_2) – комплекс гепарин–толуиленовый синий

Ido (2S) – 2-O-сульфатированная L-идуроновая кислота

IdoA – L-идуроновая кислота

$I_п$ – ток пика, мкА

K – показатель антиоксидантной активности, мкг/(дм^3·мин)

k_s – гетерогенная константа скорости реакции, см/с

n – общее число переносимых электронов

OSCS – гиперсульфатированный хондроитин сульфат

pNA – паранитроанилин

R – универсальная газовая постоянная 8,314 Дж/моль·К

T – температура, К

W – скорость развертки (сканирования) потенциала, мВ/с, В/с

α – эффективный коэффициент переноса электронов катодного процесса

ΔE – разность потенциалов, В

Λ – безразмерный параметр по Матсуда и Айябэ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Оганов, Р. Г. Демографические тенденции в Российской Федерации: вклад болезней системы кровообращения / Р. Г Оганов, Г. Я. Масленникова // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2012. – № 1. – С. 5-10.

2. Лакин, К. М. Современные антитромботические средства (обзор) / К. М. Лакин // Хим.- фарм. журнал. – 1985. – № 10. – С. 1180-1192.

3. Композиция на основе высокомолекулярного гепарина с антикоагулянтными, антитромбоцитарными, фибринолитическими и фибринодеполимеризационными свойствами [Текст]: пат. № 2454237 РФ, МПК С1 / Исаев В. А., Григорьева М. Е., Ляпина Л. А., Николаева Л. С., Семёнов А. Н., Ершов А. А., Сергеев В. Н. : заявитель и патентообладатель ЗАО НПП "Тринита". – № 2011115512/15; заявл. 20.04.2011; опубл. 27.06.2012. Бюл. № 18. – 9 с.

4. Xiaomi, Xu. High Resolution Analysis of Heparin and Heparin-like Impurities on Glycomix™ – an Anion Exchange Column. Sepax Technologies [Электронный ресурс] / Xu Xiaomi, Yuna Li, Aiyan Cui, Haiying Chen // – Режим доступа: http://www.technosaurus.co.jp/applicationListFile/ms4eaf979b74888/heparin.pdf.

5. Барбалат, Ю. А. Прикладной химический анализ: практическое руководство / Ю. А. Барбалат. – М. : Изд-во МГУ. 2010. – 456 с.

6. Каренберг, А. Кровь, флегма и дух: Гален об инсульте / А. Каренберг // История медицины. – 2015. – Т. 2. – № 2. – С. 207-216.

7. Зубаиров, Д. М. Почему свёртывается кровь / Д. М. Зубаиров // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 3. – С. 46-52.

8. Авиценна (Ибн Сина). Канон врачебной науки. Классика медицины. О сохранении здоровья. / Авиценна (Ибн Сина). Сост., доп., прим. и комментарии В.И. Бочалова. – Воронеж, 2011. – 160 с.

9. Михин, И. В., Голуб В. А. Десмургия: учебное пособие / И. В. Михин, В. А. Голуб. – Волгоград : Изд-во ВолгГМУ, 2012. – 96 с.

10. Лужковская, Ю. Восстанавливающая гимнастика для сосудов / Ю. Лужковская. – СПб. : Питер, 2013. – 160 с.

11. Wardrop, D. The story of the discovery of heparin and warfarin / D. Wardrop, D. Keeling // British Journal of Haematology. – 2008. – 141 (6). – P. 757-763.

12. Schmidt-Mulheim. Kenntniss des Peptons und seiner physiogische Bedeutung / Schmidt-Mulheim, A. Beitragezur // Arch Physiol. – 1880. – P. 33-56.

13. Jaques, L. B. Addendum: the discovery of heparin. Semin. / L. B. Jaques // Thromb. Hemost. – 1978. – № 4. – P. 350-353.

14. Friedman, S. G. The Discovery of Heparin / S. G. Friedman // JSM Atheroscler. – 2016. – 1 (3). – P. 1017-1018.

15. Гуляев, Д. В. Гепарин: история, реалии, перспективы [Электронный ресурс] / Д. В. Гуляев // Кровь. – 2011. – № 1. – С. 41-48. Режим доступа: http://ekmair.ukma.edu.ua/handle/123456789/1433.

16. Verstraete, M. Heparin and thrombosis: A seventy year long story / M. Verstraete // Haemostasis. – 1990. – № 20. – P. 4-11.

17. Казначеев, В. П. Основные ферментативные процессы в патологии и клинике ревматизма. Часть 3. Вопросы физиологии и патологии гепарина. Гепарин в патогенезе и клинике ревматизма / В. П. Казначеев. – Новосибирск : Государственный медицинский институт, 1960. – 664 с.

18. Кожевникова, И. В. Способы получения гепарина / И. В. Кожевникова, Л. П. Волковинская, Л. В. Соколова, Р. М. Норейка // Обзорная информация ЦБНТИ Минмед-пром. сер. Химико-фармацевтическая промышленность. – 1977. – №11.– С. 28.

19. Панов, В. П. Физико-химическое изучение гепарина (Обзор) / В. П. Панов, А. М. Овсепян // Хим.-фарм. журнал. – 1979. – № 12.– С. 72-86.

20. Gatti, G. Studies on the Conformation of Heparin by ^{1}H and ^{13}C NMR Spectroscopy / G. Gatti, B. Casu, G. K. Hamer, A. S. Perlin // Macromolecules. – 1979. – № 12. – P. 1001- 1007.

21. Neville, G. A. Monitoring the purity of pharmaceutical heparin preparations by high-field 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy / G. A Neville, F. Mori, K. R. Holme, A. S. Perlin // J. Pharm. Sci. – 1989. – № 78. – P. 101-104.

22. Yates, E. A. H-1 and C-13 NMR spectral assignments of the major sequences of twelve systematically modified heparin derivatives / E. A. Yates, F. Santini, M. Guerrini, A. Naggi, G. Torri, B. Casu // Carbohydr. Res. – 1996. – № 294. – P. 15-27.

23. Keire, D. A. Assay of possible economically motivated additives or native impurities levels in heparin by ^{1}H NMR, SAX-HPLC, and anticoagulation time approaches / D. A. Keire, D. J. Mans, H. Ye, R. E. Kolinski, L. F. Buhse // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2010. – № 52. – P. 656-664.

24. Dallas L. Rabenstein. Heparin and heparan sulfate: structure and function / Dallas L. Rabenstein // Nat. Prod. Rep. – 2002. – № 19. – P. 312-331.

25. Nikos K. Karamanos. Ion-pair high-performance liquid chromatography for determining disaccharide composition in heparin and heparan sulphate / Nikos K. Karamanos // J. of Chromatography A. – 1997. – V. 765. – № 6. – P. 169 - 179.

26. Cheng, C. Progress in heparin and heparin-like/mimicking polymer-functionalized biomedical membranes / C. Cheng, S. Sun, C. Zhao // Journal of Materials Chemistry B 2. – 2014. – № 44. – P. 7649-7672.

27. Casu, B. Heparin structure / B. Casu // Haemostasis. –1990. – №20. – P. 62-73.

28. Краснопольский, Ю. М. Фармацевтическая биотехнология: Производство биологически активных веществ: учеб. пособие в 2 ч. – Ч. 1 / Ю. М. Краснопольский, Н. Ф. Клещев. – Харьков : НТУ «ХПИ», 2013. – 304 с.

29. Овсепян, А. М. Контроль выделения и очистки гепарина с помощью ИК-спектроскопии / А. М. Овсепян, В. В. Кобяков, В. П. Панов // Хим.-фарм. журнал. – 1985. – № 4. – С. 486-492.

30. Alexander, G.G. Clinical Potential of Antithrombotic Drugs in Coronary Syndromes / G. G. Alexander, A. G. Turpie // The American Journal of Cardiology. – 1998. – V. 82. – P. 11L-14L.

31. Бекровский А. Л. Методы определения активности гепарина: методическое руководство / А. Л. Бекровский, Е. В. Сергеева, А. В. Суворов, А. А. Козлов – М. : «РЕНАМ», 2011. – 55 с.

32. Маслаков, Д. А. Современные представления о биологическом действии препаратов полисахаридной природы / Д. А. Маслаков, К. А. Эйсмонт, Н. Е. Максимович // Мед. новости. – 2000. – №5. – С. 19-22.

33. Кричевский, Л. А. Низкомолекулярные гепарины в современной системе управления свертываемостью крови / Л. А. Кричевский // Доктор.Ру. Анестезиология и реаниматология. Медицинская реабилитация. – 2015. – № 15 – С. 42-48.

34. Марков, В. А. Применение гепаринов в клинической практике / В. А. Марков, Т. Б. Кондратьева // Российский медицинский журнал. – 1998. – Т. 6. – № 3. – С. 164-167.

35. Савельева, К. Р. Гепарин и низкомолекулярные гепарины (обзор литературы) / К. Р. Савельева, Л. Е. Фрумин, В. Н. Шестаков // Вестник службы крови России. – 2013. – №4. – С. 46-56.

36. Gray, E. Heparin and low-molecular-weight heparin / E. Gray, B. Mulloy, T. W. Barrowcliffe // Thromb Haemost. – 2008. – V. 99. – № 5. – P. 807-818.

37. Kakkar, A. K. Low- and ultra-low-molecular-weight heparins / A.K. Kakkar // Best Practice and Research Clinical Haematology. – 2004. – № 17. – P. 77-87.

38. Harris, L. F. Heparin monitoring: From blood tube to microfluidic device / L. F. Harris, A. Killard // New York: NovaScience Publishers. – 2012. – 28 p.

39. Laurence L. Brunton. Goodman & Gilman’s: The Pharmacological Basis of Therapeutics. 12th edition. Section III Modulation of Cardiovascular Function. Chapter 30. Blood Coagulation and Anticoagulant, Fibrinolytic, and Antiplatelet Drugs. / Laurence L. Brunton, Bruce A. Chabner, Björn C. Knollmann. – New York : N.Y. McGraw-Hill Education LLC., 2011. – P. 849-876.

40. Бутров, А. В. Сравнительная оценка эффективности и безопасности низкомолекулярных гепаринов / А. В. Бутров, Е. Н. Кондрашенко // РМЖ. – 2013. – № 34. – С. 1725-1729.

41. Сыров А. В. Антикоагулянтная терапия при остром коронарном синдроме без подъема сегмента ST / А. В. Сыров, С. К. Зырянов // Атеротромбоз. – 2009. – №2. – С. 48-59.

42. Гладкий, А. П. Профилактика венозной тромбоэмболии у онкологических пациентов / А. П. Гладкий // Онкогинекология. – 2015. – № 4. – С. 54-63.

43. Явелов, И. С. Применение низкомолекулярных гепаринов в кардиологии / И. С. Явелов // Фарматека. – 2002. – №7/8. – С. 60-73.

44. Енисеева Е. С. Гепарининдуцированная тромбоцитопения / Е. С. Енисеева // Сибирский медицинский журнал. – 2013. – № 4. – С. 27-29.

45. Тавровская, Т. В. Гепарин: рациональность использования в клинике и оптимизация дозы при подкожном введении / Т. В. Тавровская, В. В. Костоусов, Д. Ю. Полозов // Вестник аритмологии. – 2003. – № 34. – С. 62-71.

46. Столбушкина, П. П. Получение и антикоагулянтная активность образцов низкомолекулярных гепаринов / П. П. Столбушкина, Г. Е. Банникова, Н. Н. Дрозд, В. А. Макаров, В. П. Варламов, Г. А. Вихорева // Хим.-фарм. журнал. – 2004. – № 2. – С. 25-28.

47. Белецкая, И. П. Ионы и ионные пары в органических реакциях / И. П. Белецкая. – М. : Мир, 1975. – 424 с.

48. Алекперов, А. Ф. Комплексообразующие свойства гепарина с органическими катионами / А. Ф. Алекперов, А. М. Алиев // Фармация. – 1987. – Т. 36. – №1 – С. 80-85.

49. Park, J. W. Acid-base and optical properties of heparin / J. W. Park, B. Chakrabarti // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 1977. – V. 78. – P. 604-608.

50. Linhardt, R. J. Hudson award address in carbohydrate chemistry. Heparin: Structure and activity / R. J. Linhardt, S. Claude // J. Med. Chem. – 2003. № 46. – P. 2551-2564.

51. O'Neil, M. J. The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals / O'Neil, M. J. – Whitehouse Station, NY : Merck and Co., Inc., 2006. – P. 804.

52. Биологический энциклопедический словарь / Гл. ред. М. С. Гиляров; Редкол.: А. А. Баев, Г. Г. Винберг, Г. А. Заварзин и др. – 2-е изд., исправл. – М. : Сов. Энциклопедия, 1986. – С. 128.

53. Edens, R. E. Heparin and deriva-tized heparin inhibit zymozan and cobra venom factor activation of complement in serum / R. E. Edens, R. J. Linhardt, C. S. Bell, J. M. Weiler // Immunopharmacology. – 1994. – V. 27. – № 2. – P. 145-153.

54. Звонкова, М. Б. Механизмы защитного действия гепарина при отравлении некоторыми зоотоксинами: дис. … канд. биол. наук : 03.00.13 / Звонкова Мария Борисовна. – Нижний Новгород, 2002. – 149 с.

55. Grant, D. Pericellular heparans may contribute to the protection of cells from free radicals/ D. Grant, W. F. Long, F. B. Williamson // Med Hypotheses. – 1987. – № 23. – P. 67-71.

56. Finotti, P. The oxidative mechanism of heparin interferes with radical production by glucose and reduces the degree of glycooxidative modifications on human serum albumin / P. Finotti, A. Pagetta, T. Ashton // Eur. J. Biochem. – 2001. – V. 268. – P. 2193-2200.

57. Юнусов, Р. В. Комплексообразование гепарина с белками плазмы крови / Р. В Юнусов // Вопр. мед. химии. – 1972. – Т. 17. – № 2. – С. 189-191.

58. Кудряшов Б. А. Комплекс гепарин-адреналин как гуморальный агент противосвертывающей системы / Б. А. Кудряшов, Л. А. Ляпина // Вопросы медхимии. – 1971. – Т. 17. – № 12. – С. 46-53.

59. Кондрашевская, М. В. Новое свойство комплекса гепарин-серотонин / М. В. Кондрашевская, Л. А. Ляпина // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 1998. – Т. 126. – № 10. – С. 425-427.

60. Ляпина, Л. А. Образование комплексов АТФ, АДФ и АМФ с гепарином in vitro / Л. А. Ляпина, Б. А. Кудряшов // Научн. докл. высшей школы. Сер. Биол. науки. – 1977. – № 9. – С. 22-26.

61. Jackson, R. L. Heparin binding to lipoprotein lipase and low density lipoproteins / R. L. Jackson, Lilian Socorro, Geralyn M. Fletcher, Alan D. Cardin // FEBS Letters. – 1985. – V. 190. – P. 297-300.

62. Ляпина, Л. А. Противосвертывающие эффекты комплексного соединения аргинина с высокомолекулярным гепарином / Л. А. Ляпина., Т. Ю. Оберган, В. Е. Пасторова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2009. – Т. 147. – № 3. – С. 300-303.

63. Ляпина, Л. А. Комплекс гепарин-лизин и его противосвертывающие свойства / Л. А. Ляпина, В. Е. Пасторова, Т. Ю. Смолина, М. Г. Голубева, М. Е. Григорьева, А. М. Ульянов // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2004. – № 1(17). – С. 37-40.

64. Ляпина, Л. А. Сравнительные исследования антикоагулянтных соединений гепарина с аминокислотами – аланином, валином и глицином / Л. А. Ляпина, Т. Ю. Оберган, М. Е. Григорьева, Е. С. Майстренко, М. Д. Калугина // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 11. – С. 412-415.

65. Францева, Ю. В. Хелатные комплексы гепарина с биометаллами (медь, цинк) / Ю. В. Францева, М. А. Феофанова, А. Н. Семенов // Вестник ТвГУ. Сб. науч. тр. Серия «Биология и экология». – 2009. – №18. – С. 81-90.

66. Хомутов, А. Е. Полифункциональные свойства гепарина / А. Е. Хомутов, М. Б. Звонкова, М. Е. Пахомова // Вестник ННГУ. Серия биологическая. Н. Новгород. – 2001. – Вып. 1.– С. 128-134.

67. Percival, M. Antioxidants / Mark Percival // Clinical Nutrition Insights. – 1998. – № 1. – P. 1-4.

68. Каликинская, Е. Антиоксиданты –защита от старения и болезней / Е. Каликинская // Наука и жизнь. – 2000. –№ 8. – С. 90-94.

69. Lapenna, D. Heparin: Does it act as an antioxidant in vivo? / D. Lapenna, A. Mezzetti, S. De Gioia, G. Ciofani, L. Marzio, C. Di Ilio, F.Cuccurollo // Biochem Pharmacol. – 1992. – № 44. – P. 188-91.

70. Ross, M. A. Inhibition by heparin of Fe(II)-catalysed free-radical peroxidation of linolenic acid / M. A. Ross, W. F. Long, F. B. Williamson // Biochem. J. – 1992. – № 286. P. 717-720.

71. Williamson, M. F. The effect of heparin on the u.v. absorption properties of Fe (II) and Fe (III) / M. F. Williamson, W. F. Long, F. B. Williamson // Biochemical Society Transactions. – 1992. – № 20. – P. 3608.

72. Gutteridge, J. M. Bleomycin-detectable iron in knee-joint synovial fluid from arthritic patients and its relationship to the extracellular antioxidant activities of caeruloplasmin, transferrin and lactoferrin / J. M. Gutteridge // Biochem. J. – 1987. – V. 245. – P. 415-421.

73. Grant, D. Heparins as essential antioxidants / D. Grant, W. F. Long, G. Mackintosh, F. B. Williamson // Agents Actions. – 1994. – № 41. – P. 214-215.

74. Grant, D. The antioxidant activity of heparins / D. Grant, W. F. Long, G. Mackintosh, F. B. Williamson // Biochem Soc Trans. – 1996. – № 24. – P. 1948.

75. Nassiri, A. A. Effects of heparin and dalteparin on oxidative stress during hemodialysis in patients with end-stage renal disease / A. A. Nassiri, M. S. Hakemi, M. Soulati, M. Marashian, K. Rahbar, F. Azizi // Iranian Journal of Kidney Diseases. – 2009. – V. 3. – №. 3. P. 162-167.

76. Першин, Г. Н. Учебник по фармакологии / Г. Н. Першин, Е. И. Гвоздева. – М. : Медгиз., 1961. – С. 405.

77. Комарова, Н. В. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ» / Н. В. Комарова, Я. С. Каменцев. – СПб. : ООО «Веда», 2006. – 212 с.

78. Toyoda, H. Rapid and sensitive analysis of disaccharide composition in heparin and heparan sulfate by reversed-phase ion-pair chromatography on a 2 μm porous silica gel column / H. Toyoda, H. Yamamoto, N. Ogino, T. Toida, T. Imanari // J. Chromatogr. – 1999. – № 830. – P. 197-201.

79. Zhou, X. M. Determination of plasma heparin by micellar electrokinetic capillary chromatography / X. M. Zhou, J. W. Liu, M. E. Zhang, S. J. Chen // Talanta. – 1998. – V. 46. – №. 4. – P. 757-760.

80. Yilan Ouyang. Qualitative and quantitative analysis of heparin and low molecular weight heparins using size exclusion chromatography with multiple angle laser scattering/refractive index and inductively coupled plasma/mass spectrometry detectors / Yilan Ouyang, Yangyang Zeng, Lin Yi, Hong Tang, Duxin Li, Robert J. Linhardt, Zhenqing Zhang // J. of Chromatography A. – 2017. – V 1522. – P. 56-61.

81. Письмо от 8 сентября 2008 года N 03И-578/08 [Электронный ресурс]. «О контроле качества посторонних примесей в препаратах гепарина». – Режим доступа: http://docs.cntd.ru/document/902119674.

82. Liu, X. Capillary electrophoresis for simultaneous analysis of heparin, chondroitin sulfate and hyaluronic acid and its application in preparations and synovial fluid / X. Liu, C. Sun, H. Zang // J Chromatogr Sci. – 2012. – № 50. – P. 373-379.

83. Volpi, N. Electrophoresis for the analysis of heparin purity and quality / N Volpi, F. Maccari, J. Suwan // Electrophoresis. – 2012. – № 33. – P.1531-1537.

84. Немченко, А. С. Фармакоэкономическая оценка лекарственной профилактики тромбоэмболических осложнений в хирургии / А. С. Немченко, М. В. Подгайная // Новости медицины и фармации. – 2009. – № 3. – С. 269-270.

85. Свергун, В. И. Идентификация и прямое количественное определение гепарина методом ЯМР 13С / В. И. Свергун, М. Б. Смирнов, В. П. Панов // Хим.-фарм. журнал. – 1979. – № 4. – С. 92-97.

86. Кобяков, В. В. Анализ нуклеиновых кислот в полупродуктах производства гепарина методом УФ-спектрофотометрии / В. В. Кобяков, А. М. Овсепян, Н. А. Фролова, В. П. Панов // Хим.-фарм. журнал. – 1978. – № 7. – С. 130-134.

87. Khokhlov, V.Yu. Heparin Determination by Spectrophotometric and Photocolorimetric Methods / V. Yu. Khokhlov, V. F. Selemenev, O. N. Khohlova, R. L. Shcherbinin // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 1999. – V. 33. – №. 8. – P. 450-451.

88. Klein, M. D. A colorimetric assay for chemical heparin in plasma / M. D. Klein, R. A. Drongowski, R. J. Linhardt, R. S. Langer // Anal Biochem. – 1982. – № 1. – P. 59-64.

89. Smith, P. K. Colorimetric method for the assay of heparin content in immobilized heparin preparations / P. K. Smith, A. K. Mallia, G. T. Hermanson // Anal Biochem. – 1980. – № 2. – P. 466-73.

90. Sun, W. Spectrophotometric determination of heparin with neutral red / W. Sun, Y. Q. Ding, J. Rao, K. Jiao // Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi. – 2006. – № 7. – P. 1322-1325.

91. Nothelfer, R.. Adsorption of thionine on heparin studied by combining ultrafiltration and difference VIS spectroscopy / R. Nothelfer, J. Ruprecht, Heyl, H. Baumgärtel // Biopolymers. – 1986. – № 25. – P. 1273-1281.

92. Manzoori, J. Determination of Heparin Using Terbium-Danofloxacin as a Luminescent Probe / J. Manzoori, Jouyban Abolghesem, Amjadi Mohammad, Ramezani Amir // Journal of Applied Spectroscopy. – 2013. – V. 80. – №. 1. – P. 104-110.

93. Jing, Li. Spectrofluorimetric determination of heparin using doxycycline–europium probe / Li Jing, Jinkai Liu, Xiaojing Zhu, Qian Peng, Chongqiu Jiang // Journal of Luminescence. – 2005. – V. 13. – №. 3. – P. 305-313.

94. Hong-Ping Guo. Resonance Light Scattering Imaging Determination of Heparin / Hong-Ping Guo, Cheng-Zhi Huang, Jian Ling // Chinese Chemical Letters. – 2006. – V. 17. – №. 1. – P. 53-56.

95. Noriko Nakamura, Fumio Linuma, Toshio Kinoshita. Fluorimetric determination of heparin with dansylprotamine / Noriko Nakamura, Fumio Linuma, Toshio Kinoshita // Analitical Sciences – 1987. – V. 3. – P. 175-177.

96. Langmaier, J. Amperometry of Heparin Polyion Using a Rotating Disk Electrode Coated with a Plasticized PVC Membrane / J. Langmaier, J. Olšák, E. Samcová, Z. Samec, A. Trojánek // Electroanalysis. – 2006. – № 2. – P. 115-120.

97. Langmaier, J. Amperometric Sensor for Heparin: Sensing Mechanism and Application in Human Blood Plasma Analysis / J. Langmaier, J. Olšák, E. Samcová, Z. Samec, A. Trojánek // Electroanalysis. – 2006. – № 14. – P. 1329-1338.

98. Langmaier, J. Potentiometric Sensor for Heparin Polyion: Transient Behavior and Response Mechanism / J. Langmaier, E. Samcová, Z. Samec // Analytical Chemistry. – 2007. – V. 79. – № 7. – P. 2892-2900.

99. Chargaff, E. Studies on the chemistry of blood coagulation. VI. Studies on the action of heparin and other anticoagulants. The influence of protamine on the anticoagulant effect in vivo / E. Chargaff, K. B. Olson // J. Biol Chem. – 1937. – V. 122. – №1. – P. 153-167.

100. Машковский, М. Д. Лекарственные средства. – 16-е изд., перераб., испр. и доп. / М. Д. Машковский. – М.: Новая волна, 2012. – 1216 с.

101. Horrow, J. C. Protamine: A Review of its Toxicity / J. C. Horrow // Anesthesia and analgesia. – 1985. – V. 64. – № 3. – P. 348-361.

102. Yun J. H. A Disposable, Coated Wire Heparin Sensor / J. H. Yun, B. Fu, M. E. Meyerhoff, V. C. Yang // ASAIO J. – 1994. – № 40. – P. 401-405.

103. Yun, J. H. Clinical application of disposable heparin sensors. Blood heparin measurements during open heart surgery / J. H. Yun, L. Lee, J. A. Wahr, V. C. Yang, M. E. Meyerhoff // ASAIO J. – 1995. – № 41. – P. 661-664.

104. Wahr, J. A. A new method of measuring heparin levels in whole blood by protamine titration using a heparin-responsive electrochemical sensor / J. A. Wahr, J. H. Yun, V. C. Yang, L. M. Lee, B. Fu, M. E. Meyerhoff // J. Cardiothorac Vasc Anesth. – 1996. – V. 10. – №. 4. – P. 447-450.

105. Ramamurthy, N. Improved protamine-sensitive membrane electrode for monitoring heparin concentrations in whole blood via protamine titration / N. Ramamurthy, N. Baliga, J. Wahr, U. Schaller, V. C. Yang, M. E. Meyerhoff // Clin. Chem. – 1998. – V. 44. – №. 3. – P. 606-613.

106. Gemme, K. L. Flash Chronopotentiometric Sensing of the Polyions Protamine and Heparin at Ion-Selective Membranes / K. L. Gemme, E. Bakker // Analytical Biochemistry. – 2009. – P. 276-281.

107. Harloff, M. Comparison study of the Hepcon System Four and the Hemostasis Management System. / M. Harloff, J. Taraskiewicz, C. Fotouhi // Perfusion. – 1991. – V. 6. – №. 4. – P. 297-301.

108. Lewinski, K. Electrochemical oxidation and determination of heparin at electrodes modified with ruthenium oxide or copper oxide / K. Lewinski, Yun Hu, C. C. Griffin, J. A. Cox // Electroanalysis. – 1997. – V. 9. – P. 675-679.

109. Piech, R. Study on Heparin Determination Using Cathodic Stripping Voltammetry / R. Piech, B. Paczosa-Bator, K. Golen // Int. J. Electrochem. Sci. – 2012. – V. 7. – P. 5122-5132.

110. Niyati Singh. Electrochemical Assay of Heparin to Monitor Anticoagulation Action in Cardiovascular Patients / Singh Niyati // Indian J Hematol Blood Transfus. – 2012. – V. 28. – №. 2. – P. 97-104.

111. Бонд, А. М. Электроаналитические методы. Теория и практика // А. М. Бонд, и др.; Ред. Ф. Шольц. М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. – 326 с.

112. Мискиджьян, С. П. Полярография лекарственных препаратов : учебное пособие / С. П. Мискиджьян, Л. П. Кравченюк. – Киев : Вища школа, 1976. – С. 180.

113. Liang Tan. Electrochemical determination of heparin using methylene blue probe and study on competition of Ba^{2+} with methylene blue for binding heparin / Tan Liang, Yao Shouzhuo, Xie Qingji // Talanta. – 2007. – V. 71. – P. 827-832.

114. Hong Yu Huo. Electrochemical sensor for heparin based on a poly(thionine) modified glassy carbon electrode / Hong Yu Huo, Hong Qun Luo, Nian Bing Li // Micrichim Acta. – 2009. – P. 195-199.

115. Wei Sun. Electrochemical Detection of Heparin Based on Its Interaction with Light Green / Wei Sun, Yaqin Ding, Qingxiang Wang, Kui Jiao // Electroanalysis. – 2006. – V. 18. – №. 11. – P. 1114-1120.

116. Sun Wei. Voltammetric Determination of Heparin Based on Its Interaction with Brilliant Cresyl Blue / Sun Wei, Ding Ya-Qin, Jiao Kui // Chem. Res. Chinese U. – 2006. – V 22. – № 3. – P. 406-409.

117. Ni Hui. Electrochemical Studies on the Interaction of Heparin with Phenosafranine and Its Analytical Application / Ni Hui, Wei Sun, Ya-Qin-Ding // J. of Chinese Society. – 2009. – V. 56. – P. 271-278.

118. Xueliang Niu. Electrochemical determination of heparin based on its interaction with acridine orange / Xueliang Niu, Wie Sun, Na Zhao, Kui Jiao // Indian J. of Chem. Technology. – 2008. – V. 15. – P. 476-482.

119. Xueliang Niu. Voltammetric Determination of Heparin Based on its Interaction with Malachite Green / Xueliang Niu, Wieli Zhang, Na Zhao, Wie Sun // Bull. Chem. Soc. Ethiop. – 2008. – V. 22. – №. 2. – P. 165-172.

120. Sun Wei. Voltammetric Determination of Heparin Based on its Interaction with Netural Red / Sun Wei, Jiao Kui, Junying Han, Lude Lu // Analytical Letters. – 2005. – V. 38. – P. 1137-1148.

121. Sun Wei. Electrochemical studies on the interaction of heparin with crystal violet and its analytical application / Sun Wei, Ding Yaqin, Jiao Kui // J. of Analytical Chem. – 2006. – V. 61. – №. 4. – P. 359-364.

122. Xiu Ying Peng. Voltammetric study on the interaction of heparin with toluidine blue, and its analytical application / Xiu Ying Peng, Hong Qun Luo, Nian Bing Li // Microchim Acta. – 2007. – V. 156. – P. 297-302.

123. Липских, О. И. Вольтамперометрическое определение синтетических красителей в пищевых продуктах на углеродсодержащем модифицированном электроде : дис. … канд. хим. наук : 02.00.02 / Липских Ольга Ивановна. – Томск, 2017. – 137 с.

124. Лурье, Ю.Ю. Справочник по аналитической химии / Ю.Ю. Лурье. – М. : Химия, 1971. – 456 с.

125. Чарыков, А. К. Математическая обработка результатов химического анализа / А. К. Чарыков. – Л. : Химия, 1984. – 168 с.

126. РМГ 61-2010 Показатели точности, правильности, прецизионности методик количественного химического анализа. Методы оценки – М. : Стандартинформ, 2013. – 62 с.

127. 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.

128. 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.

129. Brainina, Khjena Z. In situ modified electrodes in stripping voltammetry / Khjena Z. Brainina, Albina V. Tchernyshova, Natalya Yu. Stozhko, Lubov N. Kalnyshevskaya // Analyst. – 1989. – V. 114. – P. 173-180.

130. Chen, C. Monitoring formation of poly(neutral red) film by EQCM / C. Chen, Y. Gao // Russian Journal of Electrochemistry. – 2007. – V. 43. – P. 267-272.

131. Будников, Г. К. Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии. Биологии и медицине / Г. К. Будников, Г. А. Евтюгин, В. Н. Майстренко. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. – 416 с.

132. Chuanxiang Chen. Electrosynthesis of poly(neutral red) incorporated with ferrocenesulfonic acid / Chuanxiang Chen, Yuhua Gao // Electrochimica Acta. – 2007. – V. 52. – P. 7322-7329.

133. Chuanxiang Chen. Electrochemical characteristics of polyaniline electrosynthesized in the presence of neutral red / Chuanxiang Chen, Yuhua Gao // Materials Chemistry and Physics. – 2007. – V.44. – P. 1089-1093.

134. Martin, C. S. Electrocatalytic study of an electrode modified with Reactive Blue 4 dye covalently immobilized on amine-functionalized silica / C. S. Martin, M. F. S. Teixeira // J. Solid State Electrochem. – 2012. – V. 16. – P. 3877-3886.

135. Барановский, С. Ф. Исследование равновесного поведения ароматических молекул красителя тиазинового ряда в водном растворе методом спектрофотометрии / С. Ф. Барановский, П. А. Болотин, Е. В. Глобина, А. Н. Веселков // Вестник СевГТУ. – 2005. – Вып.70: Физика и математика. – С. 5-14.

136. Huangxian Ju. The Electrochemical Behavior of Methylene Blue at a Microcylinder Carbon Fiber Electrode / Huangxian Ju, Jun Zhou, Chenxin Cai, Hongyuan Chen // Electroanalysis. – 1995. – V. 7. – №. 12. – P. 1165-1170.

137. Комптон, Р. Г. Постигая вольтамперометрию : пер. с англ. / Р. Г. Комптон, К. Е. Бэнкс. – Томск : Изд-во ТПУ, 2015. – 509 с.

138. Nicolai, S. A. Electrochemical and spectroelectrochemical (SERS) studies of the reduction of methylene blue on a silver electrode / SH. A. Nicolai, P. R. P. Podrigues, S. M. L. Agostinho, J. C. Rubium // J. Electroanal. Chem. – 2002. – V. 527. – P. 103.

139. Гороховская, В. И. Практикум по электрохимическим методам анализа: учеб. пособие для студентов вузов / В. И. Гороховская, В. М. Гороховский. – М. : Высш. школа, 1983. – 191 с.

140. Bedasa Abdisa. Graduate project. Electrosynthesis and Characterization of some Poly(dyes) / Bedasa Abdisa. – Addis Ababa University, 2007. – 60 p.

141. Huihui Chen. Attapulgite with poly(methylene blue) composite film–Electrocatalytic determination of ascorbic acid / Huihui Chen, Zhe Zhang, Dongqing Cai, Shengyi Zhang, Bailin Zhang, Jilin Tang, Zhengyan Wu // Solid State Sciences. – 2012. – V. 14. – №. 3. – P. 362-366.

142. Галюс, З. Теоретические основы электрохимического анализа / З. Галюс. – М. : Мир, 1974. – 552 с.

143. Гауптман, З. Органическая химия / З. Гауптман, Ю. Грефе, Х. Ремане. – М. : Химия, 1979. – С. 748-749.

144. Shivaji Srivastava. Review. Toxicological effects of malachite green / Shivaji Srivastava, Ranjana Sinha, D. Roy // Aquatic Toxicology. – 2004. – V. 66. – № 3. – P. 319-329.

145. Хенце, Г. Полярография и вольтамперометрия. Теоретические основы и аналитическая практика / Г. Хенце, пер. с нем. А.В. Гармаша и А.И. Каменева. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 284 с.

146. Nguyen M. Cuong. Electric Potential Dependence of Intraparticle Diffusion of Malachite Green in Single Cation Exchange Resin Particles: A Laser

Trapping-Microspectroscopy Study / Nguyen M. Cuong, Shoji Ishizaka, Noboru Kitamura Donnan // American Journal of Analytical Chemistry. – 2012. – V. 3 – № 3. – P. 188-194.

147. Колпакова, Н. А. Общие вопросы электрохимического анализа: учебное пособие / Н. А. Колпакова. – Томск : Изд-во Томского политехнического университета, 2013. – 159 с.

148. Gosta Bengtsson. Polarographic Studies of Basic Triarylmethane Dyes. Kinetics, Equilibria and Behavior of Malachite Green in Aqueous Solutions / Gosta Bengtsson // Acta Chemica Scandinavica. – 1967. – V. 21. – P. 2544-2558.

149. Curr, E. Synthetic dyes in Biology, Medicine and Chemistry / E. Curr. – Academic Press, 1971. – 807 P.

150. Бишоп, Э. Индикаторы. Том 2 / Э. Бишоп, пер. с англ. – М. : Мир, 1976 – 446 с.

151. A Nixon Azariah. Electrochemical Behaviour of Neutral Red / A Nixon Azariah, Sheela Berchmans, V. Yegnaraman // Bulletin of Electrochemistry. – 1998. – V.14 – P. 309-314.

152. Rasa Pauliukaite. Poly(Neutral Red): Electrosynthesis, Characterisation and. Application as a Redox Mediator / Rasa Pauliukaite, Christopher M.A. Brett // Electroanalysis. – 2008. – № 20. – P. 1275-1285.

153. Heli, H. Electrochemical investigation of neutral red binding to DNA at the surface / H. Heli, S. Z Bathaie, M. F Mousavi // Electrochemistry communications. – 2004 – № 6. – P. 1114-1118.

154. Степанов, Б.И. Введение в химию органических красителей / Б.И. Степанов. – М. : Химия, 1984. – 592 с.

155. Чен, Ч. Мониторинг образования пленки полимера нейтрального красного с помощью электрохимических кварцевых микровесов / Ч. Чен, Ю. Гао // Электрохимия. – 2007. – Т. 43. № 3. – С. 284-289.

156. Matsuda H. Theorie der Randles-Sevčikschen Kathodenstrahl-Polarographie / H. Matsuda, Y. Ayabe // Zeitschrift für Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie. – 1955. – V. 59. – № 6. – P. 494-503.

157. Bamford, C.H. Chemical Kinetics. Volume 26. Electrode Kinetics: Principles and Methodology / C.H. Bamford, R.G. Compton. – Elsevier, 1986. – P. 150.

158. Venkataraman, K. The Chemistry of Synthetic Dyes / K. Venkataraman. – Elsevier, 1974. – Vol. 7. – P. 79.

159. Медицинская энциклопедия [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.medical-enc.ru/m/12/metahromaziya.shtml.

160. Водолазкая, Н. А. Ионные равновесия в организованных растворах: методические рекомендации к лабораторным и практическим работам / Н. А. Водолазкая, О. С. Чернышева. – Х. : ХНУ им. В. Н. Каразина, 2015. – 72 с.

161. Панасенкова, Ю. А. Способы тестирования антиоксидантных свойств лекарственных препаратов в лабораторных условиях и возможности использования этих показателей в клинической практике / Ю. А. Панасенкова, Е. И. Ременякина, В. Д. Левичкин, А. А. Басов, И. И. Павлюченко // Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. – 2013. – Т. 24 – № 25. – С. 239-243.

162. Короткова, Е. И. Вольтамперометрический метод определения суммарной активности антиоксидантов в объектак искусственного и природного происхождения: дис. … д-ра. хим. наук. : 02.00.02 / Короткова Елена Ивановна. – Томск, 2009. – 400 с.

163. Guideline on bioanalytical method validation / European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). – London, 2009. – 22 p.

164. ГОСТ Р 53022.2-2008 Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 2. Оценка аналитической надежности методов исследования (точность, чувствительность, специфичность). – М. : Стандартинформ, 2009. – 8 с.

165. Батцер, Г. Введение в химию высокомолекулярных соединений / Г. Батцер. – М. : Издательство иностранной литературы, 1960. – 256 с.

166. Юргель, Н. В. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств. (методические рекомендации) / Н. В. Юргель,

А. Л. Младенцев, А. В. Бурдейн, М. А. Гетьман, А. А. Малин, В. В. Косенко. – М. : СиК, 2007. – 48 с.

167. Инструкция «Ренапарин-тест» [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.renam.ru/kontrol-geparinoterapii/renaparin.

168. Гармаш, А. В. Метрологические основы аналитической химии / А. В. Гармаш, Н. М. Сорокина. – М. : МГУ им. М.В. Ломоносова, 2012. – 47 с.

169. Короткова, Е. И. Планирование и организация эксперимента: учебное пособие / Е. И. Короткова. – Томск: Изд-во ТПУ, 2003 – 92с.

Приложение 1.

Алгоритм выполнения расчетов по оценке показателей качества вольтамперометрической методики количественного определения гепарина в лекарственных препаратах с использованием красителя ТС

1. Оценка показателя правильности методики анализа

Установление правильности проводили путем оценки систематической погрешности. Изначально рассчитывали Ө – разность общего среднего значения найденного количественного содержания и подобного значения образца, принятого за истинное:

$$\Theta = X - C$$

Затем проверяли значимость полученного значения Ө по критерию Стьюдента, рассчитывая $t_{\text{расч.}}$ и сравнивая его с $t_{\text{табл.}}$ при числе степеней свободы f=L'-1 для доверительной вероятности P=0,95.

$$t_{\text{расч}} = \frac{|\Theta|}{\sqrt{\frac{S_{R\text{л}}^2}{L\prime} + \frac{\Delta_0^2}{3}}},$$

где $\frac{S_{R\text{л}}^2}{L\prime}$ - дисперсия общего среднего результата, Δ_0 – погрешность аттестованного значения раствора

Если $t_{\text{расч.}} < t_{\text{табл.}}$, то систематическая погрешность Ө не значима на фоне случайного разброса, и в этом случае ее принимали равной нулю и оценку систематической погрешности проводили по формуле:

$$\Delta_{\text{в,с}} = \Delta_{\text{н,с}} = \left|\Delta_{\text{с}}\right| = 1{,}96 \cdot \sqrt{\frac{S_{R\text{л}}^2}{L\prime} + \frac{\Delta_0^2}{3}} = 1{,}96 \cdot \sigma_{\text{с}} \quad ,$$

где $\sigma_{\text{с}}$ - среднеквадратичное отклонение не исключенной систематической погрешности лаборатории.

Если $t_{\text{расч.}} > t_{\text{табл.}}$, то оценка систематической погрешности значима на фоне случайного разброса и ее надо учитывать при дальнейших расчетах:

$$\Delta_{с(в,н)} = \Theta \pm 1{,}96 \cdot \sqrt{\frac{S_{Rл}^2}{L\prime} + \frac{\Delta_0^2}{3}} = \Theta \pm 1{,}96 \cdot \sigma_с ,$$

при условии, что учет Θ не приведет к превышению показателя точности исследуемой методики анализа над нормой точности. В противном случае методика анализа подлежит доработке.

Рассчитав верхнюю и нижнюю границы систематической погрешности, выбирали максимальное по модулю значение $|\Delta_{max}| = |\Delta_{c,н}, \Delta_{c,в}| = \Delta_с$ после чего записывали:

$$\pm\Delta_с = \Theta + 1{,}96 \cdot \sigma_с$$

2. Оценка показателя повторяемости методики анализа

Для расчета повторяемости также необходимо провести ряд вычислений. Изначально определяли среднее арифметическое результатов единичного измерения для каждой серии по формуле:

$$X_{m,l} = \frac{\sum_{i=1}^{N} X_{m,l,i}}{N},$$

где N – число параллельных определений.

Далее рассчитывали выборочную дисперсию для каждой серии результатов анализа по формуле

$$S_{m,l}^2 = \frac{\sum_{i=1}^{N}(X_{m,l,i} - X_{m,l})^2}{N-1}$$

На основе полученных значений выборочных дисперсий $S_{m,l}^2 ..... S_{m,L}^2$ в m-м образце проверяли гипотезу о равенстве генеральных дисперсий, используя критерий Кохрена. Для всех дисперсий выбирали наибольшее значение S_{max}^2, находили сумму всех дисперсий $\sum S_{m,l}^2$. Значение критерия Кохрена $G_{расч}$ рассчитывали по формуле:

$$G_{расч} = \frac{S_{max}^2}{\sum_{i=1}^{L} S_{m,l}^2}$$

Сравнивали расчетное значение с табличным значением критерия Кохрена для числа степеней свободы ν=N-1 и f=l (l - количество дисперсий, участвующих в расчетах) для P=0,95. Если расчетное значение было больше табличного ($G_{расч}$ > $G_{табл}$) то соответствующее значение значение S_{max}^2 исключали из дальнейших расчетов и процедуру повторяли до следующего по значению S_{max}^2 и т.д. до тех пор, пока $G_{расч}$ не станет меньше или равно $G_{табл}$. Неисключенные из расчетов $S_{m,l}^2$ считали однородными и по ним оценивали средние квадратические отклонения (СКО), по которым можно установить одно значение показателя повторяемости для результатов, полученных по методике в конкретной лаборатории:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^{L} S_{m,l}^2}{L'}},$$

где L' – число неотброшенных дисперсий.

Показатель повторяемости методики анализа в виде СКО – σ_r для содержания, соответствующего содержанию компонента в m-м образце, устанавливали, принимая равным S_r ($\sigma_r = S_r$).

3. Оценка показателя внутрилабораторной прецизионности

При оценке внутрилабораторной прецизионности для начала рассчитывали общее среднее значение результатов анализа X_m, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности:

$$X_m = \frac{\sum_{l=1}^{L} X_{m,l}}{L}$$

Проводили проверку средних значений, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности, $X_{m,l}$ на наличие выбросов по критерию Граббса.

Для результатов анализа каждого образца {$X_{m,l}$, l=1,….,L} находили максимальное $X_{m,max}$ и минимальное $X_{m,min}$ значения. Используя полученное среднее значение результатов анализа X_m, рассчитывали их средние квадратические отклонения S_m:

$$S_m = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^{L}(X_{m,l} - X_m)^2}{L-1}}$$

Затем вычисляли статистики Граббса:

$$GR_{m,max} = \frac{X_{m,max} - X_m}{S_m} \quad \text{и} \quad GR_{m,min} = \frac{X_m - X_{m,min}}{S_m}$$

сравнивали их с критическим значением $GR_{\text{табл.}}$ для числа степеней свободы f=L, соответствующего числу серий результатов анализа, и принятой доверительной вероятности P=0,95. Если $GR_{m,max} > GR_{\text{табл.}}$ или/и $GR_{m,min} > GR_{\text{табл.}}$, то соответствующие результаты $X_{m,max}$ или/и $X_{m,min}$ из дальнейших расчетов исключали.

Расчеты продолжали до тех пор, пока не добивались выполнения условия: $GR_{m,max} \le GR_{\text{табл.}}$ и $GR_{m,min} \le GR_{\text{табл.}}$.

После чего рассчитывали выборочное СКО результатов анализа m-го образца, полученных в условиях внутрилабораторной прецизионности,$S_{Rл,m}$ по формуле:

$$S_{Rл,m} = \sqrt{\frac{\sum_{l=1}^{L'}(X_{m,l} - X'_m)^2}{L'-1} + \left(1 - \frac{1}{N}\right) S^2_{r,m}} ,$$

где среди результатов нет отброшенных; L' - число неотброшенных результатов; X'_m- среднее арифметическое неотброшенных результатов.

Показатель внутрилабораторной прецизионности в виде СКО $\sigma_{Rл,m}$ для содержаний, соответствующих содержанию компонента в m-м образце, устанавливали, принимая равным СКО средних арифметических по серии $X_{m,l}$ неисключенных результатов анализа $S_{Rл,m}$ ($\sigma_{Rл,m} \approx S_{Rл,m}$).

4. Оценка показателя точности методики анализа

Показатель точности методики анализа (для содержания, соответствующего содержанию определяемого компонента в m-м образце) при получении экспериментальных данных в условиях внутрилабораторной прецизионности для принятой вероятности Р=0,95 рассчитывали по формуле:

$$\Delta_{л,m} = 1{,}96 \cdot \sqrt{(\sigma_{Rл,m})^2 + (\sigma_{с,m})^2}$$

Если на каком-либо концентрационном уровне значение систематической погрешности было значимым то, показатель точности методики рассчитывали по формуле:

$$\Delta_{л,m} = \Theta + 1{,}96 \cdot \sqrt{(\sigma_{Rл,m})^2 + (\sigma_{с,m})^2}$$

Для оценки правильности и повторяемости разработанной вольтамперометрической методики проводили анализ 15 серий стандартных фармакопейных растворов гепарина, содержащих гепарин на 3 уровнях концентрации: 1, 11,5, 23 мг/дм^3. Анализ выполняли в одной лаборатории, на одном оборудовании, одним аналитиком, в течение одного дня. Количественное содержание гепарина в образцах определяли по градуировочному графику (метод «введено-найдено»). Для оценки внутрилабораторной прецизионности проводили анализ аналогичных образцов в другой день, на другом оборудовании.

Приложение 2

Расчет показателей качества вольтамперометрической методики количественного определения гепарина в лекарственных препаратах с использованием красителя ТС

Для оценки правильности и повторяемости разработанной вольтамперометрической методики проводили анализ 15 серий стандартных фармакопейных растворов гепарина, содержащих гепарин на 3 уровнях концентрации: 1, 11,5, 23 мг/дм^3. Анализ выполняли в одной лаборатории, на одном оборудовании, одним аналитиком, в течение одного дня. Количественное содержание гепарина в образцах определяли по методу «введено-найдено». Для оценки внутрилабораторной прецизионности проводили анализ аналогичных образцов в другой день, на другом оборудовании.

2.1 Содержание гепарина 1 мг/дм^3

Результаты анализа фармакопейного стандартного раствора гепарина с концентрацией 1 мг/дм^3 для определения правильности и повторяемости методики приведены в таблице 1, для определения внутрилабораторной прецизионности и ее расчеты – в таблице 3, результаты расчета повторяемости приведены в таблице 2, правильности – в таблице 4.

Таблица 1 – Результаты анализа стандартного раствора гепарина с концентрацией 1 мг/дм^3

Истинное значение концентрации гепарина в стандартном фармакопейном растворе, мг/дм^3	Погрешность истинного раствора Δm, мг/дм^3	№ серии, L=15	Результаты параллельных измерений, мг/дм^3		Среднее значение результатов измерений, мг/дм^3
			1	2	
1	0,0086	1	1,1	1,25	1,175
		2	0,95	1,02	0,985
		3	0,9	1,1	1,0
		4	0,93	1,05	0,99

Окончание таблицы 1

		5	1,05	0,95	1
		6	1,15	0,98	1,065
		7	0,9	1,15	1,025
		8	1,15	1,05	1,1
		9	1,25	1,05	1,15
		10	1,05	1,2	1,125
		11	0,98	1,1	1,04
		12	1,02	0,95	0,985
		13	1,1	1	1,05
		14	0,96	1,12	1,04
		15	1,1	1,15	1,125

Таблица 2 – Результаты расчета повторяемости для стандартного раствора гепарина с концентрацией 1 мг/дм^3

Выборочная дисперсия результатов параллельных измерений, $S_{m,l}^2$	S_{max}^2	$\sum S_{m,l}^2$	$G_{расч}$	$G_{табл.}$	СКО повторяемости, $\sigma_r = S_r$
0,01125	0,03	0,16	0,2	0,47	0,1
0,00245					
0,005					
0,01125					
0,01125					
0,005					
0,02					
0,005					
0,0032					
0,005					
0,00045					
0,00125					
0,0002					
0,00045					

Таблица 3 – Результаты анализа стандартного раствора гепарина с концентрацией 1 мг/дм^3 в условиях внутрилабораторной прецизионности

Истинное значение концентрации гепарина в стандартном фармакопейном растворе, мг/дм^3	Результаты измерений в условиях внутрилабораторной прецизионности, мг/дм^3		Среднее значение результатов измерений по 15 сериям, мг/дм^3	$GR_{расч,max}$	$GR_{расч,min}$	$GR_{табл.}$	СКО в условиях внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{Rл}=S_{Rл}$
	1	2					
1	1,05	1,1	1,04	1,95	2,14	2,41	0,1
	0,95	0,98					
	1,2	1,05					
	0,95	1,1					
	1,12	1,04					
	1,05	1,05					
	0,98	1,1					
	1,02	1,1					
	0,98	1,02					
	1,05	1,04					
	1,05	1,1					
	0,9	1,02					
	1,1	1,03					
	0,96	1,05					
	1,1	1,05					

Таблица 4 – Результаты расчета правильности для стандартного раствора гепарина с концентрацией 1 мг/дм^3

Θ	$t_{расч}$	$t_{табл.}$	$\pm\Delta_c$, мг/дм^3	$\pm\Delta$	
				мг/дм^3	%
0,057	2,05	2,15	0,05	0,3	27,0

В таблице 5 представлены обобщенные результаты анализа, полученные в лаборатории для стандартного раствора гепарина с концентрацией 1 мг/дм^3 по 30 результатам анализа.

Таблица 5 – Результаты расчета метрологических характеристик для стандартного раствора гепарина с концентрацией 1 мг/дм^3

Уровень концентрации гепарина в растворе, мг/дм^3	Показатель повторяемости, σ_r		Показатель внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{Rл}$		Показатель правильности, $\pm \Delta c$		Показатель точности, $\pm \Delta$	
	мг/дм^3	%	мг/дм^3	%	мг/дм^3	%	мг/дм^3	%
1,00	0,1	9,7	0,1	10,3	0,05	5,4	0,3	27

2.2 Содержание гепарина 11,5 мг/дм^3

Результаты анализа фармакопейного стандартного раствора гепарина с концентрацией 11,5 мг/дм^3 для определения правильности и повторяемости методики приведены в таблице 6 для определения внутрилабораторной прецизионности и ее расчеты – в таблице 8, результаты расчета повторяемости приведены в таблице 7, правильности – в таблице 9.

Таблица 6 – Результаты анализа стандартного раствора гепарина с концентрацией 11,5 мг/дм^3

Истинное значение концентрации гепарина в стандартном фармакопейном растворе, мг/дм^3	Погрешность истинного раствора Δm, мг/дм3	№ серии, L=15	Результаты параллельных измерений, мг/дм^3		Среднее значение результатов измерений, мг/дм^3
			1	2	
11,5	0,12	1	11,05	11,95	11,5
		2	11,25	12,4	11,825
		3	11,05	12,15	11,6
		4	11,95	10,7	11,325
		5	11,75	10,9	11,325
		6	11,36	12,24	11,8
		7	11,94	11	11,47
		8	12,26	10,94	11,6
		9	10,9	11,74	11,32
		10	10,95	11,9	11,425
		11	11,72	11,05	11,385
		12	11,15	12,2	11,675
		13	12,25	10,75	11,5
		14	11,2	12,14	11,67
		15	12,2	11,15	11,675

Таблица 8 – Результаты расчета повторяемости для стандартного раствора гепарина с концентрацией 11,5 мг/дм^3

Выборочная дисперсия результатов параллельных измерений, $S^2_{m,l}$	S^2_{max}	$\sum S^2_{m,l}$	$G_{расч}$	$G_{табл.}$	СКО повторяемости, $\sigma_r = S_r$
0,06	1,125	8,21	0,14	0,47	0,74
0,15					
0,14					
0,17					
0,17					
0,39					
0,13					
0,19					
0,31					
0,04					
0,15					
0,19					
1,07					
0,18					

Таблица 9 – Результаты анализа стандартного раствора гепарина с концентрацией 11,5 мг/дм^3 в условиях внутрилабораторной прецизионности

Истинное значение концентрации гепарина в стандартном фармакопейном растворе, мг/дм^3	Результаты измерений в условиях внутрилабораторной прецизионности, мг/дм^3		Среднее значение результатов измерений по 15 сериям, мг/дм^3	$GR_{расч,max}$	$GR_{расч,min}$	$GR_{табл.}$	СКО в условиях внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{Rл}=S_{Rл}$
	1	2					
11,5	11,2	10,8	11,48	2,39	2,39	2,41	0,81
	11,1	11,96					
	11,6	12,35					
	10,9	11,72					
	11,5	11,5					
	11,36	12,2					
	11,5	10,87					
	11,5	11,6					
	10,95	11,43					
	11,43	12,28					
	11,17	11,96					
	11,2	10,7					
	12,25	11,75					
	10,9	11,7					
	11,96	11					

Таблица 10 – Результаты расчета правильности для стандартного раствора гепарина с концентрацией 11,5 мг/дм^3

θ	$t_{расч}$	$t_{табл.}$	$\pm\Delta_c$, мг/дм^3	$\pm\Delta$	
				мг/дм^3	%
0,04	0,19	2,093	0,41	1, 6	17,2

В таблице 11 представлены обобщенные результаты анализа, полученные в лаборатории для стандартного раствора гепарина с концентрацией 11,5 мг/дм^3 по 30 результатам анализа.

Таблица 11 – Результаты расчета метрологических характеристик для стандартного раствора гепарина с концентрацией 11,5 мг/дм^3

Уровень концентрации гепарина в растворе, мг/дм^3	Показатель повторяемости, σ_r		Показатель внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{Rл}$		Показатель правильности, $\pm\Delta c$		Показатель точности, $\pm\Delta$	
	мг/дм^3	%	мг/дм^3	%	мг/дм^3	%	мг/дм^3	%
11,50	0,7	6,4	0,8	7,1	0,4	3,6	1,6	17,2

2.3 Содержание гепарина 23 мг/дм^3

Результаты анализа фармакопейного стандартного раствора гепарина с концентрацией 23 мг/дм^3 для определения правильности и повторяемости методики приведены в таблице 12, для определения внутрилабораторной прецизионности и ее расчеты – в таблице 14, результаты расчета повторяемости приведены в таблице 13, правильности – в таблице 15.

Таблица 12 – Результаты анализа стандартного раствора гепарина с концентрацией 23 мг/дм^3

Истинное значение концентрации гепарина в стандартном фармакопейном растворе, мг/дм^3	Погрешность истинного раствора Δm, мг/дм^3	№ серии, L=15	Результаты параллельных измерений, мг/дм^3		Среднее значение результатов измерений, мг/дм^3
			1	2	
23	1,44	1	22,67	22,62	22,645

Окончание таблицы 12

		2	23,2	24,6	23,9
		3	21,8	22,05	21,925
		4	24,1	22,66	23,38
		5	24,2	23,34	23,77
		6	23,85	23,5	23,675
		7	22,43	23,56	22,995
		8	23,14	23,96	23,55
		9	23,87	22,65	23,26
		10	21,96	22,84	22,4
		11	23,18	22,82	23
		12	22,52	22,95	22,735
		13	24,6	22,9	23,75
		14	22,3	23,5	22,9
		15	24,05	23,2	23,625

Таблица 13 – Результаты расчета повторяемости для стандартного раствора гепарина с концентрацией 23 мг/дм^3

Выборочная дисперсия результатов параллельных измерений, $S^2_{m,l}$	S^2_{max}	$\sum S^2_{m,l}$	$G_{расч}$	$G_{табл.}$	СКО повторяемости, $\sigma_r = S_r$
0,00125	1,445	7,27	0,2	0,471	0,7
0,0072					
0,03125					
0,13005					
0,1058					
0,06125					
0,02645					
0,02205					
0,001058					
0,06125					
0,0648					
0,09245					
0,2178					
0,0578					

Таблица 14 – Результаты анализа стандартного раствора гепарина с концентрацией 23 мг/дм^3 в условиях внутрилабораторной прецизионности

Истинное значение концентрации гепарина в стандартном фармакопейном растворе, мг/дм^3	Результаты измерений в условиях внутрилабораторной прецизионности, мг/дм^3		Среднее значение результатов измерений по 15 сериям, мг/дм^3	$GR_{расч,max}$	$GR_{расч,min}$	$GR_{табл.}$	СКО в условиях внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{Rл}=S_{Rл}$
	1	2					
23	23,05	22,95	23,02	1,85	2,1	2,41	1,24
	23,2	23					
	21,7	22,85					
	22,15	22,74					
	24,2	23,2					
	22,9	23,15					
	22,43	23,6					
	23,14	22,63					
	23,2	23,77					
	23,1	22,43					
	23,18	22,95					
	22,9	23					
	23,67	22,96					
	21,94	22,85					
	24,9	23					

Таблица 15 – Результаты расчета правильности для стандартного раствора гепарина с концентрацией 23 мг/дм^3

Θ	$t_{расч}$	$t_{табл.}$	$\pm\Delta_c$, мг/дм^3	$\pm\Delta$	
				мг/дм^3	%
0,17	0,2	2,093	1,67	2,2	9,51

В таблице 16 представлены обобщенные результаты анализа, полученные в лаборатории для стандартного раствора гепарина с концентрацией 23 мг/дм^3 по 30 результатам анализа.

Таблица 16 – Результаты расчета метрологических характеристик для стандартного раствора гепарина с концентрацией 23 мг/дм^3

Уровень концентрации гепарина в растворе, мг/дм^3	Показатель повторяемости, σ_r		Показатель внутрилабораторной прецизионности, $\sigma_{R\text{л}}$		Показатель правильности, $\pm \Delta c$		Показатель точности, $\pm \Delta$	
	мг/дм^3	%	мг/дм^3	%	мг/дм^3	%	мг/дм^3	%
23,00	0,7	3,6	1,2	5,4	1,7	7,3	2,2	9,5

Приложение 3

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ПОЛИТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ «СИБТЕСТ»
Испытательный центр «Сибирь-тест»
№ RA.RU.21AB16 от 16.03.2015 г.
634004, г. Томск, пр. Ленина, 43а
Тел, факс (3822) 553-855

АКТ

Внедрения в работу испытательного центра «Сибирь-тест» (ООО «Сибтест») результатов диссертационного исследования Вишенковой Д. А. на тему: «Вольтамперометрическое определение гепарина в лекарственных препаратах с использованием ряда синтетических катионных красителей», выполненной в Национальном исследовательском Томском политехническом университете.

Настоящий акт подтверждает, что с 2018 г в испытательном центре «Сибирь-тест» (ООО «Сибтест») внедрена и используется для контроля качества гепаринсодержащих инъекционных лекарственных препаратов разработанная в Томском политехническом университете методика вольтамперометрического определения гепарина с использованием толуиленового синего. Методика полностью удовлетворяет требованиям аналитического контроля, соответствует приведенным метрологическим характеристикам, отличается экспрессностью, хорошей воспроизводимостью результатов анализа и простотой выполнения.

Директор ООО «Сибтест», к.х.н. ____________ Мордвинова Н.М.

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ «Сибтест» ОГРН 1097017020374 ИНН 7017251020 ТОМСК

Приложение 4

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Вишенковой Дарьи Александровны «Вольтамперометрическое определение гепарина в лекарственных препаратах с использованием ряда синтетических катионных красителей», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия

Настоящим актом подтверждается внедрение и возможность использования результатов диссертационного исследования Вишенковой Дарьи Александровны «Вольтамперометрическое определение гепарина в лекарственных препаратах с использованием ряда синтетических катионных красителей» в работе Испытательного центра ФБУ «Алтайский ЦСМ» для анализа лекарственных препаратов в форме инъекций, содержащих гепарин в качестве основного действующего вещества. В результате проведенных испытаний предложенной вольтамперометрической методики определения гепарина с использованием толуиленового синего установлено, что:

- процесс измерения аналитического сигнала не вызывает затруднений;
- при выполнении анализа используются недорогие и безопасные реактивы;
- показатели качества результатов анализа являются установленными характеристиками погрешности для совокупности результатов анализа, полученных при соблюдении требований методики.

Начальник Испытательного центра

ФБУ «Алтайский ЦСМ» Д.С. Стукалов

ФБУ "Алтайский ЦСМ"