

На правах рукописи



Андрюхина Елена Юрьевна

**ПРОТОЧНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПУРИНА**

Специальность 02.00.02 – аналитическая химия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении науки
Институте общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН

Научный руководитель: **Шпигун Лилия Константиновна,**
доктор химических наук, профессор, заведующая
лабораторией Федерального государственного
учреждения науки Института общей и
неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН

Официальные оппоненты: **Моросанова Елена Игоревна,**
доктор химических наук, профессор кафедры
аналитической химии химического факультета
Федерального государственного бюджетного
образовательного учреждения высшего образова-
ния Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова;
Кузнецов Владимир Витальевич,
доктор химических наук, профессор, заведующий
кафедрой аналитической химии Федерального госу-
дарственного бюджетного образовательного учреж-
дения высшего образования Российский химико-
технологический университет им. Д.И. Менделеева

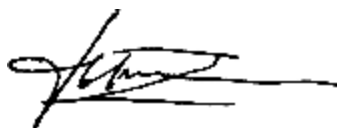
Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Ордена Ленина и Ордена
Октябрьской Революции Институт геохимии и
аналитической химии им. В.И. Вернадского
Российской академии наук (ГЕОХИ РАН)

Защита диссертации состоится «21» декабря в 11 час. 00 мин.
на заседании диссертационного совета Д 002.021.01 при ФГБУН Институте
общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН по адресу: 119991,
ГСП-1, Москва, Ленинский проспект, 31.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке
ИОНХ РАН по адресу: 119991, Москва, Ленинский проспект, 31, а также на
сайте [http:// www.igic.ras.ru](http://www.igic.ras.ru).

Автореферат разослан «16» ноября 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат химических наук



А.Ю. Быков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Соединения пуринового ряда составляют важнейший класс азотсодержащих гетероциклических соединений, играющих ключевую роль в процессах жизнедеятельности и обладающих широким спектром фармакологического действия. Среди них огромный интерес представляют 7Н-пурины – пуриновые алкалоиды (кофеин и другие) и 9Н-пурины – пуриновые основания (аденин и гуанин), являющиеся структурными фрагментами нуклеиновых кислот, а также их синтетические аналоги, входящие в состав противоопухолевых и противовирусных, в том числе анти-ВИЧ, препаратов. Применение биологически активных пуринов для решения различных биомедицинских проблем и в качестве лекарственных субстанций стимулирует стремительное развитие аналитических методов их определения в широком диапазоне концентраций. Наличие на российском фармацевтическом рынке дженериков и фальсифицированных лекарственных форм диктует необходимость разработки экспресс-методов оценки их фармацевтической эквивалентности оригинальным препаратам. Наибольший интерес представляет создание проточных методов, которые наилучшим образом удовлетворяют современным требованиям лабораторного анализа (экспрессность, автоматизация, миниатюризация). Актуальной тенденцией в этом направлении является использование автоматизированных аналитических систем на основе методологии проточно-инжекционного анализа (ПИА) и его разновидностей, в частности последовательно-инжекционного анализа (ПослИА). По сравнению с традиционным подходом, такие системы позволяют существенно повысить производительность и улучшить воспроизводимость результатов определений, обеспечить экономичность и экологическую безопасность выполнения всех основных этапов химического анализа. К настоящему времени количество статей в мировых изданиях, посвященных определению производных пурина на основе принципов ПИА и его разновидностей, ограничено. Из них всего несколько публикаций относятся к описанию систем со спектрофотометрическим детектированием, причем измерения проводятся по собственному светопоглощению определяемого вещества в ультрафиолетовой области спектра, что негативно сказывается на селективности и чувствительности анализа. Электрохимическому детектированию пуринов препятствует замедленная скорость процессов их электроокисления на твердых электродах и трудности применения химически модифицированных электродов для регистрации сигнала в непрерывном гидродинамическом режиме. Поэтому фундаментальный и практический интерес представляет развитие исследований в области ПИА, направленных на поиск и реализацию подходов к спектрофотометрическому детектированию производных пурина на основе цветных реакций, а также к их электрохимическому детектированию с использованием электродов, обладающих способностью ускорять перенос электрона в реакциях их анодного окисления и стабильностью отклика в проточных системах.

Цель и задачи диссертационной работы. Цель работы заключалась в исследовании окислительной способности биологически активных 7Н- и 9Н-пуринов и разработке на этой основе подходов к их количественному определению с использованием методологии проточно-инжекционного и последовательно-инжекционного анализа.

Для достижения поставленной цели предстояло решить следующие задачи:

◆ детально изучить теоретические и практические аспекты процессов гомогенного и гетерогенного окисления биологически активных 7Н- и 9Н-пуринов с точки зрения возможности их количественного определения в гидродинамическом режиме;

◆ исследовать механизм и оптимизировать условия анодного окисления пуринов на основе рассмотрения известных литературных сведений и собственных экспериментальных данных по электрохимическому поведению этих веществ на активированном углеситалловом электроде (АУСЭ);

◆ разработать проточные методы анализа с использованием рациональных схем ПИА и ПослИА с электрохимическим и спектрофотометрическим детектированием изученных пуринов на основе их окислительной способности в химических реакциях в растворах и на АУСЭ;

◆ провести экспериментальные исследования модельных водных растворов, содержащих изученные 7Н- и 9Н-пурины, с целью метрологической аттестации аналитических характеристик разработанных методов;

◆ апробировать разработанные методы ПИА и ПослИА на реальных медико-биологических объектах и фармацевтических препаратах.

Научная новизна работы. В ходе исследования электрохимических свойств биологически активных 7Н- и 9Н-пуринов обнаружена способность активированного углеситаллового электрода ускорять процессы их необратимого окисления по смешанному адсорбционно-диффузионному механизму, сходному с установленным ранее для других углеродных электродов. Установлены количественные характеристики электроокисления исследованных пуринов на АУСЭ в зависимости от рН и природы фонового электролита, а также от скорости развертки потенциала поляризации электрода. Накопленный экспериментальный материал позволил выявить эмпирическую закономерность, характеризующую действие функциональных заместителей в молекуле пуринов на их электрохимическую активность. Установлено, что наиболее благоприятное влияние на окислительную способность пуринов оказывает присутствие кислородсодержащих (ОН-групп) в положении С2, С6 и С8 в молекулах этих гетероциклов. Получены кинетические данные и обсужден механизм реакции окислительного азосочетания пуриновых алкалоидов с 3-метил-2-бензотиазолинон гидразоном (МБТГ) под действием периодат-ионов, протекающей с образованием сильноокрашенного продукта. Предложены рациональные схемы ПИА и ПослИА с амперометрическим и адсорбционным инверсионно-вольтамперометрическим детектированием пуриновых оснований и синтетических структурных аналогов дезоксигуанозина в широком диапазоне

определяемых концентраций. Разработаны высокопроизводительные методы ПИА и ПослИА со спектрофотометрическим детектированием пуриновых алкалоидов в видимой области спектра.

Практическая значимость работы. Показана целесообразность применения разработанных методов ПИА и ПослИА для автоматизированного определения ряда важнейших производных пурина в различных лекарственных формах и биологических жидкостях. Разработаны автоматизированные системы ПИА для лабораторного анализа депурированной ДНК и экспериментальной оценки фармацевтической эквивалентности твердых лекарственных форм (тест «Растворение»), перспективные для использования в приборной медицинской диагностике и в практике аптечного анализа.

Методология и методы исследований. Для достижения поставленных задач в данной работе использовали методологию ПИА и ПослИА, а также методы циклической вольтамперометрии, гидродинамической вольтамперометрии, адсорбционной инверсионной вольтамперометрии и спектрофотометрии. На всех этапах исследований были использованы возможности электронно-вычислительной техники.

Положения, выносимые на защиту.

◆ Результаты сравнительного изучения, возможный механизм и характеристика процессов электрохимического окисления производных пурина на АУСЭ в растворах различной кислотности.

◆ Методы ПИА с амперометрическим детектированием и ПослИА с адсорбционным инверсионно-вольтамперометрическим детектированием пуринов на АУСЭ.

◆ Методы ПИА и ПослИА со спектрофотометрическим детектированием пуриновых алкалоидов на основе хромогенной реакции их совместного окисления с МБТГ под действием периодат-ионов.

◆ Результаты разработки автоматизированной ПИ-системы для экспериментальной оценки фармацевтической эквивалентности твердых лекарственных форм (тест «Растворение»).

◆ Результаты лабораторных испытаний разработанных проточных методов на модельных и реальных образцах (фармацевтических препаратах, биологических жидкостях).

Личный вклад соискателя. Вклад соискателя в настоящую работу заключался в систематизации литературных данных и выполнении практически всех экспериментальных исследований по теме диссертации; в активном участии при постановке задач и планировании эксперимента, в проведении совместно с руководителем обработки экспериментальных данных, анализа и интерпретации полученных результатов.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были доложены на IV-ой конференции молодых ученых по общей и неорганической химии

(ИОНХ РАН, Москва, 2014); Всероссийском семинаре «Проточный анализ», проходящем в рамках 12-ой Международной выставки лабораторных технологий, химического анализа, биотехнологии и диагностики (Москва, 2014); I-ой Всероссийской конференции с международным участием «Химический анализ и медицина» (Москва, 2015); XX-ом Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Екатеринбург, 2016).

Публикации. По материалам диссертационной работы опубликовано 9 работ: 5 статей в отечественных журналах, аккредитованных ВАК, 1 статья в международном рецензируемом журнале и 3 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава 1) и экспериментальной части (главы 2 – 6), выводов и списка цитируемой литературы (240 наименований). Работа изложена на 154 страницах, содержит 78 рисунков и 48 таблиц.

Диссертационная работа выполнена в период 2013 – 2016 гг. в соответствии с научным направлением ИОНХ РАН «Фундаментальные основы химии: новые методы физико-химических исследований и анализа веществ и материалов» и в рамках программы № 10 Президиума РАН.

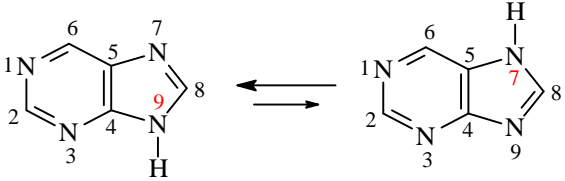
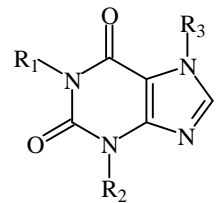
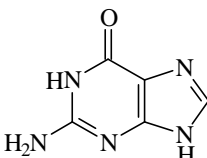
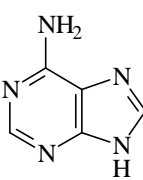
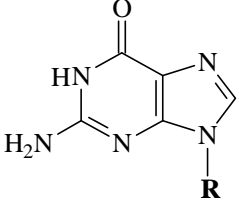
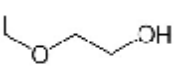
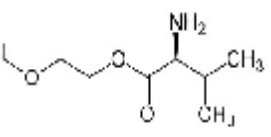
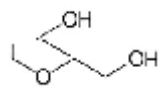
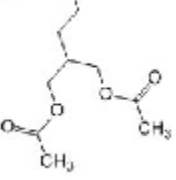
ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая глава диссертационной работы содержит обзор литературы, посвященной рассмотрению биологически активных производных пурина как аналитических объектов и обсуждению современного состояния химико-аналитических исследований в этой области. Обобщены и систематизированы имеющиеся в литературе сведения о современных подходах к определению 7Н- и 9Н-пуринов в различных объектах, главным образом с использованием методологии ПИА и его разновидностей.

Во второй главе диссертационной работы описаны используемые в работе реагенты, оборудование и техника экспериментальных исследований. В качестве объектов исследований выбраны важнейшие производные пурина (7Н- и 9Н-пурины), указанные в табл.1.

Для реализации экспериментальных работ использованы установки FIAstar-5010 Analyzer (Tecator, Швеция) со спектрофотометрическим детектором 5023 и проточной кюветой ($V = 18$ мкл, $l = 10$ мм) и FIALab-3500 (FIALab Instruments Inc., США) в комплекте с оптоволоконным детектором USB-2000 (Ocean Optics Inc., США) и проточной кюветой SMA-Z-10 ($V = 26$ мкл, $l = 10$ мм); вольт-амперометрический анализатор ЭКОТЭСТ-ВА (ООО «Эконикс-Эксперт», Россия) с трехэлектродной электрохимической ячейкой (ЭХЯ) проточного или стационарного типа.

Таблица 1 – Исследуемые в работе 7Н- и 9Н-пурины

Структурная формула				Систематическое название	Аббревиатура
				Имидазо[4,5-d]пиримидин	Пурин
	R ₁	R ₂	R ₃	3,7-дигидропурин-2,6-дион	Ксантин (Xan)
	H	H	H		
	CH ₃	CH ₃	H	1,3-диметил-3,7-дигидро-1Н-пурин-2,6-дион	Теofilлин (Tph)
	CH ₃	CH ₃	CH ₃	1,3,7-триметил-1Н-пурин-2,6(3Н,7Н)-дион	Кофеин (Caf)
	H	CH ₃	CH ₃	3,7-диметил-2,3,6,7-тетрагидро-1Н-пурин-2,6-дион	Теобромин (Tbr)
				2-амино-1Н-пурин-6(9Н)-он	Гуанин (Gua)
				9Н-пурин-6-амин	Аденин (Ade)
	R=			2-Амино-9-[(2-гидроксиэтокс)-метил]-1Н-пурин-6(9Н)-он	Ацикловир (ACV)
	R=			2-[(2-Амино-6-оксо-6,9-дигидро-3Н-пурин-9-ил)метокси]-этил-2-амино-3-метил-бутаноат	Валацикло-вир (VACV)
	R=			2-Амино-1,9-дигидро-9-[[2-гидрокси-1-(гидроксиметил)-этокс]метил]-6Н-пурин-6-он	Ганцикло-вир (GCV)
	R=			2-[2-(2-Амино-9Н-пурин-9-ил)-этил]-1,3-пропан-диол диацетат(эфир)	Фамцикло-вир (FCV)

В качестве рабочего электрода использован углеситалловый электрод (ООО НТФ «Вольта», Россия), в качестве электрода сравнения – хлоридсеребряный электрод R-173 (Kyoto Electronics, Япония), вспомогательным электродом служил платиновый электрод. С целью расширения аналитических возможностей углеситаллового электрода (УСЭ) проводили трехстадийную процедуру активации его поверхности: сначала воздействием ультразвука, а затем анодизацией при +1.4 В в 0.1 М растворе HClO_4 в течение 60 с и анодно-катодной поляризацией в диапазоне (+1.0 – -0.5 В) со скоростью развертки потенциала $\nu = 0.1$ В/с. Это позволило снизить фоновые токи и увеличить область рабочих потенциалов электрода. Как можно видеть из рис.1, активированная поверхность углеситалла приобретает высокопористую структуру с пустотами различного диаметра. Рассчитанные по уравнению Рэндлса-Шевчика, значения площади активной поверхности до и после ее активации равны 0.094 см^2 (УСЭ) и 0.152 см^2 (АУСЭ).

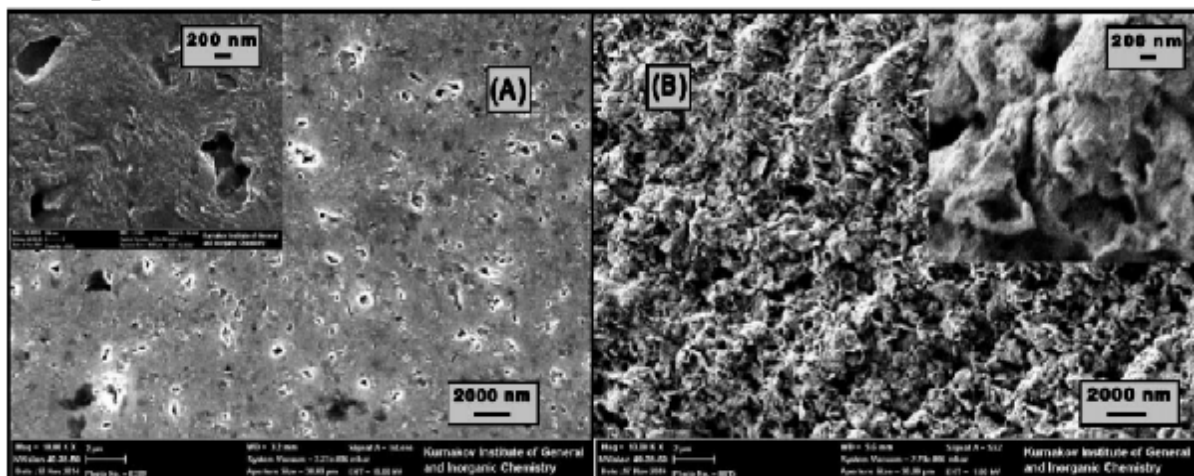


Рисунок 1. Электронные микрофотографии механически обработанной (А) и активированной (В) поверхности УСЭ (получены с.н.с. ИОНХ РАН к.х.н. А.Е. Баранчиковым).

В третьей главе представлены результаты систематического исследования вольтамперометрического поведения 7Н- и 9Н-пуринов на АУСЭ в зависимости от рН среды, скорости развертки потенциала поляризации ν и концентрации депольризатора c . В ходе исследований установлено, что активация УСЭ существенно облегчает процессы окисления пуринов. Методом циклической вольтамперометрии с линейной разверткой потенциала показано, что все изученные гидроксид- и аминопроизводные пурина необратимо окисляются в анодной области потенциалов по механизму, сходному с установленным ранее для других углеродных электродов. При этом четкие и воспроизводимые анодные пики удается регистрировать в широком диапазоне кислотности водной среды (рис.2–3). Максимальный прирост регистрируемого анодного тока наблюдается в кислых или слабокислых средах, где исследуемые вещества находятся преимущественно в протонированной форме. В табл.2 приведены вольтамперные характеристики (α' – кажущийся коэффициент переноса заряда,

n_{app} – число электронов, χ_v – критерий Семерано, k' – условная константа скорости электрохимической реакции), рассчитанные по известным уравнениям для необратимых анодных процессов.

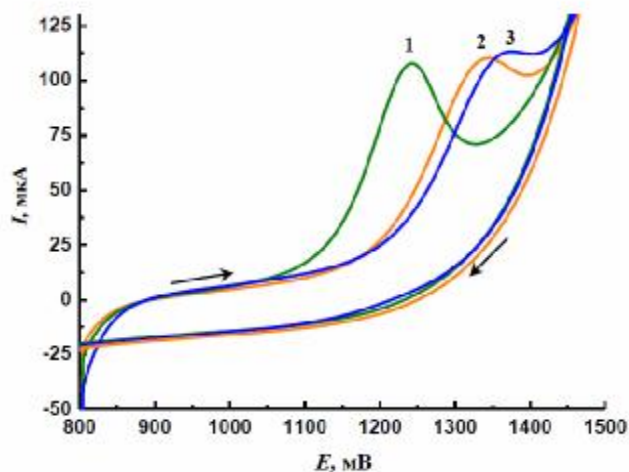


Рисунок 2. Циклические вольт-амперограммы, полученные для пуриновых алкалоидов (1.0 мМ) в 0.25 М H_3PO_4 ($v = 0.025$ В/с) на АУСЭ (1–Tph; 2–Caf; 3–Tbr).

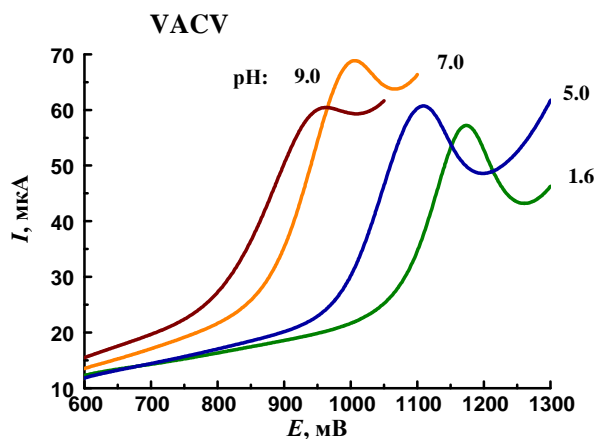
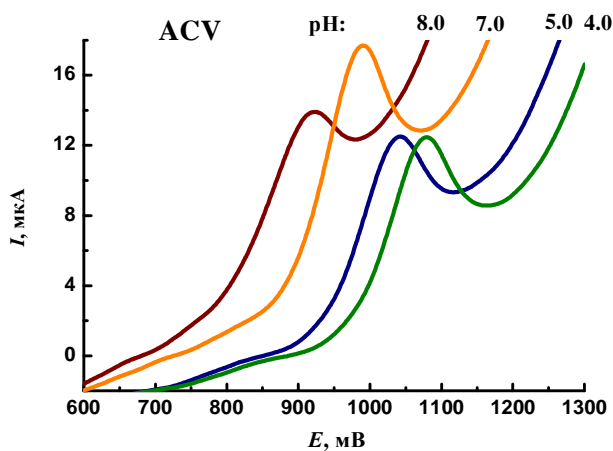
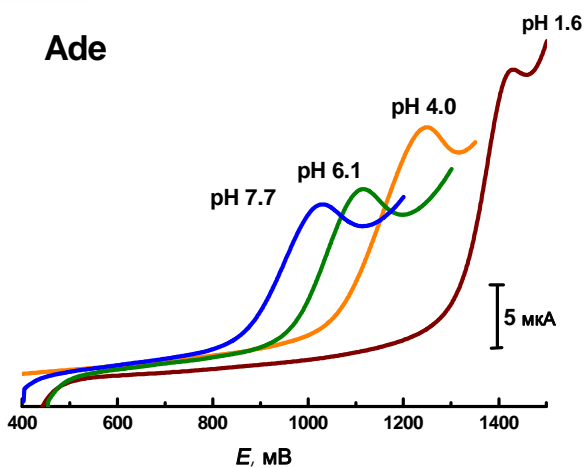
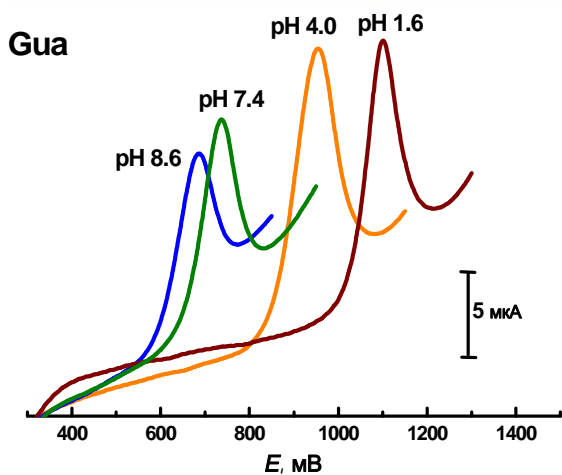


Рисунок 3. Анодные вольтамперные кривые, характеризующие окисление пуринов на АУСЭ при различных значениях pH среды (0.1 М ФБР, $v = 0.1$ В/с).

Таблица 2 – Вольтамперные характеристики анодного окисления изученных производных пурина на АУСЭ (рН = 2 – 6, 25 °С)

Вещество	$\Delta E/\Delta pH$	$(1-\alpha') n_{app}$	χ_v	k', c^{-1}
Tph	0.059	0.60	0.73	0.66 ± 0.04
Caf	0.050	0.57	0.76	0.60 ± 0.03
Tbr	0.050	0.50	0.74	0.58 ± 0.03
Ade	0.063	0.77	0.69	0.56 ± 0.03
Gua	0.060	0.84	0.80	0.93 ± 0.05
ACV	0.050	0.89	0.70	0.80 ± 0.05
VACV	0.047	0.84	0.78	0.74 ± 0.05
GCV	0.048	0.62	0.64	0.57 ± 0.04
FCV	0.056	0.55	0.54	0.45 ± 0.06

Найденные характеристики изученных электродных реакций позволяют сделать вывод о том, что электроокисление пуринов на АУСЭ имеет смешанную адсорбционно-диффузионную природу. Очевидно, что во всех случаях окислительный процесс протекает с участием эквивалентного количества протонов и электронов и сопровождается разрушением сопряженной системы π -связей. С большой долей вероятности можно полагать, что вначале происходит разрыв двойной связи имидазольного кольца, а затем разрыв двойной связи $-C_4=C_5-$. На потенциал пика окисления существенное влияние оказывает природа ациклических заместителей в положении N7 или N9 имидазольного кольца, а также присутствие функциональных групп в пиримидиновом кольце молекулы гетероцикла. При этом электрохимической активности пуринов особенно благоприятствует наличие кислородсодержащих групп в положении C2 и C6. Наилучшей окислительной способностью обладает мочева кислота (UA), содержащая, кроме того, гидроксильную группу в положении C8. Напротив, введение пространственных заместителей в положение N9 оказывает негативное влияние на процесс электрохимического окисления пуринов. Так, при прочих равных условиях (рН 2-3), способность к электроокислению уменьшается в ряду: UA > Xan > Gua > ACV > VACV > GCV, Tph > Caf, Ade > Tbr, FCV >> пурин.

Глава 4 посвящена разработке метода ПИА для амперометрического определения производных пурина в фармацевтических препаратах с использованием проточно-инжекционной системы (ПИ-системы), схематически изображенной на рис.4.

Операционные параметры системы выбирали экспериментальным путем, варьируя потенциал АУСЭ (E_{opt} , В), объём инжестируемой пробы (V , мкл), рН и скорость прокачивания (v_l , мл/мин) носителя (фонового электролита) через проточную ЭХЯ. Диапазоны варьирования и найденные оптимальные значения параметров указаны в табл.3.

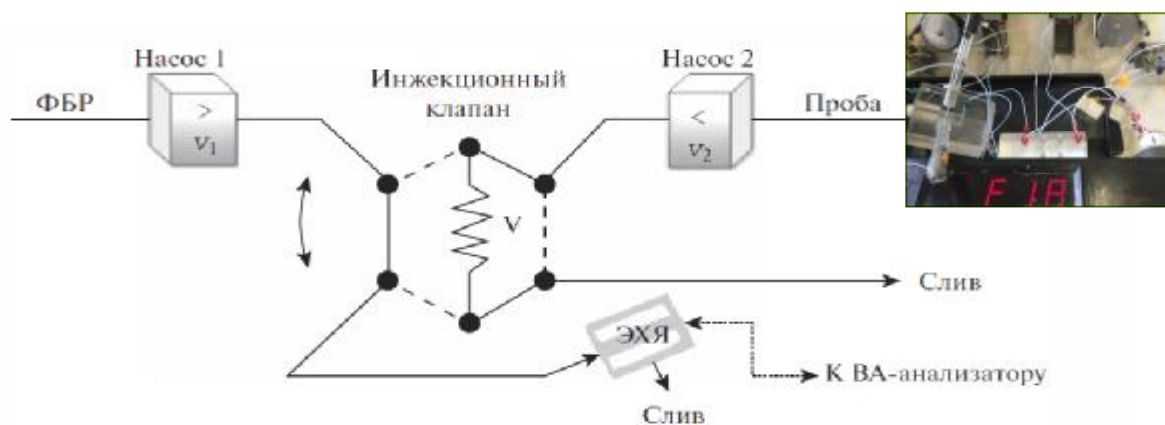


Рисунок 4. Схематическое изображение ПИ-системы с амперометрическим детектированием на АУСЭ (обозначения см. в тексте).

Таблица 3 – Диапазоны варьирования и найденные оптимальные значения операционных параметров разработанной ПИ-системы с амперометрическим детектированием на АУСЭ

Параметр	Диапазон варьирования	Оптимальное значение
Скорость потоков, мл/мин:	0.6 – 3.0	
v_1		2.0
v_2		1.5
Инжектируемый объем пробы V , мкл	0 – 800	500

На рис.5 представлена типичная ПИА-рестрограмма, полученная при поочерёдном введении в поток носителя (0.1 М ФБР, рН 7.0) равных микрообъемов растворов, содержащих разные концентрации АСV.

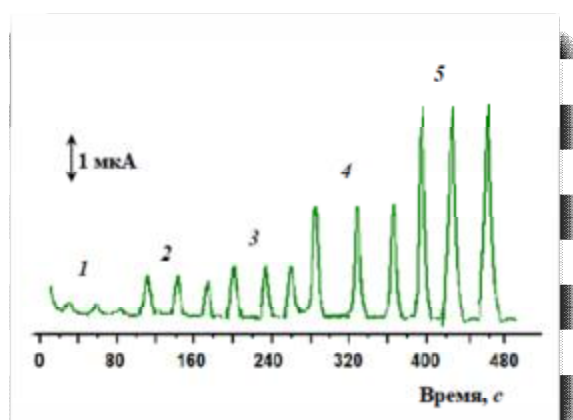


Рисунок 5. Типичная ПИА-рестрограмма, полученная при введении в поток носителя равных микрообъемов растворов с концентрацией Gua, мкг/мл: 2 (1), 7 (2), 10 (3), 25 (4), 50 (5).

В выбранных условиях производительность амперометрической ПИ-системы составляет $75-90 \text{ ч}^{-1}$. При этом время контакта инжектируемого раствора с поверхностью рабочего электрода составляет приблизительно 20 с. Концентрационные зависимости для изученных производных пурина, полученные разработанным методом (ПИА/Амп), приведены в табл.4.

Таблица 4 – Аналитические характеристики определения производных пурина методом ПИА/Амп

Вещество	$E_{\text{опт}}$, В	pH	Уравнение регрессии $H = \Delta I (\text{мкА}) = a c + b$	r	Диапазон линейности, мкг/мл	C_{min} , мкг/мл
Caf	1.41	< 2	$H = 0.119 c + 0.304$	0.9996	2 – 200	0.5
Ade	1.28	4.0	$H = 0.068 c + 0.369$	0.9997	3 – 200	0.9
Gua	0.95		$H = 0.099 c + 0.069$	0.9999	2 – 200	0.4
ACV	0.98	6.5	$H = 0.049 c - 0.057$	0.9995	4 – 200	1.2
VACV	1.00		$H = 0.032 c - 0.042$	0.9997	6 – 200	1.9
GCV	1.05		$H = 0.027 c + 0.079$	0.9996	8 – 250	2.2
FCV	1.16		$H = 0.026 c + 0.053$	0.9999	10 – 250	2.4

В табл.5 – 7 представлены результаты анализов растворов различных лекарственных форм, содержащих исследуемые пурины, выполненных предложенным методом ПИА/Амп. Метрологическая оценка результатов анализа различных препаратов с использованием метода «введено-найдено» показала отсутствие систематической погрешности ($t_{\text{эмп}} < t_{\text{крит}}$), а также высокую воспроизводимость измерений (s_r во всем диапазоне исследуемых концентраций определяемых компонентов варьировалась в пределах 0.008 – 0.05).

Таблица 5 – Метрологическая оценка результатов определения Ade в растворенных лекарственных формах методом ПИА/Амп ($n = 6$, $P = 0.95$)

Препарат	Расчетное содержание Ade в пробе	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	Правильность, %	s_r
Аденин фосфат, таблетки	20 мкг/мл	–	19.7 ± 0.8	98.5	0.04
		10.0	30.2 ± 0.9	101.0	0.03
		20.0	39.8 ± 0.8	99.5	0.02
		40.0	60.5 ± 0.6	100.8	0.01
Фаглюцид [®] раствор	34 мкг/мл	–	33.8 ± 0.9	99.4	0.03
		20.0	54.3 ± 0.6	100.6	0.01
		40.0	75.0 ± 0.8	101.4	0.01

Таблица 6 – Метрологическая оценка результатов определения синтетических структурных аналогов дезоксигуанозина в растворенных лекарственных препаратах методом ПИА/Амп ($n = 5, P = 0.95$)

Препарат	Определяемое вещество	Расчетное содержание, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	Правильность, %	s_r
Ацикловир Сандоз, таблетки	ACV	5.0	5.1 ± 0.3	102.0	0.05
		10.0	9.8 ± 0.3	98.0	0.03
		20.0	20.0 ± 0.2	100.0	0.01
Ацикловир, раствор для инъекций	ACV	50.0	49 ± 2	98.0	0.03
		100.0	102 ± 3	102.0	0.03
Валацикловир, таблетки	VACV	40.0	41 ± 1	102.5	0.02
		100.0	100 ± 1	100.0	0.008
		200.0	201 ± 2	100.5	0.008
Зирган, гель	GCV	10.0	10.0 ± 0.5	100.0	0.04
		50.0	49 ± 2	98.0	0.03
		150.0	152 ± 3	101.3	0.02
Фамцикловир- Тева, таблетки	FCV	50.0	50 ± 2	100.0	0.03
		100.0	101 ± 3	101.0	0.02
		200.0	199 ± 3	99.5	0.01

Таблица 7 – Результаты совместного определения Саf и парацетамола (Рс) в комплексных лекарственных препаратах методом ПИА/Амп ($n = 5, P = 0.95$)

Препарат	Содержание Саf, мг			Содержание Рс, мг		
	Сертифицированное значение в 1 таблетке	Найдено	Правильность, %	Сертифицированное значение в 1 таблетке	Найдено	Правильность, %
Аскофен-П	40	39 ± 2	97.5	200	204 ± 5	102.0
Каффетин	50	51 ± 1	102.0	250	246 ± 7	98.4
Кофицил-Плюс	50	50 ± 2	100.0	100	101 ± 2	101.0
Седалгин Плюс	50	50.2 ± 0.7	100.4	–	–	–

Автоматизированная ПИ-система – тест «Растворение». Одним из важнейших подходов к *in-vitro* экспериментальной оценке фармацевтической эквивалентности твердых лекарственных форм является тест «Растворение». Цель теста – установить скорость и степень высвобождения фармацевтической

субстанции, перешедшей в среду растворения из лекарственного препарата. Чаще всего, при обычном контроле качества, ограничиваются определением по одной временной точке (45 мин.). Однако наибольший интерес представляет определение профиля растворения, особенно при установлении эквивалентности препаратов в случае изменения состава и технологии. На рис.6 дано схематическое изображение разработанной нами ПИ-системы, которая позволяет достаточно достоверно моделировать поведение лекарственных средств в биорелевантных средах, имитирующих состав и свойства физиологических жидкостей желудочно-кишечного тракта (рис.7).

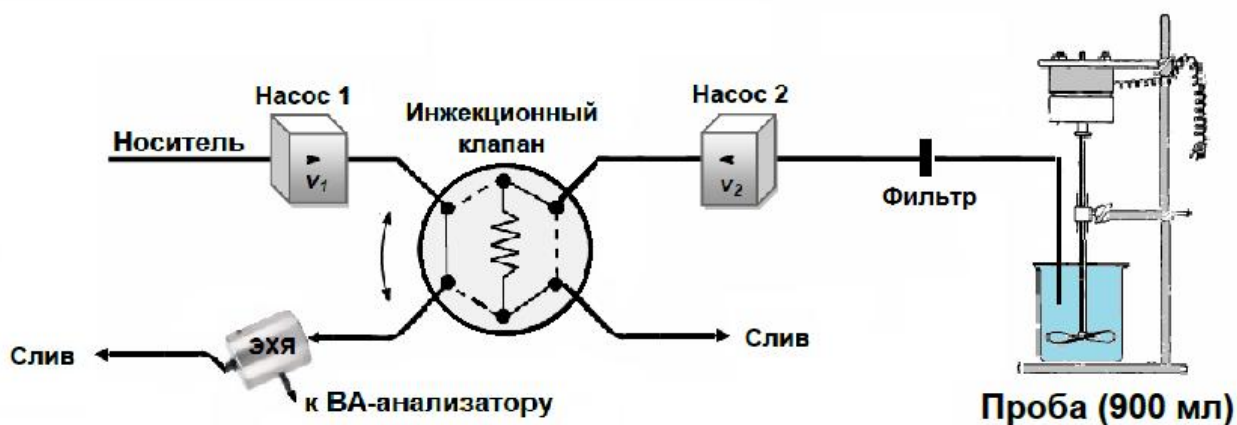


Рисунок 6. Общее схематическое изображение ПИ-системы для реализации теста «Растворение» (скорость вращения мешалки – 50 об/мин; 37.0 ± 0.5 °C).

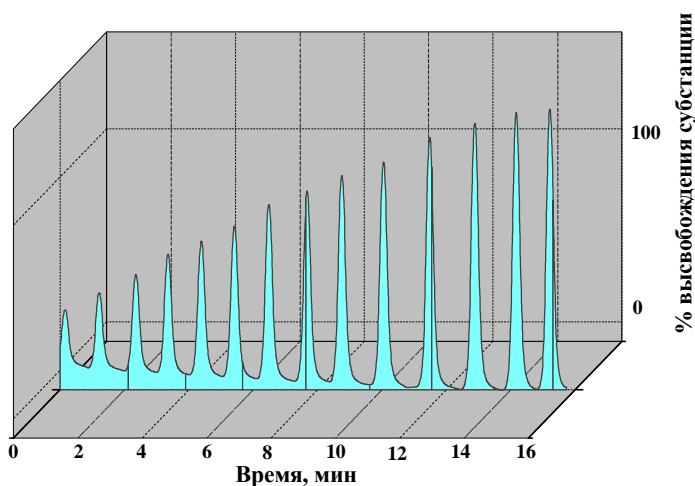


Рисунок 7. Сигналы, полученные в ПИ-системе и характеризующие кинетику высвобождения Caf из препарата «Седальгин Плюс». Среда растворения: 900 мл модельного раствора желудочного сока (0.1 М раствор HCl + 2 г NaCl).

Несомненным преимуществом предложенной системы перед стандартными фармакопейными методиками на основе УФ-спектрофотометрии является возможность увеличить частоту отбора проб, обеспечить более высокую селективность и уменьшить влияние плацебо (< 2 %).

Глава 5 посвящена созданию метода определения следовых количеств производных пурина в биомедицинских объектах на основе сочетания методологических принципов ПослИА и адсорбционной инверсионной вольтамперометрии (АДИВА). Разработанный автоматизированный метод ПослИА/АДИВА обеспечивает *on-line* сорбционное концентрирование следовых количеств пуринов на АУСЭ в контролируемых условиях массопереноса и их последующее инверсионно-вольтамперометрическое детектирование в режиме остановленного потока фонового электролита (рис.8).

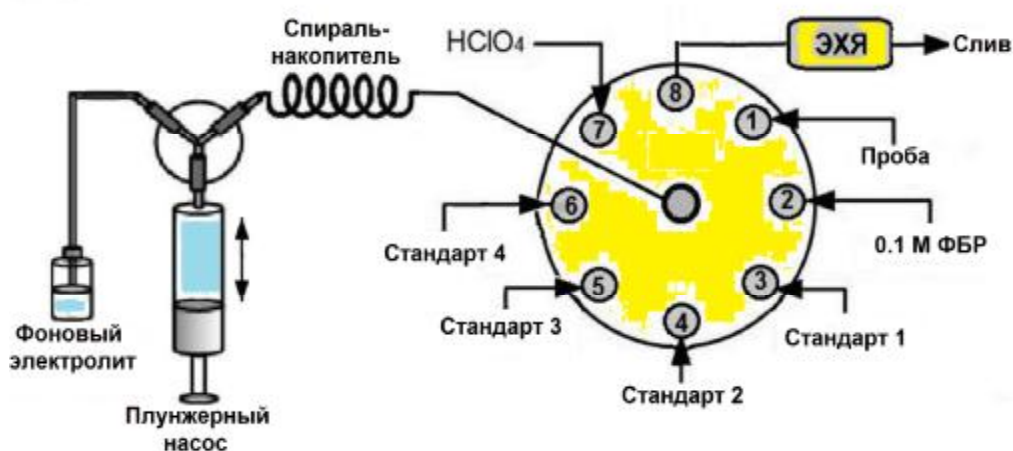


Рисунок 8. Схематическое изображение системы ПослИА/АДИВА.

Программируемый протокол реализации анализа предусматривает выполнение следующих процедур: заполнение системы фоновым электролитом; отбор аликвоты пробы или стандартных растворов 1 – 4 в спираль-накопитель; пропускание пробы (стандартов) через ЭХЯ и накопление аналита на АУСЭ; подачу в ЭХЯ фонового электролита (0.1 М ФБР); регистрацию вольтамперной кривой в остановленном потоке; регенерацию и *on-line* электрохимическую активацию электродной поверхности. При построении градуировочного графика в качестве аналитического параметра используют величину относительной высоты пика $H = \Delta I_{\text{п}}$, представляющую собой разность между током пика $I_{\text{п}}$ и током базовой линии под пиком $I_{\text{фон}}$:

$$H = \Delta I_{\text{п}} = I_{\text{п}} - I_{\text{фон}} = k t_{\text{н}} c, \quad (1)$$

где k – константа, зависящая от геометрии проточной ячейки, дисперсии и др. факторов; c – объемная концентрация вещества.

Электрохимический сигнал в разработанной системе зависит от потенциала $E_{\text{н}}$ и времени $t_{\text{н}}$ накопления, варьируемого изменением объема V и скорости $v_{\text{н}}$

прохождения пробы через ЭХЯ. Как показали результаты опытов, пики окисления для всех изученных веществ незначительно увеличиваются при изменении $E_{\text{н}}$ в пределах 0.0 В до -0.4 В. Однако при накоплении в катодной области потенциалов происходит заметное возрастание фонового тока. Поэтому наилучшие результаты с точки зрения соотношения высоты инверсионного пика к фону достигаются при накоплении аналита на АУСЭ в условиях разомкнутой цепи. Как можно видеть из вольтамперных кривых, изображенных на рис.9, в этом случае H возрастают с увеличением $t_{\text{н}}$ от 10 до 300 с ($V = \text{const} = 600$ мкл).

Аналитические характеристики разработанного метода ПослИА/АДИВА применительно к определению пуринов при $t_{\text{н}} = 120$ с представлены в табл.8.

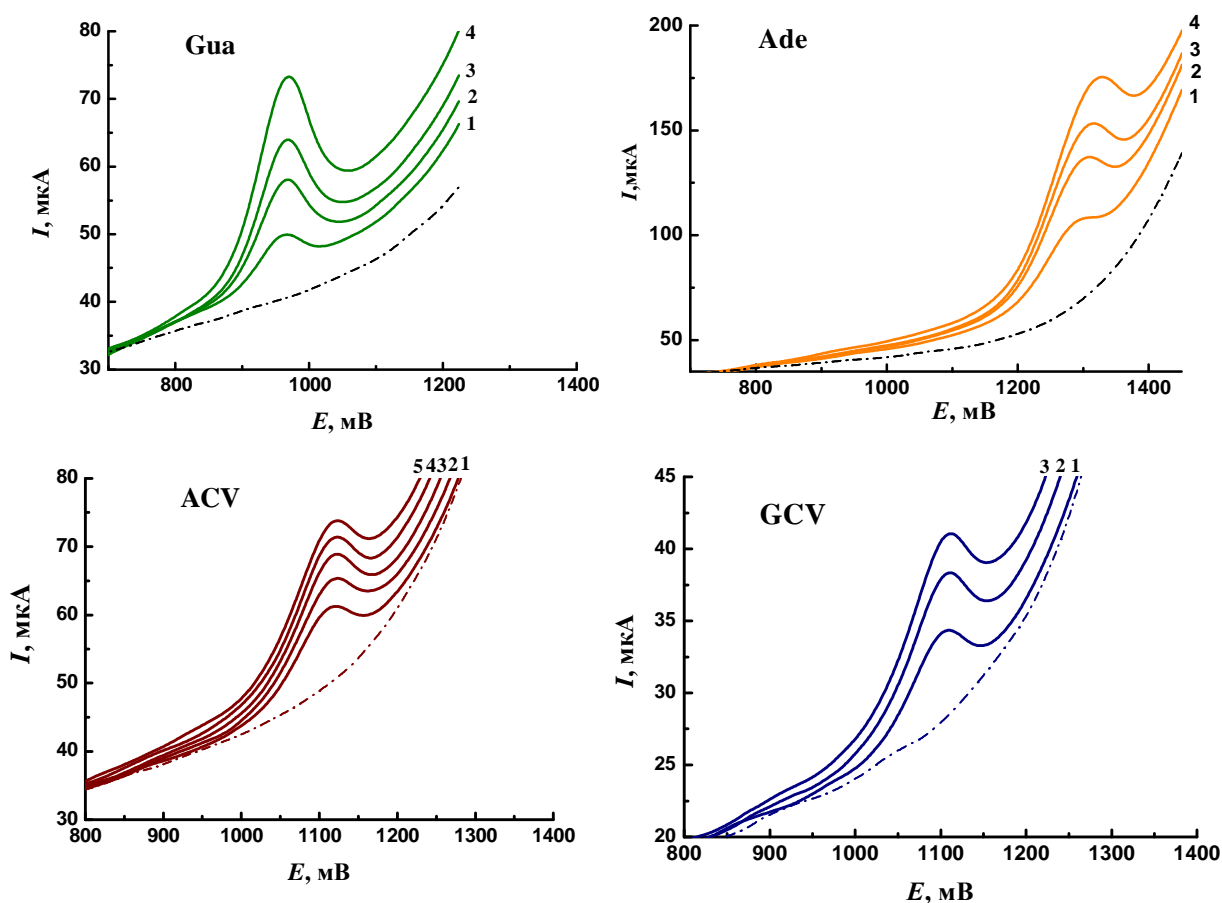


Рисунок 9. Инверсионные вольтамперные кривые, полученные на АУСЭ при анализе растворов 1.0 мкМ Gua (pH 3.9), 5.0 мкМ Ade (pH 3.5), 4.0 мкМ ACV (pH 3.6) и 2.0 мкМ GCV (pH 4.0) в зависимости от $t_{\text{н}}$ при разомкнутой цепи (с): 1 – 60, 2 – 120, 3 – 180, 4 – 240; 5 – 300 (0.1 М ФБР, $v = 0.1$ В/с). Фоновая кривая обозначена пунктирной линией.

Таблица 8 – Аналитические характеристики метода ПослИА/АдИВА при определении производных пурина ($t_n = 120$ с)

Вещество	Диапазон линейности, мкМ	$H = \Delta I_n = a c + b$		c_{\min} , нМ
		Уравнение регрессии	r	
Ade	0.2 – 20	$\Delta I_n = 5.18 c + 0.13$	0.9996	75
Gua	0.1 – 10	$\Delta I_n = 8.16 c + 0.10$	0.9997	50
ACV	0.3 – 15	$\Delta I_n = 3.67 c + 2.21$	0.9996	80
VACV	0.5 – 15	$\Delta I_n = 3.16 c + 5.01$	0.9995	120
GCV	0.5 – 10	$\Delta I_n = 3.02 c + 1.83$	0.9997	130
FCV	0.5 – 10	$\Delta I_n = 4.22 c + 5.78$	0.9996	90

Определение Ade и Gua как продуктов депуринизации ДНК. В современной системе здравоохранения важное место занимает проблема диагностики повреждения структуры нуклеиновых кислот, организующих и обслуживающих жизнь клеточных организмов. Наше исследование показало возможность применения предложенного метода для одновременного детектирования Gua и Ade в ДНК (после депуринизации гидролизом в 70 % HClO_4). В качестве объектов исследования использовали 1 – 5 % стандартные растворы *ds*-ДНК сои. На рис.10 приведены инверсионные вольтамперные кривые, полученные в растворах нативной и депуризированной *ds*-ДНК сои.

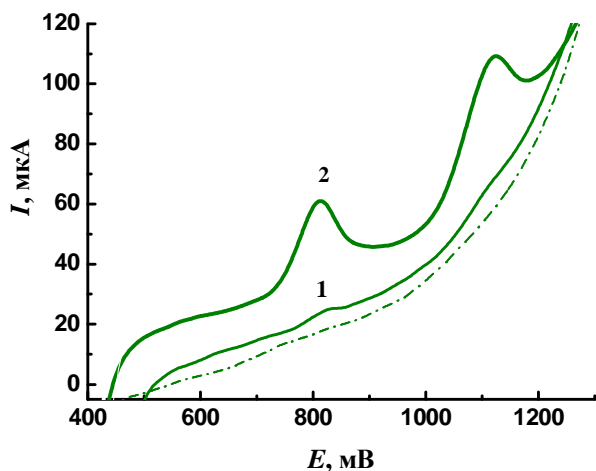


Рисунок 10. Инверсионные вольтамперные кривые, полученные в растворах нативной (1) и депуризированной (2) *ds*-ДНК сои (0.1 М ФБР, pH 7.0; $v = 0.1$ В/с).

Определение примесей Gua в ACV. Обнаружение Gua в лекарственных формах ACV (капсулы, крем, глазные мази, инъекции, пероральная суспензия и таблетки) представляет интерес потому, что это вещество является основным продуктом разложения ACV. Результаты определения Gua в ряде коммерчески доступных препаратов ACV приведены в табл.9.

Таблица 9 – Некоторые результаты определения примесей Gua в растворенных коммерчески доступных формах АСВ, содержащих различные количества добавленного Gua ($n = 6, P = 0.95$)

Препарат	Содержание АСВ, мкг/мл	Gua, нг/мл		Правильность, %	s_T
		Введено	Найдено		
Зовиракс [®] , мазь	4.0	50	52 ± 2	104.0	0.04
		100	98 ± 3	98.0	0.03
		200	199 ± 2	99.5	0.01
Ацикловир, таблетки	5.0	100	102 ± 3	102.0	0.03
		200	203 ± 4	101.5	0.02
		300	296 ± 6	98.7	0.02

Определение Ade и Gua в моче. Диагноз заболеваний, обусловленных нарушением обмена UA, нередко ставят на основании определения содержания пуриновых оснований в моче. На рис.11 представлены инверсионные вольтамперные кривые, полученные при анализе разбавленных проб искусственной мочи (рН 4.5), содержащей 60 мкМ UA ($E_{па} = 0.57$ В) и различные концентрации Gua или Ade. Там же приведены соответствующие градуировочные графики.

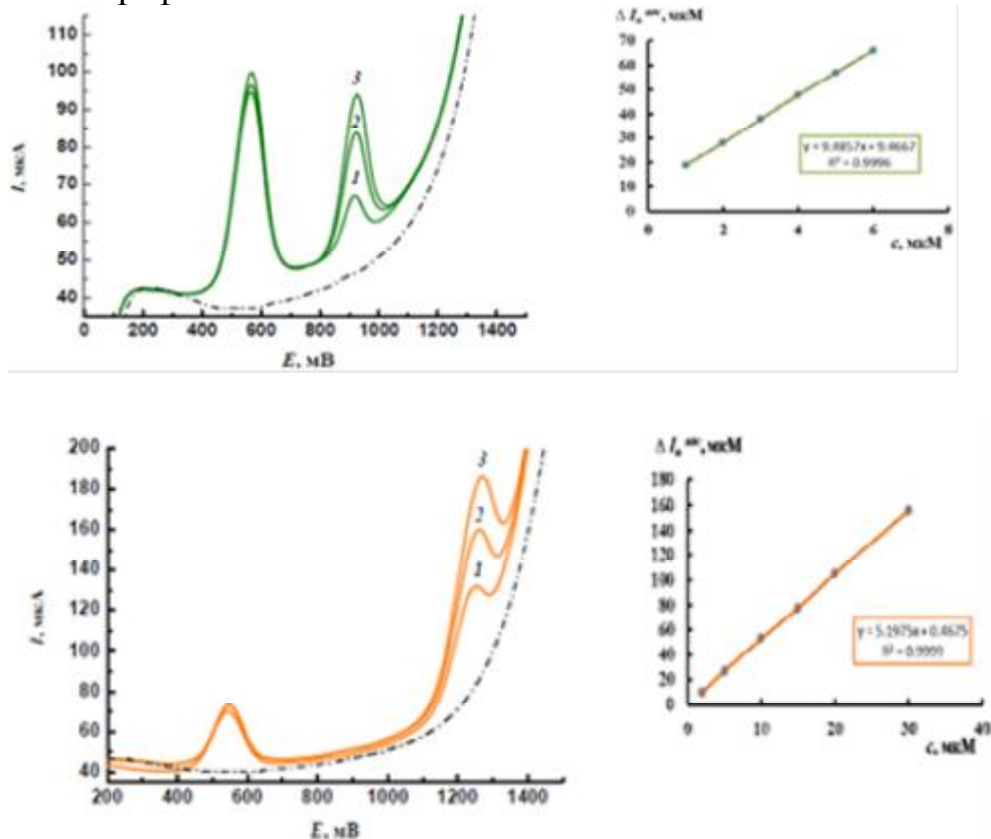


Рисунок 11. Инверсионные вольтамперные кривые, полученные при анализе разбавленной искусственной мочи (рН 4.5), содержащей 60 мкМ UA и различные концентрации Gua (в мкМ): 1 – 1.0; 2 – 3.0; 3 – 4.0 ($t_H = 180$ с) и Ade (в мкМ): 1 – 5.0; 2 – 10.0; 3 – 15.0 ($t_H = 120$ с).

Результаты оценки правильности и воспроизводимости проведенных анализов даны в табл.10.

Таблица 10 – Результаты анализа проб искусственной мочи с добавками Ade и Gua ($n = 5, P = 0.95$)

Вещество	Введено, мкМ	Найдено, мкМ	Правильность, %	s_r
Ade	5.0	5.1 ± 0.3	102.0	0.05
	10.0	9.9 ± 0.4	99.0	0.03
	15.0	15.1 ± 0.4	100.7	0.02
	20.0	20.3 ± 0.5	101.5	0.02
Gua	1.0	0.9 ± 0.1	90.0	0.09
	2.0	1.9 ± 0.1	95.0	0.04
	3.0	3.0 ± 0.2	100.0	0.06
	5.0	5.1 ± 0.2	102.0	0.03

Определение ACV в грудном молоке. Известно, что ACV экскретируется грудным молоком. В частности, после приема 500 мг этого препарата, среднее значение его концентрации составляет около 2 мкг/мл (8 мкМ). Некоторые результаты анализа разбавленных проб грудного молока, содержащих добавки ACV, даны в табл.11.

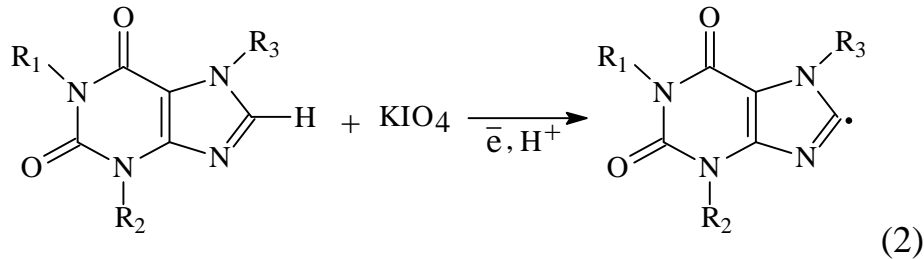
Таблица 11 – Результаты анализа проб грудного молока с добавками ACV. Условия анализа: 20-кратное разбавление пробы 0.1 М ФБР, рН 3.7; $t_n = 120$ с ($n = 5, P = 0.95$)

Содержание ACV, мкМ	Найдено ACV (с учетом разбавления), мкМ	Правильность, %	s_r
6.0	6.1 ± 0.5	101.7	0.07
8.0	7.8 ± 0.6	97.5	0.06
10.0	10.2 ± 0.6	102.0	0.05
20.0	20.0 ± 0.7	100.0	0.03
40.0	39.5 ± 0.9	98.8	0.02

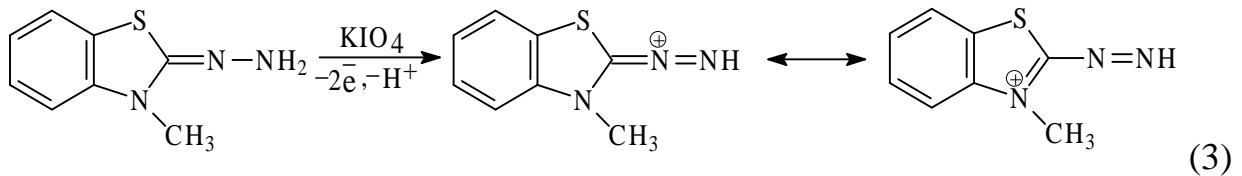
В целом, исходя из полученных результатов и их сопоставления с литературными данными, можно заключить, что разработанный метод ПослИА/АДИВА представляется мощным инструментом количественной оценки биологически активных пуринов в различных объектах благодаря следующим преимуществам: минимальному объему потребляемых образцов, хорошей точности и воспроизводимости результатов анализа, высокой степени автоматизации и выполнению всех стадий анализа в строго воспроизводимых условиях.

В главе 6 представлены результаты создания проточных методов спектрофотометрического определения пуриновых алкалоидов. В связи с тем, что продукты их окисления бесцветны, в основу наших исследований была

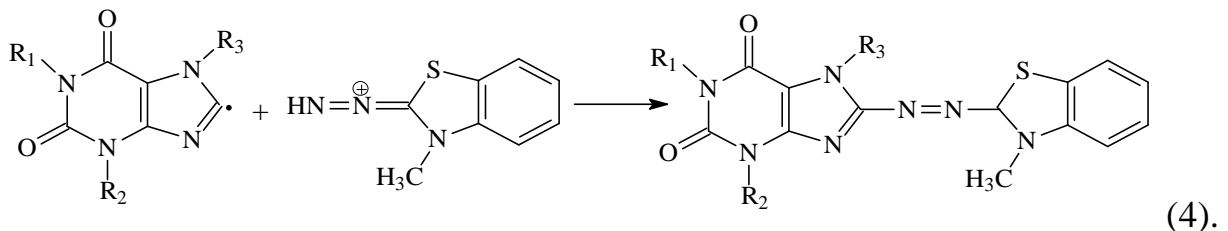
положена реакция совместного окисления пуриновых алкалоидов и 3-метил-2-бензотиазолинон гидразона (МБТГ) периодат-ионами, протекающая с образованием сильноокрашенного продукта в слабокислой среде. Предварительный эксперимент показал, что данная реакция является многостадийной. Опираясь на литературные данные, можно полагать, что в условиях эксперимента начальной стадией реакционного процесса является окисление алкалоида с образованием радикала:



При этом МБТГ также окисляется периодат-ионом до электрофильного интермедиата, существование которого было доказано ранее:



Дальнейший ход реакции существенно зависит от порядка смешивания реагирующих веществ, что подтверждается электронными спектрами поглощения. Так, при первоначальном смешивании растворов МБТГ и окислителя наблюдается образование окрашенного продукта с $\lambda_{\text{max}} = 534$ нм. Вероятно, в этом случае малостабильные интермедиаты МБТГ быстро реагируют друг с другом, образуя тетразен. При смешивании пробы (раствора алкалоида) сначала с окислителем, а затем с МБТГ наблюдается образование продукта совместного окисления с $\lambda_{\text{max}} = 630$ нм. Возможный механизм этого процесса включает азосочетание радикала алкалоидов с электрофильным интермедиатом МБТГ, которое может быть представлено следующей схемой:



Результаты изучения кинетики реакции в режиме «остановленного потока» показали, что при прочих равных условиях скорость развития окраски достаточно велика и составляет 0.057 ед.А/с, 0.053 ед.А/с и 0.028 ед.А/с для Саf, Твг и Трh соответственно. С учетом полученных данных были разработаны схемы ПослИА и ПИА со спектрофотометрическим детектированием (СФМ) образующегося окрашенного соединения при 630 нм. Аналитическим сигналом

служил скачок оптической плотности в реакционной зоне относительно оптической плотности потока смеси растворов окислителя и МБТГ.

Метод ПослИА/СФМ. Для реализации метода определения пуриновых алкалоидов по реакции совместного окисления с МБТГ использовали систему ПослИА, схематически изображенную на рис.12.

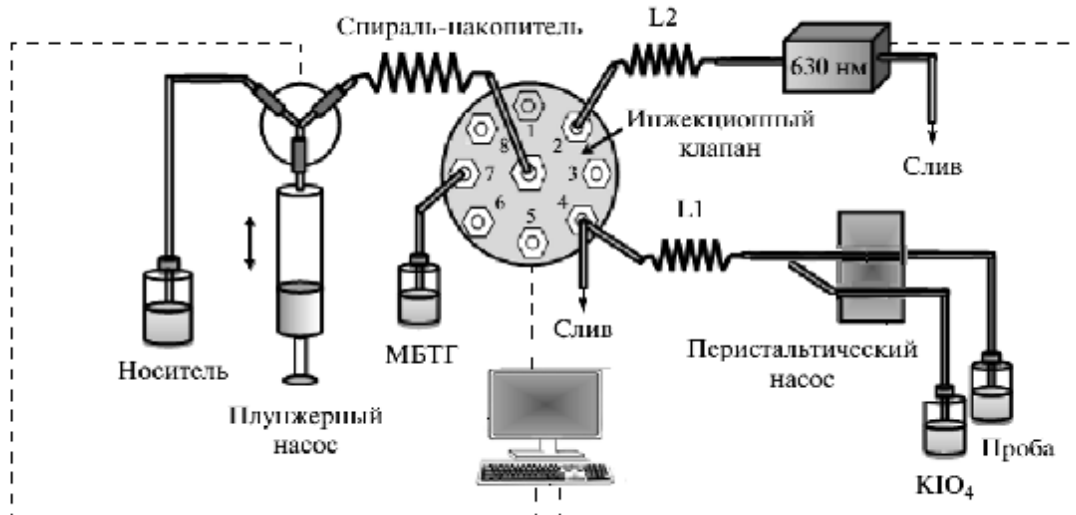


Рисунок 12. Схематическое изображение системы ПослИА для спектрофотометрического определения алкалоидов по реакции окислительного азосочетания с МБТГ (0.05 М ацетатный буферный раствор, рН 5).

В основу функционирования системы был положен принцип формирования реакционной зоны типа «сэндвич» в потоке носителя. При этом наибольшие по интенсивности сигналы регистрировали при введении микрообъемов (в мкл) в следующем порядке: $V_{(\text{проба} + \text{окислитель})} - V_{\text{МБТГ}} - V_{(\text{проба} + \text{окислитель})} = 150 - 100 - 150$ и скорости реакционного потока $\nu = 20$ мкл/с. Такой подход обеспечивал необходимое смешивание реагирующих веществ перед поступлением в проточную ячейку детектора. Основные аналитические характеристики разработанного метода ПослИА/СФМ суммированы в табл.12, результаты метрологической оценки – в табл.13.

Таблица 12. Аналитические характеристики метода ПослИА/СФМ

Вещество	Введено, мг/мл	Метод ПослИА ($n = 4, P = 0.95$)		
		Найдено, мг/мл	s_r	Правильность, %
Caf	0.02	0.021 ± 0.002	0.06	105.0
	0.05	0.049 ± 0.003	0.02	98.0
	0.10	0.101 ± 0.003	0.02	101.0
	0.15	0.148 ± 0.003	0.01	98.7
Tbr	0.04	0.041 ± 0.003	0.02	102.5
	0.10	0.102 ± 0.004	0.02	102.0
	0.20	0.203 ± 0.005	0.02	101.5
	0.30	0.297 ± 0.005	0.01	99.0

Таблица 13 – Проверка правильности и воспроизводимости определения Caf и Tbr с помощью разработанного метода ПосИА/СФМ

Вещество	$\Delta H = H - H_{хол} = a c + b$	r	Диапазон линейности, мг/мл	c_{min} , мкг/мл
Caf	$H = 0.320 c - 0.002$	0.9994	0.02 – 0.40	9
Tbr	$H = 0.203 c + 0.006$	0.9996	0.03 – 0.36	15
Tph	$H = 0.068 c + 0.005$	0.9991	0.06 – 0.36	44

Метод ПИА/СФМ. В этом случае использовали трехканальную ПИ-систему, схематически изображенную на рис.13. Оптимальные операционные параметры ПИ-системы: $V = 200$ мкл, $v_{II} = v_1 = 1.2$ мл/мин, $v_2 = v_3 = 0.6$ мл/мин, $L1 = 60$ см, $L2 = 180$ см. Аналитические характеристики разработанного метода приведены в табл.14.

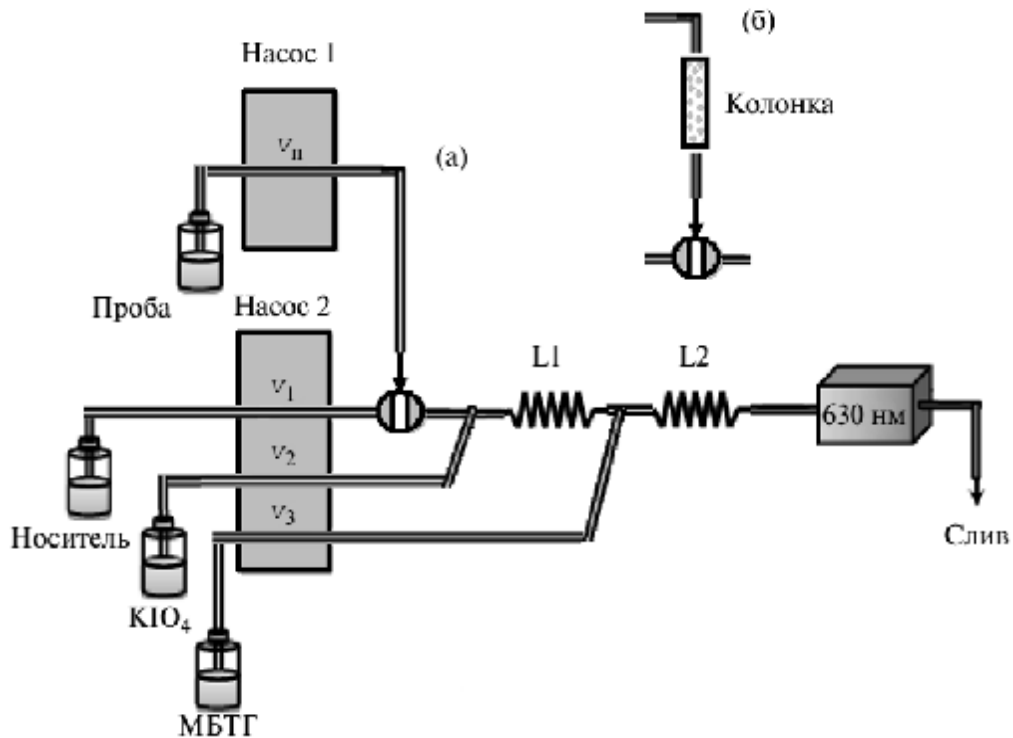


Рисунок 13. Схематическое изображение ПИ-системы со спектрофотометрическим детектированием алкалоидов с прямым вводом пробы (а) и с *on-line* извлечением мешающих компонентов на колонке, заполненной анионитом Амберлит IRA-401 (б). Носитель: 0.05 М ацетатный буферный раствор, pH 6.

Таблица 14 – Аналитические характеристики метода ПИА/СФМ

Вещество	$H = \Delta A_{630 \text{ нм}} = a c + b$	r	Диапазон линейности, мг/мл	c_{min} , мкг/мл
Caf	$H = 2.144 c - 0.001$	0.9996	0.01 – 0.25	3
Tbr	$H = 1.040 c + 0.004$	0.9998	0.01 – 0.36	6
Tph	$H = 0.385 c + 0.002$	0.9999	0.02 – 0.70	16

Разработанный метод ПИА/СФМ был опробован при анализе комбинированных препаратов, содержащих Caf и парацетамол (Pc). С целью устранения мешающего влияния Pc в ПИ-систему дополнительно вводили сорбционную микроколонку, заполненную анионообменником Амберлит IRA-401 (SERVA, Германия) в ОН⁻-форме (рис.13б). Некоторые результаты анализов приведены в табл.15.

Таблица 15 – Результаты определения Caf в комбинированных фармацевтических препаратах методом ПИА/СФМ ($n = 5, P = 0.95$)

Препарат	Сертифицированное содержание веществ, мг/табл.	Найдено Caf, мг	Правильность, %	s_r
Солпадеин	кофеин – 30, парацетамол – 500, кодеина фосфат – 8	30.9 ± 0.5	103.0	0.013
Аскофен-П	кофеин – 40, парацетамол – 200, ацетилсалициловая кислота – 200	40.4 ± 0.4	100.7	0.008
Кофицил Плюс	кофеин – 50, парацетамол – 100, ацетилсалициловая кислота – 300	49.9 ± 0.3	99.8	0.005
Каффетин	Кофеин – 50, парацетамол – 250, пропифеназон – 210, кодеина фосфат – 10	50.5 ± 0.5	101.0	0.008
Панадол Экстра	Кофеин – 65 Парацетамол – 500	65.9 ± 0.9	101.4	0.011

В целом, результаты проведенных исследований позволяют заключить, что разработанные высокопроизводительные методы ПИА и ПосЛИА отличаются хорошими аналитическими и метрологическими характеристиками и могут быть рекомендованы к использованию в лабораторном химическом анализе лекарственных препаратов и биомедицинских объектов, содержащих биологически активные производные пурина.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Проведено систематическое изучение вольтамперометрического поведения гидроксид- и аминоксидных 7Н- и 9Н-пуринов на активированном углесталловом электроде, который, как было установлено, характеризуется высокой электрохимической активностью по отношению к пуриновым соединениям в широкой области рН водных растворов. Получены экспериментальные данные, позволяющие заключить, что все изученные пурины необратимо окисляются в анодной области потенциалов по адсорбционно-диффузионному механизму, сходному с предложенным ранее для других углеродных электродов. Установлена эмпирическая закономерность изменения потенциала окисления пуринов в зависимости от природы ациклических заместителей в положении N7 или N9 имидазольного кольца, а

также присутствия кислородсодержащих групп в положении С2, С6 и С8 молекулы гетероцикла.

2. В развитие методологии ускоренного химического анализа разработаны автоматизированные методы ПИА с амперометрическим детектированием и ПослИА с адсорбционным инверсионно-вольтамперометрическим детектированием изученных веществ в широком диапазоне определяемых концентраций.

3. Разработана автоматизированная ПИ-система для экспериментальной оценки фармацевтической эквивалентности твердых лекарственных форм – тест «Растворение».

4. Исследованы химизм и условия протекания хромогенной реакции совместного окисления пуриновых алкалоидов с 3-метил-2-бензотиазолинон гидразоном под действием периодат-ионов в гидродинамическом режиме. Разработаны методы ПИА и ПослИА со спектрофотометрической регистрацией сигнала, позволяющие определять пуриновые алкалоиды в фармацевтических препаратах.

5. На различных примерах показана перспективность использования разработанных методов экспресс-анализа и исследования различных по составу медико-биологических объектов и как альтернативных способов контроля качества лекарственных средств и выявления фальсифицированных препаратов.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Шпигун, Л.К. Электрохимически активированный углеситалловый электрод как сенсор эндогенной интоксикации нуклеиновых кислот / Л.К. Шпигун, Е.Ю. Андрюхина, А.С. Протасов, М.А. Суранова // Биржа интеллектуальной собственности. – 2014. – № 12. – С. 57–63.
2. Шпигун, Л.К. Анодное поведение алкалоидов пуринового ряда на углеситалловом электроде в кислотных растворах / Л.К. Шпигун, Е.Ю. Андрюхина, М.А. Суранова // Электрохимия. – 2015. – Т. 51. – № 2. – С. 190–196.
3. Шпигун, Л.К. Спектрофотометрическое определение пуриновых алкалоидов методами проточно-инжекционного и последовательного инъекционного анализа / Л.К. Шпигун, Е.Ю. Андрюхина, Я.В. Шушеначев // Журн. аналит. химии. – 2015. – Т. 70. – № 8. – С. 811–820.
4. Shpigun, L.K. Sequential injection – adsorptive stripping voltammetric quantitation of purine nucleobases using an electrochemically activated carbositall electrode / L.K. Shpigun, E.Yu. Andryukhina, A.S. Protasov // J. Electroanal. Chem. – 2015. – V. 743. – P. 46–52.
5. Шпигун, Л.К. Электроаналитическое изучение синтетических производных гуанина, обладающих противовирусной активностью / Л.К. Шпигун, Е.Ю. Андрюхина, П.М. Камилова, М.А. Суранова, А.С. Протасов // Электрохимия. – 2016. – Т. 52. – № 4. – С. 390–397.
6. Шпигун, Л.К. Проточно-инжекционный метод амперометрического определения антивирусных производных гуанина / Л.К. Шпигун,

Е.Ю. Андрюхина, П.М. Камилова // Журн. аналит. химии. – 2016. – Т. 71. – № 6. – С. 618–625.

7. Алкалоиды пуринового ряда: окислительные свойства и проточно-инжекционное определение в фармацевтических препаратах / Е.Ю. Андрюхина // матер. IV Конф. молодых ученых по общей и неорганической химии ИОНХ РАН. – Москва, 2014. – С. 7–8.
8. Проточно-инжекционный метод для фармакокинетических исследований лекарственных форм ацикловира и его аналогов противовирусного действия / Е.Ю. Андрюхина, Л.К. Шпигун // сб. тез. «Химический анализ и медицина», I Всероссийская конференция с международным участием. – Москва, 2015. – С. 15–16.
9. Электрохимическое исследование и определение производных пурина с антивирусной и цитостатической активностью / Л.К. Шпигун, Е.Ю. Андрюхина, А.С. Протасов // тез. докл. XX Менделеевского съезда по общей и прикладной химии. – Екатеринбург, 2016. – Т. 4. – С. 344.