

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ И НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. Н.С. КУРНАКОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИОНХ РАН)**

На правах рукописи



Андрюхина Елена Юрьевна

**ПРОТОЧНЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ПРОИЗВОДНЫХ ПУРИНА**

Специальность 02.00.02 – аналитическая химия

**диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук**

**Научный руководитель:
д.х.н., профессор**

Л.К. Шпигун

Москва – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. Обзор литературы	10
1.1. Биологически активные производные пурина как аналитические объекты	10
1.1.1. Пуриновые алкалоиды	11
1.1.2. Пуриновые основания	13
1.1.3. Синтетические аналоги дезоксигуанозина	14
1.1.4. Современные подходы к определению производных пурина в различных объектах	15
1.2. Проточные методы определения пуриновых алкалоидов	16
1.2.1. Методы проточно-инжекционного анализа	16
1.2.2. Методы последовательно-инжекционного анализа и его модификаций	23
1.3. Проточные методы определения пуриновых оснований и гидроксипуринов	26
1.3.1. Методы проточно-инжекционного анализа	26
1.3.2. Методы последовательно-инжекционного анализа	33
1.4. Проточные методы определения синтетических аналогов дезоксигуанозина	36
ГЛАВА 2. Объекты и техника экспериментальных исследований	40
2.1. Объекты исследования	40
2.2. Реагенты и растворы	41
2.3. Аппаратура	42
2.4. Методики анализа различных образцов	44
2.5. Статистическая обработка результатов	45
ГЛАВА 3. Вольтамперометрическое поведение 7Н- и 9Н-пуринов на активированном углеситалловом электроде	46
3.1. Активация и электрохимические свойства углеситаллового электрода	49
3.2. Анодное окисление пуриновых алкалоидов	53
3.3. Анодное окисление пуриновых оснований	62
3.4. Анодное окисление синтетических аналогов дезоксигуанозина	67

ГЛАВА 4. Проточно-инжекционный метод для амперометрического определения пуринов в фармацевтических препаратах	73
4.1. Описание схемы и выбор параметров проточной системы	74
4.2. Определение синтетических аналогов дезоксигуанозина	75
4.3. Определение пуриновых оснований	79
4.4. Определение кофеина	82
4.5. Автоматизированная система – тест «Растворение»	86
ГЛАВА 5. Метод последовательно-инжекционного анализа для адсорбционного инверсионно-вольтамперометрического определения пуринов в биомедицинских объектах	91
5.1. Описание схемы и выбор параметров проточной системы	92
5.2. Определение пуриновых оснований	93
5.3. Определение синтетических аналогов дезоксигуанозина	98
5.4. Анализ модельных растворов и биомедицинских объектов	102
ГЛАВА 6. Проточные методы спектрофотометрического определения пуриновых алкалоидов	110
6.1. Изучение механизма и условий протекания индикаторной реакции окислительного сочетания пуриновых алкалоидов с 3-метил-2-бензтиазолинон-гидразоном	112
6.2. Спектрофотометрическая система последовательно-инжекционного анализа	113
6.3. Система проточно-инжекционной спектрофотометрии	117
6.4. Анализ комбинированных фармацевтических препаратов, содержащих кофеин	123
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	126
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	128

ВВЕДЕНИЕ

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 собствен-

ных 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. Впервые получены диагностические данные по зависимости потенциала и тока пика электроокисления исследованных пуринов на АУСЭ от рН и природы фонового электролита, а также от скорости сканирования 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 аналогов дезоксигуанозина в широком диапазоне определяемых концентраций. Впервые разработаны 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 депуринизированной 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, входящих в перечень ВАК, 1 статья в международном рецензируемом журнале и 3 тезисов докладов.

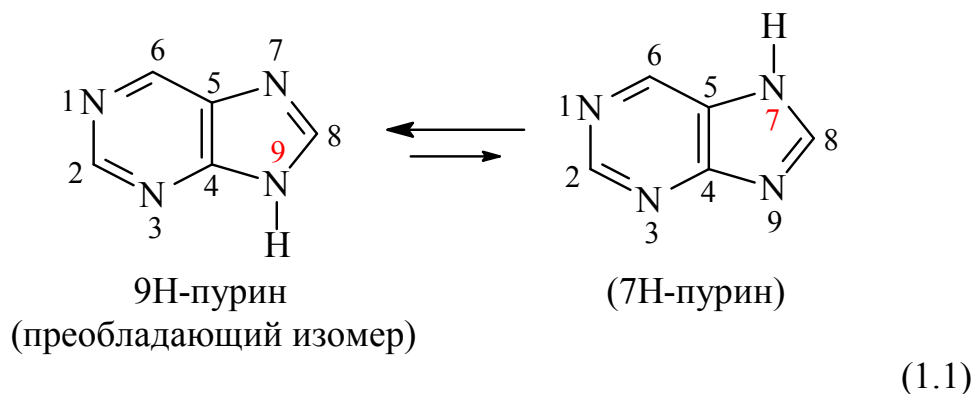
Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава 1) и экспериментальной части (главы 2 – 6), выводов и списка цитируемой литературы (240 наименований). Работа изложена на 154 страницах, содержит 78 рисунков и 48 таблиц.

Диссертационная работа выполнена в период 2013 – 2016 гг. в соответствии с научным направлением ИОНХ РАН 44е – «Фундаментальные основы химии: новые методы физико-химических исследований и анализа веществ и материалов, а также в рамках проектов программы Президиума РАН «Химический анализ и исследование структуры веществ: фундаментальные основы и новые методы».

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1 Биологически активные производные пурина как аналитические объекты

Пурин (имидазоло-4",5"-4,5-пиримидин) – гетероциклическое соединение с четырьмя атомами азота, содержащее два конденсированных кольца – пиримидиновое и имидазольное, и существующее в виде двух таутомерных форм:

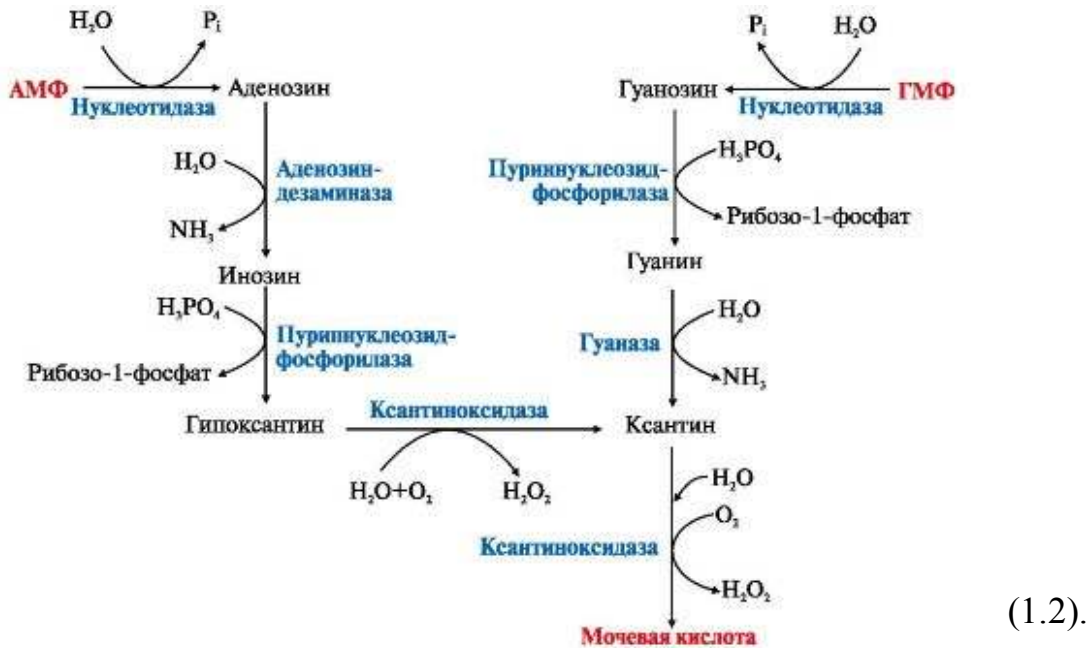


Химическая реакционная способность молекулы пуринов обусловлена, главным образом, тем, что пиримидиновое кольцо является π -электрон-дефицитным, а имидазольное – π -электрон-избыточным. Согласно имеющимся в литературе данным, электрофильное замещение у атома углерода пуринового ядра происходит преимущественно в положение С8 [1].

Соединения пуринового ряда широко распространены в природе и играют важную роль в биологических процессах, благодаря чему применяются в составе ценнейших лекарственных средств. Лекарственные средства – производные пурина обладают широким спектром фармакологического действия, включая противовирусную и противоопухолевую активность. Среди них, большую группу составляют гидрокси- и аминопроизводные пурина: пуриновые алкалоиды (7H-пурины) и пуриновые основания (9H-пурины), являющиеся структурными фрагментами нуклеиновых кислот, входя в состав нуклеотидов.

Катаболизм пуриновых мононуклеотидов в организме происходит в несколько стадий: под действием фосфатаз или нуклеотидаз нуклеотиды теряют

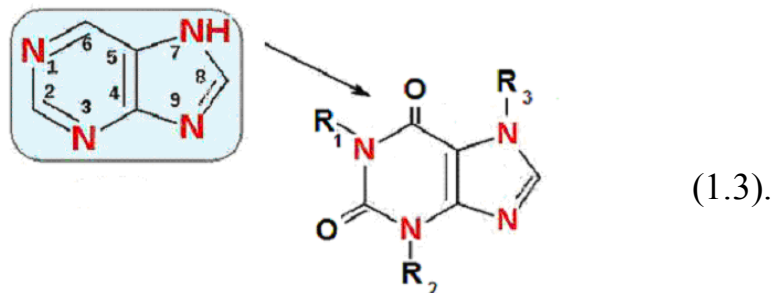
фосфатный остаток и превращаются в нуклеозиды; аденозин дезаминируется, отщепляет рибозу и образует гипоксантин; гуанозин в результате сходных реакций превращается в ксантин; далее гипоксантин и ксантин окисляются в мочевую кислоту [2,3]:



Нормальное содержание мочевой кислоты в сыворотке крови составляет 0.15 – 0.47 мМ или 3 - 7 мг/дл, а в суточной моче – 400 - 600 мг/дл. При некоторых заболеваниях, в частности при гиперурикемии и подагре (отложение мочевой кислоты в виде солей в суставах), содержание мочевой кислоты заметно увеличивается.

1.1.1 Пуриновые алкалоиды

К биологически активным 7Н-пуринам, в которых заместитель находится у атома азота N7, относятся пуриновые алкалоиды: кофеин (**Caf**), кофеин бензоат натрия, теобромин (**Tbr**), теofilлин (**Tph**) и его производные (эуфиллин и другие):



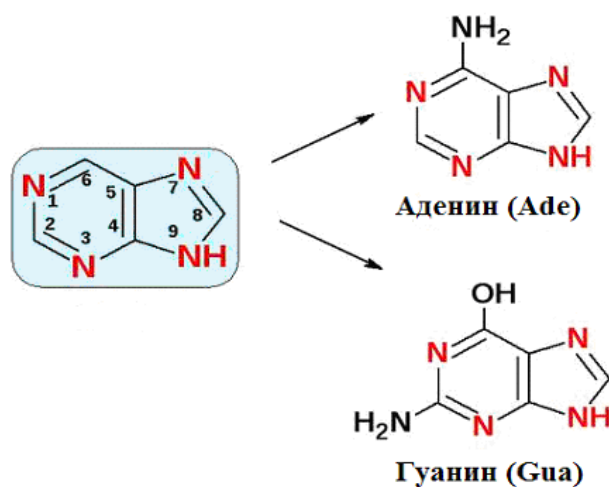
Этот интереснейший класс природных химических соединений встречается главным образом в продуктах растительного происхождения (листья чая, бобы какао, зерна кофе, орехи кола) и входит в состав лекарственных средств и энергетических напитков [4 – 6]. В медицинской практике препараты кофеина применяют при отравлениях наркотиками и другими ядами, а также как средства, стимулирующие ЦНС и сердечно-сосудистую систему. Недавние исследования (опыты на мышах) показали, что кофеин может предохранять животный организм от вредного воздействия ионизирующих излучений. Теобромин и теофиллин применяют в качестве бронхолитических средств и используют при спазмах сосудов головного мозга, коронарной недостаточности, застойных явлениях сердечной и почечной этиологии. Однако передозировка этих веществ может привести к вредным для здоровья человека последствиям [5]. Например, первые признаки интоксикации Саf наблюдаются после приема более 300 мг, а подтвержденная летальная доза составляет около 10 г. Более токсичным являются теофиллин и его производное эуфиллин: при внутривенном введении смертельная доза составляет 0.1 г. Диапазоны терапевтической и токсической концентраций пуриновых алкалоидов близки, поэтому необходим тщательный контроль над содержанием этих веществ в организме человека.

Актуальной задачей является определение алкалоидов в продуктах питания, энергетических напитках, пищевых добавках. Наличие на российском фармацевтическом рынке фальсифицированных лекарственных препаратов также приводит к росту потребности в быстрых и надежных средствах идентификации и оценки содержания пуриновых алкалоидов и их метаболитов в лекарственных средствах. Кроме того, в последние годы все большее значение приобретает необходимость определения следовых содержаний этих веществ в биологических материалах [7] и водах [8].

Литературные данные о свойствах и определении пуриновых алкалоидов обобщены и систематизированы в обзорах [9 – 11].

1.1.2 Пуриновые основания

К группе 9Н-пуринов, в которых заместитель находится у атома азота 9N, относятся пуриновые основания – аденин (**Ade**) и гуанин (**Gua**):

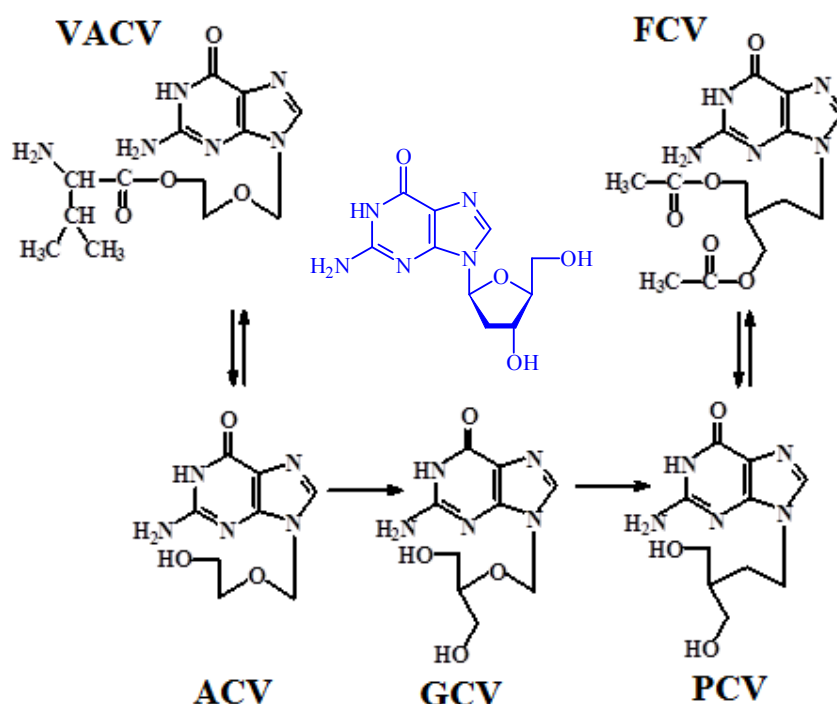


(1.4).

Биомолекулы Ade и Gua содержатся во всех организмах в составе нуклеиновых кислот и играют ключевую роль в функционировании живых систем, участвуют в хранении и передаче генетической информации (одна из 4 «букв» генетического кода), росте и делении клеток, биосинтезе белков, накоплении энергии и передаче нервных импульсов [12]. Уровень индивидуальных концентраций этих соединений и их соотношение в структуре ДНК являются важным индикатором при клинической диагностике и лечении различных заболеваний [13]. Наиболее часто при патологии пуринового обмена повреждаются нервная система (задержка развития, аутизм, эпилептические приступы), кроветворная ткань (анемия) и почки (нефропатия, мочекаменная болезнь). Снижение концентрации Ade отрицательно сказывается на метаболизме липидов, вызывает замедление роста и костный артрит. В составе фармацевтических препаратов Ade используется при лечении лейкозов, отравлении бензолом [14]. В связи с этим, Ade и Gua считаются важными объектами исследований в области клинического и фармацевтического анализа. Особый интерес представляет их определение в физиологических жидкостях человека.

1.1.3 Синтетические аналоги дезоксигуанозина

В последние годы большое внимание уделяется синтезу и применению производных пурина, обладающих противовирусной активностью на молекулярном уровне и играющих ключевую роль в лечении герпес-вирусных и цитомегаловирусных заболеваний [15]. К ним относятся ацикловир (ACV), валацикловир (VACV), ганцикловир (GCV) фамцикловир (FCV) и пенцикловир (PCV), являющиеся структурными аналогами дезоксигуанозина, участвующего в биосинтезе нуклеиновых кислот:



(1.5).

ACV, имитирующий собой эндогенный нуклеозид, попадая в зараженную вирусом клетку, прекращает дальнейший рост ДНК, так как, в отличие от дезоксигуанозин-трифосфата, не содержит рибозильный фрагмент с 5'-ОН-группой, и вирусная инфекция в зараженном организме подавляется [15]. В здоровых клетках концентрация ACV в 40 – 100 раз ниже, чем в клетках, пораженных вирусами. GCV действует не только на вирус герпеса, но и на цитомегаловирус, нередко обуславливающий тяжелые осложнения при СПИДе [16]. VACV и FCV – новые препараты, которые в несколько раз эффективнее ACV [17].

1.1.4 Современные подходы к определению производных пурина в различных объектах

Применение биологически активных пуринов для решения широкого круга биомедицинских проблем и в качестве лекарственных субстанций стимулирует развитие различных аналитических методов для их определения. Среди многочисленных публикаций на эту тему, наибольший интерес представляют проточные методы анализа, которые наилучшим образом удовлетворяют современным требованиям лабораторного анализа (скорость, надежность, автоматизация, миниатюризация).

Наибольшее распространение получили хроматографические методы, а именно жидкостная хроматография с УФ- или амперометрическим детектированием [18 – 26], а также ВЭЖХ в сочетании с флуориметрическим детектором [27]. Для количественного определения пуринов в сыворотке крови и других объектах предложены методы ион-парной жидкостной хроматографии, которые позволяют осуществлять их одновременное определение и ряда других соединений, близких к ним по свойствам и структуре [28, 29]. Разработаны высокоселективные и чувствительные методы газовой или жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией [30 – 35].

С появлением новых технологий, хроматографические методы определения пуринов постоянно совершенствуются. Из недавних разработок следует отметить методы жидкостной хроматографии ультравысокого давления с УФ-детектированием, предложенные для определения ACV и GCV в плазме крови на уровне 0.1 – 1.0 мкг/мл [36,37]. Все более популярным становится изучение пуриновых соединений методами в варианте обращенно-фазовой ВЭЖХ [38 – 42], мицеллярной электрокинетической хроматографии [43,44]. Известны методы капиллярного электрофореза (КЭ), которые характеризуются высокой чувствительностью и избирательностью по отношению к пуриновым основаниям и алкалоидам [45 – 49]. Определение Caf в алкогольных и безалкогольных напитках методом КЭ регламентировано ГОСТ Р 53193-2008.

Перспективным направлением в создании автоматизированных методов определения пуринов является применение методологии проточно-инжекционного анализа (ПИА) и его разновидностей, в частности последовательно-инжекционного анализа (ПослИА) [50]. По сравнению с традиционными, такие методы позволяют не только существенно повысить производительность анализа и снизить объемы потребляемых растворов, но и существенно улучшить воспроизводимость результатов [51 – 58].

Ниже приведен обзор ранее опубликованных работ, относящихся к определению важнейших биологически активных пуринов в системах ПИА и ПослИА.

1.2 Проточные методы определения пуриновых алкалоидов

Разработка проточных методов определения пуриновых алкалоидов в водных и других средах имеет первостепенное значение для оценки безопасности алкалоидсодержащих пищевых продуктов, напитков и фармацевтических препаратов.

1.2.1 Методы проточно-инжекционного анализа

Наибольшее число работ, посвященных созданию методов ПИА для определения пуриновых алкалоидов в различных объектах относится к Саf. Первая статья на эту тему была опубликована Б. Карлбергом в 1978 г., который разработал проточный метод экстракционно-фотометрического определения Саf в таблетках ацетилсалициловой кислоты [59]. Позднее, для определения Саf в фармацевтических препаратах и безалкогольных напитках были предложены автоматизированные проточно-инжекционные системы (**ПИ-система**) с *on-line* экстракционным извлечением аналита в органический растворитель и регистрацией ИК-Фурье спектра в полученном экстракте [60– 62]. В первой половине 1990-х годов были выполнены работы по определению Трh в биологических жидкостях методами иммуноферментного ПИА [63 – 65]. Последующие немногочисленные исследования были преимущественно

посвящены созданию и применению ПИ-систем со спектрофотометрическим и электрохимическим детектированием пуринов.

ПИ-системы со спектрофотометрическим детектированием. В табл.1.1 суммированы литературные данные, характеризующие разработанные ПИ-системы на основе прямого УФ-детектирования пуриновых алкалоидов в различных объектах.

Таблица 1.1 – ПИ-системы с УФ-детектированием пуриновых алкалоидов ($\lambda_{\text{макс}} = 272 - 276 \text{ нм}$).

Вещество	Диап. линейности градуир. графика, мкг/мл	c_{min} , мкг/мл	Q , ч ⁻¹	Объект анализа	Ссылка
Caf	3.5 – 50	0.56	15 – 20	Фарм. препараты	[66]
	5 – 75	0.65	11 – 20		[67]
	500 – 15000	400	7 – 8	Растительные экстракты	[68]
	10 – 800 мкМ	–	120		[69]
	300 – 1600	128	10		[70]
Caf, Tbr, Tph	1 – 16 1 – 12	0.1	–	Фарм. препараты, напитки	[71]

Пуриновые алкалоиды входят в состав многих фармацевтических препаратов, в том числе комбинированных, что нередко затрудняет их количественное определение. Поэтому большинство из предложенных методов включают стадию пробоподготовки для отделения и концентрирования определяемого компонента из матричного раствора: экстракцию в органический растворитель, твердофазную экстракцию, сорбцию и другие. Так, испанскими исследователями разработана ПИ-система анализа комбинированных жаропонижающих препаратов, содержащих кофеин и парацетамол (**Рс**), спектры светопоглощения которых сильно перекрываются [66]. В основе метода лежит *on-line* разделение определяемых веществ на мини-колонке, заполненной силикагелем с привитой фазой C_{18} (рис.1.1).

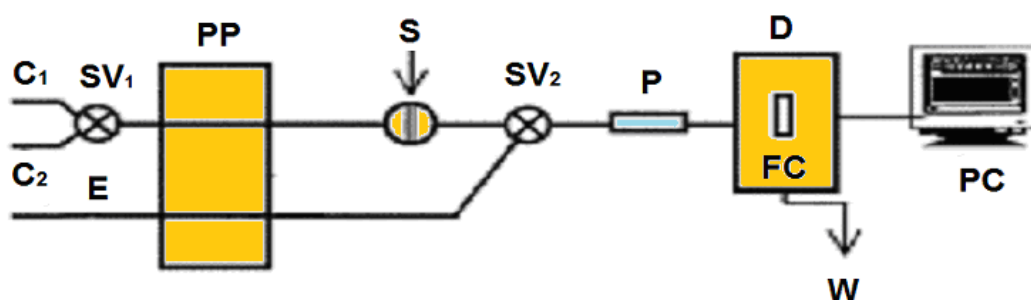


Рисунок 1.1. Схематическое изображение ПИ-системы для определения кофеина и парацетамола. C_1 и C_2 – носители; E – десорбирующий раствор; S – проба; PP – перистальтический насос; SV_1 SV_2 – селекторы; P – мини-колонка с сорбентом; D – УФ-детектор; FC – проточная ячейка; W – слив; PC – компьютер (взято из [66]).

Согласно схеме, в поток носителя C_1 (H_2O) инжестрировали пробу S , содержащую кофеин и парацетамол. При пропускании пробы через колонку P , помещенную перед проточной ячейкой детектора FC , Ca_f осаждался, а Pc оставался в инжестрируемой зоне, при прохождении которой через детектор регистрировали УФ-сигнал, отвечающий его содержанию в пробе. Десорбцию и детектирование Ca_f проводили, прокачивая через микроколону поток носителя C_2 ($NaOH$) и регистрируя сигнал при 275 нм. С использованием такой же ПИ-системы в сочетании с обработкой данных методом инвариантной калибровки впервые удалось провести одновременное определение Ca_f , Pc и пропифеназона [67]. Предложенный метод имеет ряд преимуществ: скорость и простота выполнения определений при низкой стоимости расходных материалов. Позднее, те же авторы использовали подобный метод для одновременного определения Ca_f и Trh в фармацевтических препаратах, а также Ca_f и Tbr в пищевых продуктах [71]. Достоверность результатов анализа, полученных описанным методом, подтверждена сопоставлением с данными ВЭЖХ.

Аналогичный метод для анализа водных экстрактов молотых кофейных зерен с *on-line* твердофазной экстракцией на мини-колонке с C_{18} описан в работе [70]. В этом случае для десорбции Ca_f использовали 400 мкл смеси метанол : вода = 25 : 65.

В работе [69] описана квази-ПИ-система для избирательного определения содержания Ca_f в трех видах чая (20 – 50 мг/г). Анализ включал пропускание

предварительно полученных экстрактов чая сначала через микроколону (90x60 мм) с поливинилполипирролидоном (для удаления полифенолов), а затем через хроматографическую колонку GL-Science Inertsil ODS-3 (10x1.5 мм). Продолжительность каждого определения составляет всего 20 с.

Жидкие мембраны являются привлекательной альтернативой других способов пробоподготовки, как например, жидкость-жидкостной экстракции: потребление органических реагентов снижается за счет иммобилизации растворителя в пористой гидрофобной мембране. В работе [68] описан метод спектрофотометрического определения Caf как в измельченных образцах чая и кофе (рис.1.2а), так и в их водных экстрактах (рис.1.2б).

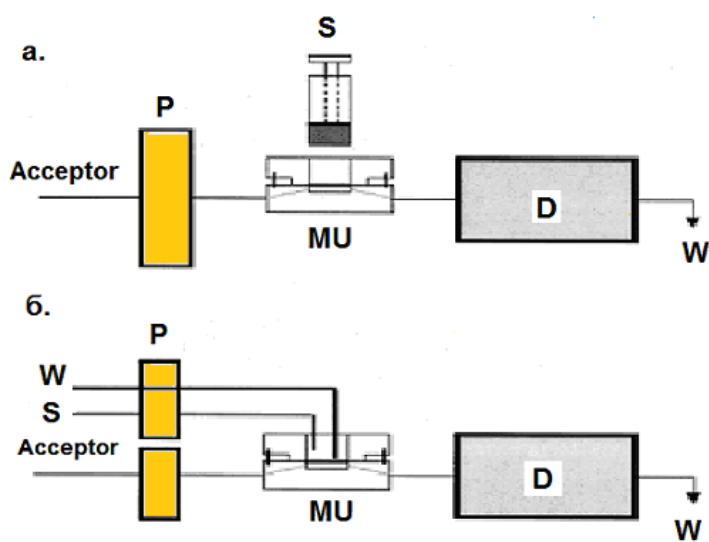


Рисунок 1.2. Схематическое изображение ПИ-систем для определения Caf в твердых образцах кофе или чая (а) и их экстрактах (б). P – перистальтический насос, MU – мембранное устройство, D – детектор, S – проба, W – слив. (взято из работы [68]).

В первом случае твердый образец помещался непосредственно в мембранное устройство (MU) и затем вымывался десорбирующим раствором (Acceptor) в проточную ячейку детектора (рис.1.2а). Во втором случае, анализ включал извлечение аналита из растворенной пробы при пропускании ее через мембрану (политетрафторэтилен/н-ундекан:гексилловый эфир) и последующее детектирование Caf в фазе десорбента (2.5 мМ H₂SO₄) (рис.1.2б). Примечательно, что применение жидких мембран в ПИА позволяет полностью автоматизировать процесс анализа, избегая потерь при проведении пробоподготовки твердых образцов.

Разработан автоанализатор для последовательного определения Caf, сахаров и подсластителя в безалкогольных напитках (рис.1.3) [72].

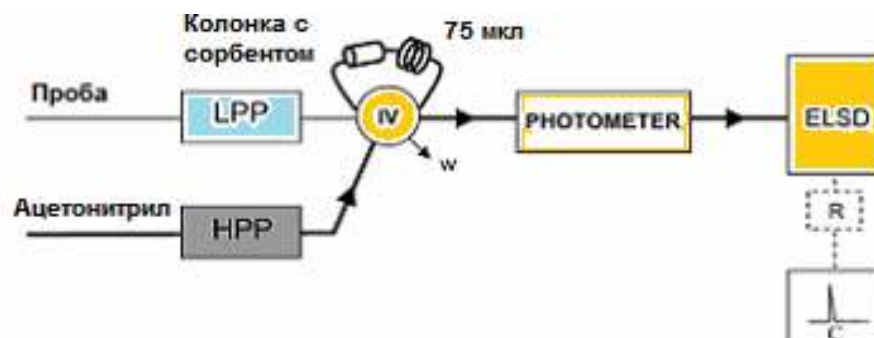


Рисунок 1.3. Схема автоанализатора для анализа безалкогольных напитков (взято из [72]).

Работа мультипараметрического автоанализатора основана на использовании *in-valve* колонки с твердофазным экстрагентом и двух детекторов: спектрофотометра и испарительного детектора по светорассеянию (ELSD). Анализ включал две стадии. На первой стадии кофеин сорбировался на колонке, а остальные компоненты детектировали в проходящем растворе. Вторая стадия включала элюирование Caf ацетонитрилом и его фотометрическое детектирование. Анализатор был успешно использован для контроля качества более 20 различных образцов безалкогольных напитков разных составов.

ПИ-системы с электрохимическим детектированием. К настоящему времени известны единичные работы, относящиеся к проточно-инжекционному амперометрическому определению пуриновых алкалоидов, а точнее Caf (табл. 1.2). В отличие от наиболее распространенных оптических детекторов, амперометрические детекторы позволяют использовать простейшие схемы ПИА, так как чаще всего не требуют предварительного проведения химических преобразований пробы перед регистрацией аналитического сигнала.

Таблица 1.2 – ПИ-системы для амперометрического детектирования Саf

Электрод	pH	$E_{па}$, В	Диапазон линейности, мкМ	c_{min} , мкМ	V , мкл / Q , ч ⁻¹	Объект анализа	Ссылка
СУЭ	1.9	+1.70	10 – 80	0.21	80 / 120	Напитки	[73]
ААЭ	4.7	+1.55	1 – 315 мг/л	0.17 мг/л	140	Фарм. препараты	[74]
		+1.49	3 – 60	0.16	150		[75]

Электрохимические исследования, проведенные различными авторами в статических условиях, показали, что общим свойством пуриновых алкалоидов, в том числе Саf, является способность к необратимому окислению в анодной области потенциалов [76]. Для амперометрического детектирования электроокисления Саf в условиях ПИА были использованы твердые электроды, а именно стеклоуглеродный электрод (СУЭ) и электрохимически активированной алмазный электрод, легированный бором (ААЭ). В работе [73] описана двухканальная ПИ-система для определения Саf в безалкогольных напитках на СУЭ без предварительной пробоподготовки (рис.1.4). Средняя продолжительность пребывания пробы в такой системе ≈ 30 с.

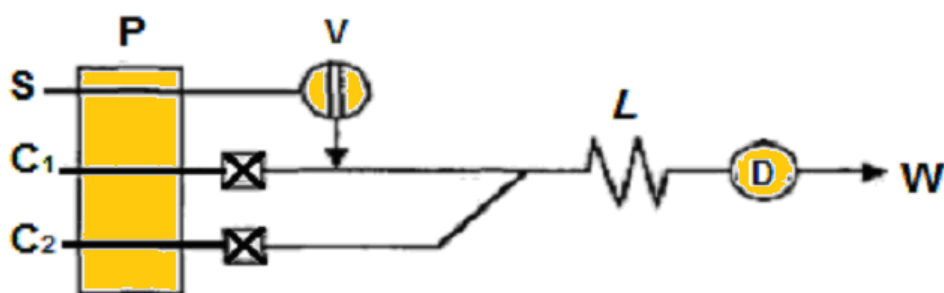


Рисунок 1.4. Схематическое изображение ПИ-системы для определения Саf в безалкогольных напитках. P – перистальтический насос, S – проба, C₁ – носитель, C₂ – буферный раствор (рН 1.9), L – реактор, D – амперометрический детектор, W – слив (взято из[73]).

Чтобы избежать негативных эффектов, обусловленных адсорбцией Саf на поверхности электрода, по второму каналу периодически прокачивали буферный

раствор Бриттона–Робинсона с рН 1.9 (C_2). Непродолжительное время контакта определяемого вещества с электродом также позволило уменьшить негативное влияние адсорбции и таким образом использовать электрод в течение всего рабочего дня без механической и электрохимической обработки. Разработанная система проста в эксплуатации и довольно экономична, с учетом отсутствия пробоподготовки и использования недорогостоящих реагентов.

Авторы работ [74,75] исследовали возможность амперометрического определения Саf в составе комбинированных лекарственных препаратов. Благодаря большой разности значений потенциалов окисления компонентов пробы, было реализовано их индивидуальное определение при совместном присутствии. Метод с мульти-импульсным амперометрическим детектированием Саf и Рс на предварительно активированном алмазном электроде, легированном бором (ААЭ), описан в работе [74]. Схематическое изображение используемой трехэлектродной проточной ячейки представлено на рис.1.5а. Последовательность наложения импульсов потенциалов была выбран таким образом, что при потенциале +1.20 В / 50 мс регистрировали ток окисления Рс, а при +1.55 В / 50 мс – суммарный ток окисления Саf и Рс (рис.1.5б).

В работе [75] предложен усовершенствованный вариант данного метода для одновременного определения Саf, Рс и ибупрофена в растворенных фармацевтических препаратах. Амперометрическое детектирование проводили при импульсном наложении четырех потенциалов, выбранных с учетом потенциалов окисления определяемых веществ: $E_1 = +1.20$ В/70 мс (Рс), $E_2 = +1.49$ В/40 мс (Рс и Саf), $E_3 = +1.70$ В/70 мс (Рс, Саf и ибупрофен), а также $E_4 = +1.80$ В/100 мс (очистка поверхности электрода). Пробоподготовка включала растворение твердых препаратов и разбавление раствором электролита непосредственно перед определением. В целом, предлагаемый метод экономически эффективен и дает минимальное количество отходов. Правильность полученных результатов подтверждена сопоставлением с данными ВЭЖХ.

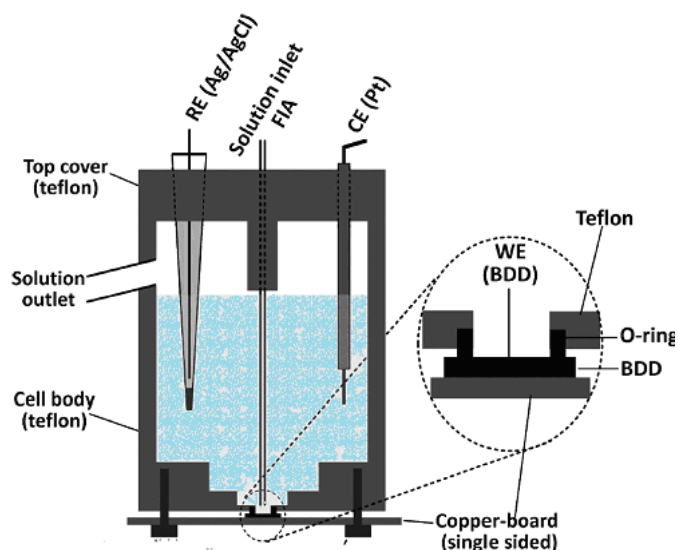


Рисунок 1.5а. Схематическое изображение электрохимической ячейки типа «wall-jet», используемая в работе [74].

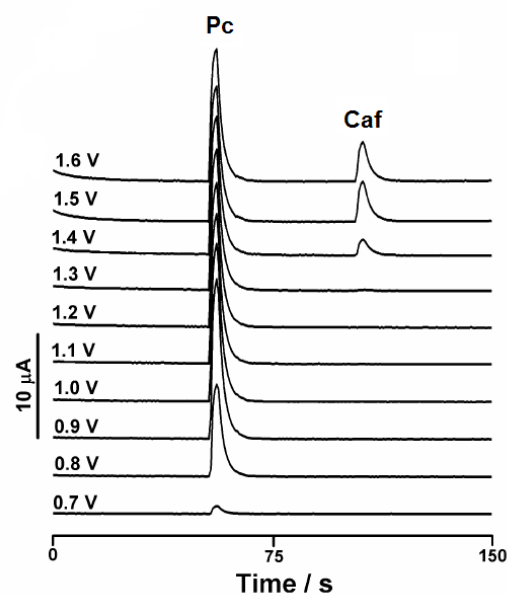


Рисунок 1.5б. ПИА-амперограмма, полученная при введении по 100 мкл растворов Pc (34.3 мкг/мл) и Caf (4.9.мкг/мл) [74].

1.2.2 Методы последовательно-инжекционного анализа и его модификаций

Современные исследования в области ПИА привели к созданию новой концепции, получившей название «Sequential Injection Analysis» (последовательно-инжекционный анализ или ПослИА). В отличие от традиционных ПИ-систем, в данном случае реакционная зона формируется по принципу перекрывающихся сегментов пробы и реагентов, подаваемых в систему с помощью плунжерного насоса и многоходового клапана-дозатора с двумя и более дозирующими петлями. Основы этой концепции были заложены Я. Ружичкой с сотр. [77]. Позднее ими же были предложены и другие модификации такого анализа – Bead Injection Analysis (BIA) и Sequential Injection Chromatography (SIC) [78]. Все эти методологические подходы нашли применение при разработке автоматизированных способов определения пуриновых алкалоидов (табл.1.3).

Таблица 1.3 – Автоматизированные системы определения пуриновых алкалоидов

Вещество	Метод детектирования	Диапазон линейности, мкг/мл	Q_3 , ч ⁻¹	V , мкл	Ссылка
Трh	ВИА/ твердофазное УФ-детектирование	22 – 280 мкг/мл	10	200	[79]
Саf	ПосЛИА/сканирование УФ-спектра поглощения в остановленном потоке	10 – 50	45	10	[80]
	ЦИА /потенциометрическое детектирование	0.01 – 10 мМ	6	300	[81]
	SIC/ УФ-спектрофотометрическое детектирование	0.5 – 50	10	25	[82]

На основе принципов ВИА предложена автоматизированная система для определения Трh в присутствии Саf, основанная на твердофазной экстракции вещества на анионообменной микроколонке, встроенной в проточную ячейку детектора (рис.1.6) [79].

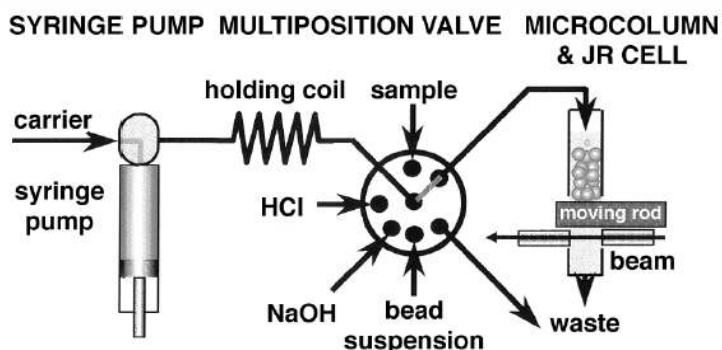


Рисунок 1.6. Система ВИА для твердофазно-спектрофотометрического определения Трh в присутствии Саf (взято из [79]).

Анализ в такой системе включает введение водной суспензии частиц анионообменника (шарики диаметром 0.8 мм) в проточную ячейку, а затем последовательное инжектирование 5 мМ раствора NaOH, пробы и 0.1 М раствора HCl. Каждый цикл анализа занимал 7.6 мин при расходе жидкой фазы 5.955 мл, из которой вода составляла 4.150 мл.

В работе [81] предложен проточный метод экстракционно-потенциометрического определения Саf в слюне. Метод основан на методологии циклического инъекционного анализа (ЦИА) и включает микроэкстракционное концентрирование аналита хлороформом, удаление органического растворителя и потенциометрическое детектирование Саf в 0.01 М растворе H₂SO₄ с помощью мембранного электрода.

На основе сочетания принципов ПослИА и обращено-фазовой хроматографии разработана автоматизированная система SIC с УФ-детектированием для одновременного определения Саf, Рс, и ацетилсалициловой кислоты (рис.1.7) [82]. Для разделения определяемых компонентов использовали колонку типа Chromolith Flash RP-18e (25x4.5 мм, Merk, Germany), для регистрации сигнала – оптоволоконный детектор (Ocean Optics, Ins., USA). Наилучшие результаты были получены при использовании подвижной фазы состава ацетонитрил:0.01 М фосфатный буферный раствор, рН 4 = 10:90 (об.).

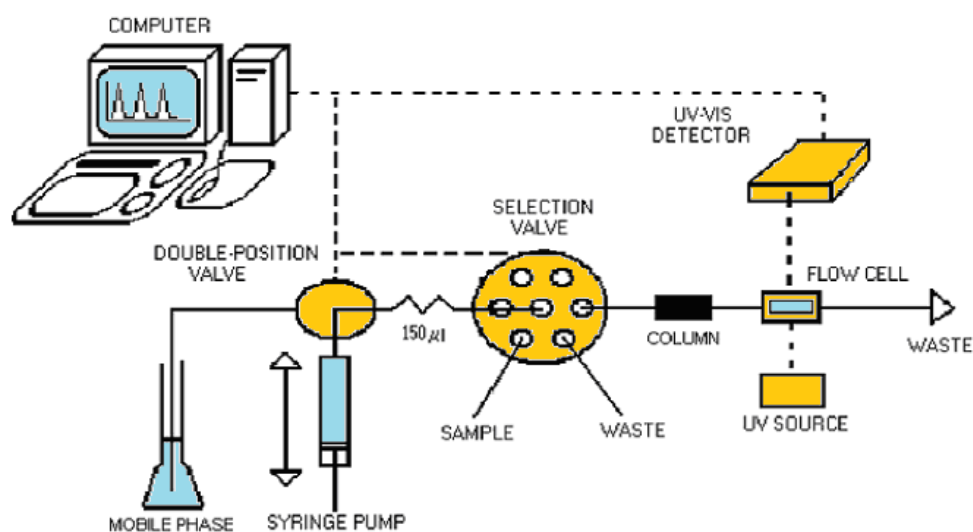


Рисунок 1.7. Схематическое изображение SIC-системы для определения Саf и Рс (взято из [82]).

1.3 Проточные методы определения пуриновых оснований и гидроксипуринов

Высокая потребность в количественном определении Ade и Gua, а также гидроксипуринов – ксантина (Xan), гипоксантина (HXan) и мочевой кислоты (UA), в физиологических жидкостях стимулировала разработку ряда автоматизированных систем ПИА и ПосЛИА.

1.3.1 Методы проточно-инжекционного анализа

ПИ-системы с оптическим детектированием. Наличие в молекуле пуринов имидазольного кольца обуславливает возможность их окисления типичными окислителями, используемыми в хемилюминесцентных и фотометрических реакциях. В табл.1.4 суммированы характеристики ПИ-систем, разработанных на этой основе.

Опубликованные работы относятся главным образом к созданию ПИ-ХЛ систем для определения UA. В частности, на рис.1.8 дано схематическое изображение подобной системы со стеклянной мини-колонкой, заполненной смесью частиц анионообменника (Amberlyt A-27) с иммобилизованным реагентом (люминолом) и их же с окислителем (периодатом калия) [86].

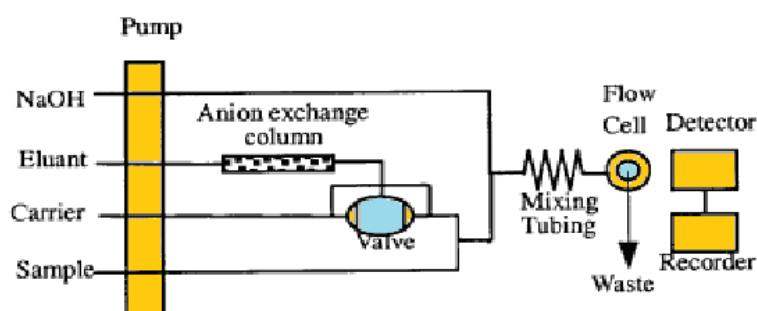


Рисунок 1.8. Схематическое изображение ПИ-ХЛ-системы, предложенной для определения UA. (Carrier – вода, eluant – Na_2SO_4) (взято из [86]).

Анализ основан на ингибировании интенсивности хемилюминесценции (ΔI) в реакционной системе люминол – периодат – NaOH в присутствии UA:

$$\Delta I = 110.96 \lg c - 53.08 \quad (r = 0.9993) \quad (1.6)$$

Метод был использован как для определения UA в моче и сыворотке крови, так и для исследования ее суточного метаболизма в организме человека.

Таблица 1.4 – ПИ-системы для определения Ade, Gua и их метаболитов с использованием оптических детекторов

Вещество	Метод детектирование	Диапазон линейности, мкМ	Q_2 , ч ⁻¹	V , мкл	Ссылка
Хап, НХап	ХЛ биосенсор	5 – 1000 2 – 1000	–	–	[83]
НХап	СФ / ферментный реактор / соль тетразолия	2 – 1500	30	20	[84]
UA	ХЛ / ферментный реактор	0.5 – 10	–	20	[85]
	ХЛ / люминол - периодат	5 – 500 нг/мл	100	100	[86]
	ХЛ / Ru(bpy) ₃ ²⁺ - Ce(IV)	10 – 1000 нг/мл	12	25	[87]
	ХЛ / люминол - дипериодатаргентат(III)	0.4 – 200 0.01 – 5	–	90	[88] [89]
	ХЛ / люминол – Co(II)	0.003 – 0.5			[90]
	СФ / Fe(II) - трипиридилтриазин	100 – 600	30	20	[91]
	СФ / Cu(II) - ВСА	10 – 100 или 2 – 20 мкг/мл	95	54	[92]
Ade	ХЛ / Люминол – K ₂ Cr ₂ O ₇	0.001 – 3	90	78	[93]

Заслуживают внимания работы, посвященные созданию ПИ-систем для спектрофотометрического определения UA или НХап.

Для определения НХап, экстрагируемого из мяса рыбы, была предложена одноканальная ПИ-СФ-система с ферментным реактором (ксантиноксидаза + каталаза), схематически представленная на рис.1.9 [84].

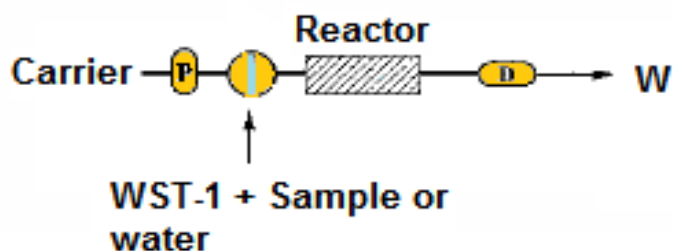


Рисунок 1.9. Схематическое изображение ПИ-СФ-системы с ферментным реактором для определения НХап (взято из [84]).

В основу анализа положено каталитическое окисление НХап в ферментном реакторе с образованием супероксид-радикалов, детектируемых далее по

фотометрической реакции с водорастворимой натриевой солью 4-[3-(4-иодофенил)-2-(4-нитрофенил)-2H-5-тетразолий]-1,3-бензол дисульфоната (WST-1), протекающей с образованием формазана. При этом раствор WST-1 подавался в систему в смеси с пробой (или водой).

Для спектрофотометрического определения UA в моче предложены две различные системы: ПИ-система с мультипозиционным детектором (рис.1.10) [91]; микронасосная система с *on-line* разбавлением анализируемой пробы (рис.1.11) [92].

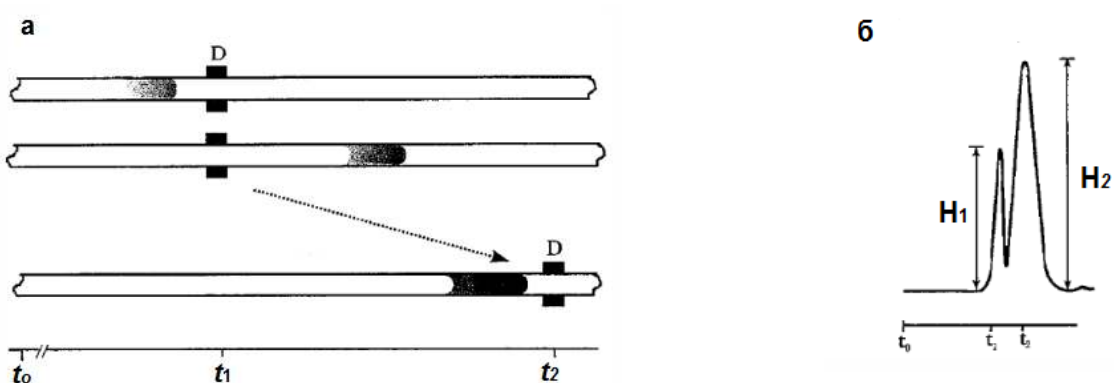


Рисунок 1.10. а.– Изменение расположение детектора (D) в проточной системе; б. – типичные ПИ-сигналы, регистрируемые при нахождении детектора в двух разных позициях (взято из [91]).

В основу регистрации фотометрического сигнала положены реакции восстановления ионов Fe(III) или Cu(II) под действием UA и последующее детектирование окрашенных комплексов восстановленных ионов Fe(II) с трипиридилтриазином [91] или Cu(I) с 2,2'-бихинолин 4,4'-дикарбоновой кислотой (BCA) [92].

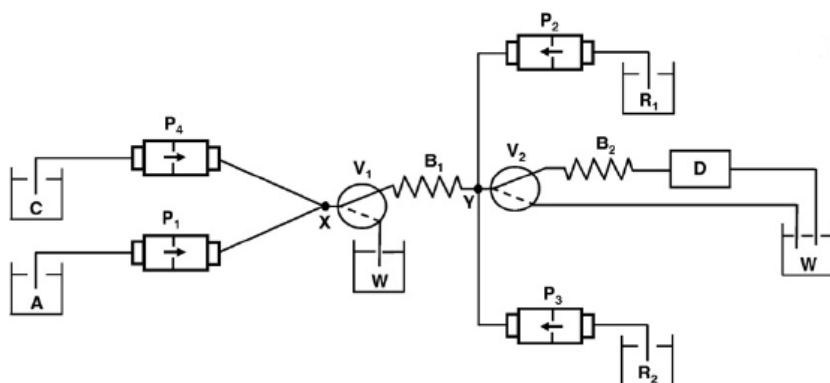
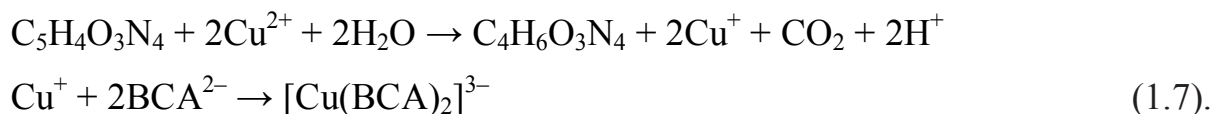


Рисунок 1.11. Схематическое изображение проточной системы с соленоидными микронасосами ($P_1 - P_4$) для спектрофотометрического определения UA: С – носитель (NH_4OH); А – проба; $R_1 - \text{CuSO}_4 + \text{NH}_4\text{Ac}$; $R_2 - \text{BCA}$ (взято из [92]).

В последнем случае механизм аналитического процесса описан следующей реакционной схемой:



Преимущества использования рассмотренного метода в клинической лаборатории по сравнению с общеизвестным методом обращенно-фазовой жидкостной хроматографии состоит в более высокой скорости и низкой стоимости анализа, а также в минимизации токсичных сливов.

Для определения следов Ade в сыворотке крови был предложен ПИ-ХЛ-метод на основе реакции люминол – $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ – NaOH в мицеллярной среде (рис.1.12) [93].

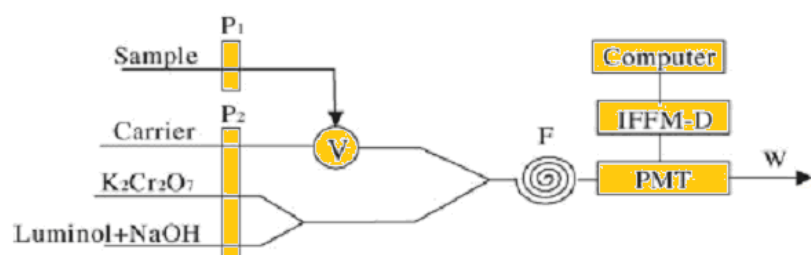


Рисунок 1.12. Схематическое изображение ПИ-ХЛ-системы для определения Ade (взято из [93]).

В этом случае растворы реагентов подаются в распределительный модуль по отдельным каналам и смешиваются непосредственно перед поступлением в проточную ячейку детектора (F).

ПИ-системы с электрохимическим детектированием. Способность пуриновых оснований и их метаболитов к окислению позволила разработать методы ПИА на основе их электрохимического детектирования на различных электродах. Первая работа на эту тему выполнена Дж. Томасом (J.D.R. Thomas) с сотр., которая была посвящена созданию метода для косвенного амперометрического определения NH_4an с помощью би-ферментного сенсора (платиновый электрод, покрытый нейлоновой мембраной с иммобилизованными ферментами – ксантин оксидазой и пероксидазой) и гексацианоферрата(II) в качестве редокс-медиатора [94]. Позднее были опубликованы работы,

относящиеся к использованию ферментных реакторов в сочетании с кислородным или пероксид-водородным сенсором [95,96]. Для определения UA в биологических жидкостях также была предложена ПИ-система с потенциометрическим детектированием на графитовом электроде с ПВХ-мембраной, содержащей липофильный ионный ассоциат аниона UA с батофенантролинатным комплексом Fe(II) [97]. Предел обнаружения UA – 8 мкг/мл, производительность Q – 120 ч⁻¹.

Начиная с 2004 г., в качестве электрохимических сенсоров для определения UA, а также Ade, Gua и их производных в ПИА стали применять модифицированные твердые электроды. Аналитические характеристики предложенных ПИ-систем такого типа для определения UA приведены в табл.1.5.

На рис.1.13 дано схематическое изображение ПИ-системы для определения UA в разбавленной моче [100]. Для измерения амперометрического сигнала была использована проточная трехэлектродная ячейка с трубчатым СУЭ. В работе [102] предложен способ амперометрического детектирования гидроксипуринов на СУЭ, модифицированным смешанно валентными оксидами рутения и иридия, в одноканальной ПИ-системе.

Таблица 1.5 – ПИ-системы для амперометрического определения UA

Рабочий электрод	E , В (отн. Ag AgCl)	Диапазон линейности, мкМ	Q , ч ⁻¹	V , мкл	Ссылка
Массив из 24 золотых микроэлектродов, покрытых Pd	+ 0.75	0.34 – 1.68 мкг/мл	–	400	[98]
СУЭ, модифицированный пленкой поли-(N,N-диметиланилина)	+ 0.5	2 – 21	60	5	[99]
Электрохимически активированный СУЭ	+ 1.2	2 – 6	120	100	[100]
		100 – 800	60	4	[101]

Показано, что предельно допустимая скорость потока не должна превышать 3 мл/мин, так как при более высоких скоростях заметно ухудшается воспроизводимость измерений. Отмечено мешающее влияние Саf, а также избытка аскорбиновой кислоты. В связи с тем, что суточная концентрация UA в моче обычно составляет 1.49 – 4.46 мМ или 250-750 мкг/мл, те же авторы впоследствии разработали ПИ-систему с on-line разбавлением пробы в 2500 раз [101].

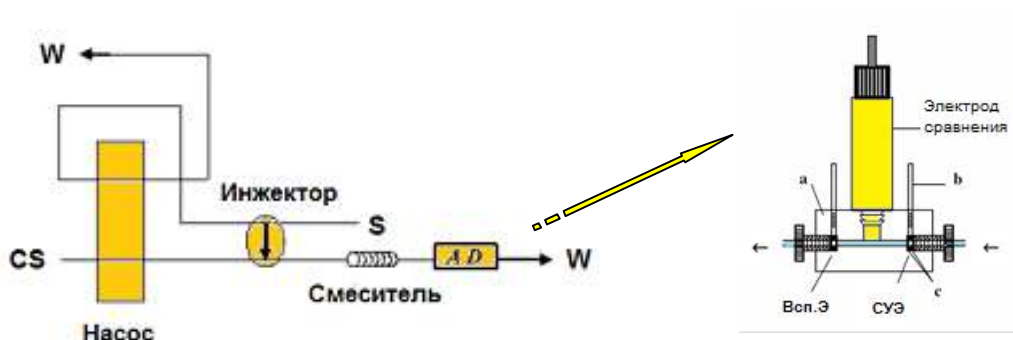


Рисунок 1.13. Схематическое изображение ПИ-системы с амперометрическим детектированием UA в моче. CS: 0.5 М H₂SO₄ (взято из [100]).

Установлено, что такой электрод проявляет каталитическую активность при окислении UA, Хап и НХап, что позволяет определять эти вещества в диапазоне концентраций 0.5 – 5000 мкМ. Производительность системы – до 90 ч⁻¹ (при объеме проб 800 мкл и времени отклика электрода 40 с).

ПИ-система со СУЭ [103] была использована для изучения электрохимического поведения Ade и его производных (аденозин, 2-аминопурин, 2,6-диаминопурин, 6-бензиламинопурин, аденозин монофосфат циклического аденозинмоно-фосфат, никотинамид-аденин-динуклеотид, аденозинтрифосфат, S-аденозил- L-метионин и синтетические производные AD-3, AD-6 и AD-9). Выбраны оптимальные условия их определения: рабочий потенциал 1.1 В, рН среды – 3, скорость потока носителя – 0.75 мл/мин.

Аналитические характеристики методов ПИА, разработанных для определения Ade и Gua, суммированы в табл.1.6.

Таблица 1.6 – Методы ПИА для электрохимического определения Ade и Gua

Вещество	Рабочий электрод	E , В (отн. Ag AgCl)	Диапазон линейности, мкМ	Q , ч ⁻¹	V , мкл	Ссылка
Ade	СУЭ	+1.1	0.1 – 100 или 0.014 – 13.5 мкг/мл	–	–	[103]
Gua	ГЦКР/СУЭ	+1.05	1 – 1000	–	800	[104]
Gua Ade	RuPtCl ₆ /СУЭ	+1.05 +1.35	0.5 – 5000 0.05 – 5000	–	–	[105]
Gua Ade	Хитозан – УНВ / СУЭ	+ 0.80 +0.95	0.2 – 50	40	20	[106]
Gua Ade	Fe(bpy) ₃ ²⁺ -МУНТ- Нафион/СУЭ	+0.7 +1.0	2 – 700 30 – 100	48		[107]

Обозначения: ГЦКР – гексацианокобальтат(III) рутения (III); УНВ – углеродное нановолокно.

Для одновременного определения пуриновых оснований в присутствии пиримидиновых оснований разработана ПИ-система с использованием электрохимического детектора (DECD), содержащего два рабочих СУЭ, поверхность которых модифицирована пленкой хитозана с углеродными нановолокнами (GCE/Chit-CNF) (рис.1.14) [106]. Такой детектор позволяет одновременно регистрировать сигналы в варианте ДИВА при двух значениях потенциалов, один из которых отвечает окислению Gua, а второй – Ade и Gua.

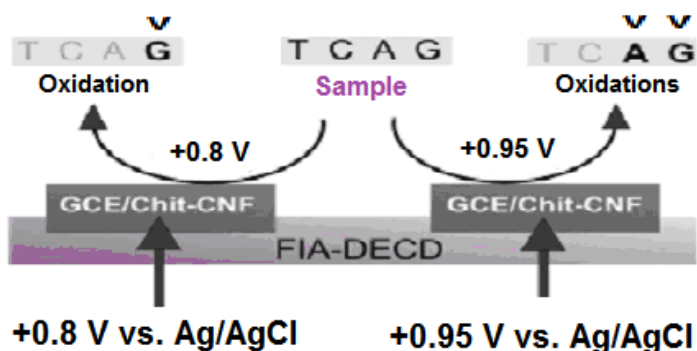


Рисунок 1.14. Иллюстрация анализа смеси пуриновых оснований в ПИ-системе с двухканальным амперометрическим детектором (взято из работы [106]).

Количество Ade рассчитывали по разности между пиками. Скорость потока носителя (фосфатный буферный раствор, pH 7) – 0.8 мл/мин. Предложенная система была успешно использована для определения Ade и Gua в говяжьих почках, а также для исследования процессов гибридизации ДНК.

В работе [107] для избирательного электрохимического детектирования пуриновых оснований в присутствии пиримидиновых оснований (тимина и цитозина) предложена ПИ-система со СУЭ, поверхность которого покрыта слоем многостенных углеродных нанотрубок (MWCNT), модифицированных нафием (Nf) с адсорбированными комплексами железа с 2,2'-бипиридином (bpy) (рис.1.15).

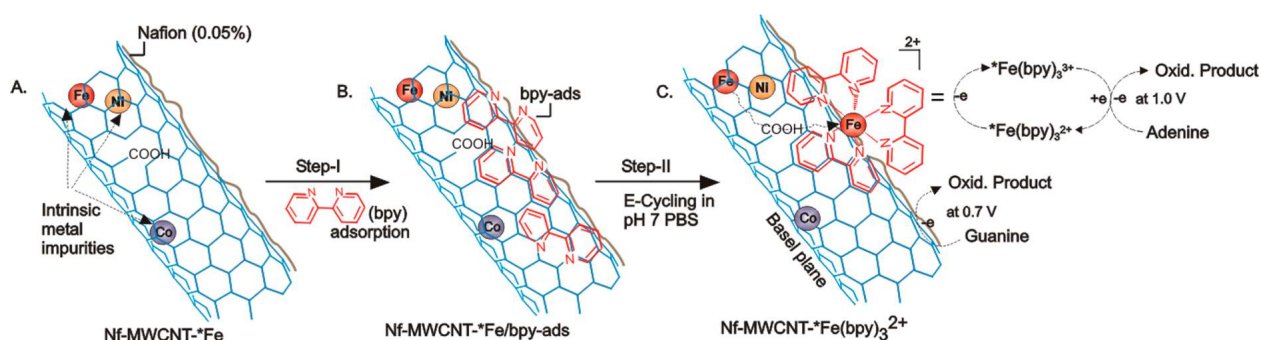


Рисунок 1.15. Иллюстрация *in-situ* комплексообразования редокс-активного комплекса примесного Fe, содержащегося в многостенных углеродных нанотрубках (≈ 2.1 % масс.), с 2,2'-бипиридином (bpy) и механизм его каталитического действия в электроокислении Ade (взято из [107]).

Значения пределов обнаружения Ade и Gua в этом случае примерно в 10 раз ниже, чем полученные ранее методами ВЭЖХ с детектированием в УФ и видимой областях спектра [28, 108]. В работе [109] показаны возможности количественного определения нуклеиновых кислот в ПИ-системе с амперометрическим детектированием на угольнопастовом электроде.

1.3.2 Методы последовательно-инжекционного анализа

В последние годы были разработаны миниатюризированные проточные системы для определения НХап и пуриновых оснований на основе принципов ПослИА (табл.1.7).

Таблица 1.7 – Системы ПослИА для определения гипоксантина и пуриновых оснований

Вещество	Метод детектирования	Диапазон линейности, мкМ	Q , ч^{-1}	V , мкл	Ссылка
HXan	Ферментный реактор / СФМ, 290 нм	6 – 40	15	150	[110]
	ВА на Fe_3O_4 -МУНТ- β -CD / СУЭ	0.05 – 10	20	400	[111]
Gua Ade	ДИВА на $\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ - β -CD / СУЭ	0.1 – 10	–	500	[112]

Наибольший практический интерес представляют электроаналитические системы ПослИА типа *lab-on-valve*, предложенные китайскими исследователями [111,112]. В частности, на рис.1.16 дано схематическое изображение такой системы с электрохимическим детектором для определения HXan. Протокол функционирования системы включал первоначальное пропускание через систему 500 мкл 0.1 М фосфатного буферного раствора (PBS), а затем последовательное введение в спираль-накопитель (НС) 400 мкл PBS, 100 мкл воздуха, 400 мкл пробы (S) и 1600 мкл PBS.

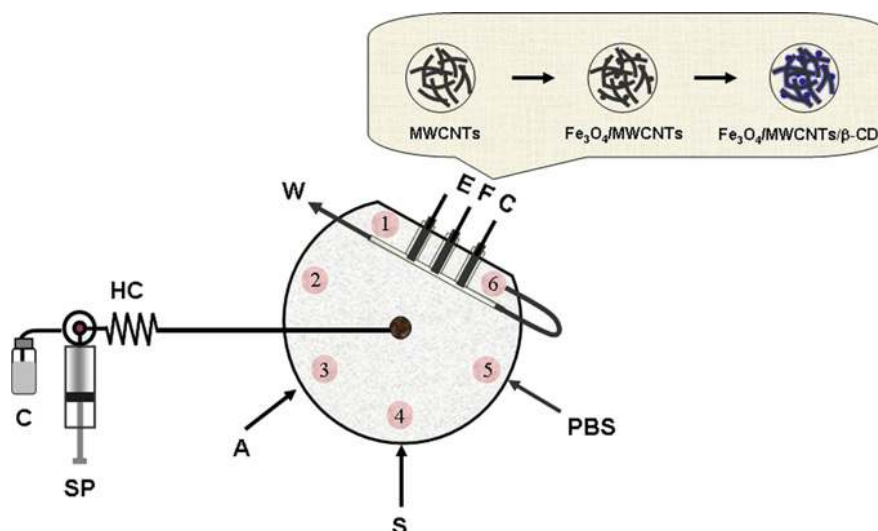
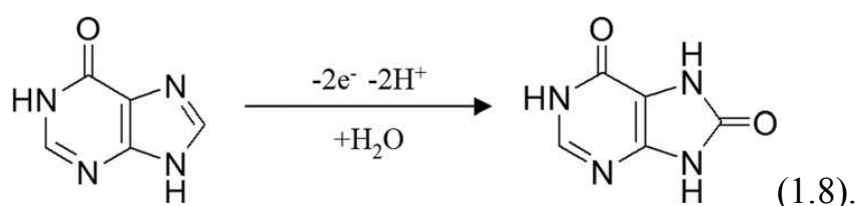


Рисунок 1.16. Схематическое изображение системы ПослИА типа *lab-on-valve* с вольтамперометрическим детектором. С: носитель (вода); SP: шприцевой дозатор; НС – спираль-накопитель; А – воздух; S – проба; PBS – фосфатный буферный раствор; EFC – электрохимическая ячейка (200 мкл) (взято из [111]).

После этого, поток направлялся в проточную электрохимическую ячейку (EFC) со скоростью 16 мкл/с. При этом НХап аккумулировался на поверхности рабочего электрода при -0.1 В в течение 120 с, после чего проводилась регистрация вольтамперометрического сигнала в пределах $+0.8 - +1.2$ В (отн. Ag/AgCl). В качестве рабочего электрода был использован СУЭ, модифицированный наноконкомпозитом, состоящим из МУНТ, функционализированных Fe_3O_4 , и β -циклодекстрина (β -CD). Максимальный ток необратимого окисления НХап на таком электроде наблюдался при $+1.47$ В (рН 7.5):



Разработанная система была использована для определения НХап в супернатантных пробах рыбы и мяса без пробоподготовки.

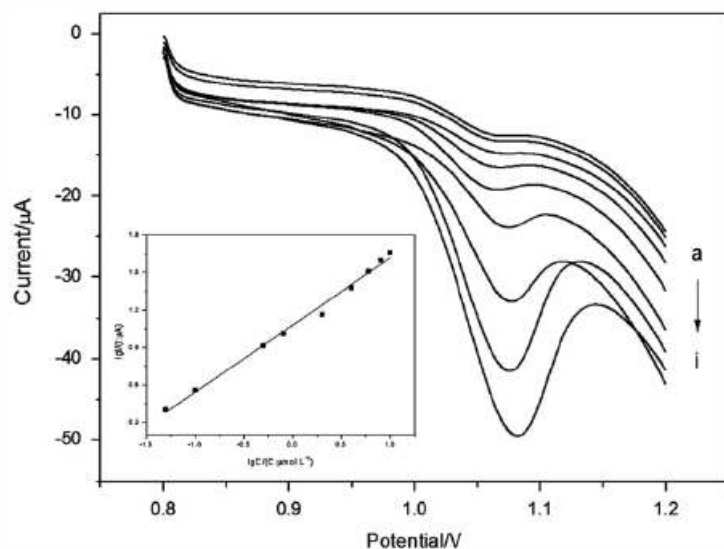


Рисунок 1.17. Вольтамперограммы, полученные на Fe_3O_4 -МУНТ- β -CD / СУЭ в растворах с различной концентрацией НХап от 0.05 до 10 мкМ (взято из [111]).

Подобный подход был реализован для одновременного электрохимического определения Gua и Ade на СУЭ, модифицированным композитом $\text{Cu}_3(\text{BTC})_2$ - β -CD, в физиологических жидкостях и пищевых продуктах [112].

1.4 Проточные методы определения синтетических аналогов дезоксигуанозина

Важную группу фармацевтически активных аминопроизводных пурина представляют вещества – синтетические аналоги дезоксигуанозина, содержащие гуанидиновую группировку ($-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}-)=\text{N}-$): ACV, VACV, GCV и FCV.

К настоящему времени для количественного определения ACV и GCV разработаны ПИ-системы с хемилюминесцентным детектированием [113 – 118], а для FCV – с потенциометрическим детектированием [119]. Аналитические характеристики этих методов суммированы в табл. 1.8.

Таблица 1.8 – Аналитические характеристики ПИ-систем для определения синтетических производных дезоксигуанозина с противовирусной активностью

Вещество	Метод детектирования	Диапазон линейности, мг/л	$Q_{\text{ч}^{-1}}$	Ссылка
ACV	Электрохемилюминесценция	0.79 – 130 мкМ	60	[113]
	ХЛ / $\text{KMnO}_4 - \text{HCHO}$	0.2 – 80	120	[114]
	ХЛ / $\text{H}_2\text{O}_2 - \text{Co(II)}$	0.8 – 60	–	[115]
	ХЛ / люминол – H_2O_2	0.09 – 3 мкМ	–	[116]
ACV GCV	ХЛ / $\text{Ce(IV)} - \text{Родамин В} - \text{H}_2\text{SO}_4$	30 – 70000 50 – 70000	90	[117,118]
FCV	Потенциометрия с мембранным ИСЭ	0.01 – 10 мМ	–	[119]

Эффективный метод ПИА с электрохемилюминесцентным детектированием для определения ACV описан в работе китайских исследователей [113]. Механизм индикации основан на способности ACV повышать интенсивность электрохемилюминесценции люминола ($\Delta I_{\text{эхл}}$), генерируемой с помощью *on-line*

гальванической ячейки, в щелочной среде (рис.1.18). Полученное уравнение градуировочного графика имело вид ($n=7$, $P = 0.90$):

$$\Delta I_{\text{экл}} = 12.45 (\pm 0.12) c_x + 22.1 (\pm 6.2) \quad (1.9).$$

Предлагаемый метод применен к определению АСВ в фармацевтических препаратах. Надежность метода была проверена путем проведения параллельных определений и методом добавок.

В работе [114] описан метод ПИА для определения АСВ на основе мониторинга хемилюминесцентной реакции между АСВ и перманганатом калия в присутствии формальдегида. Предложенный метод характеризуется высокой чувствительностью с пределом обнаружения 0.06 мг/л. Метод был применен для анализа лекарственных форм.

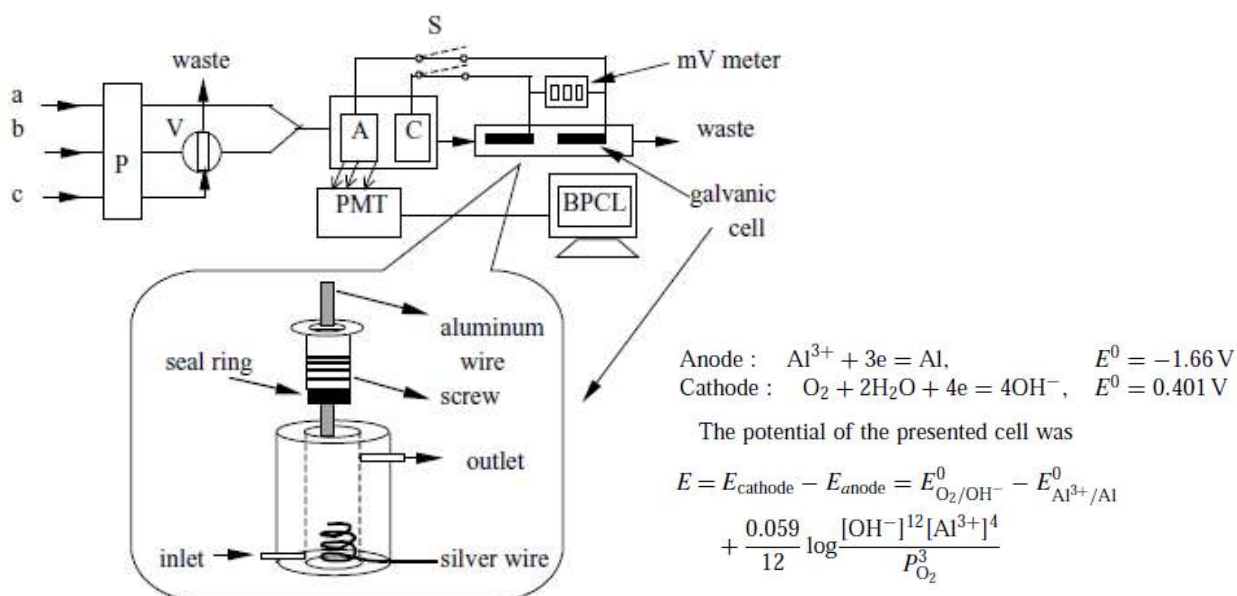


Рисунок 1.18. ПИ-система с *on-line* гальванической ячейкой (взято из [113]).

Еще один вариант ПИ-метода с хемилюминесцентным детектированием был описан для определения АСВ и GCV в работах (рис.1.19) [117, 118]. Анализ в системе основан на измерении интенсивности хемилюминесцентного излучения, получаемого в ходе окислительно-восстановительной реакции АСВ или GCV с Се(IV) в присутствии Родамина Б в среде H_2SO_4 . Было исследовано влияние концентраций Се(IV), Родамина Б, H_2SO_4 на ход реакции.

Метод характеризуется широким диапазоном определяемых концентраций и был применен для определения ACV и GCV в инъекциях.

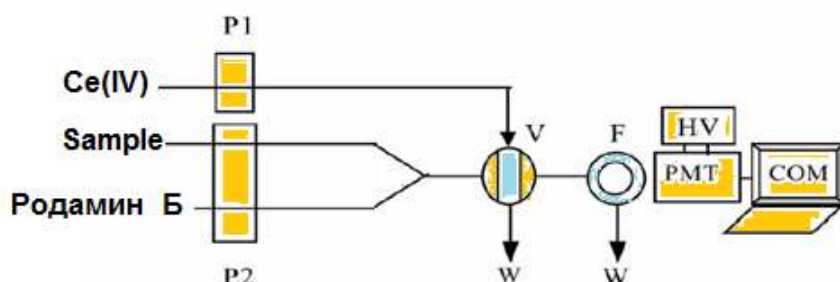


Рисунок 1.19. Схематическое изображение ПИ-системы для хемилюминесцентного детектирования ACV или GCV (взято из [118]).

В работе [119] показаны возможности потенциометрического определения FCV с помощью двух новых мембранных ионоселективных электродов (ИСЭ), содержащих в качестве электродноактивных компонентов ионные ассоциаты FCV с фосфорновольфрамовой или фосфорномолибденовой кислотой. Были изучены различные экспериментальные условия: тип пластификатора мембраны, стабильность и набухание поверхностного слоя мембраны, pH, температура и мешающее влияние посторонних веществ. Показано, что метод может быть применен для рутинного фармацевтического анализа и при проведении «теста на растворение».

В целом, обзор литературы показал, что использование методологии ПИА и ПослИА позволяет создавать высокоэффективные автоматизированные методы анализа и исследования фармацевтических препаратов, пищевых продуктов и физиологических жидкостей [50 – 58]. Преимущества практического применения таких методов обусловлены многими факторами, в частности использованием недорогой аппаратуры, возможностью выполнения сложных операций пробоподготовки в режиме *on-line* (разделение/концентрирование, физико-

химические превращения, диализ, режим «остановленного потока» и т.д.) в сочетании с простыми регистрирующими устройствами.

Пурины представляют собой важнейший класс азотсодержащих гетероциклических соединений, среди которых особую роль в процессах жизнедеятельности играют 9Н-пурины, а именно пуриновые основания – аденин и гуанин и синтетические производные гуанозина, а также 7Н-пурины – пуриновые алкалоиды. В связи с этим, разработка простых и высокопроизводительных методов фармакологического скрининга биологически активных пуринов и их количественного определения в жизненно важных объектах имеет первостепенное значение. К настоящему времени количество статей в мировых изданиях, посвященных определению этих веществ на основе принципов ПИА и новейших разновидностей, ограничено (< 60). Из них всего несколько работ относится к описанию систем со спектрофотометрическим детектированием пуриновых алкалоидов, главным образом кофеина. При этом в большинстве случаев детектирование проводится по собственному поглощению растворов данных веществ в ультрафиолетовой области спектра, что негативно сказывается на селективности и чувствительности их определения.

Особый интерес представляют проточные системы с электрохимическими детекторами [119,120]. Разработанные системы последовательно-инжекционного электроанализа для определения пуриновых оснований не только не уступают по своим аналитическим характеристикам другим проточным методам, но и имеют ряд преимуществ, таких как экономичность, экологическая безопасность и относительно низкий расход потребляемых реагентов.

Однако, несмотря на успехи, достигнутые в этой области, актуальным остается развитие фундаментальных исследований, 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 окисления.

ГЛАВА 2 Объекты и техника экспериментальных исследований

2.1 Объекты исследования

В качестве объектов исследований были выбраны биологически активные производные пурина (7Н- и 9Н-пурины), указанные в табл.2.1 и 2.2.

Таблица 2.1 – Структуры исследуемых в работе природных производных пурина

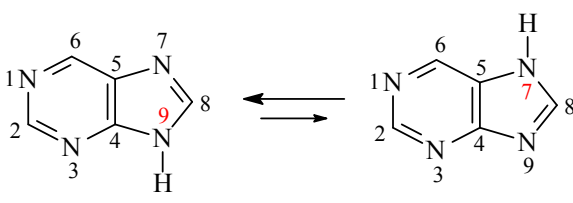
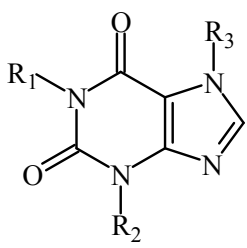
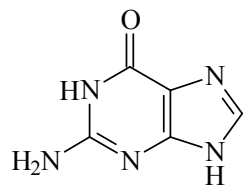
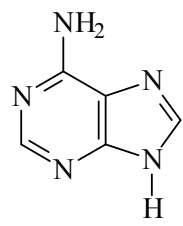
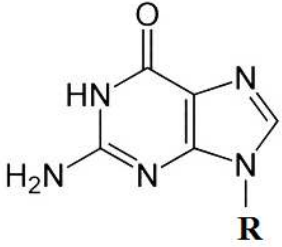
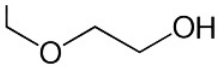
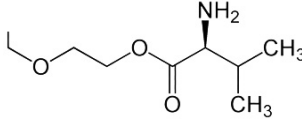
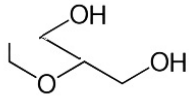
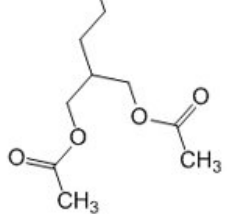
Структурная формула	Систематическое название	Аббревиатура
	Имидазо[4,5-d]пиримидин	Пурин
	R ₁ H R ₂ H R ₃ H	3,7-дигидропурин-2,6-дион
	CH ₃ CH ₃ H	1,3-диметил-3,7-дигидро-1Н-пурин-2,6-дион
	CH ₃ CH ₃ C H ₃	1,3,7-триметил-1Н-пурин-2,6 (3Н,7Н)-дион
	H CH ₃ C H ₃	3,7-диметил-2,3,6,7-тетрагидро-1Н-пурин-2,6-дион
	2-амино-1Н-пурин-6(9Н)-он	Гуанин (Gua)
	9Н-пурин-6-амин	Аденин (Ade)

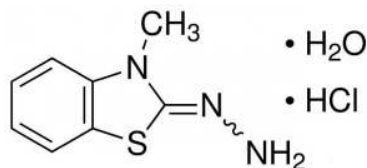
Таблица 2.2 – Структуры исследуемых в работе синтетических аналогов дезоксигуанозина

Структурная формула	R:	Систематическое название	Аббревиатура
		2-Амино-9-[(2-гидрокси-этокси)-метил]-1Н-пурин-6(9Н)-он	Ацикловир (ACV)
		2-[(2-Амино-6-оксо-6,9-дигидро-3Н-пурин-9-ил)метокси]-этил-2-амино-3-метилбутаноат	Валацикловир (VACV)
		2-Амино-1,9-дигидро-9-[[2-гидрокси-1-(гидроксиметил)-этокси]метил]-6Н-пурин-6-он	Ганцикловир (GCV)
		2-[2-(2-Амино-9Н-пурин-9-ил)-этил]-1,3-пропандиол диацетат(эфир)	Фамцикловир (FCV)

2.2 Реагенты и растворы

Растворы исследуемых веществ готовили из реактивов квалификации «ос.ч.» или «ч» (Sigma-Aldrich Chemical Corp. USA). Исходные растворы ксантина (0.5 мМ), теofilлина и кофеина (0.01 М или 1000 мкг/мл), теобромина (2.5 мМ или 500 мкг/мл) и парацетамола (1000 мкг/мл) готовили растворением точных навесок препаратов в 100 мл воды или в растворах кислот. Исходные растворы аденина и гуанина (0.01 М или 1.0 мг/л) готовили растворением точных навесок препаратов в NaOH (0.05 М или 5.0 мМ). Исходные растворы синтетических аналогов дезоксигуанозина (1.0 мг/л) готовили в 5 мМ NaOH. Все растворы хранили в темноте при 4 °С. Рабочие растворы готовили путем пошагового разбавления исходных растворов фоновым электролитом и хранили не более 12 часов.

Исходный раствор 3-метил-2-бензотиазолинонгидазона (0.01 М) готовили растворением точной навески препарата (97 %, Sigma_Aldrich Chem. Comp.) в воде:



Исходный раствор KIO_4 (0.01 М) готовили растворением точной навески препарата (99.8%, Sigma_Aldrich Chem. Comp.) в 0.05 М ацетатном буферном растворе (рН 3–8).

Ацетатный буферный раствор (АцБР), буферный раствор Бриттона-Робинсона и фосфатный буферный раствор (ФБР) готовили из реактивов квалификации «ос.ч.» или «ч» (Sigma-Acros Org.) с добавлением 0.1 М KCl . ФБР с различным значением рН готовили из 0.1 М NaH_2PO_4 и 0.1 М Na_2HPO_4 и значение рН доводили растворами 0.1 М H_3PO_4 или 5.0 мМ NaOH .

Водные растворы кислот (H_2SO_4 , H_3PO_4 , HClO_4 , HCl и CH_3COOH) и NaOH готовили из концентрированных кислот квалификации «ос.ч.» или «ч». (Sigma-Acros Org.). Другие использованные органические вещества были квалификации «ос.ч.» и использовались без предварительной очистки.

Все растворы готовили на бидистиллированной воде ($3 - 5 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, 25 °С), из которой предварительно удаляли кислород, и хранили в тёмных емкостях в холодильнике. Растворенный кислород удаляли током азота («ос.ч.»).

2.3 Аппаратура

Основное оборудование. Для реализации ПИА применяли установку FIAstar-5010 Analyzer (Tecator, Швеция), снабженную двумя программируемыми перистальтическими насосами и инъекционным клапаном-дозатором, в комплекте с электрохимическим детектором или спектрофотометрическим детектором. Проточные системы монтировали с использованием потокораспределительных модулей типа Chemifold I и II той же фирмы, содержащих коммуникации в виде капиллярных трубок и спиралей внутренним диаметром 0.5 мм для соединения с инжектором и проточной кюветой детектора. Объем дозирующей петли инжектора варьировали в пределах 30–500 мкл.

Для реализации ПослИА использовали компьютеризированную установку FIAlab-3500 (FIAlab Instruments Inc., США), снабженную плунжерным насосом объемом 2.5 мл и мультипозиционным инжекционным клапаном Cheminert (Valco Instrument Co., США).

Спектрофотометрические измерения проводили с использованием спектрофотометра 5023 (Tecator, Швеция) с проточной кюветой ($V = 18$ мкл, $l = 10$ мм) и персональным компьютером или с помощью оптоволоконного детектора Ocean Optics USB-2000 (Ocean Optics Inc., США) с проточной кюветой SMA-Z-10 ($V = 26$ мкл, $l = 10$ мм) и источником излучения LS-1 (Ocean Optics Inc., США).

Все электрохимические измерения проводили с помощью вольтамперометрического комплекса ЭКОТЭСТ-ВА (ООО «Эконикс-Эксперт», Москва), управляемого персональным компьютером с помощью программ MDEV, в трехэлектродных ячейках (проточного типа «отражающая стенка» или стационарного типа) при комнатной температуре (23 ± 2 °C). В качестве рабочего электрода использовали углеситалловый электрод (ООО НТФ «Вольта»). Вспомогательным электродом служил проволочный платиновый электрод (ЭВП-1), электродом сравнения – хлоридсеребряный электрод R-173 (Kyoto Electronics). Циклические вольтамперограммы регистрировали при скорости развертки потенциала поляризации ν в пределах 0.01 – 0.30 В/с.

Активацию поверхности рабочего электрода проводили в две стадии: сначала в ультразвуковой ванне, поочередно выдерживая электрод в разбавленной HNO_3 (1:1), этиловом спирте и бидистилляте в течение 2-3 мин, а затем электрохимически методами потенциостатической при +1.4 В и анодно-катодной поляризации в 0.1 М HClO_4 в области +1.0 – -0.5 В. Электрод высушивали в токе чистого азота. Непосредственно перед измерениями активированный электрод обрабатывали методом циклической вольтамперометрии в растворе фонового электролита. Перед активацией поверхность электрода полировали порошком оксида алюминия (0.3 м 0.05 мкм) до зеркального блеска.

Вспомогательное оборудование. Ультразвуковую обработку УСЭ проводили в ультразвуковой ванне E-ONE (Elma, Германия). Рабочая частота

ультразвукового воздействия составляла 35 кГц. Значение pH растворов измеряли с помощью pH-метра OP-110 (Radelkis, Венгрия) с погрешностью ± 0.01 ед. pH. Для регистрации электронных спектров поглощения растворов использовали спектрофотометр модели JENWAY 6705 (Bibby Scientific Ltd.) с кварцевой кюветой ($l = 10$ мм). Для пробоподготовки таблетированных лекарственных препаратов использовали центрифугу UniCen M (Herolab, Германия).

Морфологию поверхности изучали с использованием электронного микроскопа Carl Zeiss NVision 40 (Carl Zeiss Group, Германия). Электронные микрофотографии были получены сотрудником ИОНХ РАН с.н.с. Баранчиковым А.Е.

2.4 Методики анализа различных образцов

Анализ лекарственных форм. В качестве объектов анализа были использованы коммерчески доступные лекарственные препараты, содержащие пуриновые производные. Такие препараты обычно выпускаются в виде таблеток, мазей, гелей или растворов для инъекций.

При пробоподготовке таблетированных форм, взвешивали и тщательно измельчали пять таблеток каждого препарата. Необходимое количество измельченного препарата растворяли в бидистилляте или в растворе фонового электролита в условиях ультразвукового воздействия. Затем полученный раствор центрифугировали (из-за присутствия нерастворимых вспомогательных веществ) и фильтровали в мерную колбу, доводя фоновым электролитом до метки. Приготовленные растворы были использованы в качестве исходных для всех исследований. Рабочие растворы были приготовлены соответствующим разбавлением исходных. При анализе глазного геля точную навеску образца растворяли в соответствующем объеме фонового электролита. При анализе раствора для инъекций 100 мкл пробы разбавляли до 100 мл фоновым электролитом.

Неизвестную концентрацию вещества определяли по градуировочному графику или методом добавок. Проверку правильности и воспроизводимости

результатов проводили сопоставлением с сертифицированными данными и/или по способу «введено-найдено».

Анализ биологических жидкостей и ДНК. При анализе биологических жидкостей (искусственная моча, грудное молоко и модельный раствор желудочного сока) необходимые объемы проб разбавляли фоновым электролитом.

Депуринизацию ДНК проводили обработкой образца 70 % HClO_4 при нагревании и перемешивании в течение 10 мин и последующей нейтрализацией 9 М NaOH .

2.5 Статистическая обработка результатов

Полученные экспериментальные данные обрабатывали методами математической статистики с применением распределения Стьюдента. При статистической обработке градуировочных графиков рассчитывали параметры уравнения ($y = a + bx$) методом линейной регрессии без учета весов. Предел обнаружения c_{\min} оценивали по формуле:

$$c_{\min} = \frac{3s_x}{b} \quad (2.1),$$

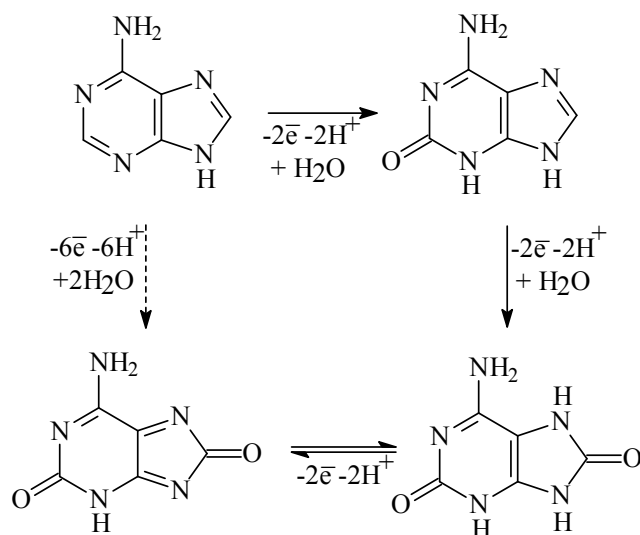
где s_x – относительное стандартное отклонение аналитического сигнала фона (нулевая линия), b – коэффициент чувствительности, равный тангенсу угла наклона прямолинейного градуировочного графика.

Правильность характеризовали показателем правильности ПП (%):

$$\text{ПП (\%)} = (\text{найдено/введено}) \times 100 \quad (2.2).$$

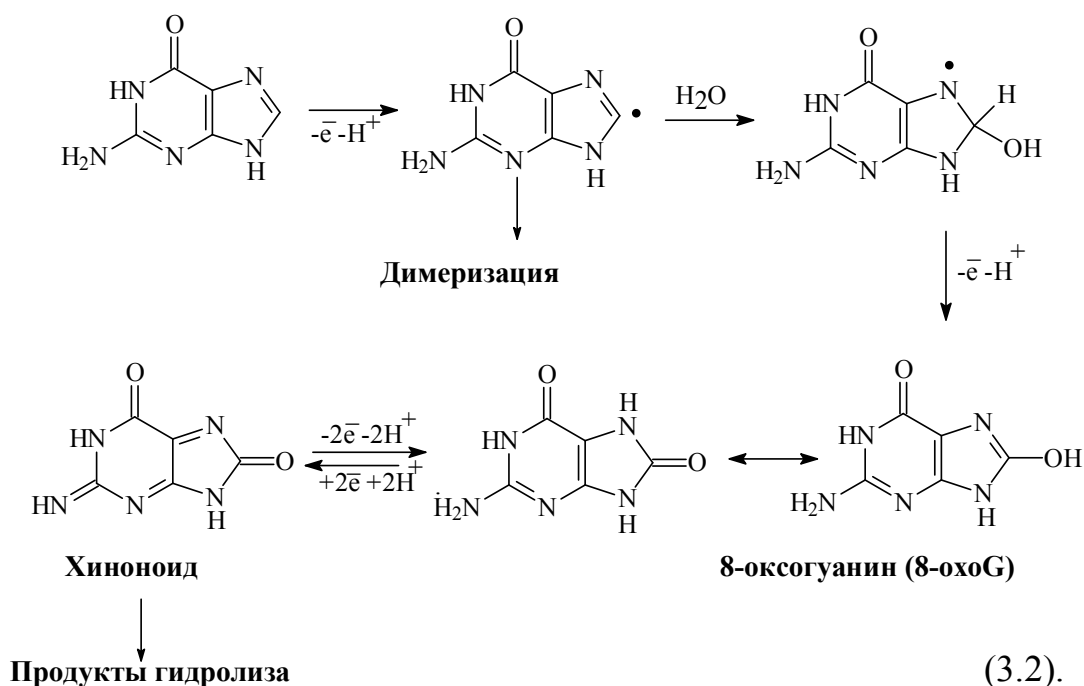
ГЛАВА 3 Вольтамперометрическое поведение 7Н- и 9Н-пуринов на активированном углесталловом электроде

Вопросы, связанные с вольтамперометрическим поведением биологически активных пуринов, являются предметом изучения многих ученых, так как предполагается, что механизм их электроокисления аналогичен процессам ферментативного окисления в живых организмах [121,122]. К настоящему времени опубликован целый ряд работ, относящихся к изучению редокс-поведения пуринов на различных электродах, в частности пуриновых оснований и их нуклеозидов [123 – 133], синтетических аналогов дезоксигуанозина [134 – 137] и пуриновых алкалоидов [138 – 145]. Во всех случаях окислительный процесс протекает в несколько стадий с участием протонов и сопровождается разрушением сопряженной системы π -связей. В частности, механизм электроокисления Ade в водных растворах может быть представлен следующей реакционной схемой [132,133]:



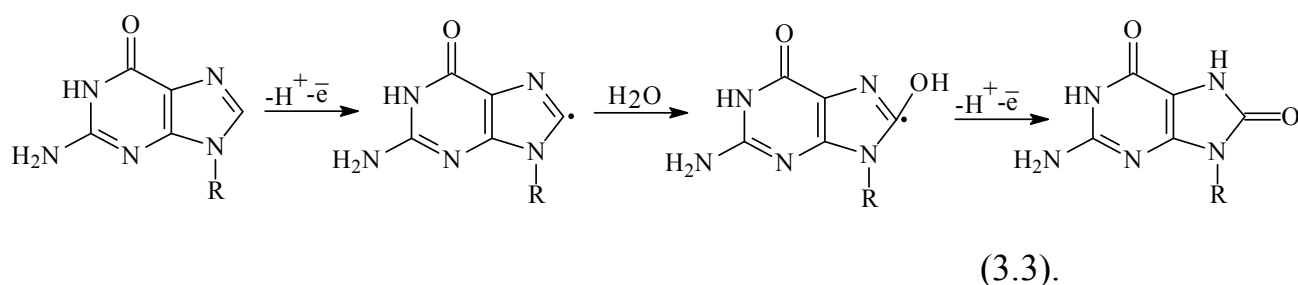
(3.1).

Независимо от природы электрода, окисление Gua предположительно протекает с отрывом четырех электронов следующим образом [128 – 130]:



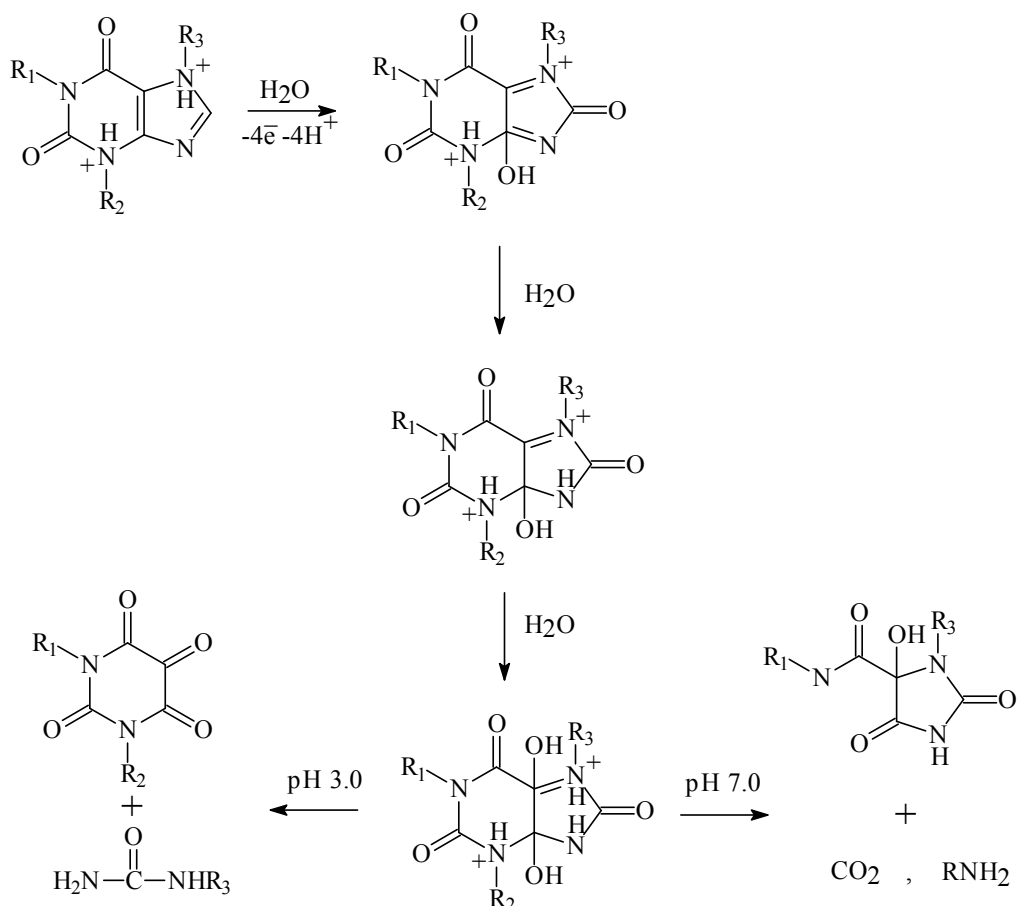
Согласно схеме, сначала Gua претерпевает необратимое окисление, которое включает отрыв двух электронов от наиболее нуклеофильной $-N_7=C_8-$ связи с образованием 8-оксогуанина (**8-охоG**). Это же соединение образуется при окислении гуанинового компонента ДНК *in vivo*. В настоящее время именно 8-охоG считается одним из основных биомаркеров окислительного стресса ДНК [146]. Далее возможно обратимое окисление по двухэлектронному механизму с образованием неустойчивого хиноноида.

Данные, полученные различными авторами по электрохимии синтетических аналогов дезоксигуанозина (ACV, GCV и др.) немногочисленны и весьма противоречивы [134 – 137]. Наиболее вероятно, электроокисление этих веществ также протекает с разрывом двойной связи $-N_7=C_8-$ имидазольного цикла с образованием 8-оксо-соединений по следующей схеме [137]:



Предполагаемый механизм электроокисления алкалоидов пуринового ряда на твердых электродах протекает с потерей 4 протонов и 4 электронов с

образованием дииминов, далее подвергающихся гидролитическому разложению, продукты которого зависят от pH среды. Процесс окисления можно представить следующей схемой [138]:



(3.4).

В связи с тем, что окисление пуринов на твердых электродах обычно характеризуется либо замедленной скоростью электрохимической стадии, либо кинетическими ограничениями за счет низкой скорости химической стадии, в последние годы стремительное развитие получило создание химически модифицированных электродов (ХМЭ), способных ускорять наблюдаемые процессы. Например, описаны ХМЭ на основе полимерных покрытий с электрокаталитической активностью к пуриновым алкалоидам (Caf и Trp) [147 – 149]; предложены электроды с каталитическими свойствами по отношению к пуриновым основаниям и их производным, изготовленные с использованием металлов платиновой группы или их соединений [104, 105, 150 – 153]. Разработаны ХМЭ с применением углеродных наноматериалов (углеродные

нанотрубки, оксид графена и др.) и композитов на их основе, которые проявляют способность катализировать процессы анодного окисления различных пуринов [154 – 161]. Однако технологические методы изготовления большинства модифицированных электродов весьма сложны, трудоемки и дорогостоящи. Кроме того, важно отметить, что срок их функционирования весьма ограничен, что особенно затрудняет применение в непрерывном режиме регистрации электрохимического сигнала. Более простыми в производстве и удобными в эксплуатации представляются электроды из химически и электрохимически активированных углеродных материалов: стеклоуглерода [162 – 165] и алмаза, легированного бором [166, 167]. Как правило, уникальные свойства активированного углерода, такие как большая площадь поверхности и наличие редокс- и кислотно-основных центров, обеспечивают улучшенные характеристики электрохимического отклика по отношению ко многим трудноокисляемым биологически активным соединениям [168, 169].

3.1 Активация и электрохимические свойства углеситаллового электрода

Существуют различные методы активации поверхности электродов из углеродных материалов, из которых наиболее широко применяются разные варианты ультразвуковой и электрохимической обработки, способствующие улучшению кинетики электродных реакций и адсорбции деполяризатора вследствие изменения состава и структуры поверхностного слоя [170 – 175].

Как правило, углеродный электрод может быть активирован либо в щелочных, либо в кислых (или нейтральных) растворах. Электрохимическая активация СУЭ в потенциодинамическом режиме в интервале $-1.0 - +0.55$ В ($v = 100$ мВ/с) в щелочной среде (NaHCO_3) использована в работе [165], посвященной определению Ade и тимина в присутствии Gua. При определении Ade и Gua в ДНК проводили активацию СУЭ, покрытого слоем фуллерена C_{60} , методом циклической вольтамперометрии в две стадии: сначала в 1М КОН в интервале от 0 до -1.5 В, а затем в фосфатном буферном растворе (рН 7) в интервале от $+0.55$

до -0.05 В (отн. Ag/AgCl) в токе азота [176]. В работах [162, 177] электрохимическую активацию поверхности СУЭ проводили в потенциостатическом режиме при потенциале $+1.75 - +1.8$ В (отн. Ag/AgCl) в слабокислой среде (рН 5) в течение 300 с. Это позволило повысить токи окисления пуриновых алкалоидов, а также обеспечить 10-кратное увеличение тока окисления пуриновых оснований за счет их адсорбционного накопления на электроде. В работе [151] активацию СУЭ, перед его модифицированием каталитически активными комплексами рутения, проводили многократным сканированием потенциала в 0.5 М растворе H_2SO_4 .

Согласно данным Кеплея и Барда [178], электрохимическая активация стеклоуглерода приводит к образованию новой высокопористой фазы с пустотами разного размера. Дальнейшие исследования показали, что структура активированной поверхности зависит от способа и условий активации. Так, быстрая электрохимическая обработка электрода приводит к увеличению емкости двойного электрического слоя и образованию поверхностных $>C=O$ групп, которые могут ускорять реакции переноса электрона [179]. Авторы работы [177] установили, что при потенциалах выше $+1.75$ В и увеличении времени активации более 300 с на активированной поверхности происходило образование тонкой голубоватой пленки, которая затем становилась золотисто-желтой или коричневатой, что ухудшало ее адсорбционные свойства. Согласно данным, полученным методом сканирующей туннельной микроскопии [180], метод анодизации в потенциостатическом режиме более эффективен по сравнению с циклической поляризацией.

Наряду со СУ, в качестве электродного материала используют углеситалл – углеродный материал, впервые синтезированный в СССР в 1968 г. [181]. Углеситалл имеет конденсационно-кристаллизационную структуру, состоящую из углеродной фазы, содержащей крупные и мелкие монокристаллические частицы соединений бора [182,183]. Мелкие частицы относятся к одной из модификаций карбида бора, а крупные – нитрида бора. Примечательно, что нитрид бора может приобретать структуру типа графита, при этом в узлах решетки чередуются атомы

бора и азота. По своим физико-механическим и технологическим свойствам углеситалл сравним со СУ, являясь хорошим проводником электрического тока и функционирующим в широком интервале потенциалов поляризации, он менее хрупок и легче поддается механической обработке.

В отличие от СУЭ, исследованию и применению которого посвящено огромное число публикаций, электроды из углеситалла (УСЭ) изучены в значительно меньшей степени. Хотя представления о структуре углеситалла в настоящее время во многом сформированы, использование УСЭ в электроаналитической химии до недавнего времени было ограничено применением для определения неорганических веществ, окисляющихся в ближней анодной области потенциалов [184]. О.Л. Кабановой с сотр. проведено детальное исследование условий использования УСЭ для определения серебра и золота методом инверсионной вольтамперометрии. Найдены способы обработки УСЭ для получения минимальных и наиболее воспроизводимых значений фоновых токов [185]. В последние годы стали появляться работы по использованию химически модифицированных УСЭ в качестве вольтамперометрических биосенсоров [186].

С целью расширения аналитических возможностей УСЭ нами была проведена активация его поверхности методом анодизации при + 1.4 В в 0.1М растворе HClO_4 в течение 60 с. и последующей анодно-катодной поляризацией путем двукратного сканирования потенциала в диапазоне (+1.0 – -0.5 В) со скоростью развертки потенциала $\nu = 0.1$ В/с. Далее электрод был обработан методом циклической вольтамперометрии, сканируя потенциал от 0.0 до +1.4 В в 0.1 М ФБР (рН 7) до получения стабильной вольтамперограммы (10 – 15 циклов). Это позволило снизить фоновые токи и увеличить область рабочих потенциалов электрода. На рис. 3.1 микрофотографии поверхности УСЭ до (А) и после (В) процесса активации.

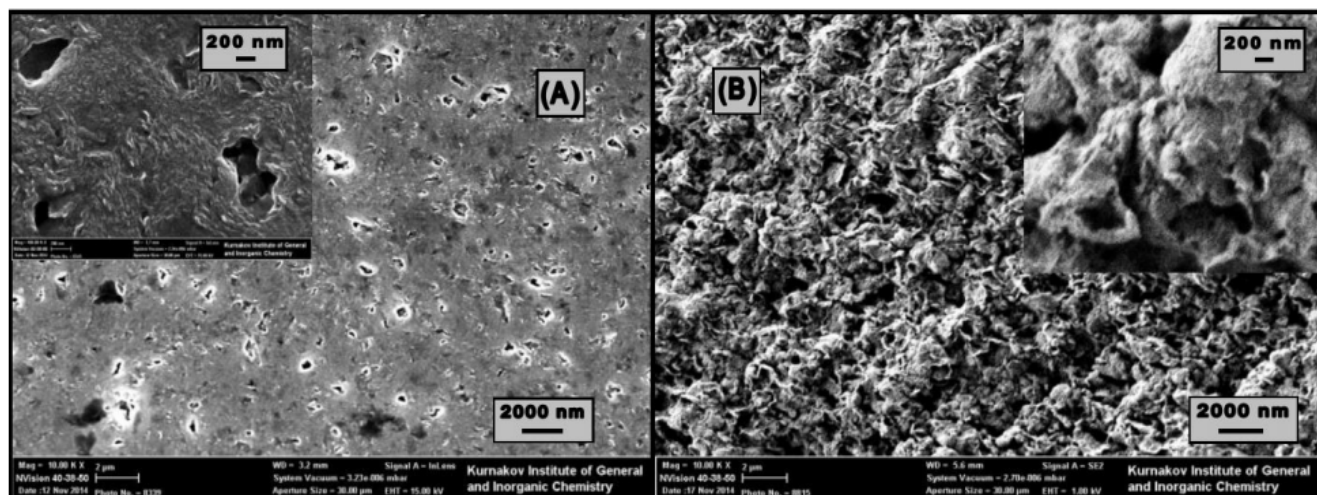


Рисунок 3.1. Микрофотографии поверхности механически обработанной (А) и активированной (В) поверхности СУЭ.

Можно видеть, что электрохимически неактивированная поверхность углеситалла достаточно гладкая, но содержит субмикронные полости (пустоты) и микрокристаллические частицы, хаотично распределенные по поверхности. После активации углеситалл приобретает высокопористую структуру с пустотами различного диаметра и диспергированными включениями соединений бора.

На рис.3.2 приведены циклические вольтамперограммы редокс-пары $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, полученные на УСЭ до и после электрохимической активации его поверхности. Сравнительный анализ циклических вольтамперограмм, полученных в 5.0 мМ растворе $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, содержащем 0.1 М KCl , на УСЭ и электрохимически активированном УСЭ (АУСЭ) показал, что в последнем случае наблюдается улучшение обратимости электродного процесса, а также заметное возрастание регистрируемых катодно-анодных пиков: от 80 мкА (УСЭ) до 125 мкА (АУСЭ) при $\nu = 0.05$ В/с.

Рост тока обусловлен главным образом увеличением активной поверхности электрода (Q). Рассчитанные по уравнению Рэндлса-Шевчика [170], значения Q равны 0.094 см^2 (УСЭ) и 0.152 см^2 (АУСЭ).

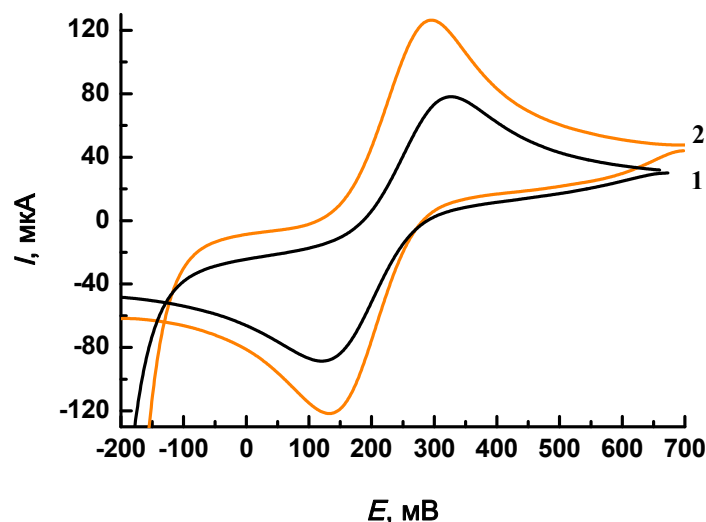


Рисунок 3.2. Циклические вольтамперограммы, полученные для редок-пары $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{3-/4-}$ на УСЭ до (1) и после (2) электрохимической активации его поверхности (ν , 0.05 В/с).

Ниже представлены полученные нами данные, относящиеся к исследованию поведения ряда биологически активных производных пурина на активированном углесталловом электроде (АУСЭ) методом циклической вольтамперометрии.

3.2 Анодное окисление пуриновых алкалоидов

Методом циклической вольтамперометрии с линейной разверткой потенциала установлено, что пуриновые алкалоиды – теofilлин (**Tph**), кофеин (**Caf**) и теобромин (**Tbr**) (табл.2.1), необратимо окисляются в области анодной поляризации АУСЭ в пределах 0.8 – 1.4 В. Исследования показали, что хотя окисление этих веществ происходит в широком интервале рН среды, наиболее четкие и воспроизводимые анодные пики, особенно для Caf и Tbr, удается регистрировать в разбавленных кислотах.

На рис. 3.3 представлены типичные циклические вольтамперограммы, характеризующие редокс-поведение этих веществ на фоне 0.25 М H_3PO_4 .

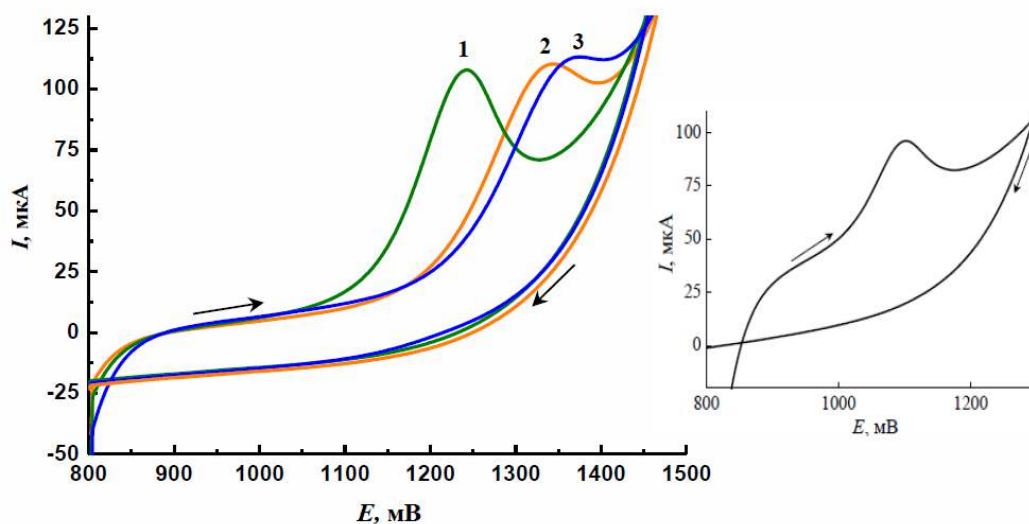


Рисунок 3.3. Циклические вольтамперограммы, полученные для 1.0 мМ пуриновых алкалоидов (1 – Trp; 2 – Caf; 3 – Tbr) и Хан (вставка) на АУСЭ в 0.25 М растворе H_3PO_4 ($\nu = 0.025$ В/с).

В связи с тем, что исследуемые алкалоиды являются N-метилпроизводными ксантина (Хан), представляло интерес сопоставить их электрохимические свойства. Сравнение циклических вольтамперограмм изученных алкалоидов с вольтамперограммой Хан, полученных на АУСЭ, показало, что они схожи между собой. Однако положение максимума анодного пика зависит от структурных особенностей этих веществ. Теоретически, эффект уменьшения окислительной способности в ряду Хан > Trp > Caf ~ Tbr можно объяснить исходя из предположения, что введение метильных групп в бициклическую молекулу Хан увеличивает электронную плотность пуринового ядра по индуктивному механизму, затрудняя разрыв двойной связи $-\text{C}_8=\text{N}_9-$. Кроме того, наличие заместителей может стерически препятствовать планарной ориентации молекулы на поверхности электрода [138]. В частности, на рис.3.4 сопоставлены анодные ветви циклических вольтамперограмм Хан и Trp (фоновый электролит – 0.1 М H_3PO_4), на которых видно, что потенциал пика окисления последнего сдвинут в положительном направлении почти на 200 мВ по сравнению с потенциалом пика окисления Хан. Это можно объяснить тем, что Trp имеет две метильные группы в пиримидиновом кольце, в связи с чем наблюдается увеличение отрицательных зарядов в циклах его молекулы, а, следовательно, заряд атома азота в положении 9

Trh больше, чем у Хан. Влияние ауксохромных (метильных) групп в пиримидиновом кольце проявляется в небольшом батохромном сдвиге, т.е. смещении максимума полосы поглощения, наблюдаемом на УФ-спектре в растворе Trh (вставка на рис.3.4).

Тот факт, что окисление Саf и Твг протекает при более высоких потенциалах, чем Trh можно объяснить наличием электронодонорной метильной группы в положении N7 имидазольного кольца, присутствие которой наиболее сильно сказывается на повышении электронной плотности у углеродного атома в положении С8 [1]. Кроме того, возможная протонизация имидазольного кольца приводит к снижению электронной плотности в положении С8.

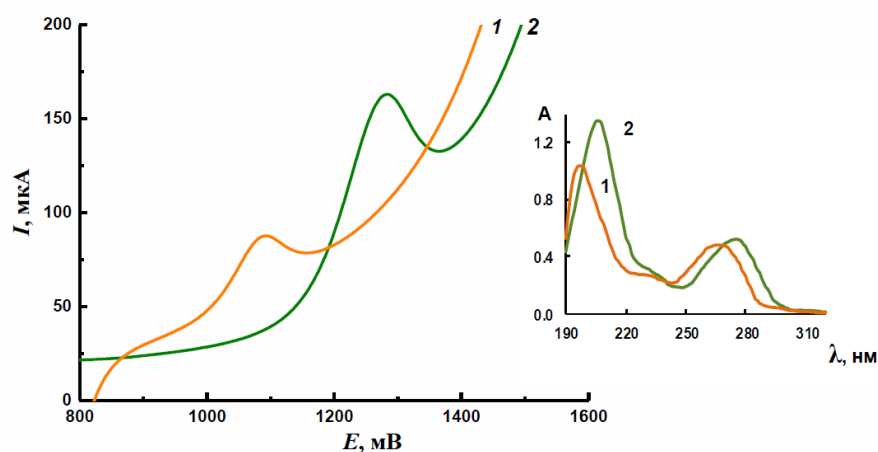


Рисунок 3.4. Анодные ветви циклических вольтамперограмм 0.1 мМ Хан (1) и 0.1 мМ Trh (2) в 0.1 М растворе H_3PO_4 ($\nu = 0.1$ В/с). Вставка: соответствующие УФ-спектры поглощения (в ед. оптической плотности А) Хан (1) и Trh (2).

Влияние природы и концентрации кислоты. Кислотность фонового электролита представляется одним из наиболее важных факторов, влияющих на характеристические параметры анодного окисления исследуемых веществ. Различными авторами установлено, что во всех случаях с увеличением рН от 2 до 8 анодный пик сдвигается в область менее положительных значений потенциалов, что указывает на участие протонов в лимитирующей стадии электроокисления. Однако результаты изучения влияния рН на величину токов анодных пиков $I_{\text{па}}$ неоднозначны. Так, в работе [187] показано, что токи $I_{\text{па}}$, характеризующие окисление Хан на графитовом электроде в интервале рН 2.96 – 10.66, возрастают с

увеличением рН. Авторы работ [142,143] установили, что функция $I_{\text{па}} - \text{pH}$ для всех ксантинов имеет вид кривой с максимумом при $\text{pH} \sim 3 - 6$. Напротив, в работах [140,141] показано, что наименьшие по высоте пики наблюдаются в области нейтральных значений рН среды. При этом наибольшие по величине токи наблюдали в кислой среде, где молекулы всех исследуемых веществ находятся в протонированной форме [144,145,188]. В связи с этим, нами было подробно изучено анодное поведение пуриновых алкалоидов – производных Хан в водных растворах различных минеральных кислот.

Как следует из данных табл.3.1, потенциал пиков окисления изученных веществ зависит от природы и концентрации кислоты, используемой в качестве фонового электролита.

Таблица 3.1 – Сопоставление потенциалов пиков анодного окисления ксантина и его N-метилпроизводных в 0.1 М растворах различных кислот ($\nu = 0.1 \text{ В/с}$)

Вещество	H_3PO_4	H_2SO_4	HCl	HClO_4
Хан	1.094	1.105	1.107	1.111
Тph	1.283	1.304	1.308	1.317
Сaf	1.398	1.408	1.409	1.412
Тbr	1.432	1.440	1.443	1.448

Степень влияния природы кислоты проявляется в небольших изменениях потенциалов и токов пиков окисления исследуемых веществ, что в определенной степени может быть обусловлено различиями в их способности к протонированию и образованию солей с минеральными кислотами, а также изменениями концентрации ионов водорода.

Зависимости $E_{\text{па}}$ от теоретически рассчитанных значений рН фонового раствора фосфорной кислоты прямолинейны (табл. 3.2). Тангенс угла наклона полученных прямых характерен для процессов, в которых участвует эквивалентное количество протонов и электронов.

Таблица 3.2 – Уравнения, описывающие зависимость потенциала пиков окисления пуриновых алкалоидов от теоретически рассчитанных значений рН раствора фосфорной кислоты ($\nu = 0.1$ В/с)

Вещество	$E_{\text{па}} (\text{pH } 0.6 - 3.0) = a + b \text{ pH}_{\text{расч}}$	
	Уравнение регрессии	r
Xan	$E_{\text{па}} = 1.174 - 0.053 \text{ pH}$	0.9997
Trh	$E_{\text{па}} = 1.371 - 0.059 \text{ pH}$	0.9994
Caf	$E_{\text{па}} = 1.478 - 0.050 \text{ pH}$	0.9993
Tbr	$E_{\text{па}} = 1.509 - 0.050 \text{ pH}$	0.9992

В изученном интервале кислотности зависимость соответствующих анодных токов имеет вид кривой с максимумом, наблюдаемом при концентрации фосфорной кислоты в пределах 0.1 – 0.3 М. В частности, на рис.3.5 представлена гистограмма высот пиков, регистрируемых в 1.0 мМ растворе Trh на фоне различных концентраций кислоты.

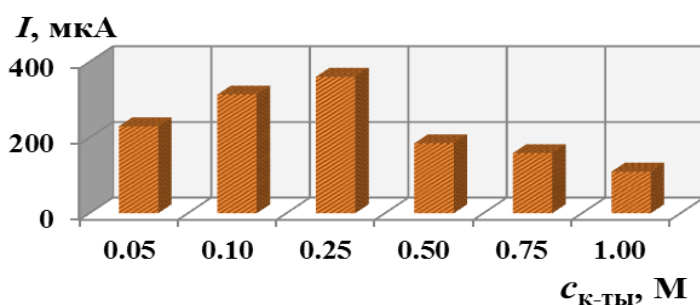


Рисунок 3.5. Гистограмма токов пика окисления 1.0 мМ Trh на АУСЭ в растворах фосфорной кислоты ($\nu = 0.1$ В/с).

Влияние скорости развертки потенциала. На рис.3.6 даны циклические вольтамперограммы, демонстрирующие влияние скорости сканирования потенциала поляризации (ν) на характеристические параметры окисления изученных пуриновых алкалоидов на АУСЭ в 0.25 М растворе H_3PO_4 . Полученные функциональные данные позволяют предположить, что электрохимические процессы, происходящие в кислотных растворах изученных веществ, имеют адсорбционно-диффузионную природу, как и в растворах с более высоким значением рН. Так, найденные значения тангенса угла наклона логарифмических зависимостей между $I_{\text{па}}$ и ν (критерий Семерано χ_ν) указывают

на вклад адсорбции, что также подтверждается увеличением функции тока анодного пика $I_{па}/Acv^{1/2}$ от скорости развертки потенциала (рис. 3.7, кривая 1). Примечательно, что в более концентрированных растворах фосфорной кислоты (1.0 М и выше) эта функция остается почти постоянной (рис. 3.7, кривая 2). Это указывает на то, что скорость наблюдаемого электродного процесса лимитируется стадией переноса электрона.

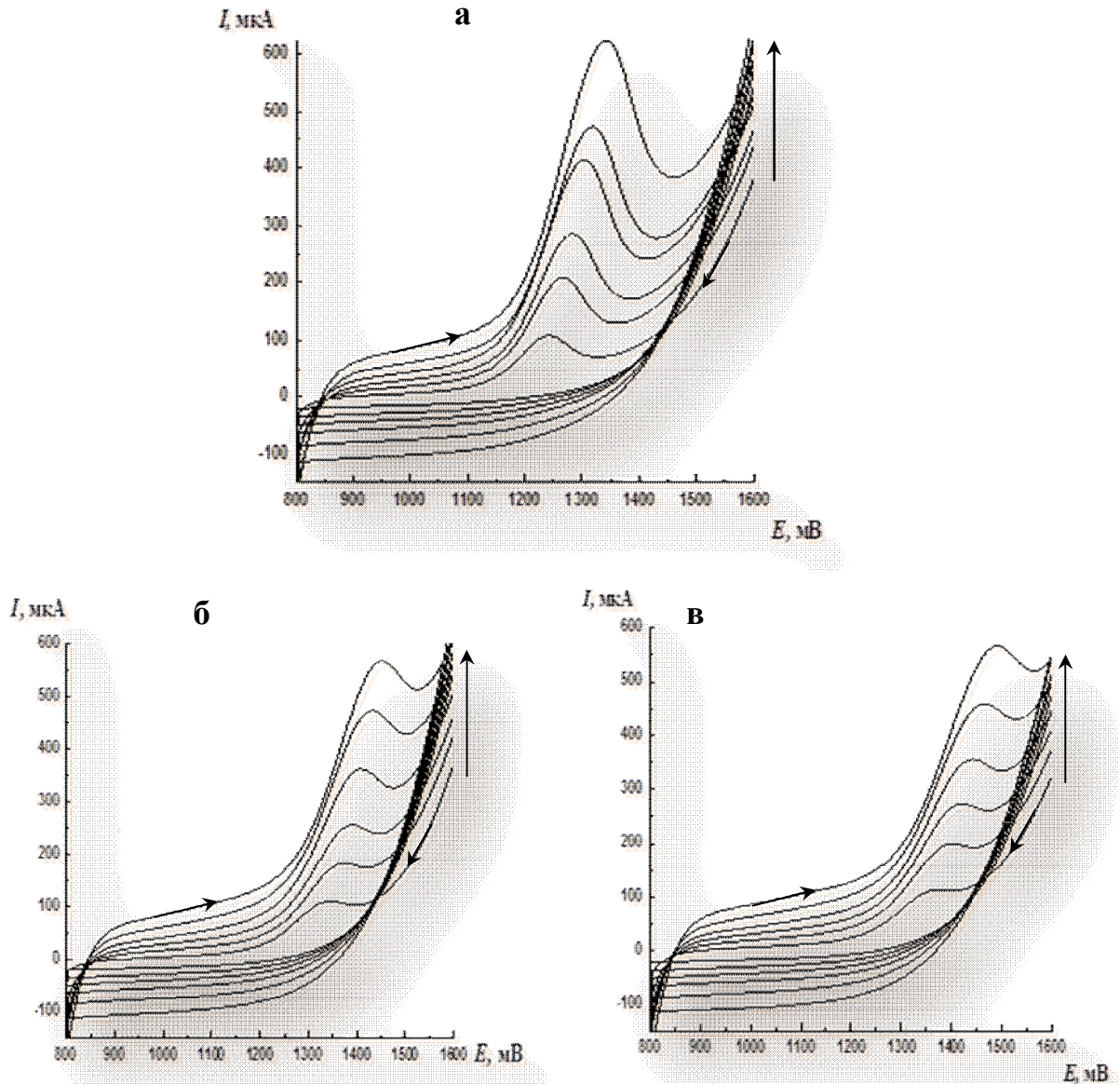


Рисунок 3.6. Циклические вольтамперограммы, полученные на АУСЭ в 1.0 мМ фосфорнокислых растворах Трп (а), Саф (б) и Тбр (в) при скорости развертки потенциала v (0.025 – 0.250) В/с.

Таблица 3.3 – Уравнения, описывающие зависимость тока анодных пиков окисления пуриновых алкалоидов от скорости развертки потенциала v (рН 1.6)

Вещество	$I_{па} (\text{мкА}) = a \sqrt{v} (\text{мВ/с}) + b$	$\lg I_{па} (\text{мкА}) = a \lg v (\text{мВ/с}) + b$
Трh	$I_{па} = 23.74 \sqrt{v} - 61.73$ $r = 0.9993$	$\lg I_{па} = 0.734 \lg v + 0.762$ $r = 0.9994$
Сaf	$I_{па} = 32.59 \sqrt{v} - 92.28$ $r = 0.9987$	$\lg I_{па} = 0.761 \lg v + 0.828$ $r = 0.9994$
Тbr	$I_{па} = 46.04 \sqrt{v} - 124.38$ $r = 0.9991$	$\lg I_{па} = 0.742 \lg v + 1.025$ $r = 0.9996$

Потенциалы анодных пиков $E_{па}$ для всех изученных веществ смещаются в положительном направлении с ростом v , что подтверждает необратимый характер процесса переноса электрона.

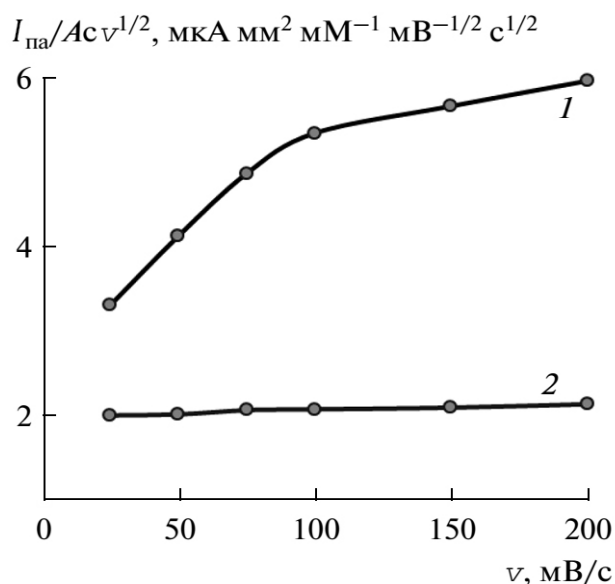


Рисунок 3.7. Зависимости функции тока анодного пика от скорости развертки потенциала, полученные для 1.0 мМ раствора теофиллина в 0.25 М фосфорной кислоте (1) и 1.0 М фосфорной кислоте (2).

Соответствующие линейные уравнения зависимостей $E_{па}$ от логарифма скорости развертки потенциала суммированы в табл.3.4.

Таблица 3.4 – Линейные уравнения зависимости потенциалов окисления ксантинов от логарифма скорости развертки потенциала (рН = 1.6, 25 °С) и некоторые диагностические характеристики этого процесса

Вещество	$E_{па} (\text{В}) = a \lg v (\text{В/с}) + b$	$(1-\alpha') n_{app}$	$E^{o'}$	$k', \text{с}^{-1}$
Трh	$E_{па} = 0.098 \lg v + 1.379$ $r = 0.9991$	0.60	1.21	0.66 ± 0.04
Сaf	$E_{па} = 0.103 \lg v + 1.503$ $r = 0.9994$	0.57	1.32	0.60 ± 0.03
Тbr	$E_{па} = 0.118 \lg v + 1.547$ $r = 0.9990$	0.50	1.34	0.58 ± 0.03

Там же приведены значения параметров $(1-\alpha)n_{app}$, а также величины условных констант скорости переноса заряда k' , рассчитанные по известным уравнениям для необратимых анодных процессов [189, 190]:

$$E_{па} = E^{of} + \frac{2.3 RT}{(1-\alpha)nF} \lg \frac{(1-\alpha)nFv}{RTk'_s} \quad (3.5)$$

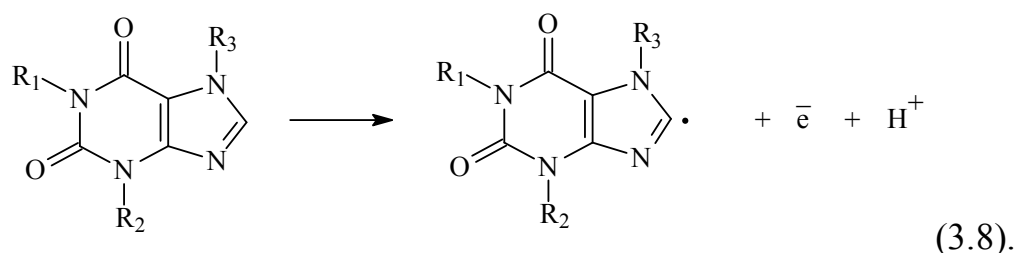
$$\lg k'_s = \alpha \lg(1-\alpha) + (1-\alpha) \lg \alpha - \lg \frac{RT}{nFv} - \frac{(1-\alpha)\alpha nF \Delta E}{2.3 RT} \quad (3.6),$$

где E^{of} – формальный электродный потенциал, В; ΔE – разность потенциалов пика и полупика; n – число электронов; α – коэффициент переноса заряда; k'_s – условная константа скорости электрохимической реакции, c^{-1} ; T – температура (298 К); F – постоянная Фарадея; R – универсальная газовая постоянная.

Вопрос о лимитирующей стадии остается дискуссионным. Исходя из известного уравнения для необратимого процесса:

$$E_{па} = \frac{b}{2} \lg v + const \quad (3.7),$$

где b – наклон Тафеля, и полагая, что $0.25 < \alpha' < 0.75$ можно предположить, что лимитирующей стадией является $2e^-$, $2H^+$ -окисление с разрывом двойной связи – $C_8=N_9$ – имидазольного кольца. Возможно также и первоначальное одноэлектронное окисление изученных веществ, о чем свидетельствуют результаты работы [144]:



Конечными продуктами окисления пуриновых алкалоидов в кислотных растворах предположительно являются метильные производные аллоксана и мочевины (схема 3.4). Для подтверждения предполагаемого механизма электроокисления было прослежено видоизменение УФ-спектров поглощения Хап в процессе электролиза на АУСЭ в течение 120 мин.

На рис.3.8 представлены УФ-спектры, полученные до (спектр 1) и после (спектр 2) анодного окисления Хап в 0.1 М H_3PO_4 . Можно видеть, что первоначальный спектр 1, характерный для структуры всех пуриновых производных, состоит из двух полос поглощения разной интенсивности с максимумами в области 198 нм и 269 нм соответственно. В результате электроокисления Хап удается наблюдать заметные спектральные изменения: исчезновение полосы поглощения при 269 нм, свидетельствующее о разрыве хромофорной группы $-\text{N}_9-\text{C}_4=\text{C}_5-\text{C}_6=\text{O}$. При этом на спектре становится видна широкая полоса поглощения, характеризующая спектральные характеристики продуктов электролиза. Заметное сходство этого спектра с индивидуальными УФ-спектрами аллоксана и мочевины (вставка на рис.3.8) может служить экспериментальным подтверждением предположения о том, что эти соединения (или их метилпроизводные) являются конечными продуктами анодного окисления ксантина и его производных в кислотной среде.

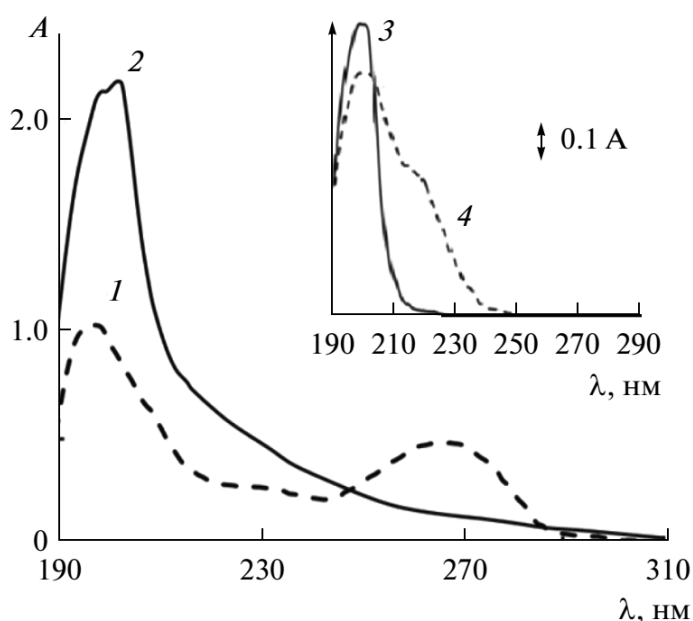


Рисунок 3.8. Электронные УФ-спектры поглощения (в единицах оптической плотности A), полученные до (1) и после (2) электроокисления ксантина на УСЭ в 0.1 М H_3PO_4 . Вставка: УФ-спектры поглощения мочевины (3) и аллоксана (4).

В табл. 3.5 приведены сравнительные данные по электроокислению пуриновых алкалоидов на АУСЭ и активированных электродов из других углеродных материалов.

Таблица 3.5 – Сравнительные данные, характеризующие процессы электроокисления пуриновых алкалоидов на различных углеродных электродах

Вещество	Электрод	$E_{па}$, В (рН ~ 2)	α'	Ссылка
Trh	Графитовый электрод	+1.34	–	[139]
	МУНТ/СУЭ	+1.28	0.74	[142]
	МУНТ/УПЭ	+1.29	0.56	[143]
Caf	УПЭ	+1.46	0.67	[144]
	Нафион – графен / СУЭ	+1.45	0.76	[156]
Trh	Электрохимически активированный СУЭ	+1.41	–	[163]
Caf		+1.43		
Trh	Алмазный электрод, легированный бором	+1.20	–	[141]
Caf		+1.43		
Tbr		+1.41		
Trh	АУСЭ	+1.25	0.70	Эта работа
Caf		+1.39	0.72	
Tbr		+1.41	0.75	

Из приведенных в таблице данных можно заключить, что по своей электроактивности в отношении пуриновых алкалоидов АУСЭ не уступает другим углеродным электродам, и даже превосходит электрохимически активированный СУЭ. Так, разность потенциалов между пиками Trh и Caf на АУСЭ составляет 130 мВ, в то время как на АСУЭ – 20 мВ.

3.3 Анодное окисление пуриновых оснований

Данные линейной и циклической вольтамперометрии показали, что в слабокислой среде Gua окисляется на неактивированном УСЭ с большим перенапряжением (рис.3.9а), пик окисления Ade перекрывается высоким фоновым током (рис.3.9б).

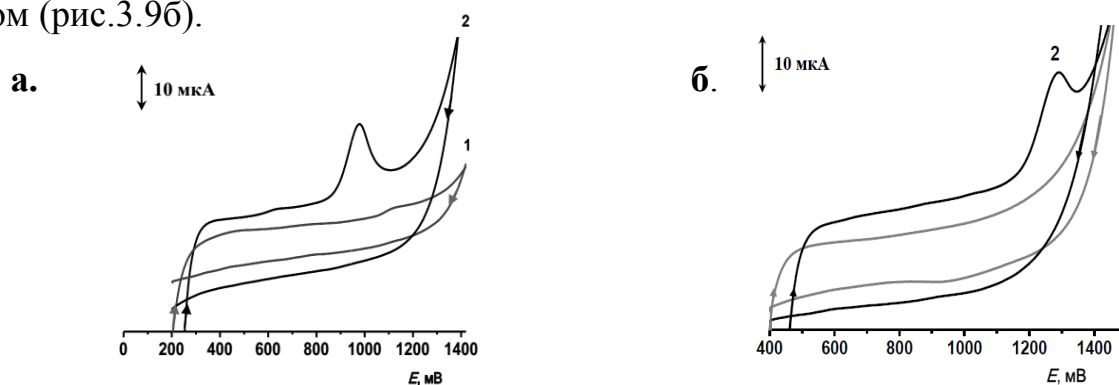


Рисунок 3.9. Циклические вольтамперограммы, полученные для 0.1 мМ Gua (а) и 0.1 мМ Ade (б) в 0.1 М ФБР (рН 3.7) на УСЭ до (1) и после (2) его активации при $\nu = 0.05$ В/с.

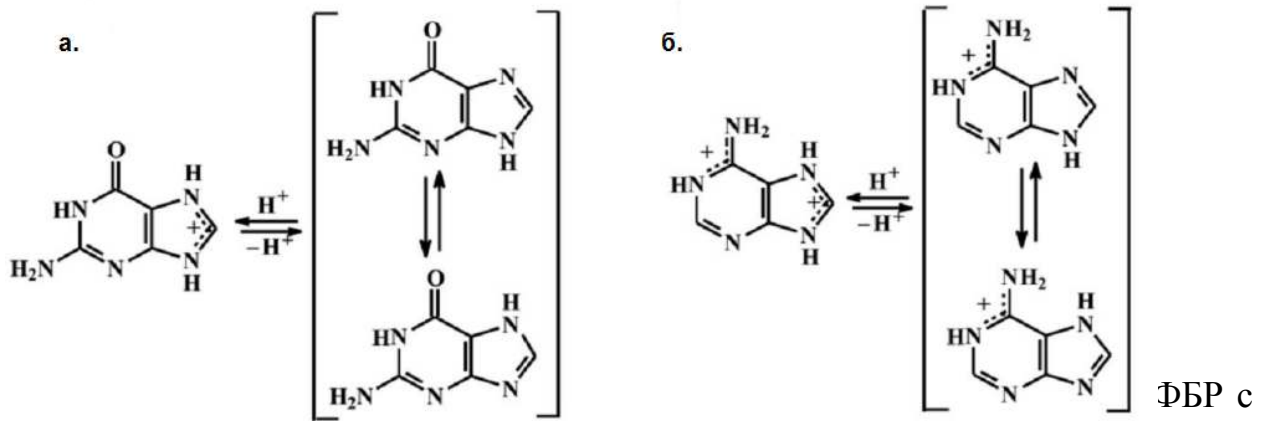
В противоположность этому, в случае АУСЭ, удается наблюдать хорошо выраженные анодные пики, соответствующие их полному необратимому окислению в широком диапазоне рН (1–9). В качестве примера на рис.3.9 представлены циклические вольтамперограммы, демонстрирующие высокую чувствительность отклика АУСЭ к Gua и Ade по сравнению с неактивированным электродом: потенциал анодного пика смещается в направлении менее положительных значений потенциала ($\Delta E_{\text{па}} \sim 300$ мВ), а его высота возрастает в несколько раз.

Влияние рН фонового электролита. Опыты с использованием АУСЭ показали, что с ростом рН потенциалы пиков окисления всех исследуемых веществ становятся менее положительными, что характерно для окислительных процессов, протекающих с участием ионов водорода. Зависимости значений $E_{\text{па}}$ от рН среды, полученные для каждого соединения, описываются линейными уравнениями регрессии, приведенными в табл.3.6. Полученные данные указывают на то, что в электродном процессе участвует эквивалентное число электронов и протонов.

Таблица 3.6 – Уравнения экспериментальных зависимостей потенциалов пиков окисления изученных веществ от рН среды (ФБР, рН 1.6 – 9.0), полученные при $v = 0.1$ В/с

Вещество	$E_{\text{па}}(\text{В}) = a + b \text{ рН}$	
	Уравнение регрессии	r
Ade	$E_{\text{па}} = 1.528 - 0.063 \text{ рН}$	0.9997
Gua	$E_{\text{па}} = 1.199 - 0.060 \text{ рН}$	0.9998

Очевидно, что электроокисление Gua и Ade зависит от их кислотно-основных свойств и формы нахождения в растворах. Максимальный прирост регистрируемого анодного тока наблюдался в кислых и слабокислых средах, где пуриновые основания находятся преимущественно в протонированной форме (Gua – А, Ade–В):



разным рН даны на рис. 3.10. Как можно видеть, пик тока окисления Gua слегка изменяется в диапазоне рН 1.6 – 4.0, а затем уменьшается с увеличением рН от 4.0 до 9.0. Ток окисления Ade также снижается с ростом рН.

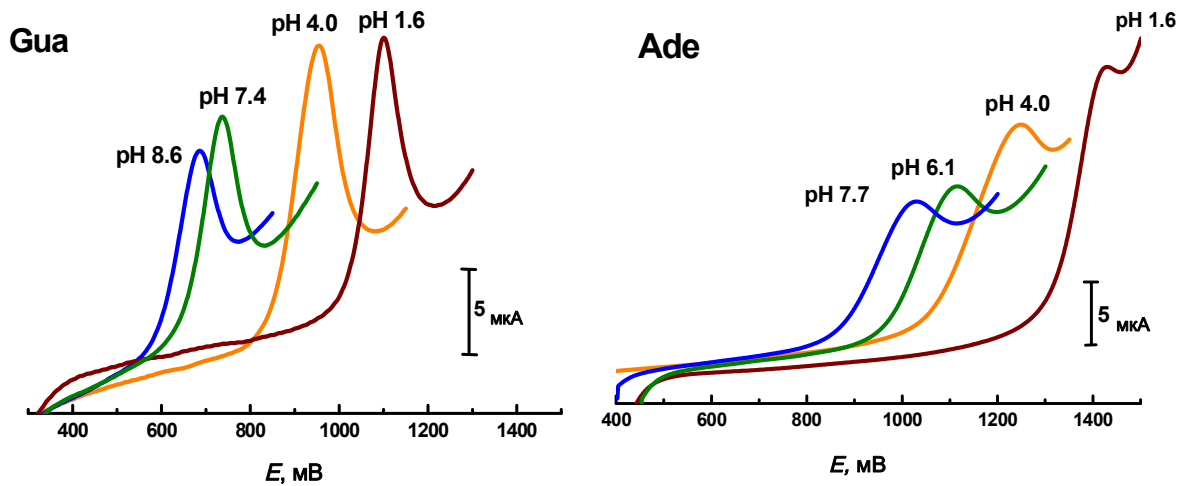


Рисунок 3.10. Эффект рН на анодное окисление 0.1 мМ Gua and 0.1 мМ Ade на АУСЭ в 0.1 М ФБР ($v = 0.1$ В/с).

Во всех случаях, Gua окисляется значительно легче, чем Ade, что позволяет регистрировать их одновременно (рис.3.11). Например, значения $E_{\text{па}}$, полученные при рН 7.0, составили +0.779 В и +1.087 В для Gua и Ade соответственно. При этом разность между пиками этих соединений порядка 300 мВ во всем изученном интервале рН, что очень важно, так как они оба являются структурными центрами ДНК и РНК.

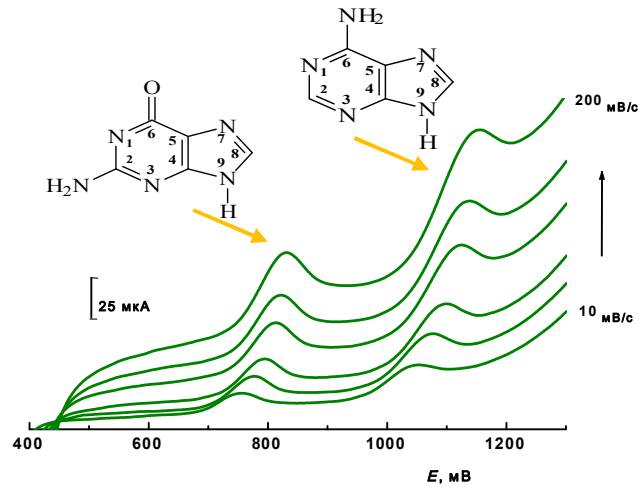


Рисунок 3.11. Анодные вольтамперограммы, полученные на АУСЭ в 0.1 М ФБР (рН 6.4), содержащем смесь Gua и Ade (2:1), при разных скоростях развертки потенциала.

Влияние скорости развертки потенциала. Исследованы эффекты изменения скорости развертки потенциала поляризации электрода ν от 0.01 до 0.30 В/с на пики токов окисления Gua и Ade. Установлено, что с ростом ν величина $I_{\text{па}}$ постепенно увеличивается, а $E_{\text{па}}$ сдвигается в сторону более положительных значений. Зависимости $\lg I_{\text{па}}$ и $E_{\text{па}}$ от $\lg \nu$ описываются линейными уравнениями регрессии, приведенными в табл.3.7 и 3.8.

Таблица 3.7. – Уравнения, описывающие зависимости тока окисления Gua и Ade от скорости развертки потенциала (рН 3.8 ± 0.1)

Вещество	$I_{\text{па}} (\text{мкА}) = a \sqrt{\nu} (\text{мВ/с}) + b$	$\lg I_{\text{па}} (\text{мкА}) = a \lg \nu (\text{мВ/с}) + b$
Ade	$I_{\text{па}} (\text{мкА}) = 13.034 \sqrt{\nu} - 33.122$ $r = 0.9977$	$\lg I_{\text{па}} = 0.695 \lg \nu + 0.580$ $r = 0.9995$
Gua	$I_{\text{па}} (\text{мкА}) = 5.551 \sqrt{\nu} - 20.740$ $r = 0.9954$	$\lg I_{\text{па}} = 0.799 \lg \nu - 0.087$ $r = 0.9992$

Таблица 3.8. – Уравнения, описывающие зависимости потенциала пиков окисления Gua и Ade (рН 3.8 ± 0.1) от скорости развертки потенциала ($\nu = 0.010 - 0.250$ В/с), а также диагностические параметры механизма окисления изученных веществ ($\nu = 0.05$ В/с)

Вещество	$E_{\text{па}} = a \lg \nu (\text{В/с}) + b$	$(1-\alpha') n_{\text{app}}$	$E^{\circ'}, \text{В}$	$k', \text{с}^{-1}$
Ade	$E_{\text{па}} = 0.077 \lg \nu + 1.359$ $r = 0.9990$	0.77	1.20	0.56 ± 0.03
Gua	$E_{\text{па}} = 0.085 \lg \nu + 1.068$ $r = 0.9991$	0.84	0.92	0.93 ± 0.05

Найденные характеристические параметры электродных реакций позволяют сделать вывод о том, что регистрируемые анодные пики имеют смешанную адсорбционно-диффузионную природу. На рис.3.12 и в табл.3.9 и приведены сравнительные характеристики анодного окисления исследуемых пуриновых оснований на различных электродах

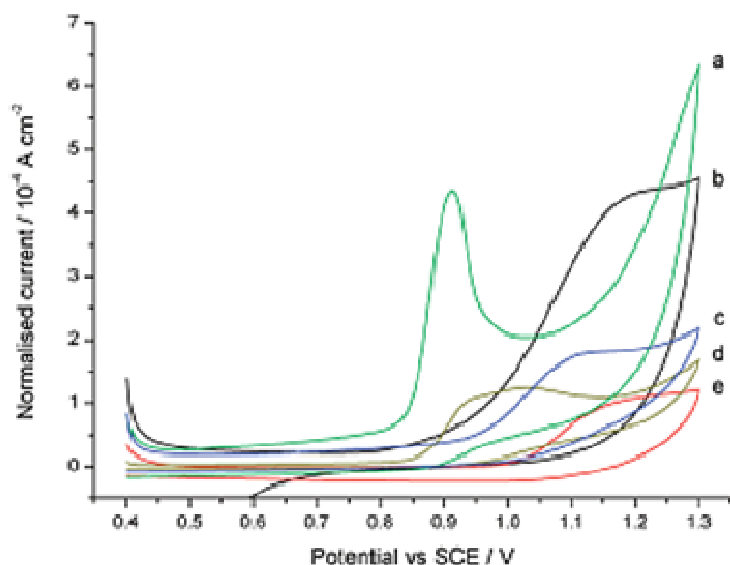


Рисунок 3.12. Циклические вольтамперограммы 0.1 мМ Ade в ФБР (рН 6.85) на разных электродах: а – электрод из пиролитического графита типа edge-plane; b – золотой электрод; c – СУ-электрод; d – электрод из пиролитического графита типа basal-plane; e – алмазный электрод; f – платиновый электрод (взято из работы [133]).

Таблица 3.9 – Сравнительные данные вольтамперных характеристик электроокисления Ade и Gua на различных электродах из упорядоченных углеродных структур

Электрод	Ade			Gua			Ссылка
	$E_{па}, В$ (рН 4)	χ_v	α'	$E_{па}, В$ (рН 4)	χ_v	α'	
Электрохимически активированный СУЭ	+ 1.19	0.74	–	+0.87	0.72	–	[162]
МУНТ/СУЭ	+1.21	0.73	0.66	+0.90	0.73	0.68	[191]
	–	–	–	+0.94	0.90	0.60	[128]
Фуллерен C ₆₀ /СУЭ	+1.18	0.27	–	+0.86	0.32	–	[176]
Графен-ионная жидкость-Хитозан/СУЭ	+1.14	–	0.51	+0.82	–	0.58	[154]
Алмазный электрод, легированный бором	+1.44	–	–	+1.23	–	–	[166]
АУСЭ	+1.27	0.69	0.62	+0.96	0.80	0.58	Эта работа

Из приведенных данных можно заключить, что, в отличие от многих традиционно используемых электродов, АУСЭ позволяет регистрировать хорошо

выраженные отдельные пики электроокисления Ade и Gua, а также по своей электроактивности практически не уступает электродам на основе наноструктурированных углеродных материалов, особенно в случае Gua. Важной особенностью окисления на АУСЭ является вклад адсорбционной составляющей в механизм электродного процесса.

3.4. Анодное окисление синтетических аналогов дезоксигуанозина

Дальнейшие исследования показали, что АУСЭ проявляет высокую электроактивность в отношении ACV, VACV, GCV и FCV (табл.2.2). Например, на рис.3.13 представлены типичные циклические вольтамперограммы, характеризующие редокс-поведение этих веществ в 0.1 М ФБР (рН 6). Видно, что во всех случаях на вольтамперограммах наблюдаются только анодные пики, то есть наблюдаемые электродные процессы окисления изученных веществ являются практически необратимыми.

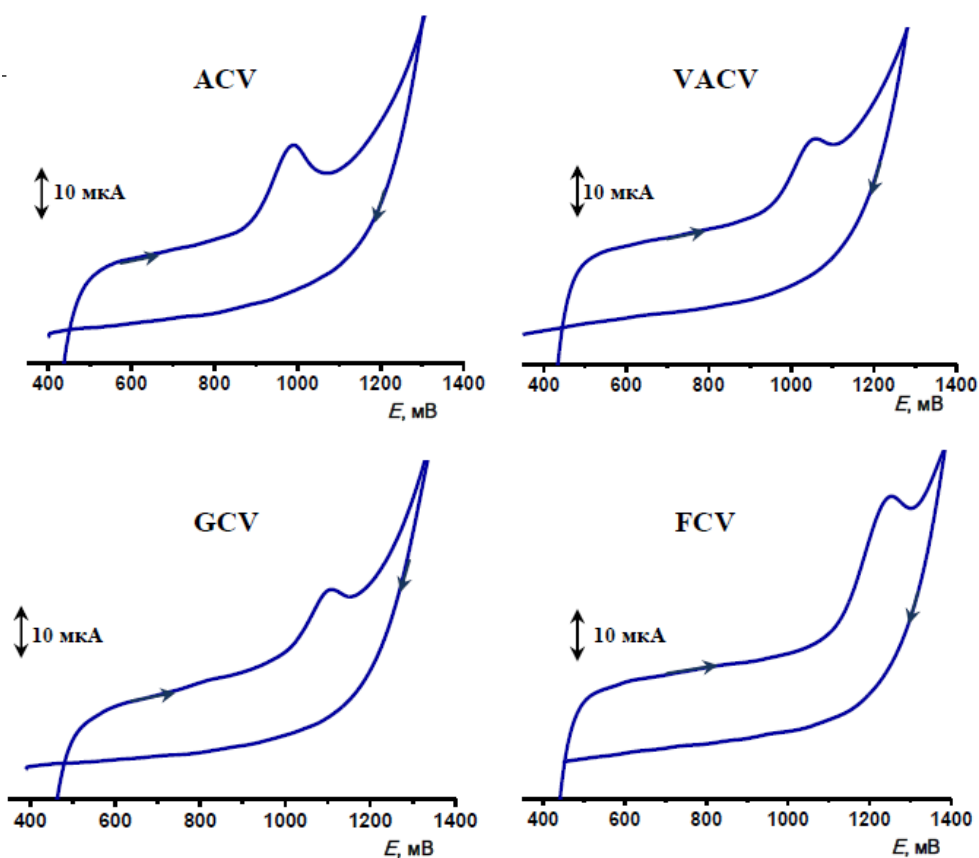


Рисунок 3.13. Циклические вольтамперограммы, полученные для противовирусных производных Gua (10 мкг/мл, 0.1 М ФБР, рН 6): ACV, VACV, GCV и FCV, на активированном УСЭ при $\nu = 0.1$ В/с.

Установлено, что при прочих равных условиях эти вещества, содержащие гуанидиновую группировку $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}-)=\text{N}-$, окисляются при довольно близких потенциалах, но заметно труднее, чем Gua ($E_{\text{па}} = 0.84 \text{ В}$), что может быть обусловлено пространственными затруднениями при переносе электронов и влиянием природы ациклического заместителя в положении N9 имидазольного цикла на отрыв электронов. Так, в растворах с pH 6.0 способность к окислению ухудшается в ряду ACV ($E_{\text{па}} = 1.00 \text{ В}$), VACV ($E_{\text{па}} = 1.04 \text{ В}$), GCV ($E_{\text{па}} = 1.07 \text{ В}$), FCV ($E_{\text{па}} = 1.20 \text{ В}$).

Влияние pH фонового электролита. С целью диагностики механизма процессов электроокисления исследуемых веществ нами были изучены зависимости соответствующих вольтамперных характеристик от pH и природы фонового электролита, в качестве которого использовались растворы 0.1 М фосфорной кислоты, ФБР, Бриттона-Робинсона и ацетатный буферный раствор. Судя по полученным результатам, природа электролита незначительно влияет как на потенциал, так и на высоту регистрируемых пиков окисления исследуемых веществ. Однако наиболее выразительные сигналы удается наблюдать в ФБР. Изучение эффекта pH фонового электролита (0.1 М ФБР) на электрохимическое поведение ACV и родственных соединений показало, что токи пиков окисления увеличиваются с ростом pH до 6 – 7, а затем начинают уменьшаться (рис. 3.14).

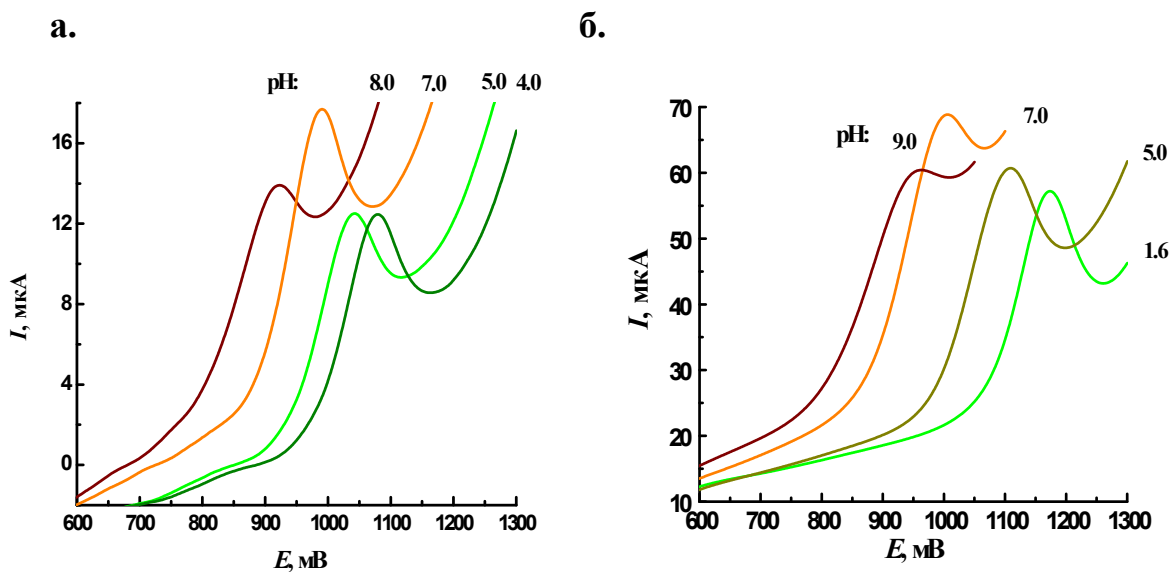


Рисунок 3.14. Эффект pH среды на пики анодного окисления ACV (а) и VACV (б).

При этом графики зависимости $E_{па} = f(pH)$ прямолинейны с наклоном, свидетельствующим о том, что электрохимическая реакция характеризуется эквивалентным числом протонов и электронов (табл. 3.10).

Таблица 3.10 – Уравнения зависимости потенциалов пиков окисления противовирусных производных Gua от pH среды (ФБР, pH 1.6 – 9.0), полученные при $v = 0.1$ В/с

Вещество	$E_{па} = a + b \text{ pH}$	
	Уравнение регрессии	r
ACV	$E_{па} = 1.301 - 0.050 \text{ pH}$	0.9974
VACV	$E_{па} = 1.321 - 0.047 \text{ pH}$	0.9988
GCV	$E_{па} = 1.358 - 0.048 \text{ pH}$	0.9994
FCV	$E_{па} = 1.521 - 0.056 \text{ pH}$	0.9979

Влияние скорости развертки потенциала поляризации. Установлено, что токи пиков окисления изученных веществ возрастают с ростом скорости развертки потенциала v в интервале (10 – 250) мВ/с. Соответствующие зависимости $I_{pa} = f(\sqrt{v})$ и $\lg I_{na} = f(\lg v)$ прямолинейны (табл. 3.11).

Таблица 3.11 – Уравнения зависимостей пика тока анодного окисления противовирусных производных дезоксигуанозина от скорости развертки потенциала поляризации v (10 – 250 мВ/с)

Вещество	pH	$I_{na} \text{ (мкА)} = a \sqrt{v} \text{ (мВ/с)} + b$	$\lg I_{na} \text{ (мкА)} = a \lg v \text{ (мВ/с)} + b$
ACV	6.8	$I_{na} = 4.15 \sqrt{v} - 9.49$ $r = 0.9908$	$\lg I_{na} = 0.70 \lg v + 0.08$ $r = 0.9981$
VACV	6.9	$I_{na} = 9.08 \sqrt{v} - 23.68$ $r = 0.9934$	$\lg I_{na} = 0.78 \lg v + 0.24$ $r = 0.9980$
GCV	6.2	$I_{na} = 16.87 \sqrt{v} - 27.25$ $r = 0.9911$	$\lg I_{na} = 0.64 \lg v + 0.86$ $r = 0.9978$
FCV	6.0	$I_{na} = 25.54 \sqrt{v} - 15.68$ $r = 0.9982$	$\lg I_{na} = 0.54 \lg v + 1.30$ $r = 0.9934$

Найденные величины критерия Семерано $\chi_v (\lg I_{na}/\lg v)$, особенно в случае ACV и VACV, указывают на существенное влияние адсорбции при их окислении на АУСЭ. При этом потенциалы пика $E_{па}$ и полупика $E_{па/2}$ с ростом v смещаются к более положительным значениям, что свидетельствует о кинетических

ограничениях анодного окисления исследуемых веществ на активированном УСЭ. Экспериментальные зависимости $E_{па}$ от $\lg v$ прямолинейны во всем изученном интервале рН (табл.3.12) и могут быть описаны модельным уравнением Лавирона для необратимых анодных процессов [189].

Таблица 12 – Уравнения зависимости потенциалов пика окисления противовирусных производных дезоксигуанозина на АУСЭ от $\lg v$

Вещество	$E_{па} = a \lg v (В/с) + b$	
	pH = 4.0 ± 0.2	pH = 6.5 ± 0.5
ACV	$E_{па} = 0.081 \lg v + 1.210$ $r = 0.9988$	$E_{па} = 0.066 \lg v + 1.017$ $r = 0.9960$
VACV	$E_{па} = 0.090 \lg v + 1.234$ $r = 0.9992$	$E_{па} = 0.069 \lg v + 1.066$ $r = 0.9983$
GCV	-	$E_{па} = 0.096 \lg v + 1.157$ $r = 0.9959$
FCV	-	$E_{па} = 0.108 \lg v + 1.314$ $r = 0.9970$

Рассчитанные величины $E^{0'}$, α' и k' (при скоростях развертки порядка 0.050 В/с) приведены в табл.3.13.

Таблица 3.13 – Некоторые диагностические параметры механизма окисления изученных веществ на АУСЭ

Вещество	pH = 4.0 ± 0.2		pH = 6.5 ± 0.5	
	$(1-\alpha') n_{app}$	$k, с^{-1}$	$(1-\alpha') n_{app}$	$k, с^{-1}$
ACV	0.73	0.77 ± 0.03	0.89	0.80 ± 0.05
VACV	0.66	0.62 ± 0.04	0.84	0.74 ± 0.05
GCV	-	-	0.62	0.57 ± 0.04
FCV	-	-	0.55	0.45 ± 0.06

Для сравнения, в табл.3.14 приведены данные, характеризующие электрохимическую активность АУСЭ и некоторых других углеродных электродов по отношению к окислению ACV и его аналогов. Из сопоставления приведенных данных можно заключить, что применение АУСЭ позволяет уменьшить перенапряжение окисления всех исследуемых веществ.

Таблица 3.14 – Сравнительные данные, характеризующие процессы электроокисления антивирусных производных гуанина на некоторых углеродных электродах

Вещество	Электрод	$E_{па}$, В (pH ~ 7)	χ_v	α'	Ссылка
ACV	СУЭ	+1.10	–	–	[192]
	Фуллерен C ₆₀ /СУЭ	+0.97	0.99	0.97	[137]
VACV	СУЭ	+1.10	0.46	–	[193]
	УНТ/СУЭ	~+0.91	–	–	[157]
	Алмазный электрод, легированный бором	+1.08	0.22	–	[194]
GCV	СУЭ	+1.15	0.74	–	[135]
	Алмазный электрод, легированный бором	+1.01	–	0.48	[195]
ACV	АУСЭ	+0.95	0.70	0.56	Эта работа
VACV		+0.99	0.78	0.58	
GCV		+1.02	0.64	0.69	
FCV		+1.13	0.54	0.73	

В целом, проведенные исследования показали, что все изученные гидроксиды и аминопроизводные пурина необратимо окисляются в анодной области потенциалов на углесталловом электроде, предварительно активированном методами ультразвуковой и электрохимической обработки, по механизму, сходному с установленным ранее для других углеродных электродов.

Найденные диагностические характеристики изученных электродных реакций позволяют сделать вывод о том, что электроокисление пуринов имеет смешанную адсорбционно-диффузионную природу. Очевидно, что во всех случаях окислительный процесс протекает с участием протонов и сопровождается разрушением сопряженной системы π -связей. С большой долей вероятности можно считать, что сначала происходит разрыв двойной связи $-C_8=N_9-$ 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

присутствие кислородсодержащих групп (ОН-групп) в положении С2, С6 и С8, что подтверждается результатами ранее опубликованных работ [123,124]. Напротив, введение пространственных заместителей в положение N9 оказывает негативное влияние на процесс электроокисления пуринов.

При прочих равных условиях (рН 2-3), способность к электроокислению уменьшается в ряду: UA > Xan, Gua > ACV > VACV > GCV, Tph > Ade, Caf > Tbr, FCV (рис.3.15).

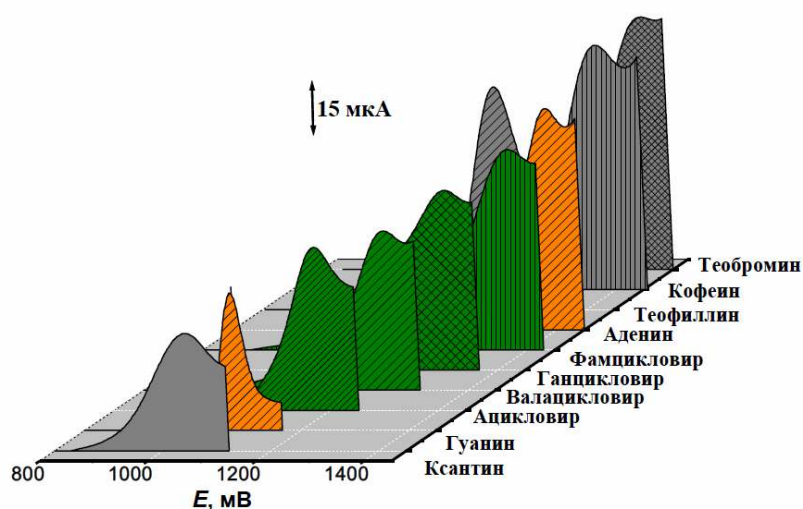


Рис.3.15. Сравнительная диаграмма вольтамперометрического отклика АУСЭ по отношению к изученным биологически активным производным пурина.

В целом, актуальность исследований в области электрохимии пуринов обусловлена необходимостью разработки высокоэффективных методов приборной медицинской диагностики и количественного определения биологически активных пуринов в лекарственных средствах и пищевых продуктах. Полученный нами экспериментальный материал свидетельствует об аналитической полезности АУСЭ при создании автоматизированных проточных систем для электрохимического определения пуринов в различных объектах. Особый интерес представляет использование таких систем для проведения исследований, необходимых на всех стадиях разработки и контроля качества фармацевтических препаратов.

ГЛАВА 4. Проточно-инжекционный метод для амперометрического определения пуринов в фармацевтических препаратах

Методы проточно-инжекционного электроанализа характеризуются многими достоинствами, в том числе более высокой производительностью и улучшенными метрологическими характеристиками результатов анализа по сравнению с традиционными способами их выполнения [50]. Последнее объясняется как общей спецификой электрохимических измерений в проточных системах, так и следующими дополнительными обстоятельствами, связанными с особенностями методологии ПИА: 1) индикаторный электрод постоянно находится в «кондиционирующей» среде, а анализируемый раствор (проба) лишь короткое время (5 – 30 с) контактирует с его поверхностью; 2) стабилизируются условия на границе раздела фаз, обеспечивая более тонкий диффузионный слой у поверхности электрода; 3) фоновый ток и его дрейф во времени, обычно имеющий место у любого электрода, автоматически учитывается путем отсчета высоты аналитического сигнала относительно «нулевой» линии. В некоторых случаях наблюдается повышение избирательности электрохимических определений за счет эффекта «кинетической дискриминации» посторонних ионов по отношению к определяемому веществу. Однако при проведении электроанализа в гидродинамических условиях возникают специфические трудности, связанные, прежде всего, с необходимостью обеспечить стабильность активной поверхности индикаторного электрода и воспроизводимость электрохимического отклика.

Обзор литературы показал, что известны лишь единичные работы, относящиеся к проточно-инжекционному амперометрическому определению пуринов, а именно: Caf [73–75], Ade и Gua [103–107] и FCV [119]. В качестве детектора предложено использовать электроды различного типа, главным образом химически модифицированные электроды. Однако хорошо известно, что срок функционирования таких электродов в закрытой проточной системе весьма

ограничен. Что касается применения немодифицированного твердого электрода, то его поверхность требует периодической активации.

Нами разработан автоматизированный метод амперометрического определения всех изученных гидроксид- и аминопуринов в растворах, основанный на использовании одноканальной ПИ-системы с АУСЭ.

4.1 Описание схемы и выбор параметров проточной системы

Для реализации амперометрического детектирования пуринов на АУСЭ в гидродинамических условиях использовали ПИ-систему, схематически изображенную на рис.4.1. Рабочие параметры оптимизировали экспериментальным путем, выбирая потенциал АУСЭ ($E_{\text{опт}}$, В), объем инжектируемой пробы (V , мкл), рН и скорость прокачивания (v_1 , мл/мин) фонового электролита через проточную трехэлектродную электрохимическую ячейку.

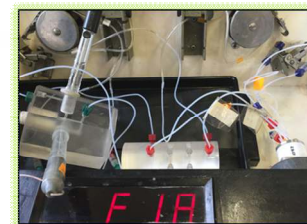
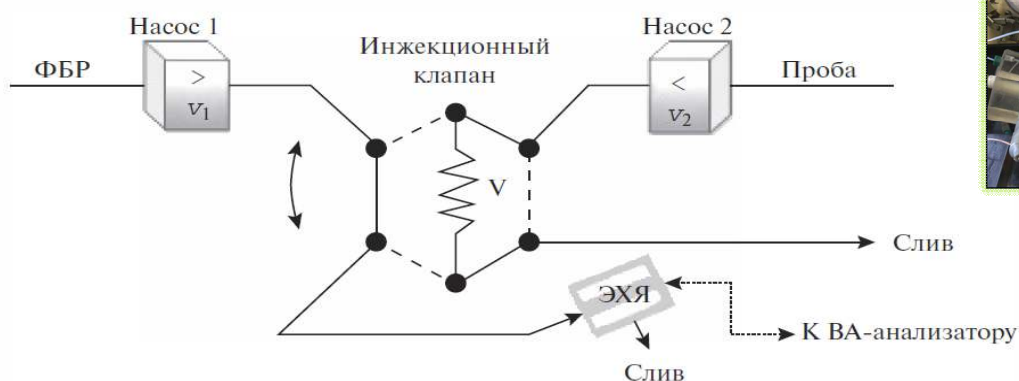


Рисунок 4.1. Схематическое изображение ПИ-системы с амперометрическим детектированием на АУСЭ (обозначения см. в тексте).

Согласно представленной схеме, дискретные микрообъемы V анализируемого раствора вводятся в поток раствора фонового электролита. Далее инжектированная «зона» поступает в проточную ячейку детектора, который непрерывно регистрирует величину тока (I , мкА) при $E = \text{constant}$ и таким образом фиксирует его изменение (скачок) в момент прохождения инжектированного раствора (ΔI , мкА). Типичный выходной сигнал имеет форму пика высотой $H = \Delta I$, зависящей от концентрации определяемого вещества.

Для периодической активации поверхности УСЭ через ячейку прокачивают 0.1 М раствор HClO_4 и проводят электрохимическую обработку согласно ранее описанному способу (см с. 44).

Выбор операционных параметров ПИ-системы. На примере GCV установлено, что высота H достигает максимума при скорости потока $v_1 = 2.0 - 2.5$ мл/мин и объеме пробы $V = 500$ мкл (рис. 4.2).

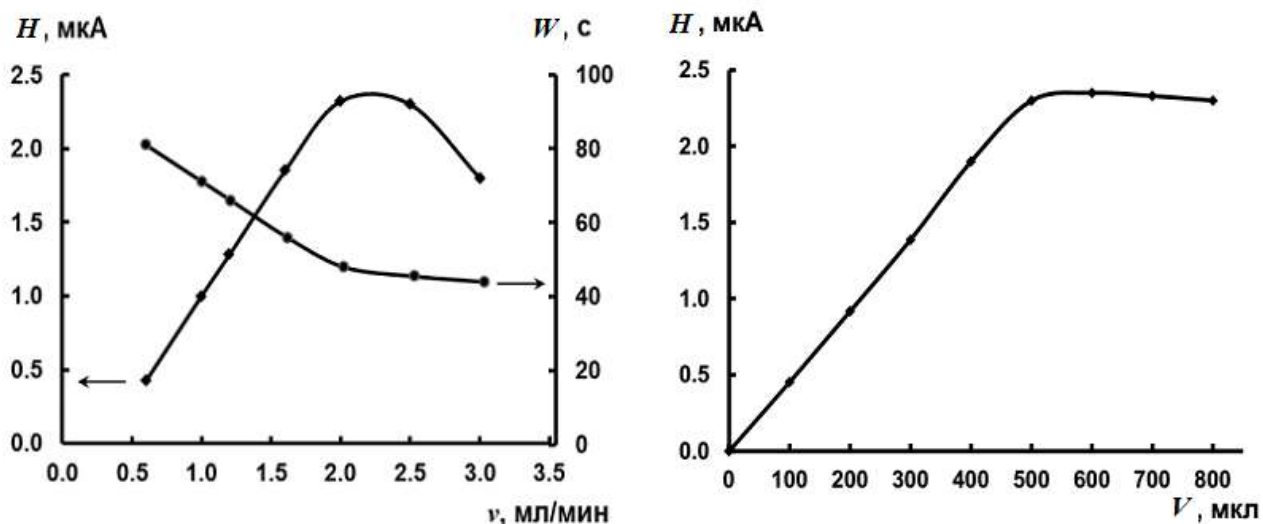


Рисунок 4.2. Влияние высоты H и ширина W сигнала GCV, регистрируемого в ПИ-системе, от скорости потока фонового электролита (0.1 М ФБР, рН 7.0) и инжектируемого объема V пробы (80 мкг/мл GCV).

Рост H с увеличением v_1 от 0.6 мл/мин до 2.0 мл/мин можно объяснить повышением скорости массопереноса к поверхности электрода. Снижение H при $v_1 > 2.5$ мл/мин, вероятно, связано с уменьшением времени контакта Δt электрода с инжектируемой пробой. Чем выше скорость потока, тем более узкие пики удается регистрировать, что способствует повышению производительности ПИ-системы.

4.2 Определение синтетических аналогов дезоксигуанозина

С целью нахождения оптимального значения рабочего потенциала АУСЭ ($E_{\text{опт}}$) были получены гидродинамические вольтамперограммы АСВ и его

производных путем регистрации изменения сигнала тока ($H = \Delta I$) при различных значениях потенциала поляризации (E) рабочего электрода (рис.4.3)

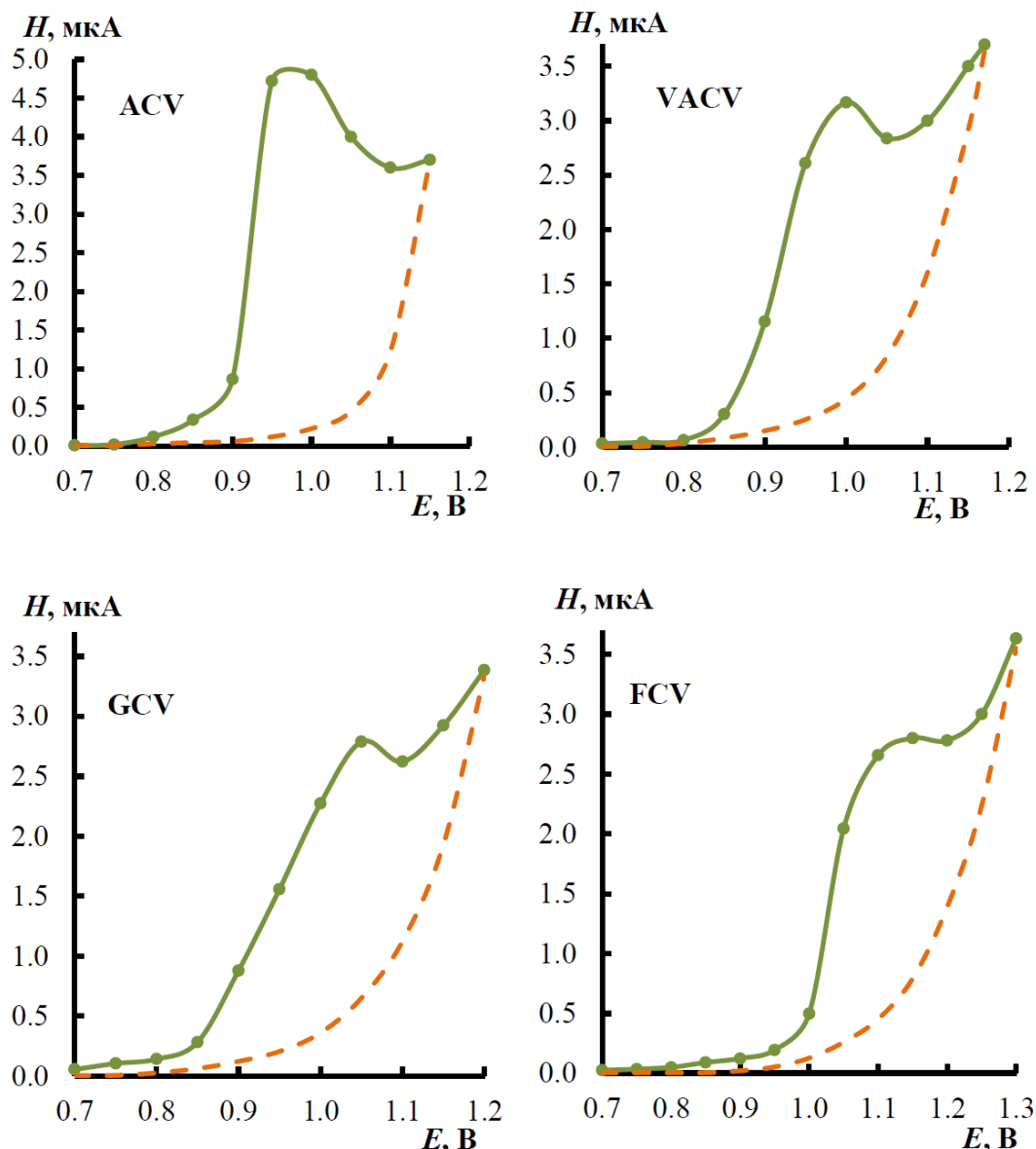


Рисунок 4.3. Гидродинамические вольтамперограммы, полученные для исследуемых веществ в разработанной ПИ-системе путем регистрации изменения сигнала тока при различных значениях потенциала поляризации рабочего электрода. Концентрация веществ 100 мкг/мл, рН 7 (0.1 М ФБР). Скорость потока 2.0 мл/мин, инжестируемый объем 500 мкл.

Можно видеть, что во всех случаях гидродинамические вольтамперограммы имеют вид кривой с максимумом. При этом наибольшие по высоте сигналы отвечают значениям потенциалов, практически совпадающим с соответствующими потенциалами пиков E_{pa} окисления этих веществ, регистрируемых в стационарных условиях методом циклической вольтамперометрии.

Диапазоны варьирования и оптимальные значения рабочих параметров ПИ-системы указаны в табл.4.1.

Таблица 4.1 – Диапазоны варьирования и найденные оптимальные значения рабочих параметров разработанной ПИ-системы с амперометрическим детектированием на активированном углесталловом электроде

Параметр	Диапазон варьирования	Оптимальное значение
pH (0.1 М ФБР)	1.6 – 9.0	6.5 ± 0.5
Скорость потоков, мл/мин:	0.6 – 3.0	
v_1		2.0
v_2		1.5
Инжектируемый объем пробы V , мкл	0 – 800	500
Рабочий потенциал $E_{\text{опт}}$, В:	0.7 – 1.3	
ACV		0.98
VACV		1.00
GCV		1.05
FCV		1.16

В выбранных условиях производительность разработанной амперометрической ПИ-системы Q составляет $75\text{--}90 \text{ ч}^{-1}$. При этом время контакта инжектируемого раствора с поверхностью рабочего электрода составляет приблизительно $20\text{--}40 \text{ с}$.

Аналитические характеристики метода и анализ фармацевтических препаратов. Аналитические характеристики разработанного ПИ-метода для амперометрического определения всех изученных противовирусных веществ, суммированы в табл.4.2.

Таблица 4.2 – Характеристики концентрационных зависимостей для изученных противовирусных веществ, полученные методом ПИА с амперометрическим детектированием на АУСЭ ($P= 0.95$, $n = 4$)

Вещество	Уравнение регрессии $H = \Delta I(\text{мкА}) = a c + b$	Диапазон линейности, мкг/мл	r	C_{min} , мкг/мл
ACV	$H = 0.049 c - 0.057$	4 – 200	0.9995	1.2
VACV	$H = 0.032 c - 0.042$	6 – 200	0.9997	1.9
GCV	$H = 0.027 c + 0.079$	8 – 250	0.9996	2.2
FCV	$H = 0.026 c + 0.053$	10 – 250	0.9999	2.4

В качестве примера на рис.4.4 представлена типичная ПИ-регистраграмма, полученная при поочерёдном введении в поток носителя (0.1 М ФБР) равных микрообъемов растворов, содержащих разные концентрации АСV.

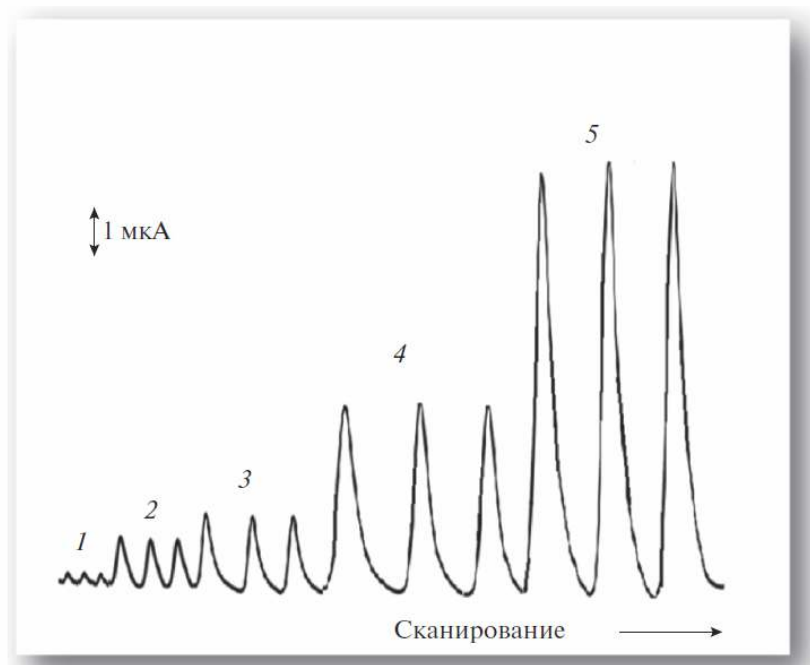


Рисунок 4.4. Типичная ПИА-регистраграмма, полученная при введении в поток фонового электролита (носителя) равных микрообъемов (500 мкл) растворов АСV. Концентрация АСV, мкг/мл: 1 – 5, 2 – 20, 3 – 30, 4 – 100, 5 – 200.

В табл.4.3 представлены результаты анализа растворов различных лекарственных форм, содержащих АСV, VАСV, GCV и FСV, выполненного предложенным методом. Результаты определения компонентов анализируемых препаратов показали отсутствие систематической погрешности ($t_{эмп} < t_{крит}$), а величина относительного стандартного отклонения s_r во всем диапазоне исследуемых концентраций варьировалась в пределах 0.01 – 0.05.

Из полученных результатов следует, что впервые разработанный нами метод ПИА/Амп для амперометрического определения АСV и его производных отличается от ранее предложенных методов тем, что позволяет проводить прямое детектирование этих веществ в растворенных лекарственных формах без какой-либо пробоподготовки (сравни с данными табл. 1.8).

Таблица 4.3 – Оценка проверки правильности (ПП) и воспроизводимости (s_r) результатов определения исследуемых веществ (мкг/мл) в растворенных лекарственных препаратах ($P = 0.95$, $n = 5$)

Препарат	Определяемое вещество	Расчетное содержание в пробе	Найдено	ПП, %	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
		100.0	99 ± 1	99.0	0.008
Ацикловир натриевая соль (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	25.0	24.3 ± 0.8	97.2	0.03
		50.0	50 ± 2	100.0	0.03
		100.0	101 ± 3	101.0	0.02
		200.0	199 ± 3	99.5	0.01

4.3 Определение пуриновых оснований

Выбор величины поляризующего напряжения. В связи с тем, что высота амперометрического отклика АУСЭ зависит от величины поляризующего напряжения, в найденных оптимальных условиях ПИ-системы были получены гидродинамические вольтамперограммы Gua и Ade, представленные на рис. 4.5. Согласно приведенным данным, наилучшие условия определения достигаются при использовании в качестве фонового электролита 0.1 М ФБР (рН ~ 4) и детектировании амперометрического сигнала Gua при $E_{\text{опт}} = +0.95$ В, а Ade при $E_{\text{опт}} = +1.28$ В. При этом взаимное мешающее влияние этих веществ друг на друга практически отсутствует, что открывает возможности для их совместного определения.

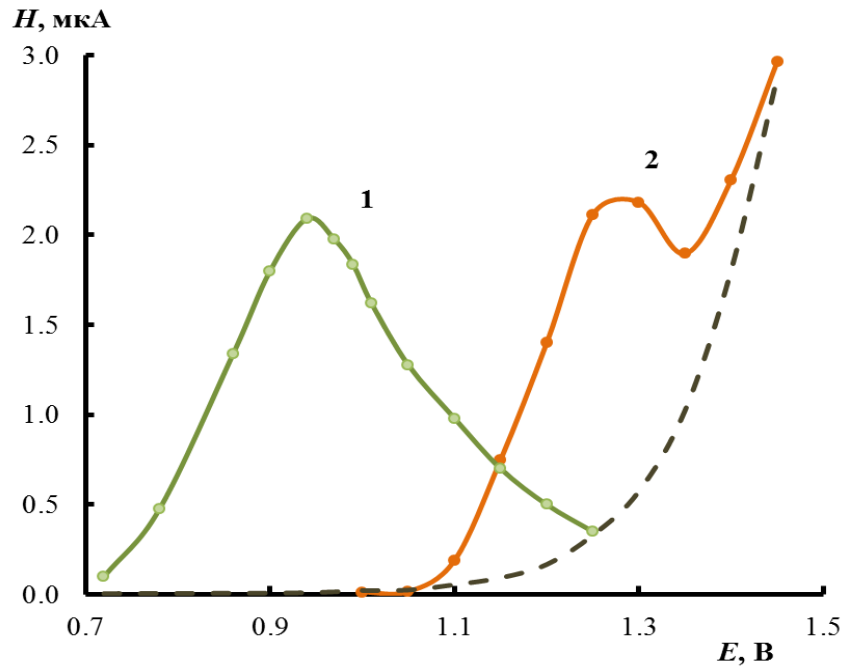


Рисунок 4.5. Гидродинамические вольтамперограммы, полученные для 20 мкг/мл Gua (1) и 27 мкг/мл Ade (2) путем регистрации изменения сигнала тока (H) при различных значениях потенциала поляризации рабочего электрода (E). Фоновый электролит – 0.1 М ФБР, рН 4. Скорость потока 2.0 мл/мин. пунктирная линия – сигнал фона.

Аналитические характеристики метода. Типичные ПИ-сигналы, полученные при трехкратном введении в ПИ-систему 500 мкл растворов с разным содержанием Gua и Ade путем их измерения при двух разных потенциалах: $E_1 = +0.95$ В и $E_2 = +1.28$ В, представлены на рис.4.6. Установлено, что в случае инжектирования индивидуальных растворов амперометрический сигнал прямолинеен в диапазоне концентраций 2 – 200 мкг/мл для Gua и 3 – 200 для Ade и описывается следующими уравнениями:

$$H^{\text{Gua}} = 0.099 c + 0.069 \quad (r = 0.9999) \quad (4.1)$$

$$H^{\text{Ade}} = 0.068 c + 0.369 \quad (r = 0.9997) \quad (4.2).$$

Предел обнаружения c_{\min} , рассчитанный по уравнению (2.1) составил 0.4 мкг/мл (~ 2.6 мкМ) и 0.9 мкг/мл (~ 6.7 мкМ) для Gua и Ade соответственно.

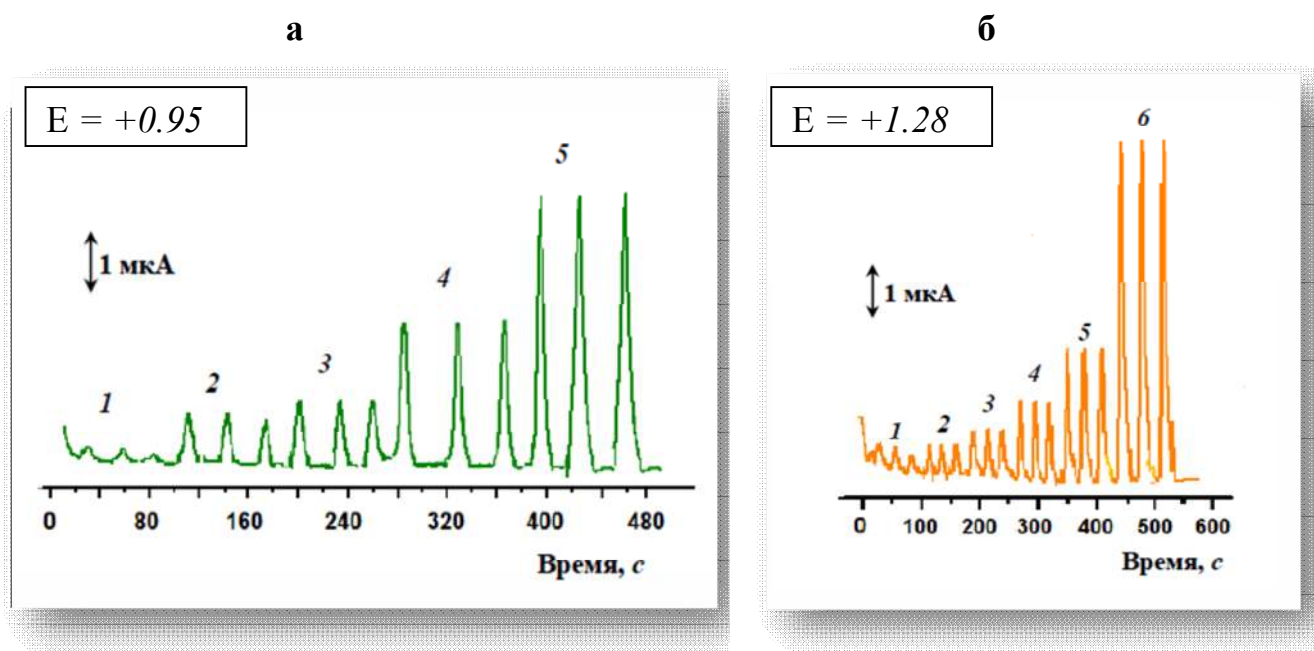


Рисунок 4.6. ПИА-регистрограммы, полученные при трехкратном введении растворов Gua (а) и Ade (б) и регистрации амперометрических сигналов при двух разных потенциалах поляризации АУСЭ. Концентрация Gua, мкг/мл: 1 – 2; 2 – 7; 3 – 10; 4 – 25; 5 – 50. Концентрация Ade, мкг/мл: 1 – 5; 2 – 10; 3 – 20; 5 – 40; 6 – 100. Фоновый электролит – 0.1 М ФБР, рН 4.

Анализ фармацевтических препаратов, содержащих аденин. В медицинской практике Ade используется, преимущественно, как консервант при заготовках препаратов крови, а также как гепатопротектор для печени при лечении алкогольной и наркотической зависимости. Он применяется и как средство, улучшающее когнитивные процессы в центральной нервной системе человека. Под его действием активизируется умственная и физическая активность, нормализуется память, повышается способность к концентрации внимания и так далее.

Разработанный метод ПИА/Амп был апробирован при анализе таблеток аденин фосфата и гемоконсерванта Фаглюцида, содержащего Ade на фоне лимонной кислоты, цитрата и гидрофосфата натрия. Некоторые результаты проведенных анализов и проверки правильности и воспроизводимости полученных данных приведены в табл.4.4.

Таблица 4.4 – Оценка правильности и воспроизводимости результатов определения Ade в растворенных лекарственных формах ($P = 0.95$, $n = 6$)

Препарат	Расчетное содержание Ade в пробе, мкг/мл	Введено, мкг/мл	Найдено, мкг/мл	ПП, %	s_T
Аденин фосфат, таблетки (20 мг/табл.)	20.0	–	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 ^R раствор (0.34 г/л)	34.0	–	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

4.4 Определение кофеина

Среди важнейших лекарственных средств широко используются комбинированные анальгетики, содержащие кофеин совместно с парацетамолом (Pc), аскорбиновой кислотой (AA) и ацетилсалициловой кислотой (ASA). В связи с этим в литературе имеется несколько публикаций по их совместному электрохимическому определению [74,75,167,196–198]. В основе определения лежит способность этих веществ окисляться в анодной области потенциалов, что нередко вносит существенную погрешность в результаты анализа их смесей и требует тщательного выбора условий электрохимических измерений.

Вольтамперометрическое поведение Caf в присутствии парацетамола, аскорбиновой и ацетилсалициловой кислот. Предварительные исследования методом циклической вольтамперометрии показали, что наиболее четкие отдельные пики окисления для всех трех вышеуказанных веществ удается регистрировать на АУСЭ при использовании в качестве фонового электролита 0.1 М H₂SO₄. На рис.4.7 представлены циклические вольтамперограммы, полученные в сернокислых растворах, содержащих бинарные смеси Caf–Pc, Caf–AA и Caf–ASA. Видно, что во всех случаях удается регистрировать достаточно четкий анодный пик кофеина, высота которого линейно зависит от его концентрации (в мг/мл) согласно следующему уравнению:

$$I, \text{ мкА} = 86.73 c + 248.03 \quad (r = 0.9997) \quad (4.3).$$

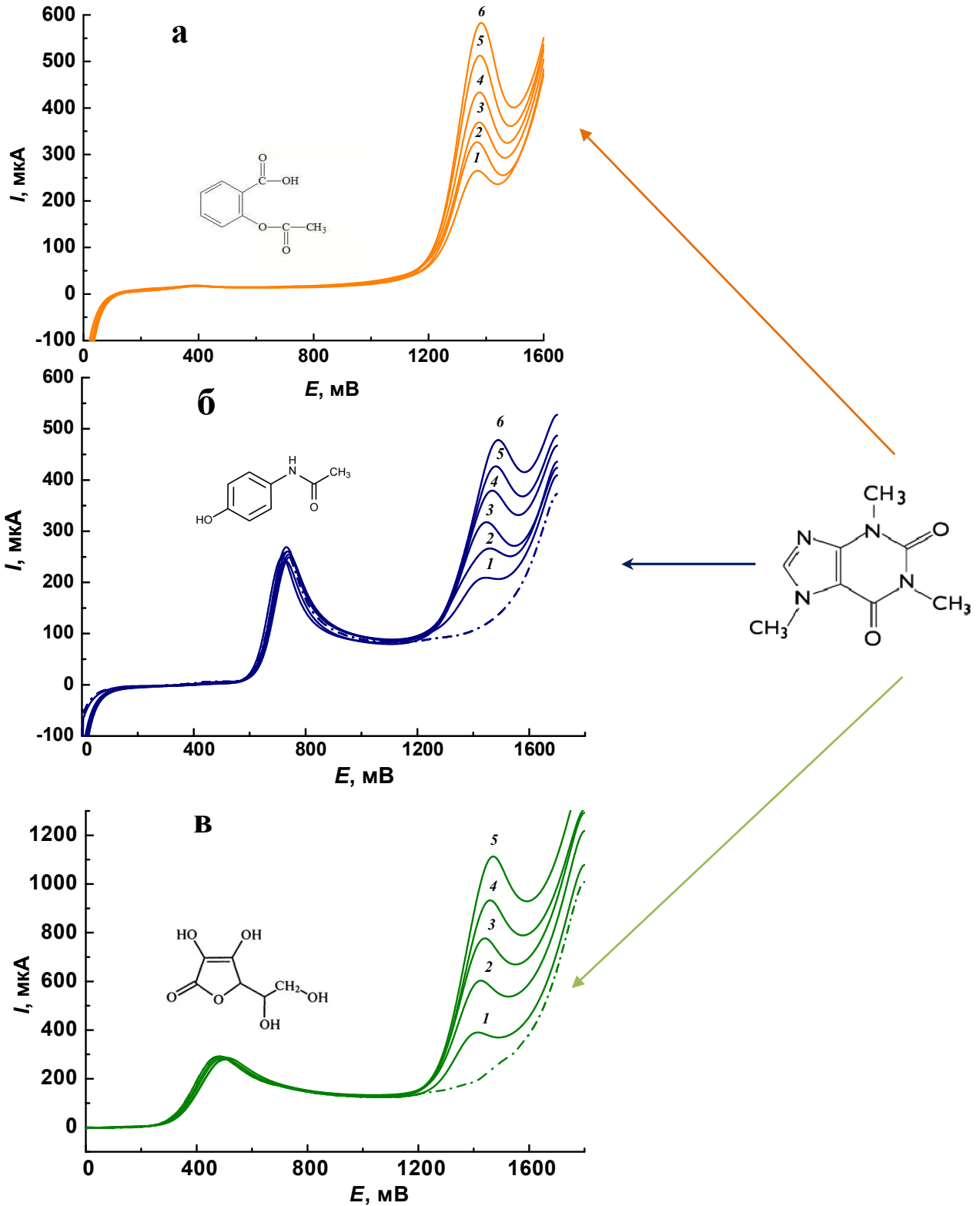


Рисунок 4.7. Анодные ветви циклических вольтамперограмм сернокислых растворов Caf (в мкг/мл) в присутствии 50 мкг/мл ASA (а): 1 – 0.25, 2 – 1.0, 3 – 1.5, 4 – 2.0, 5 – 3.0, 6 – 4.0; в присутствии 25 мкг/мл Pc (б): 1 – 0.20, 2 – 1.0, 3 – 1.5, 4 – 2.0, 5 – 2.5; в присутствии 50 мкг/мл AA (в): 1 – 1.5, 2 – 4.0, 3 – 6.0, 4 – 8.0, 5 – 10.0. Пунктирная линия – в отсутствие Caf.

Кроме того, возможно получить отдельные пики окисления аскорбиновой кислоты или парацетамола и кофеина, разность потенциалов между которыми составляет более 700 мВ.

Выбор величины поляризующего напряжения. С целью выбора величины поляризующего напряжения для детектирования амперометрического сигнала в ПИ-системе были получены гидродинамические вольтамперограммы Caf и Pc, представленные на рис. 4.8.

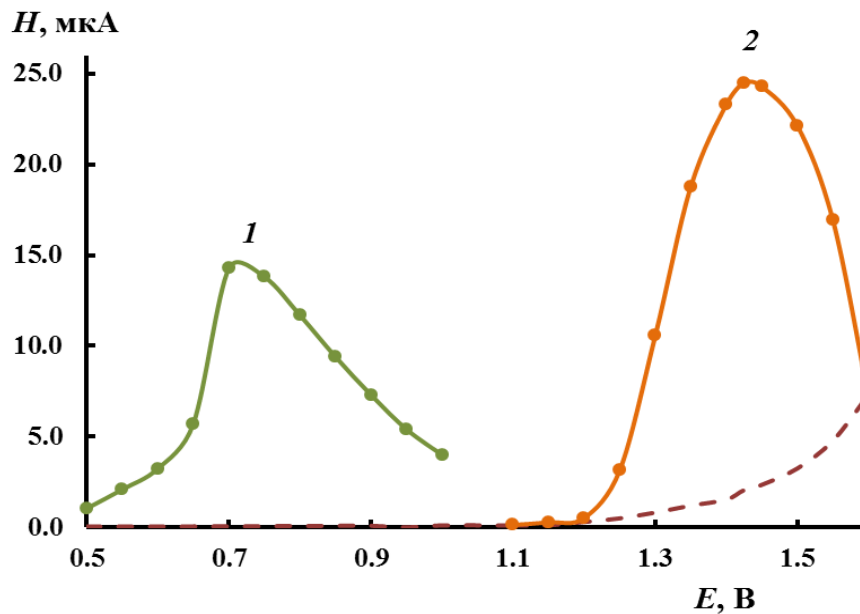


Рисунок 4.8. Гидродинамические вольтамперограммы, полученные для 100 мкг/мл Pc (1) и 200 мкг/мл Caf (2) путем регистрации изменения сигнала тока (I , мкА) при различных значениях потенциала поляризации рабочего электрода (E , В). Фоновый электролит – 0.1 М H_2SO_4 . Скорость потока 2.0 мл/мин. пунктирная линия – сигнал фона.

Согласно полученным данным, наилучшие условия детектирования амперометрического сигнала Pc реализуются при $E_{\text{опт}} = +0.73$ В, а Caf – при $E_{\text{опт}} = +1.43$ В. При этом взаимное мешающее влияние этих веществ друг на друга практически отсутствует, что открывает возможности для их совместного определения.

Аналитические характеристики метода. Типичные ПИ-сигналы, полученные при двух разных потенциалах ($E_1 = +0.7$ В и $E_2 = +1.4$ В) и отвечающие введению в ПИ-систему по 500 мкл растворов смеси Рс (25 мкг/мл) и Саf (50 мкг/мл), представлены на рис. 4.9.

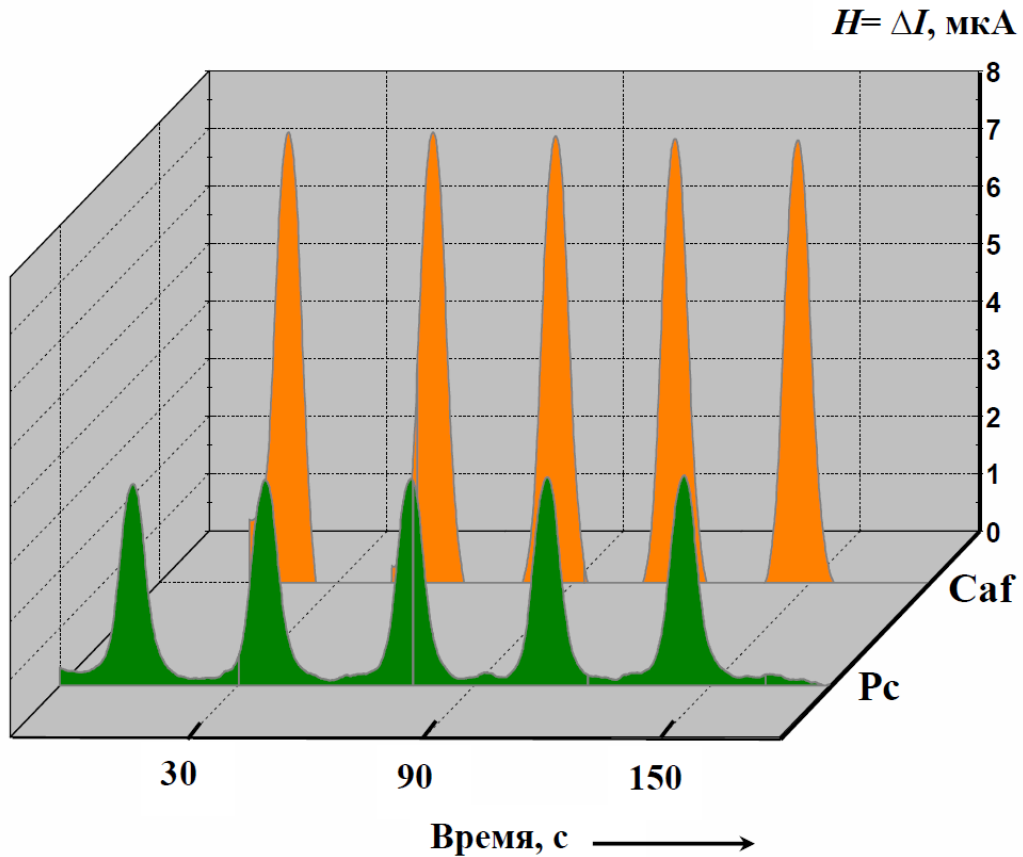


Рисунок 4.9. ПИ-регистраграммы, полученные при последовательном введении в ПИ-систему равных микрообъемов смеси Рс (25 мкг/мл) и Саf (50 мкг/мл) и регистрации амперометрических сигналов Рс ($E = +0.7$ В) и Саf ($E = +1.4$ В).

Установлено, что амперометрический сигнал прямолинеен в диапазоне концентраций 3 – 500 мкг/мл для Рс и 2 – 200 для Саf и описывается следующими уравнениями:

$$H^{Pc} = 0.103 c + 0.563 \quad (r = 0.9997) \quad (4.4)$$

$$H^{Caf} = 0.119 c + 0.850 \quad (r = 0.9996) \quad (4.5).$$

Предел обнаружения c_{\min} , рассчитанный по уравнению (2.1) составил 0.6 мкг/мл (4 мкМ) и 0.5 мкг/мл (2 мкМ) для Рс а и Саf соответственно.

Анализ лекарственных форм. Разработанный метод был опробован при анализе готовых таблетированных лекарственных форм, содержащих Pс, Caf и ASA (табл.4.5). Предварительная пробоподготовка включала получение сернокислых растворов, содержащих примерно путем 50 – 100 мкг/ мл определяемых веществ.

Таблица 4.5 – Результаты определения Caf и Pс в комплексных лекарственных препаратах ($n = 5, P = 0.95$)

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

Правильность и селективность определений подтверждена сравнением с расчетными значениями: показатель правильности составляет 97 – 102 %. При этом величина относительного стандартного отклонения s_r не превышает 0.04.

4.5 Автоматизированная система – тест «Растворение»

Следует отметить, что отличительной чертой современного фармацевтического рынка России является преобладание дженериков – более дешевых, по сравнению с оригиналами, воспроизведенных лекарственных средств. В частности, в России зарегистрировано 67 дженериков таблеток АСV [199]. Фармацевтически эквивалентными дженериками считаются лекарственные препараты, содержащие одинаковое количество одной и той же субстанции в одной и той же форме оригинального лекарственного средства. Одним из важнейших подходов к in-vitro экспериментальной оценке фармацевтической эквивалентности твердых лекарственных форм является тест «Растворение» [200

– 202]. Цель теста – установить скорость и степень высвобождения фармацевтической субстанции (ФС), перешедшей в среду растворения из лекарственного препарата [203]. Чаще всего, ограничиваются определением по одной временной точке (45 минут) – обычный контроль качества. Однако наибольший интерес представляет определение профиля растворения, особенно при установлении эквивалентности препаратов в случае изменений состава и технологии. В качестве метода определения ФС, высвободившейся из лекарственного препарата в среду растворения, чаще всего используют УФ-спектрофотометрию, реже – масс-спектрометрию, ВЭЖХ, потенциометрическое титрование и другие [204]. Разработаны автоматические приборы для выполнения теста «Растворение» в проточных системах со спектрофотометрическим [205] и потенциометрическим [119] детектированием.

Общая схема ПИ-системы. Нами показаны возможности реализации теста «Растворение» с использованием разработанной ПИ-системы (рис.4.10).

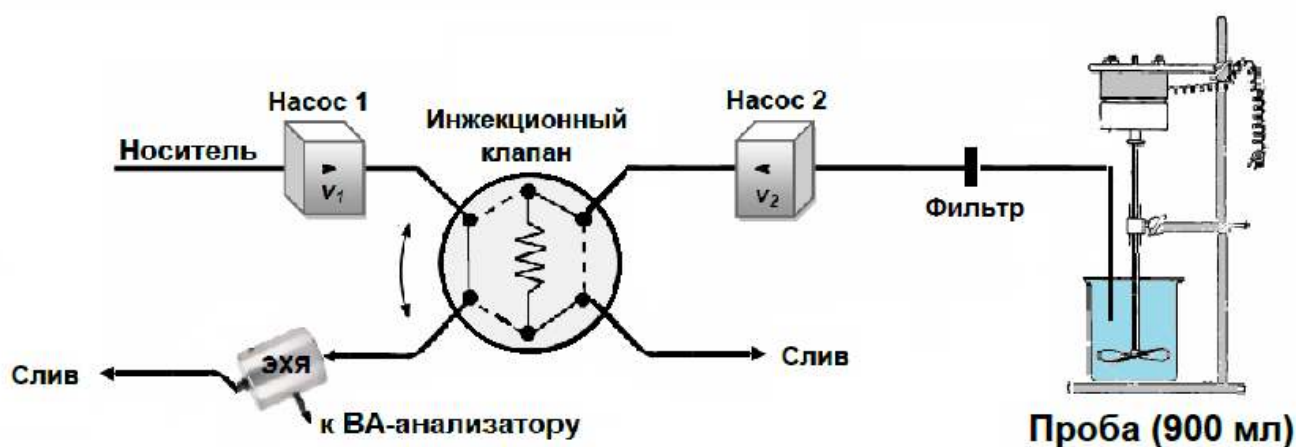


Рисунок 4.10. Общее схематическое изображение ПИ-системы для реализации теста «Растворение».

Такая система позволяет достаточно достоверно моделировать поведение лекарственных средств в биорелевантных средах, имитирующих состав и свойства физиологических жидкостей желудочно-кишечного тракта. Испытание проводили в режиме *on-line* в стандартных условиях механического перемешивания (скорость вращения мешалки – 50 об/мин) и термостатирования

(37.0 ± 0.5 °C) [201]. В качестве среды растворения использовали 900 мл модельного раствора желудочного сока после еды (0.1 М раствор HCl + 2 г NaCl) [206]. Периодичность отбора пробы – 60 с. В сочетании с достаточно высокой чувствительностью отклика АУСЭ, это позволяет получить точную информацию о кинетике растворения твердых дозированных лекарственных форм по количеству действующего вещества, перешедшего в среду растворения. Несомненным преимуществом предложенной системы перед стандартными фармакопейными методиками на основе УФ-спектрофотометрии [207] является возможность увеличить частоту отбора проб, обеспечить более высокую селективность и уменьшить влияние плацебо (< 2 %). Явным преимуществом нового метода является простота исполнения и малая продолжительность выполнения анализа.

Определение профиля растворения таблетированных форм ACV и VACV.

На рис. 4.11 представлены сравнительные профили высвобождения активных веществ (ACV или VACV) во времени из таблеток, представленных на фармацевтическом рынке РФ.

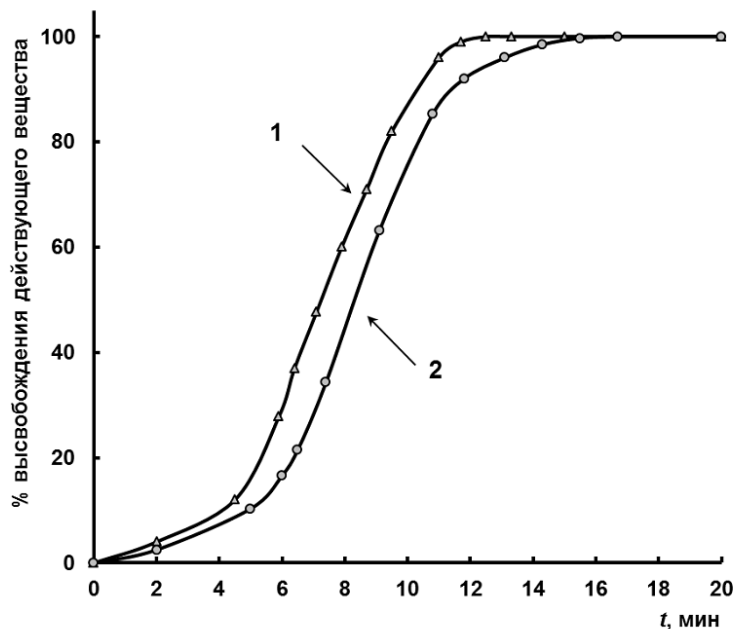


Рисунок 4.11. Профили высвобождения активного вещества из таблетированных лекарственных препаратов, полученные при реализации теста “Растворение” в ПИ-системе. Активное вещество: 1 – ACV, 2 – VACV.

Полученные результаты наглядно показывают, что оба эти изученных препарата относятся к категории «очень быстрорастворимых» лекарственных форм – за 15 мин из них должно перейти в среду растворения не менее 85 % субстанции [207]. Следует отметить, что известные ВЭЖХ-методики для изучения растворимости препаратов, содержащих АСV достаточно специфичны, особенно при использовании спектрофлуориметрического детектора вместо УФ-детектора, но флуоресценция АСV сильно зависит от рН. Кроме того, время удерживания АСV на колонке нередко достигает 5 мин. [208].

Определение профиля высвобождения Caf и Pc из комбинированных препаратов. На рис.4.12 и 4.13 представлены профили высвобождения Caf и Pc из комбинированных препаратов «Седальгин Плюс» и «Кофицил Плюс» соответственно. Из приведенных данных следует, что за 10 мин в среду растворения переходит почти 100 % субстанции.

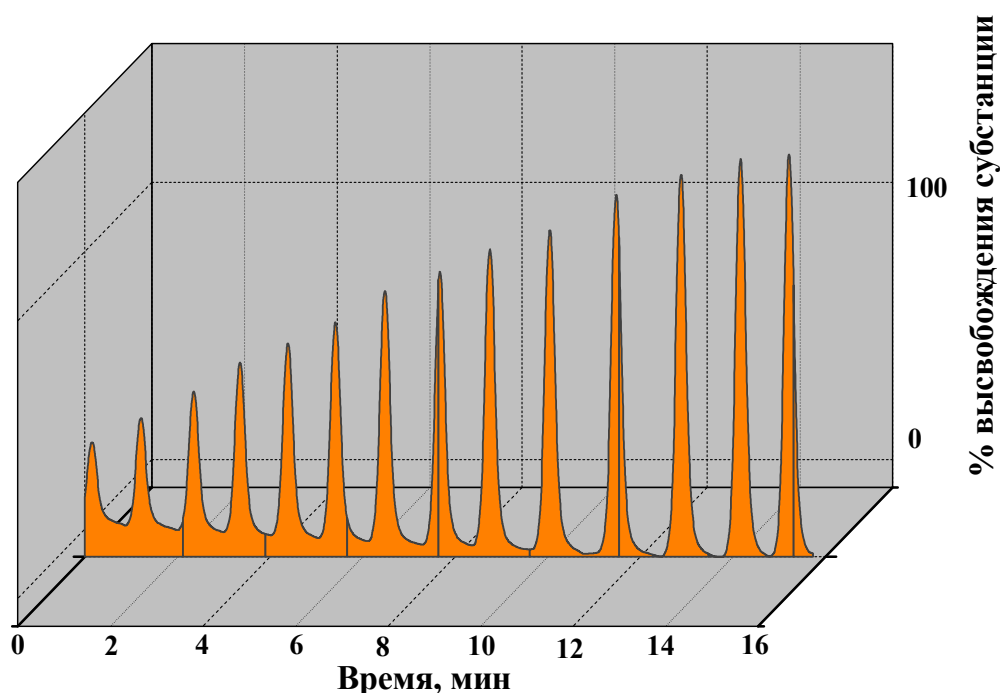


Рисунок 4.12. Сигналы, полученные в ПИ-системе (рис.4.10) и характеризующие кинетику высвобождения Caf из препарата «Седальгин Плюс».

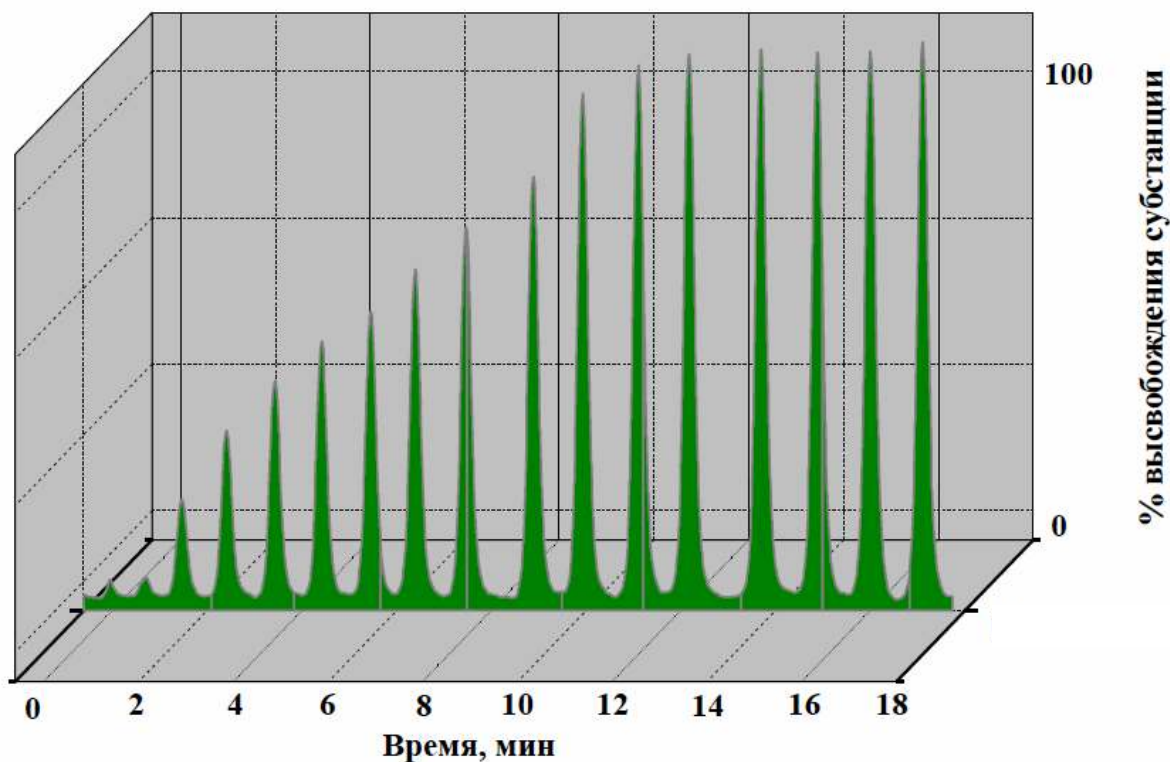


Рисунок 4.13. Сигналы, полученные в ПИ-системе (рис.4.10) и характеризующие кинетику высвобождения Рс из препарата «Кофицил Плюс».

В целом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о перспективности использования предложенного автоматизированного метода ПИА/Амп как альтернативного способа контроля качества лекарственной формы изученных веществ, оценке их фармацевтической эквивалентности и выявления фальсифицированных препаратов.

ГЛАВА 5. Метод последовательно-инжекционного анализа для адсорбционного инверсионно-вольтамперометрического определения пуринов в биомедицинских объектах

Исследования последних лет в области компьютеризации и миниатюризации электроанализа показали, что в практическом отношении перспективно использование автоматизированных систем ПослИА [209, 210]. Значительный интерес представляет сочетание методологических принципов ПослИА с адсорбционной инверсионной вольтамперометрией (**АдИВА**) [211]. Такой подход позволяет реализовать в режиме on-line концентрирование следовых количеств определяемых компонентов на электроде перед измерением электрохимического сигнала. До недавнего времени подобные системы были известны только для определения следов металлов [212,213]. Лишь в последние годы были опубликованы две работы китайских исследователей, посвященные определению пуринов на β -CD – композитном электроде методом ПослИА в варианте *lab-on-valve* [111,112].

Проведенное нами исследование морфологии активированной поверхности АУСЭ показало, что она имеет высокопористую структуру и содержит как сильные (карбонильные), так и слабые (карбоксильные) кислотные группы. В связи с этим, нами была изучена возможность использования АУСЭ для адсорбционного инверсионно-вольтамперометрического детектирования следовых количеств исследуемых пуринов в системе ПослИА.

Предлагаемый метод ПослИА/АдИВА основан на накоплении аналита на поверхности АУСЭ в контролируемых условиях массопереноса с последующим вольтамперометрическим измерением адсорбционных пиков (v , 100 мВ/с). В качестве фонового электролита выбран 0.1 М ФБР.

5.1 Описание схемы и выбор параметров проточной системы

На рис.5.1 дано схематическое изображение автоматизированной системы ПослИА с *on-line* адсорбционным концентрированием анализируемого вещества на АУСЭ и последующим вольтамперометрическим детектированием в режиме остановленного потока.

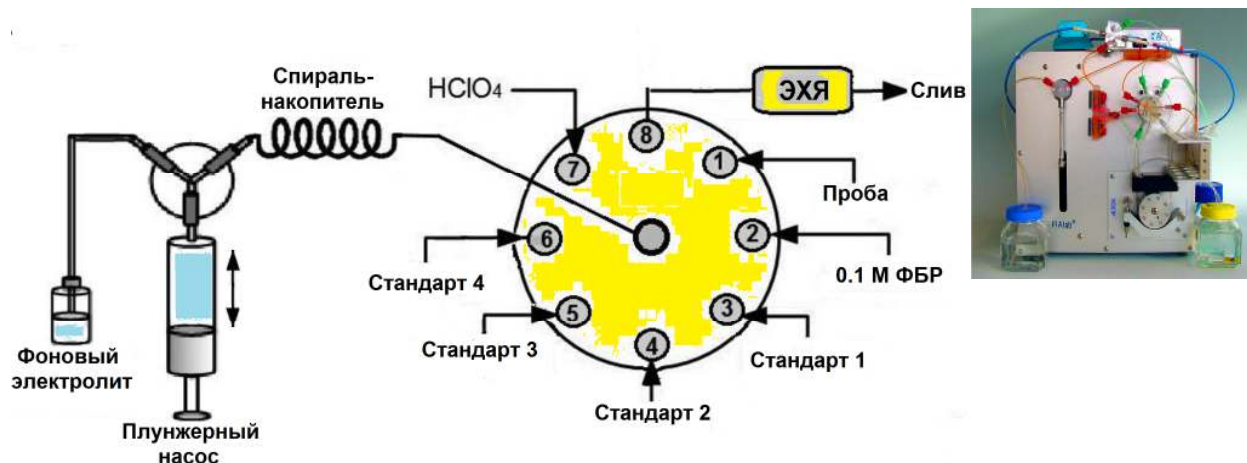


Рисунок 5.1. Общая схема системы ПослИА/АДИВА.

Основными компонентами такой системы являются восьмиходовой селекторный клапан, плунжерный (шприцевой) насос и проточная электрохимическая ячейка (ЭХЯ). Программируемый протокол реализации аналитического цикла, указан в таблице 5.1 и предусматривает выполнение следующих операций:

- отбор аликвоты пробы (стандартных растворов) в спираль-накопитель;
- пропускание пробы (стандартов 1-4) через проточную ЭХЯ и накопление аналита на АУСЭ;
- подачу фонового электролита (0.1 М ФБР) в ЭХЯ;
- регистрацию инверсионной вольтамперной кривой в остановленном потоке;
- регенерацию и *on-line* активацию электродной поверхности.

Эффективность анализа в такой системе во многом определяется параметром накопления, который контролирует предел обнаружения определяемого вещества. Поэтому регистрируемый сигнал зависит от потенциала накопления E_n , времени

накопления t_n и скорости v_n прокачивания пробы через ЭХЯ в процессе накопления.

Таблица 5.1 – Протокол аналитического цикла измерений, используемый для определения пуринов в системе ПослИА/АдИВА.

Процедура	Позиция клапана	t , с	v , мкл/с	V , мкл
Заполнение системы фоновым электролитом	8	100	20	2000
Отбор аликвоты пробы (стандартных растворов 1–4)	1, 3–6	30	20	600
Накопление пробы (стандартных растворов) на АУСЭ	8	120–30	2–20	–
Отбор 0.1 М ФБР	2	30	20	600
Подача 0.1 М ФБР в ЭХЯ	8	30	20	–
Стадия успокоения	8	20	0	–
Регистрация вольтамперной кривой	8	20	0	–
Прокачивание фонового электролита через систему, очистка системы и поверхности электрода	8	100	20	2000
Отбор HClO_4	7	30	20	600
Подача HClO_4 в ЭХЯ, электрохимическая активация поверхности электрода при +1.4 В	8	60	10	–

5.2 Определение пуриновых оснований

Выбор условий накопления на АУСЭ. Эксперимент показал, что пуриновые основания нуклеиновых кислот способны адсорбироваться на пористой поверхности АУСЭ. В связи с этим, представляло интерес изучить инверсионно-вольтамперметрическое поведение этих веществ в гидродинамическом режиме и установить экспериментальные зависимости тока окисления адсорбированных веществ $I_n^{\text{адс}}$ от E_n и t_n при фиксированной скорости потока $v_n = 10$ мкл/с. Опыты проводили с использованием проточной системы с *in-valve* детектором (рис.5.2).

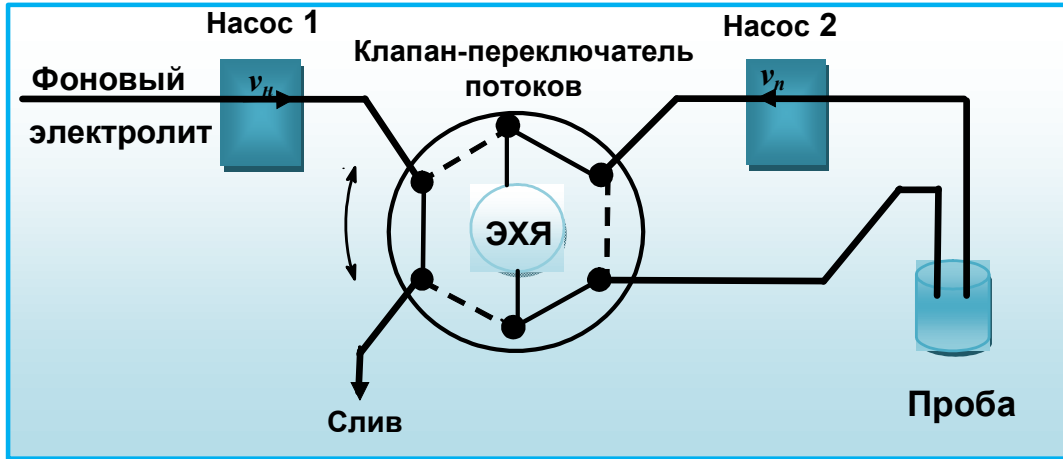


Рисунок 5.2 Схематическое изображение проточной системы с *in-valve* вольтамперометрическим детектором.

Влияние E_n на пики окисления Gua и Ade, адсорбированных на АУСЭ, изучали в пределах значений потенциалов поляризации рабочего электрода от -0.5 до $+0.3$ В при $t_n = 60$ с. Результаты показали, что высоты пиков $I_n^{алс}$ для обоих веществ незначительно уменьшаются при изменении потенциала накопления в пределах $-0.4 - 0.0$ В (рис.5.3).

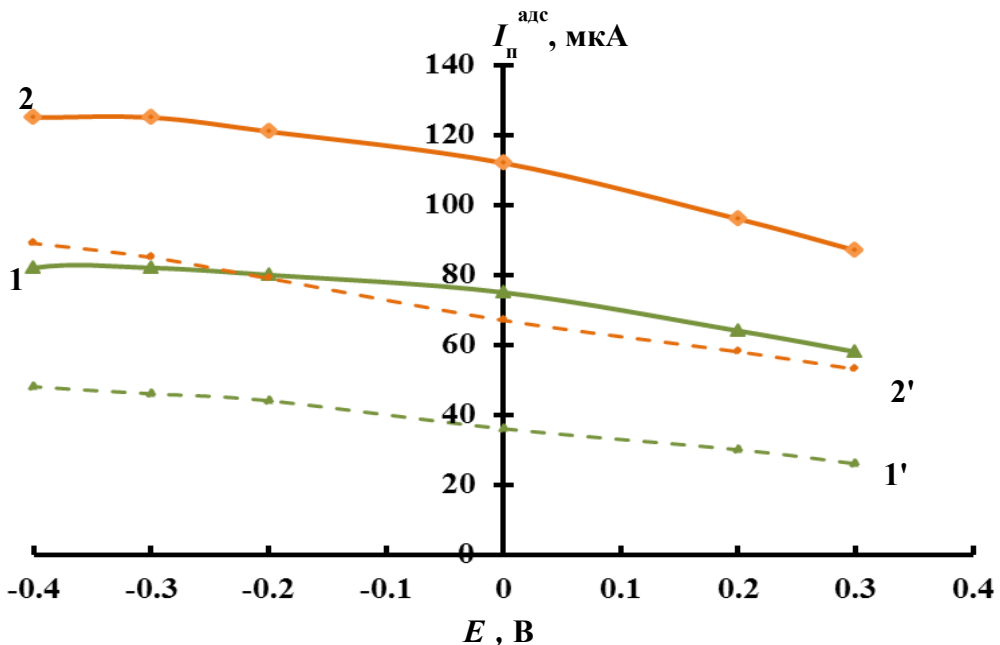


Рисунок 5.3. Эффект E_n на высоту пиков окисления 5 мкМ Gua (1) и 5 мкМ Ade (2), регистрируемых на АУСЭ после концентрирования в течение 60 с, а также соответствующие фоновые значения тока в 0.1 М ФБР (рН 4) для Gua (1') при $+0.95$ В и Ade (2') при $+1.28$ В.

При положительных значениях E_H высота пика уменьшается, что может быть объяснено худшей адсорбционной способностью этих веществ на положительно заряженной поверхности АУСЭ в условиях эксперимента. Однако при накоплении в анодной области потенциалов происходит заметное увеличение фонового тока. Отсюда следует, что наилучшие результаты с точки зрения соотношения высоты адсорбционного пика к фону достигаются при накоплении Gua и Ade при разомкнутой цепи.

Эффект t_H на высоту пиков Gua и Ade оценивали путем изменения t_H от 0 до 600 с на активированном УСЭ в условиях разомкнутой цепи. Как можно видеть из вольтамперограмм, изображенных на рис. 5.4 и 5.5, высоты пиков окисления для обоих соединений возрастают с увеличением t_H .

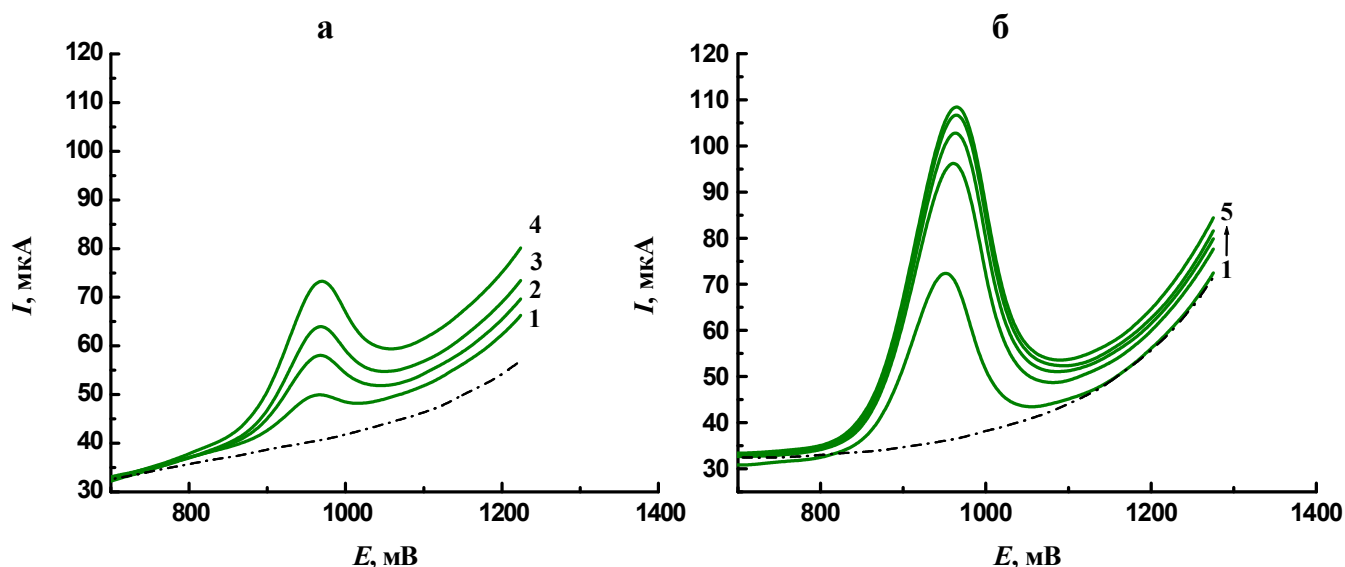


Рисунок 5.4. Инверсионные вольтамперные кривые, полученные на АУСЭ в 0.1 М ФБР (рН 3.9), содержащем 1.0 мкМ Gua (а) и 5.0 мкМ Gua (б), при различном t_H (с): а – 60 (1), 120 (2), 180 (3), 240 (4); б – 60 (1), 120 (2), 180 (3), 240 (4), 300 (5). v , 0.1 В/с.

Как показано на рис. 5.6, зависимость тока пика от t_H , регистрируемого в растворах, содержащих до 5 мкМ Gua, практически прямолинейна. Для растворах с концентрацией аналита свыше 5 мкМ эта зависимость имеет вид кривой с насыщением при $t_H > 120$ с. Сходные зависимости получены и для Ade.

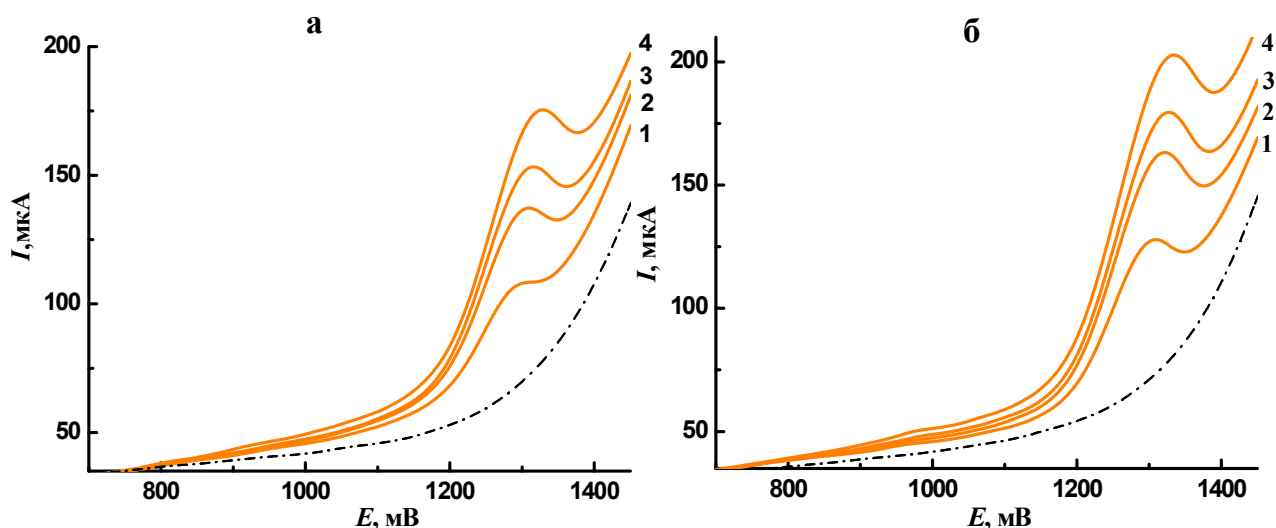


Рисунок 5.5. Инверсионные вольтамперные кривые, полученные на АУСЭ в растворах 5.0 мкМ Ade (а) и 10.0 мкМ (б) в 0.1 М ФБР (рН 3.5) в зависимости от t_n при разомкнутой цепи (с): 60 (1), 120 (2), 180 (3), 240 (4). v , 0.1В/с.

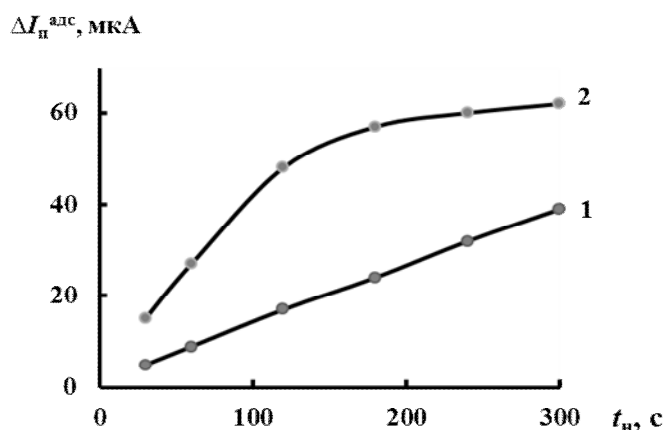


Рисунок 5.6. Эффект t_n при разомкнутой цепи на инверсионный пик, регистрируемый в растворах (рН 4) с разным содержанием Gua (в мкМ): 1 – 1; 2 – 5.

Аналитические характеристики детектирования Gua и Ade разработанным методом ПослИА/АДИВА представлены в табл.5.2. При построении градуировочного графика в качестве аналитического параметра использовали величину относительной высоты пика ΔI_n , представляющую собой разность между высотой пика и током базовой линии под пиком [214]:

$$\Delta I_n = I_n - I_{\text{фон}} = k t_n c \quad (5.1),$$

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

Таблица 5.2 – Аналитические характеристики метода ПослИА/АДИВА для определения Gua и Ade (0.1 М ФБР, рН 4.0 ± 0.5) при $t_H = 120$ с

Характеристика	Gua	Ade
Уравнение градуировочного графика $\Delta I_{\text{п}}(\text{мкА}) = a c (\text{мкМ}) + b$	$\Delta I_{\text{п}} = 8.16 c + 0.10$	$\Delta I_{\text{п}} = 5.18 c + 0.13$
Коэффициент корреляции r	0.9997	0.9996
Диапазон линейности графика (мкМ)	0.1 – 10	0.2 – 30
c_{min} (нМ)	50	75

В табл.5.3 сопоставлены характеристики разработанного метода с другими, опубликованными в литературе методами, включающими предварительное концентрирование пуриновых оснований на различных электродах.

Таблица 5.3 – Сравнительные характеристики определения Ade и Gua методами, включающими стадию адсорбции на различных электродах.

Режим измерения/ рабочий электрод	E_H , В	t_H , с	Диапазон линейности, мкМ		Ссылка
			Gua	Ade	
<i>Lab-on-valve</i> , металло-органический нанокompозитный электрод	-0.3	120	0.1 – 10		[112]
ДИВА, графен-хитозан модифицированный СУЭ	-0.2	180	2.5 – 150	1.5 – 350	[154]
ДИВА, нанокompозитный СУЭ	+0.3	600	1 – 45		[215]
ДИВА, нанокompозитный СУЭ		240	0.1 – 20	0.4 – 37	[216]
ДИВА, графен-нафион модифицированный СУЭ		300	2 – 120	5 – 170	[131]
АДИВА, электрохимически активированный СУЭ		240	1.6 – 31	1.9 – 37	[162]
ДИВА, графен-СООН/СУЭ	–	100	0.5 – 200		[217]
ДИВА, нанокompозитный электрод на основе Pt-Pd-сплава		300	0.1 – 10		[153]
ПослИА/АДИВА, АУСЭ		120	0.1 – 10	0.2 – 30	Эта работа

5.3 Определение синтетических аналогов дезоксигуанозина

Подобно пуриновым основаниям, АСV и другие изученные аналоги дезоксигуанозина способны адсорбироваться на АУСЭ. В связи с этим, нами были исследованы условия их определения методом ПосЛИА/АдИВА.

Выбор условий накопления на АУСЭ. Установлено, что высота анодных пиков АСV и его аналогов растет с увеличением времени накопления t_n этих веществ на электроде при разомкнутой цепи. Например, как можно видеть из рис.5.7, при выдерживании АУСЭ в 0.1 М ФБР, содержащем 4 мкМ АСV, в течение 120 с, высота анодного пика I_p становится в несколько раз выше по сравнению с пиком, регистрируемым сразу после 10-секундного контакта электрода с тем же раствором.

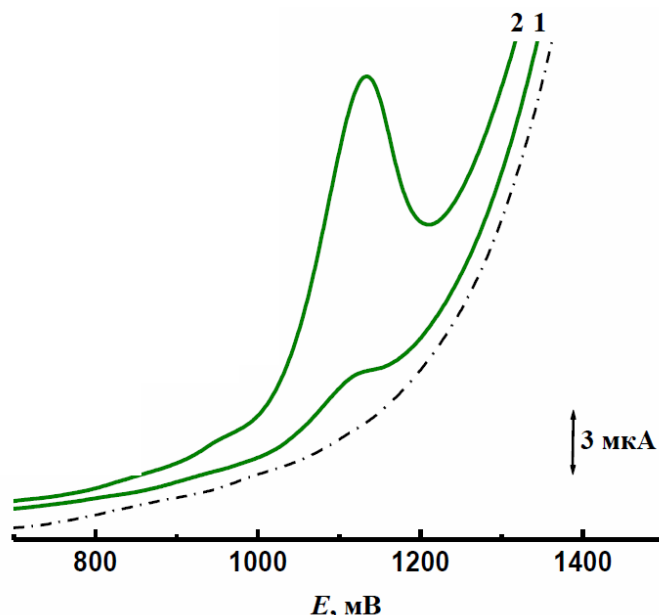


Рисунок 5.7. Инверсионные вольтамперные кривые, снятые после накопления АСV (4 мкМ) на АУСЭ в течение 10 с (1) и 120 с (2) из растворов с рН 3.5. Фоновая вольтамперограмма обозначена пунктирной линией.

При этом зависимость ΔI_p от t_n прямолинейна (рис.5.8). Для более высоких концентраций АСV эта зависимость характеризуется двумя прямолинейными участками (вставка на рис. 5.8).

Аналогичные закономерности характерны и для других изученных веществ (рис.5.9 – 5.11).

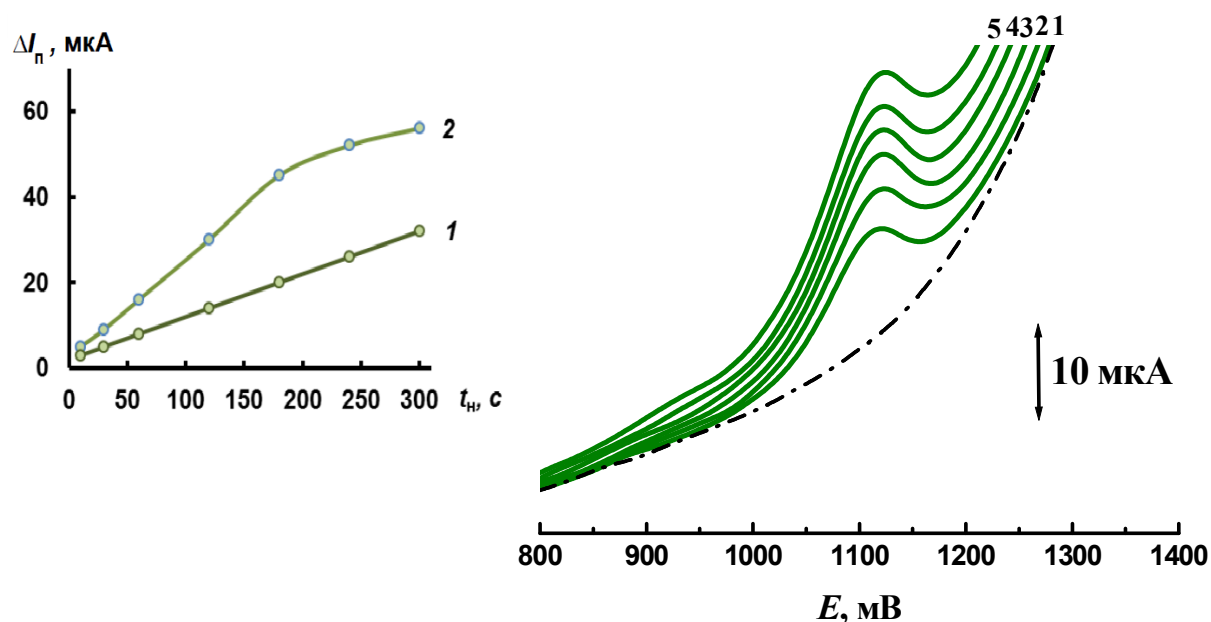


Рисунок 5.8. Инверсионные вольтамперные кривые, снятые после накопления ACV (4 мкМ) в течение 1 – 60 с, 2 – 120 с, 3 – 180 с, 4 – 240 с; 5 – 300 с из растворов с pH 3.5. Фоновая вольтамперограмма обозначена пунктирной линией. Вставка: зависимость относительной высоты пика от времени накопления в растворах с различной концентрацией ACV (в мкМ): 4 (1), 10 (2).

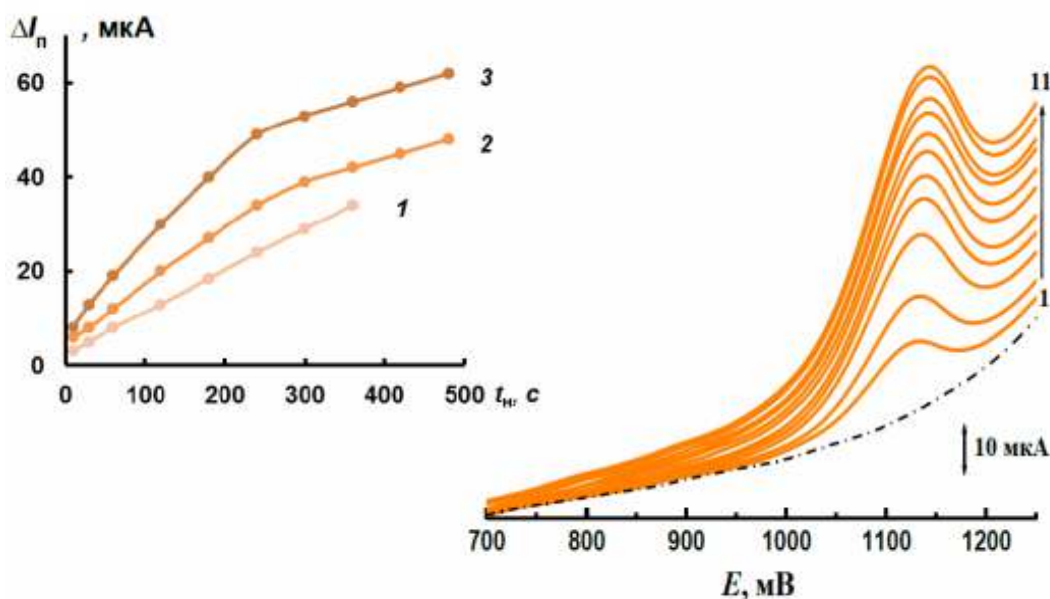


Рисунок 5.9. Инверсионные вольтамперные кривые, снятые после накопления VACV (6 мкМ) из растворов с pH 4.0 в течение t_{acc} (в с): 1 – 30; 2 – 60; 3 – 120; 4 – 180; 5 – 240; 6 – 300; 7 – 360; 8 – 420; 9 – 480; 10 – 540, 11 – 600. Фоновая вольтамперограмма обозначена пунктирной линией. Вставка: зависимость относительной высоты пика от времени накопления в растворах с различной концентрацией VACV (в мкМ): 1.5 (1), 3 (2), 6 (3).

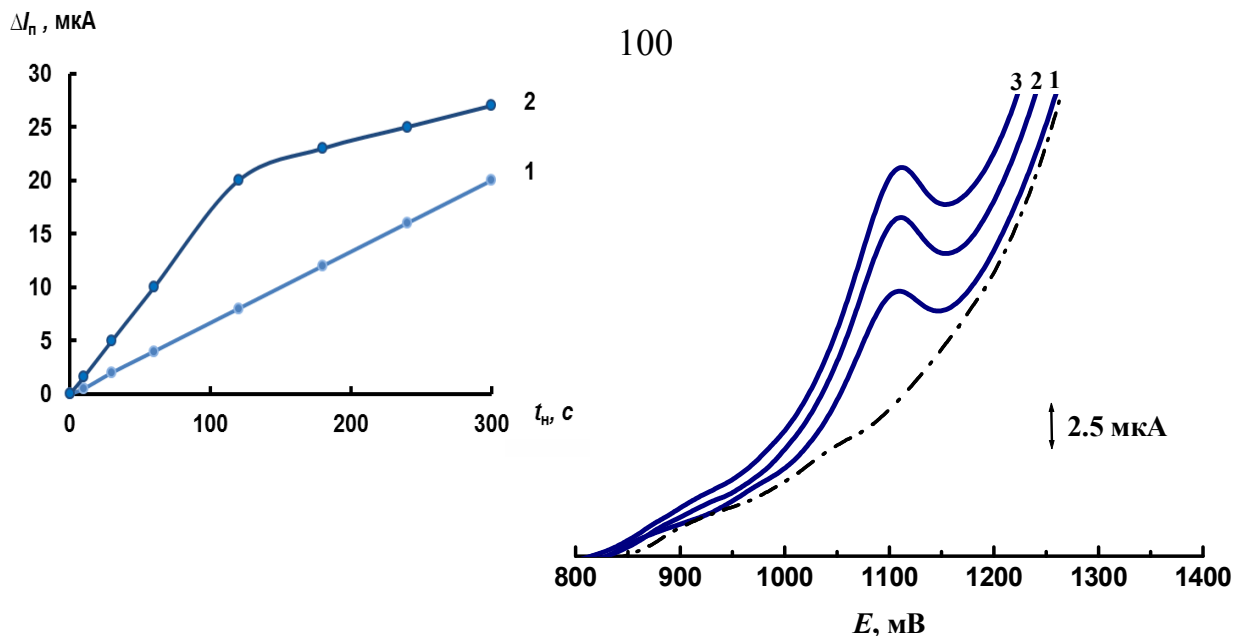


Рисунок 5.10. Инверсионные вольтамперные кривые, снятые после накопления GCV (2.0 μM) из растворов с pH 4.0 в течение t_H (в с): 1 – 60; 2 – 120; 3 – 180. Фоновая вольтамперограмма обозначена пунктирной линией. Вставка: зависимость относительной высоты пика от времени накопления в растворах с различной концентрацией GCV (в μM): 2 (1), 4 (2).

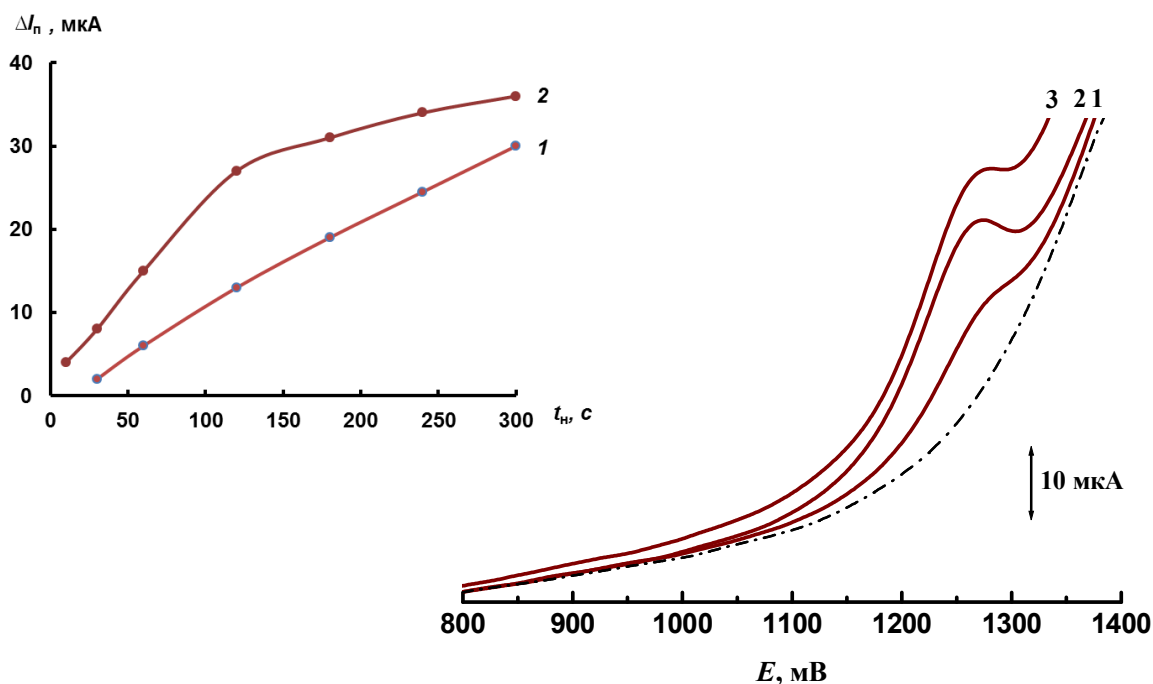


Рисунок 5.11. Инверсионные вольтамперные кривые, снятые после накопления FCV (5 μM) из растворов с pH 4.3 в течение t_H (в с): 1 – 60; 2 – 120; 3 – 180. Фоновая вольтамперограмма обозначена пунктирной линией. Вставка: зависимость относительной высоты пика от времени накопления в растворах с различной концентрацией FCV (в μM): 1.5 (1), 5 (2).

Аналитические характеристики. Установлено, что регистрируемые пики окисления ACV, VACV, GCV и FCV пропорциональны их объемной концентрации в инжектируемом растворе. В качестве примера, на рис. 5.12 приведены инверсионные вольтамперные кривые, полученные для растворов, содержащих разные количества VACV при $t_H = 120$ с.

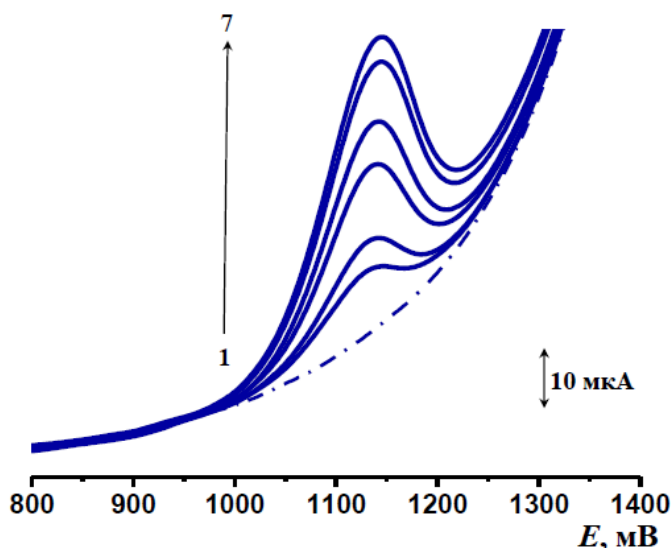


Рисунок 5.12. Инверсионные вольтамперные кривые, полученные в 0.1 М ФБР (pH 3.7) с разным содержанием VACV (мкМ) при $t_k = 120$ с: 1 – 0; 2 – 1.5; 3 – 3.0; 4 – 7.0; 5 – 10.0; 6 – 12.0; 7 – 15.0.

Соответствующие линейные уравнения концентрационных зависимостей, полученные для всех изученных веществ при $t_k = 120$ с приведены в табл.5.4.

Таблица 5.4 – Характеристики концентрационных зависимостей для ACV и его аналогов, полученные методом ПосИИА/АдИВА (pH = 4.0 ± 0.5; $\nu = 0.1$ В/с; $t_H = 120$ с)

Вещество	$E_{па},$ В	Диапазон линейности, мкМ	$\Delta I_{п} = a c + b$		$c_{min},$ нМ
			Уравнение регрессии	r	
ACV	1.10	0.3 – 15	$\Delta I_{п} = 3.67 c + 2.21$	0.9996	80
VACV	1.13	0.5 – 15	$\Delta I_{п} = 3.16 c + 5.01$	0.9997	120
GCV	1.17	0.5 – 10	$\Delta I_{п} = 3.02 c + 1.83$	0.9997	130
FCV	1.30	0.5 – 10	$\Delta I_{п} = 4.22 c + 5.78$	0.9996	90

Согласно полученным данным можно заключить, что в этом случае удастся достичь весьма низких пределов обнаружения изученных веществ. В частности, предел обнаружения ACV при $t_H = 180$ с составляет 50 нМ, что вполне сопоставимо с ранее полученными результатами по ACV, описанными в литературе (табл.5.5).

Таблица 5.5 – Сравнительные характеристики методов определения АСV, включающих стадию концентрирования на различных электродах при разомкнутой цепи.

Режим измерения/рабочий электрод	t_n , с	Диапазон линейности, мкМ	c_{min} , нМ	Ссылка
ВА, МУНТ-модифицированный СУЭ	60	0.08 – 10	30	[136]
ДИВА, С ₆₀ -модифицированный СУЭ	150	0.09 – 6.0	20	[137]
ПослИА/АДИВА, АУСЭ	180	0.1 – 10	50	Эта работа

Предложенный метод открывает возможности анализировать различные биомедицинские объекты.

5.4 Анализ модельных растворов и биомедицинских объектов

Обнаружение пуриновых оснований является важным инструментом для исследования путей физиологического и патофизиологического метаболизма от молекулярной патологии до экологической или судебной медицины. Большой интерес представляет чувствительное определение этих соединений и их производных в ряде биологических жидкостей и фармацевтических препаратов.

Детектирование Ade и Gua как продуктов депуринизации ДНК. В современной системе здравоохранения важное место занимает проблема диагностики повреждения структуры нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), организующих и обслуживающих жизнь клеточных организмов [13]. Особую актуальность эта проблема приобретает в связи с возрастающей опасностью изменения молекул ДНК и РНК в результате разрушительного воздействия со стороны веществ, содержащихся в окружающей среде или образующихся в процессе естественного метаболизма. С точки зрения современной медицины наиболее чувствительными мишенями при эндогенной интоксикации нуклеиновых кислот являются пуриновые основания. Высвобождение пуриновых оснований из ДНК или РНК в результате разрыва всех N-гликозидных связей – депуринизация – относится к наиболее распространенным процессам,

вызывающим повреждение нуклеиновых кислот в живых организмах и развитие различных заболеваний (рис.5.13).

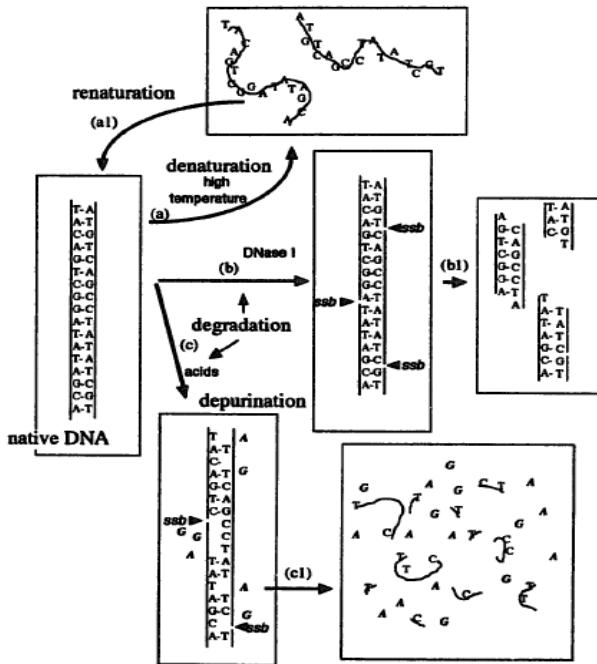


Рисунок 5.13. Схематическое представление денатурации, деградации и депурикации двухцепочечной ДНК (А—аденин; Г—гуанин; Т—тимин; С — цитозин). Взято из работы [218].

Согласно современным представлениям, нуклеотидный состав каждого вида ДНК характеризуется коэффициентом специфичности, величина которого рассчитывается как отношение суммарного содержания гуанина и цитозина к суммарному содержанию аденина и тимина. Коэффициент специфичности, отражающий колебания нуклеотидного состава ДНК животных и большинства растений ниже 1 (0.54 – 0.94), у микро-организмов он колеблется в пределах от 0.5 до 2.6 [219]. Экспериментальные методы определения коэффициента специфичности нуклеиновых кислот основаны на анализе растворов, образующихся при их химическом расщеплении при высоких температурах или/и под действием сильных кислот. К настоящему времени в литературе можно найти много работ, посвященных различным методам определения пуриновых оснований в нуклеиновых кислотах, среди которых важное место занимают методы электроанализа на различных углеродных электродах [105, 220, 221]. Для оценки интенсивности депурикации нуклеиновых кислот разработан электрохимический метод, основанный на определении Gua [222]. Наиболее удобным и эффективным способом депурикации ДНК или РНК представляется кислотный гидролиз в жестких условиях до полного растворения (70 % хлорная

кислота, 100 °С). Можно использовать мягкий кислотный гидролиз (1 М соляная кислота, 95-100 °С, ~1 ч), в результате которого образуются пуриновые основания и пиримидиновые нуклеозид-2'(3')-фосфаты.

Наше исследование показало возможность одновременного обнаружения Gua и Ade в ДНК (после их депуринизации в 70 % HClO₄) с помощью предложенного метода. В качестве объектов исследования использовали 1 – 5 % стандартные образцы ДНК сои. На рис.5.14 приведены инверсионные вольтамперные кривые, полученные в растворах нативной и депуризированной ДНК (рН 7.0). Видно, что, в отличие от нативной ДНК, вольтамперограмма депуризированной ДНК содержит два пика, которые соответствуют окислению Gua и Ade.

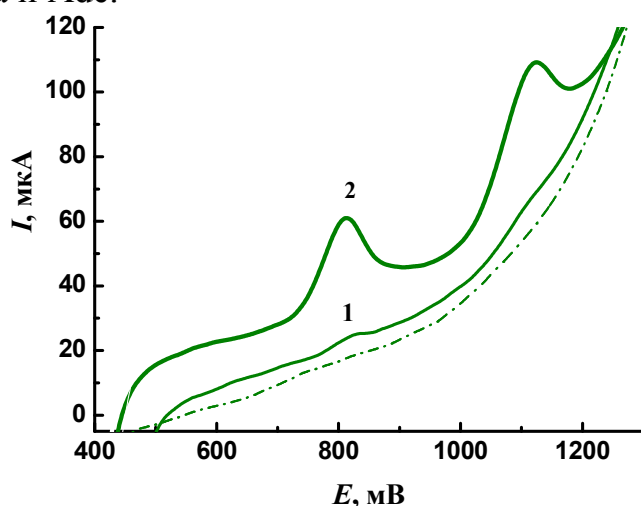


Рисунок 5.14. Инверсионные вольтамперные кривые, полученные в растворах нативной (1) и депуризированной (2) ds-ДНК сои (0.1 М ФБР, рН 7.0). $\nu = 0.1$ В/с.

Результаты оценки соотношения Gua/Ade в ДНК приведены в табл. 5.6.

Рассчитанное значение молярного соотношения Gua/Ade в изученных образцах ДНК сои характерно для растительных препаратов.

Таблица 5.6 – Результаты оценки определения соотношения Gua/Ade в ДНК, выделенных из сои ($n = 5$, $P = 0.95$)

Параметр	Молярная доля, %	Молярное соотношение
Gua	23.1 ± 0.3	–
Ade	26.9 ± 0.5	–
Gua/Ade	–	0.86 ± 0.02

Определение следов Gua в лекарственных препаратах, содержащих АСV.

Проведено определение примесей Gua в различных лекарственных формах

ацикловира. Как известно, АСV или его натриевая соль широко используются как противовирусный препарат, который в основном используется как ингибитор вируса простого герпеса типа 1 (ВПГ-1), 2 (ВПГ-2) и ветряной оспы (ВВО). Обнаружение Gua в лекарственных формах АСV (капсулы, крем, глазные мази, инъекции, пероральная суспензия и таблетки) представляет интерес потому, что это соединение является основным продуктом разложения АСV. Кроме того, АСV может также содержать примеси Gua, если он был синтезирован путем алкилирования Gua с помощью 2-(хлорметокси)этилбензоата.

На рис.5.15 показаны инверсионные вольтамперные кривые, полученные в растворенном препарате «Зовиракс», содержащем 2.5 мкг/мл АСV и различные концентрации Gua (рН 4.0, $t_H = 120$ с).

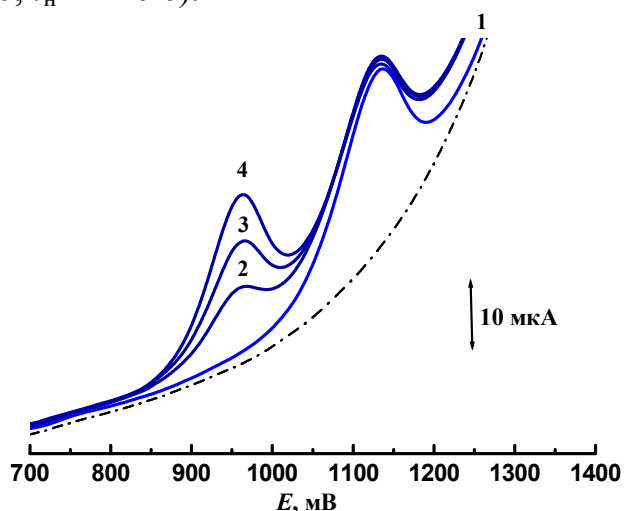


Рисунок 5.15. Инверсионные вольтамперные кривые, полученные при анализе растворенного препарата «Зовиракс» (2.5 мкг/мл АСV в 0.1 М ФБР, рН 3.6), содержащем различные концентрации Gua (в нг/мл): 0 (1); 100 (2); 200 (3); 300 (4). Пунктирная кривая: вольтамперограмма фонового электролита ($v=0.1$ В/с; $t_H=120$ с.).

Как можно видеть, четкий анодный пик АСV наблюдается при 1.13 В. (ФБР, рН 3.6). Введение Gua в раствор ацикловира дает дополнительный пик при 0,96 В. Прямолинейная зависимость между значениями относительной высоты инверсионного пика ΔI_H и объемной концентрации Gua наблюдается в диапазоне 10 – 1000 нг/мл и описывается следующим уравнением регрессии ($n=5$; $P=0.95$):

$$\Delta I_H = 76.64 c + 1.91 \quad (r = 0.9996) \quad (5.2).$$

Результаты определения Gua в используемых препаратах ACV приведены в таблице 5.7.

Таблица 5.7. Результаты определения примесей Gua в растворенных коммерчески доступных формах ACV ($n=6$, $P=0.95$), содержащих различные количества добавленного Gua.

Препарат	ACV, мкг/мл	Введено, нг/мл	Найдено, нг/мл	ПП, %	s_r
Натриевая соль ацикловира, раствор для инъекций	4.0	50	49	98.0	0.04
		75	77	102.7	0.04
		100	101	101.0	0.02
Зовиракс [®] , мазь	4.0	50	52	104.0	0.04
		100	98	98.0	0.02
		200	199	99.5	0.01
Ацикловир, таблетки	5.0	100	102	102.0	0.03
		200	203	101.5	0.02
		300	296	98.7	0.02

Полученные значения показателя правильности и относительного стандартного отклонения отражают высокую правильность и точность предложенного метода. Многократные избытки глюкозы, сахарозы, крахмала, декстрозы, аскорбиновой кислоты – вспомогательных веществ, входящих в состав противовирусных препаратов, практически не влияют на вольтамперометрический сигнал исследуемых производных Gua.

Определение ACV в грудном молоке. Разработанный нами метод был использован для обнаружения следов ацикловира в грудном молоке, так как известно, что ацикловир экскретируется грудным молоком. Установлено, что после приема 500 мг этого препарата, среднее значение концентрации ацикловира в грудном молоке составляет около 2 мкг/мл (8 мкМ). На рис. 5.16 представлена инверсионные вольтамперные кривые, полученные в отсутствие и в присутствии ACV в пробах грудного молока (20-кратное разбавление).

Некоторые результаты анализа проб грудного молока, содержащих добавки ACV и разбавленных 0.1 М ФБР (рН 3.7) в 20 раз, даны в табл. 5.8.

Метрологическая оценка всех полученных результаты показала отсутствие систематической погрешности и хорошую воспроизводимость измерений.

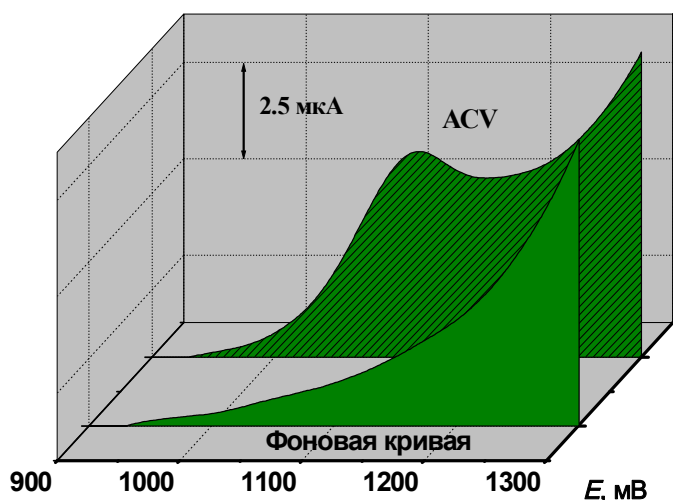


Рисунок 5.16. Инверсионные вольтамперные кривые, полученные при анализе пробы грудного молока без добавления и с добавлением 1 мкМ АСВ (0.1 М ФБР, рН 3.7, $t_H = 120$ с).

Таблица 5.8 – Результаты анализа проб грудного молока с добавками АСВ ($n=5$, $P=0.95$) Условия анализа: 20-кратное разбавление 0.1 М ФБР, рН 3.7; $t_H = 120$ с.

Содержание АСВ, мкМ	Найдено АСВ (с учетом разбавления), мкМ	ПП, %	s_T
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

Анализ проб мочи. Мочевая кислота (UA) – конечный продукт окислительного метаболизма пуринов в организме (см. схему 1.2). Основное ее количество выводится из организма с мочой. Нарушение обмена UA является важным звеном в патогенезе целого ряда заболеваний.

Определение Ade и Gua. Диагноз заболеваний, обусловленных нарушением обмена UA, ставят, прежде всего, на основании определения содержания UA и пуриновых оснований. Так, повышенная концентрация Ade (> 6 мкМ) наблюдается в моче больных лейкемией [223] или гепатоцеллюлярной карциномой (печеночно-клеточный рак) [224]. Повышенное содержание Gua свидетельствует о дефиците пурин-нуклеозидфосфорилазы [225]. На рис.5.17 и 5.18 представлены инверсионные вольтамперные кривые, полученные при анализе разбавленных проб искусственной мочи, содержащей 60 мкМ UA ($E_{па} = 0.57$ В) и различные концентрации Gua или Ade.

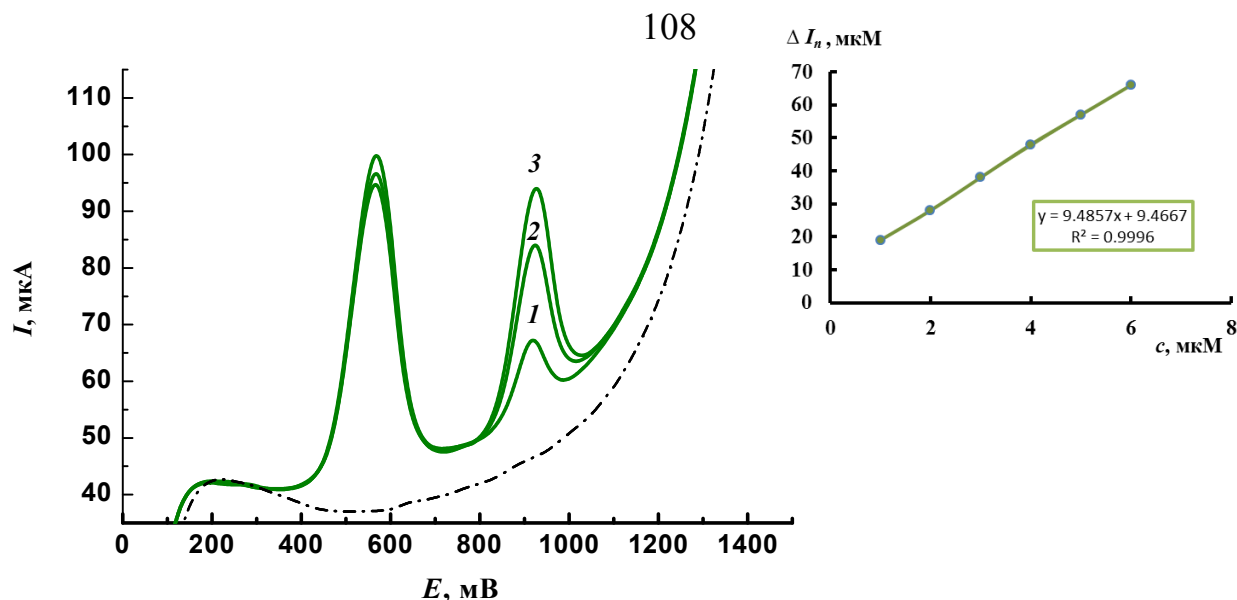


Рисунок 5.17. Инверсионные вольтамперные кривые, полученные при анализе разбавленной искусственной мочи, содержащей 60 μM мочевой кислоты ($E_{\text{па}} = 0.57 \text{ V}$) и различные концентрации Gua (в μM): 1 – 1.0; 2 – 3.0; 3 – 4.0 (pH 4.5). $\nu = 0.1 \text{ V/c}$, $t_{\text{H}} = 180 \text{ c}$.

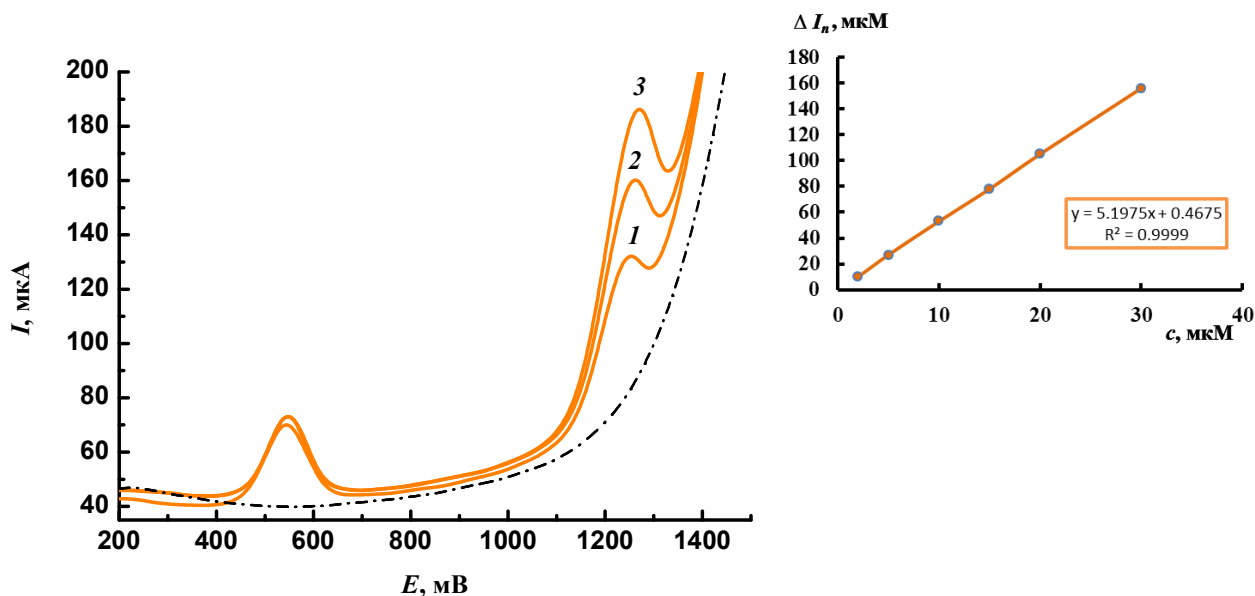


Рисунок 5.18. Инверсионные вольтамперные кривые, полученные при анализе разбавленной искусственной мочи, содержащей 60 μM мочевой кислоты ($E_{\text{па}} = 0.57 \text{ V}$) и различные концентрации Ade (в μM): 1 – 5.0; 2 – 10.0; 3 – 15.0 (pH 4.5). $\nu = 0.1 \text{ V/c}$, $t_{\text{H}} = 120 \text{ c}$.

Там же приведены соответствующие градуировочные графики. Можно видеть, что разработанный метод позволяет регистрировать отдельные пики окисления UA и пуриновых оснований. Результаты оценки правильности и воспроизводимости проведенных анализов даны в табл. 5.9.

Таблица 5.9 – Результаты анализа проб искусственной мочи с добавками Ade и Gua ($n=5$, $P=0.95$)

Вещество	Введено, мкМ	Найдено, мкМ	ПП, %	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

Разработанный метод также позволяет проводить одновременное определение Gua и ACV на фоне UA (рис. 5.19).

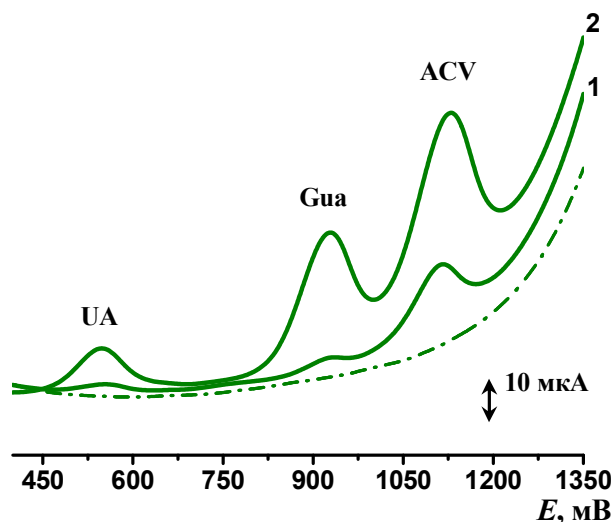


Рисунок 5.19. Инверсионные вольт-амперные кривые модельного раствора мочи с добавками Gua (1 мкМ) и ACV (10 мкМ), полученные после накопления их на электроде в течение 60 с (1) и 180 с (2). Фоновая вольтамперограмма обозначена пунктирной линией.

Исходя из полученных результатов и их сопоставления с литературными данными, можно заключить, что разработанный метод ПослИА/АдИВА с использованием АУСЭ представляется мощным инструментом количественной оценки биологически активных пуринов в растворах благодаря следующим преимуществам: минимальный объем потребляемых образцов, хорошая точность и воспроизводимость, высокая степень автоматизации и выполнение всех стадий анализа в строго воспроизводимых условиях, экономичность.

ГЛАВА 6. Проточные методы спектрофотометрического определения пуриновых алкалоидов

Одним из перспективных направлений создания экспрессных методов определения пуриновых алкалоидов представляется применение методологии проточно-инжекционной спектрофотометрии. Однако отсутствие хромофорных группировок в молекулах этих веществ препятствует их детектированию в видимой области спектра. Поэтому все до сих пор разработанные проточные методы определения пуриновых алкалоидов основаны на измерении собственного светопоглощения растворов данных веществ в ультрафиолетовой области спектра, что негативно сказывается на селективности и чувствительности их определения [66 – 71].

В области классической спектрофотометрии известно всего несколько индикаторных реакций с участием пуриновых алкалоидов, протекающих с образованием окрашенных продуктов (табл.6.1). Среди них, интерес представляют реакции азосочетания, в результате которых образуются интенсивно окрашенные соединения. В частности, изучена реакция Trh и аминофиллина с диазотированным *m*-нитроанилином в щелочной среде, в результате которой образуются азо-соединения желтого цвета [230]. Авторами работы [231] было проведено кинетическое изучение реакции азосочетания продуктов щелочного гидролиза Trh, дифиллина и проксифиллина с ионом диазония в присутствии сульфаниловой кислоты. Описана спектрофотометрическая методика определения Caf и Trh при совместном присутствии [232]. В качестве спектрофотометрического реагента предложен 4-нитрофенилдиазоний. Установлено, что продукты щелочного гидролиза кофеина и теофиллина вступают в реакцию азосочетания с образованием соединений, имеющих максимум светопоглощения при 280 нм и 230 нм соответственно. После добавления уксусной кислоты, в системе появляется таутомерная форма азосоединений, поглощающая в видимой области спектра при 375 нм и 500 нм для кофеина и теофиллина соответственно.

Таблица 6.1 – Цветные реакции, предложенные для спектрофотометрического определения пуриновых алкалоидов.

Вещество	Фотометрическая реакция	λ_{\max} , нм	Диапазон линейности, мкг/мл	c_{\min} , мкг/мл	Ссылка
Caf	Реакция с фосфорно-молибденовой кислотой	440	1 – 5 мг	–	[226]
	Реакция с Cu(II)-неокупроином; рН 5, ПАВ	453	0.1–3.0	0.05	[227]
	Реакция образования комплекса с Бенгальским розовым, рН 9	551	2–34	–	[228]
Trh	Реакция образования тройного комплекса ацетат кобальта: TPh: изопропиламин	560		0.3	[229]
	Реакция с диазотированным <i>n</i> -нитроаналином в щелочной среде	440	2–16	–	[230]
	Реакция азосочетания с солями диазония	470 550	2 – 9	–	[231]
Caf Trh	Реакция азосочетания продуктов щелочного гидролиза с тетраборатом 4-нитрофенилдиазония	375 500	3.6 – 48 1 – 22	1.20 0.30	[232]
	Реакция совместного окисления с 3-метил-2-бензотиазолинон гидразоном	630	0 – 1.1	–	[233]

В работе [233] предложена реакция для спектрофотометрического определения Caf и Trh с помощью 3-метил-2-бензотиазолинон гидразона (МБТГ). Эта реакция и была выбрана нами для создания автоматизированных методов ПИА и ПослИА для определения алкалоидов пуринового ряда в водных растворах. МБТГ издавна известен как чувствительный хромогенный редокс-реагент для фотометрического определения фенолов, ароматических аминов, гетероциклических оснований и соединений с активными метильными группами [234 – 237].

6.1. Изучение механизма и условий протекания индикаторной реакции окислительного сочетания пуриновых алкалоидов с 3-метил-2-бенз-тиазолинон-гидразоном

Характерной особенностью пуриновых алкалоидов является способность к окислению. Однако продукты их окисления бесцветны (рис.6.1, спектр 1). Поэтому в основу наших исследований была положена реакция окисления пуриновых алкалоидов в присутствии МБТГ, протекающая с образованием сильноокрашенных продуктов в слабокислой среде (рис.6.1, спектр 3).

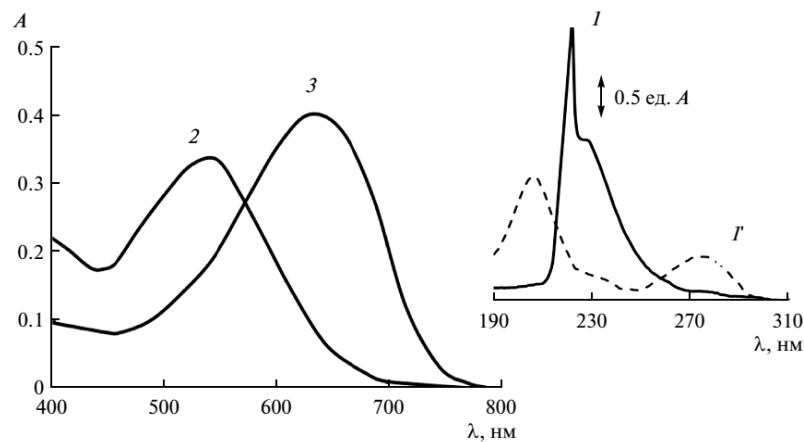
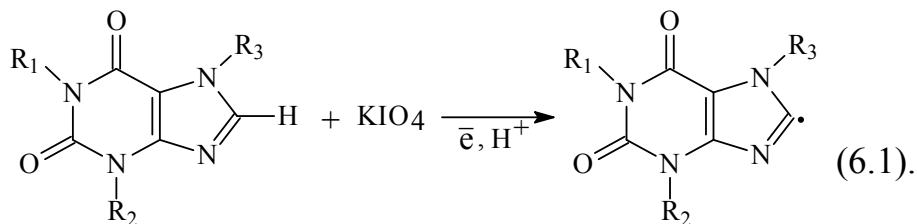
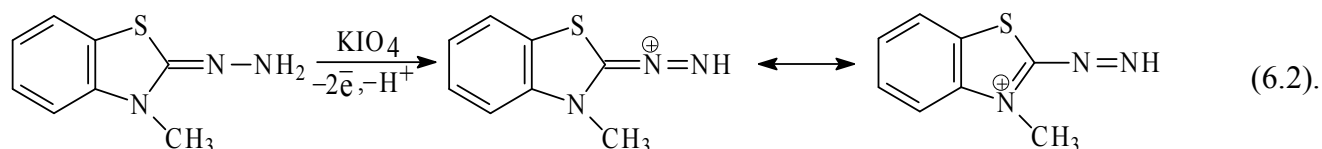


Рисунок 6.1. Электронные спектры поглощения растворов Caf (0.1 мМ) в отсутствие (*I*) и в присутствии (*I'*) KIO_4 (10 мМ); смеси МБТГ (5 мМ) и KIO_4 (10 мМ) (2); смеси Caf (1 мМ), МБТГ (5 мМ) и KIO_4 (10 мМ) (3). Фон: 0.05 М ацетатный буферный раствор, pH 5.5.

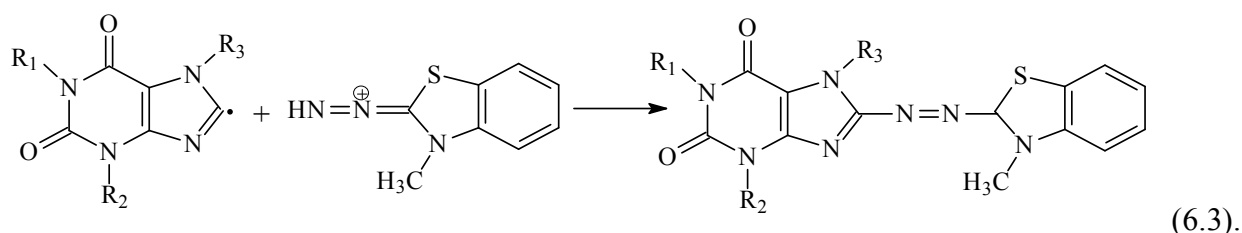
Предварительный эксперимент показал, что данная реакция является многостадийной. Опираясь на литературные данные, можно полагать, что в условиях эксперимента начальной стадией реакционного процесса является окисление алкалоида с образованием радикала:



При этом МБТГ окисляется периодат-ионом до электрофильного интер-медиата, существование которого было доказано ранее в работах [238, 239]:



Дальнейший ход реакции существенно зависит от порядка смешивания реагирующих веществ, что подтверждается спектрами поглощения. Так, при первоначальном смешивании растворов МБТГ и окислителя наблюдается образование окрашенного соединения с полосой поглощения с $\lambda_{\text{max}} = 534$ нм (рис.6.1, спектр 2). Вероятно, в этом случае малостабильные интермедиаты МБТГ быстро реагируют друг с другом, образуя тетразен [240]. При смешивании пробы (раствора алкалоида) сначала с окислителем, а затем с МБТГ наблюдается образование окрашенного соединения с полосой поглощения с максимумом при 630 нм (рис. 6.1, спектр 3). Возможный механизм этого процесса включает азосочетание радикала алкалоидов с электрофильным интермедиатом МБТГ, которое может быть представлено следующей схемой:



С учетом полученных результатов нами была разработаны методы ПослИА и ПИА для определения пуриновых алкалоидов на основе спектрофотометрического детектирования данного соединения.

6.2 Спектрофотометрическая система последовательно-инжекционного анализа

Сохраняя преимущества ПИА, методология ПослИА позволяет полностью компьютеризировать выполнение анализа. В связи с этим нами были изучены возможности реализации изученной индикаторной реакции в системе ПослИА.

Описание системы и протокол аналитического цикла. Разработку автоматического метода ПослИА для спектрофотометрического (СФМ)

определения пуриновых алкалоидов по реакции совместного окисления с МБТГ проводили в системе, схематически изображенной на рис.6.2.

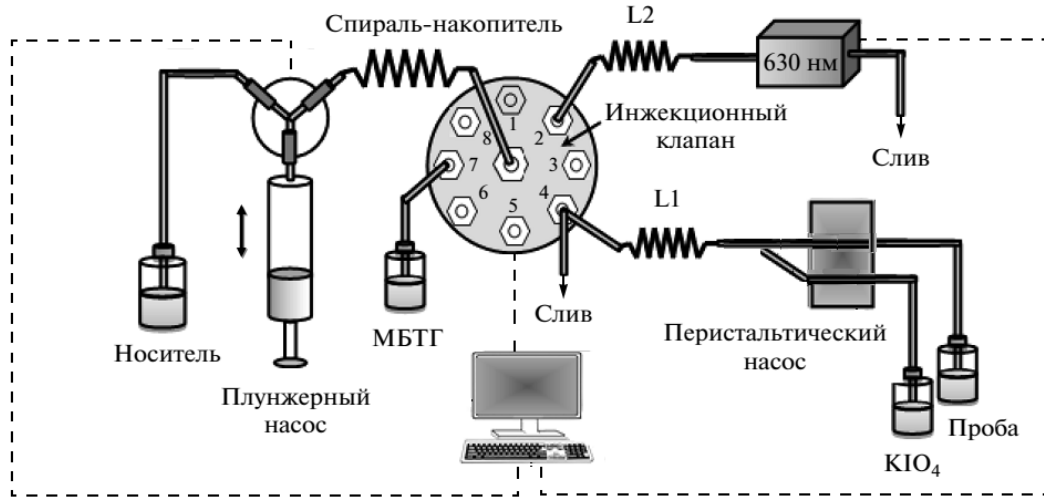
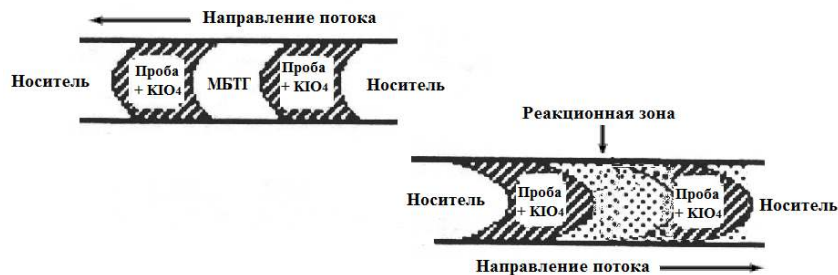


Рисунок 6.2. Схематическое изображение системы ПослИА для спектрофотометрического определения алкалоидов по реакции окислительного азосочетания с МБТГ (0.05 М АцБР, рН 5).

В основу функционирования системы нами положен принцип перекрывающихся зон с формированием «сэндвич-конфигурации» в потоке носителя:



Такой подход обеспечивал образование практически гомогенной реакционной зоны, поступающей в проточную ячейку детектора. При этом наибольшие по интенсивности сигналы регистрировали при введении объемов (в мкл): $V_{\text{проба + окислитель}} - V_{\text{МБТГ}} - V_{\text{проба + окислитель}} = 150 - 100 - 150$ в режиме «остановленного потока» (табл.6.2).

Таблица 6.2 – Высота пика (ед. A), регистрируемого в системе ПослИА/СФМ, в зависимости от профиля реакционного потока, скорости потока носителя и инжестируемых объемов. Начальные концентрации растворов: Саf – 1.0 мМ, МБТГ – 5.0 мМ, КЮ₄ – 6.0 мМ

v , мкл/с	V , мкл		Профиль реакционного потока	
	$V_{(S+Ox)}$	V_R	R – (S + Ox)	(S + Ox) – R – (S + Ox)
40		50		-
	10		0.008	-
	20		0.015	-
	30		0.024	-
	40		0.030	-
	50		0.031	-
	100		-	-
		20	-	0.027
		50	-	0.049
		100	-	0.109
30	150	100	-	0.132
10			-	0.161
5			-	0.184
0			-	0.235

Обозначения: S – проба, Ox – КЮ₄, R – МБТГ.

Однако в этом случае наблюдалось увеличение холостого сигнала (рис.6.3). Поэтому в дальнейшем измерение сигнала проводили при пропуске реакционной зоны через ячейку детектора со скоростью 20 мкл/с.

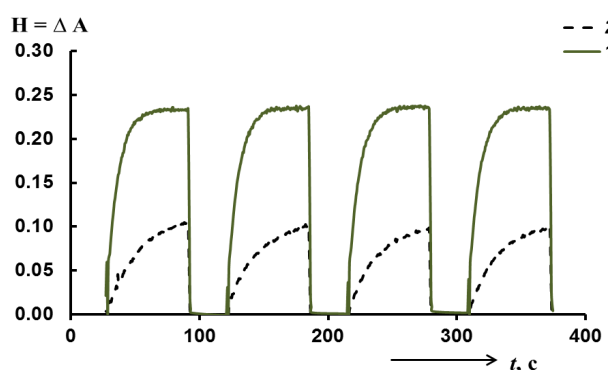


Рисунок 6.3. Фотометрические сигналы Саf (1), регистрируемые в режиме остановленного потока. 2 – холостой сигнал.

Согласно разработанному протоколу аналитического цикла, представленному в табл.6.3, первоначально всю проточную систему заполняли носителем (0.05 М ацетатным буферным раствором) с помощью плунжерного насоса. Затем в спираль-накопитель (600 мкл) последовательно вводили микрообъемы пробы, предварительно смешанной с окислителем в спирали L1,

затем раствора реагента МБТГ и снова смеси пробы с окислителем. При работе плунжерного насоса в обратном направлении инжектируемые зоны частично или полностью перекрывались и поступали в спиральный реактор L2, а затем в проточную ячейку детектора. Полный цикл измерений занимал 60 с.

Таблица 6.3 – Протокол аналитического цикла измерений, используемый для определения пуриновых алкалоидов в системе ПослИА/СФМ

Описание действия	Позиция клапана	t , с	v , мкл/с	V , мкл
Отбор носителя плунжерным насосом и заполнение системы	2	10	200	800
Отбор аликвоты смеси пробы (раствора алкалоида) и окислителя в спираль-накопитель	4	3	50	150
Отбор аликвоты реагента (МБТГ) в спираль-накопитель	7	2	50	100
Отбор аликвоты смеси пробы (раствора алкалоида) и окислителя в спираль-накопитель	4	3	50	150
Прокачивание реакционной смеси через реактор (L2)	2	14	40	–
Измерение сигнала при 630 нм	2	28	40	–

В качестве примера, на рис.6.4 приведены типичные сигналы, полученные при введении аликвотной части стандартного раствора Саf в систему ПослИА/СФМ.

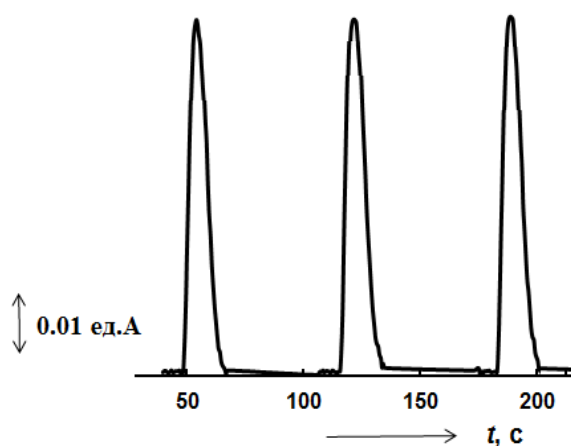


Рисунок 6.4. Сигналы, полученные при введении аликвотной части 0.4 мМ раствора Саf в систему ПослИА/СФМ.

Аналитические характеристики метода. Основные аналитические характеристики разработанного метода суммированы в табл.6.4.

Таблица 6.4. Аналитические характеристики разработанного метода ПослИА

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

В табл.6.5 приведены результаты метрологической оценки разработанного метода ПослИА/СФМ.

Таблица 6.5 – Проверка правильности и воспроизводимости разработанного метода

Вещество	Введено, мг/мл	Метод ПослИА/СФМ ($n=4, P=0.95$)		
		Найдено, мг/мл	s_r	ПП, %
Кофеин	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
Теобромин	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

6.3. Система проточно-инжекционной спектрофотометрии

Описание схемы и выбор параметров системы. Экспериментальные исследования по разработке методов определения пуриновых алкалоидов на основе хромогенной реакции их совместного окислительного азосочетания с МБТГ проводили в ПИ-системе, схематически представленной на рис.6.5. Использовали трехканальную систему, в которой микрообъемы пробы (V) вводили в непрерывный поток носителя (вода), который далее смешивался с потоками растворов окислителя (периодата калия в 0.05 М ацетатном буферном растворе) и реагента (МБТГ). После протекания индикаторной реакции реакционная зона поступала в проточную кювету спектрофотометрического детектора, который непрерывно регистрировал оптическую плотность проточного раствора при предварительно выбранной длине волны (630 нм).

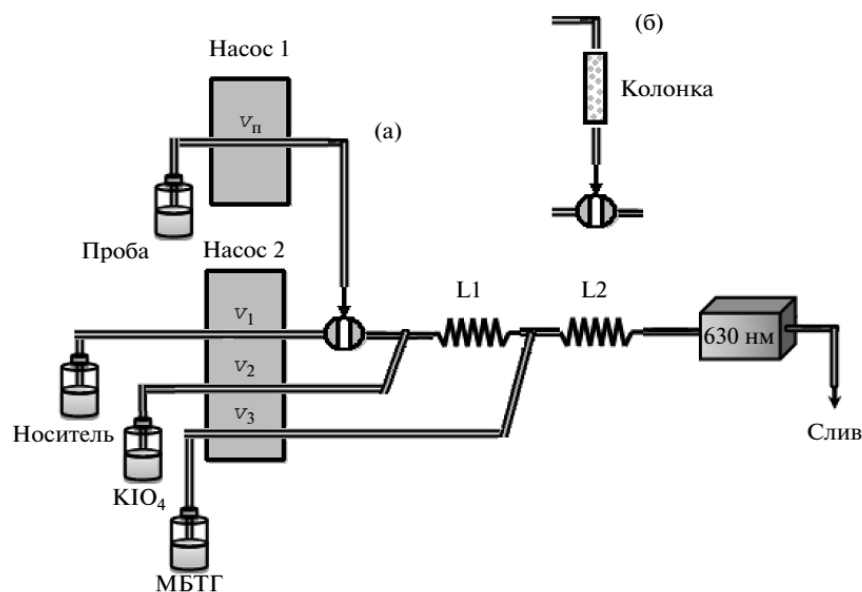


Рисунок 6.5. Схематическое изображение ПИ-системы со спектрофотометрическим детектированием алкалоидов по реакции окислительного азосочетания с МБТГ с прямым вводом пробы (а) и с *on-line* извлечением мешающих компонентов на колонке, заполненной анионитом Амберлит IRA 401 (б).

Аналитическим сигналом служил скачок оптической плотности в реакционной зоне относительно оптической плотности потока смеси растворов окислителя и МБТГ (нулевая линия).

На рис.6.6 приведены кинетические кривые, полученные в режиме «остановленного потока» и характеризующие реакцию окислительного азосочетания МБТГ с Trp (кривая 1), Tbr (кривая 2) и Caf (кривая 3).

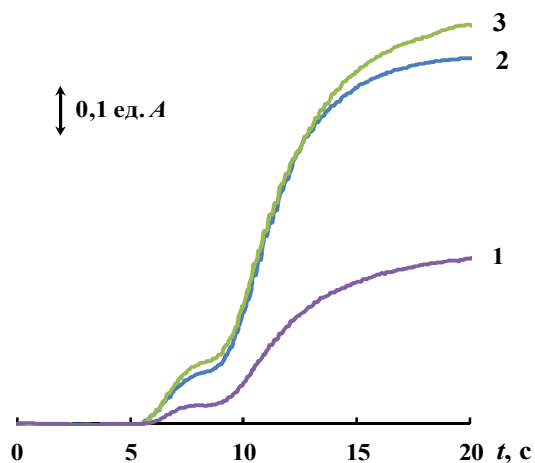


Рисунок 6.6. Кинетические кривые, полученные в режиме «остановленного потока» в ПИ-системе и характеризующие скорость реакции окислительного азосочетания МБТГ с Trp (1), Tbr (2) и Caf (3) в водных растворах, содержащих 1.0 мМ алкалоида (pH 5.5, $\lambda = 630$ нм).

Установлено, 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 Caf, Tbr и Trh соответственно.. При этом сигнал Trh существенно ниже. Мож-но предположить, это обусловлено либо малым временем существования интермедиата, либо сдвигом λ_{\max} образующегося продукта (рис.6.7).

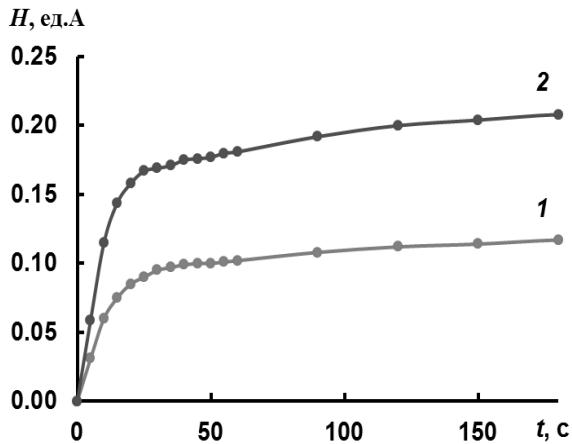


Рисунок 6.7. Кинетические зависимости H для 2.0 мМ Trh, полученные при регистрации фотометрического сигнала при 630 нм (1) и 590 нм (2).

Высота регистрируемого фотометрического сигнала H зависит как от химических условий (рН среды, концентрация реагентов, температура), так и от операционных параметров ПИ-системы. Как видно из рис.6.8, экспериментальные зависимости H от рН реакционной среды имеют вид кривой с максимумом при рН 6.0 ± 0.5 для всех трех изученных веществ.

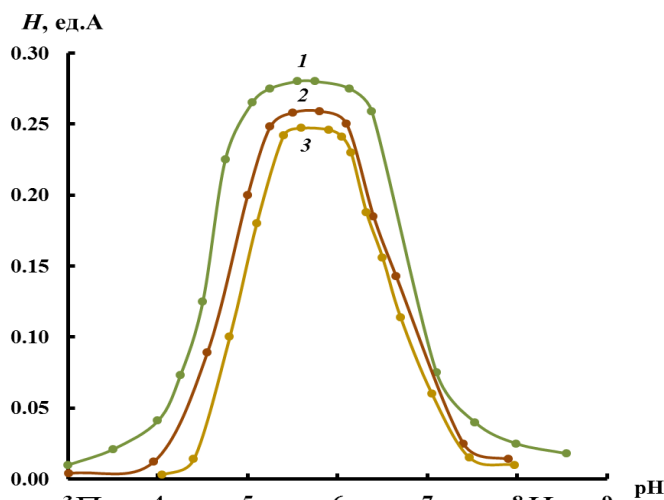


Рисунок 6.8. Экспериментальные зависимости высоты пика H при 630 нм от рН реакционной среды, полученные при введении в ПИ-систему 200 мкл растворов, содержащих 1.0 мМ Caf (1), 1.0 мМ Tbr (2) и 5.0 мМ Trh (3).

При изучении зависимости H от начальной концентрации растворов МБТГ и окислителя установлено, что во всех случаях максимальные по высоте пики удается регистрировать при введении (6 ± 1) мМ раствора МБТГ и 0.01 М раствора KIO_4 (рис.6.9).

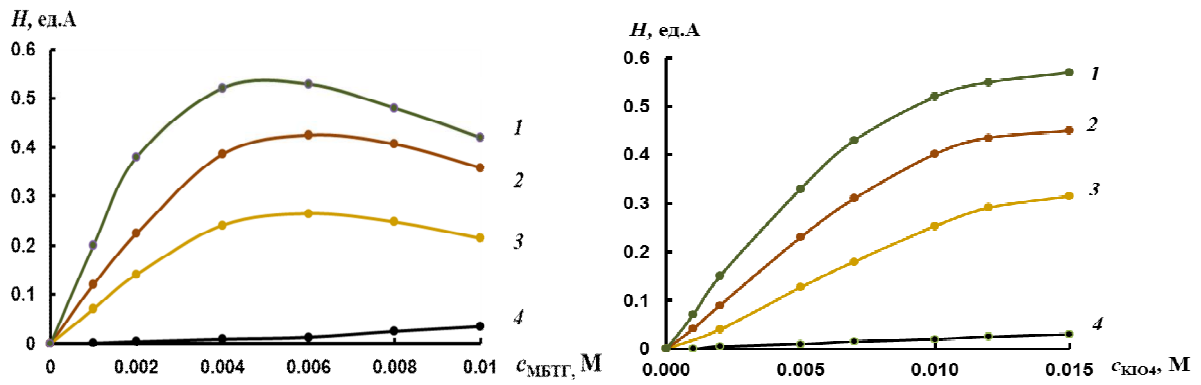


Рисунок 6.9. Зависимости H от концентрации растворов МБТГ и окислителя при введении 200 мкл растворов Caf (1), Tbr (2), Tph (3). 4 – нулевая линия. Концентрация инжектируемых растворов Caf и Tbr – 2 мМ, Tph – 5 мМ.

Характер зависимостей H от операционных параметров ПИ-системы был изучен на примере Caf. Полученные кривые представлены на рис.6.10 и 6.11.

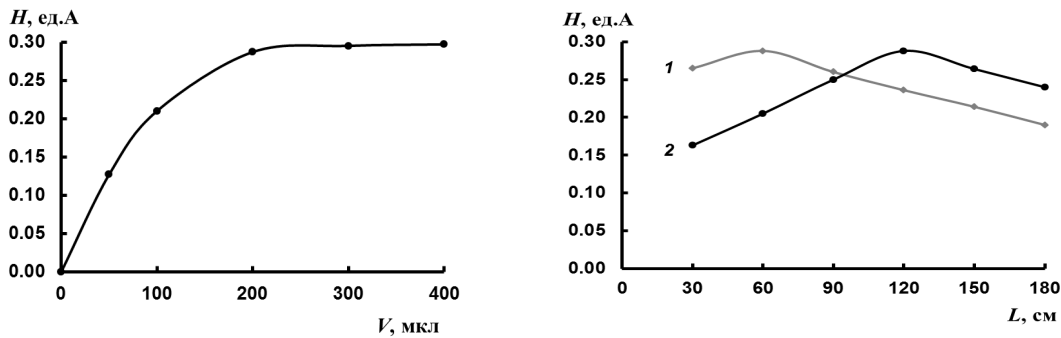


Рисунок 6.10. Зависимость H , соответствующая введению 200 мкл 1.0 мМ раствора Caf, от инжектируемого объема V и длины реакционных петель L1 (1) и L2 (2).

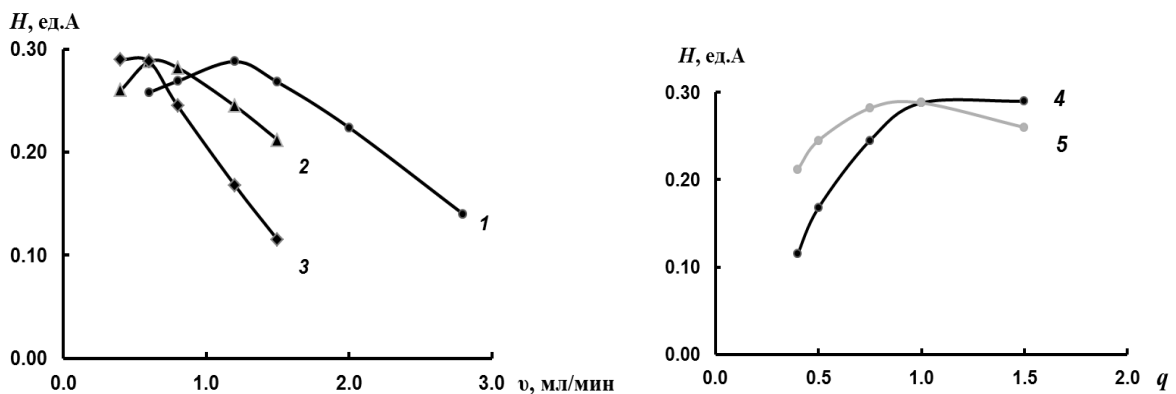


Рисунок 6.11. Зависимость H , соответствующая введению 200 мкл 1.0 мМ раствора Caf, от скорости потоков носителя v_1 (1), окислителя v_2 (2) и реагента v_3 (3), а также от соотношения скоростей v_2/v_3 (4) и v_3/v_2 (5).

Из полученных данных следует, что высота пика закономерно возрастает с увеличением инжектируемого объема в пределах 30 – 200 мкл, а затем практически не изменяется. При постоянном значении объема вводимого раствора, высота пика сначала возрастает, а затем начинает уменьшаться с увеличением длины реакционных спиралей L1 или L2 и скорости потоков $v_1 - v_3$. Наличие максимумов отвечает соответствию скорости индикаторной реакции и результирующей скорости потока ($\sum v = 2.4$ мл/мин) и оптимальному соотношению реагирующих веществ.

Наиболее благоприятные гидродинамические условия протекания химических реакций, лежащих в основе формирования сигнала, представлены в табл.6.6.

Таблица 6.6 – Диапазоны варьирования, найденные оптимальные условия и операционные параметры ПИ-системы, используемой для определения пуриновых алкалоидов

Параметры системы	Диапазон варьирования	Оптимальное значение
Начальные концентрации реагентов, мМ:		
МБТГ	1.0 – 10.0	5.0
КЮ ₄	1.0 – 15.0	10.0
рН (0.05 М ацетатный буферный раствор)	3.0 – 8.0	6.0 ± 0.5
Температура, °С	20 – 50	25 ± 5
Скорости потоков, мл/мин:	0.4 – 2.8	
пробы (v_p)		1.2
носителя (v_1)		1.2
окислителя (v_2)		0.6
реагента (v_3)		0.6
Длина реакционной спирали, см:	30 – 180	
L1		60
L2		180
Инжектируемый объем пробы V , мкл	0 – 400	200
Длина волны, нм	400 – 700	630 ± 12

Аналитические характеристики метода ПИА/СФМ. На рис.6.12 приведена типичная ПИА-регистраграмма, полученная при трехкратном введении в систему нескольких растворов сравнения кофеина. Соответствующие уравнения градуировочных графиков для всех изученных алкалоидов приведены в табл.6.7. Производительность системы – 120 ч^{-1} .

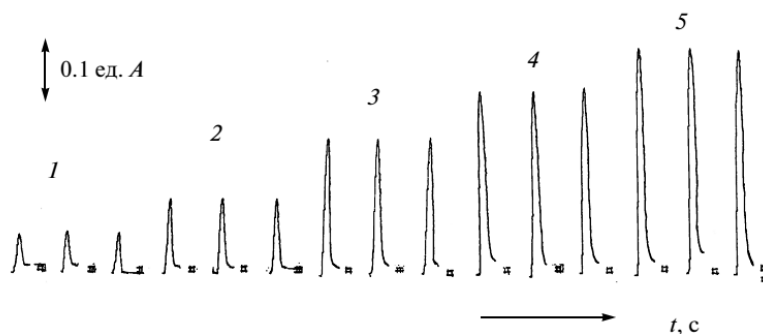


Рисунок 6.12. Типичная ПИА-регистраграмма, полученная при трехкратном введении в систему нескольких растворов сравнения Caf, в мг/мл: 1 – 25, 2 – 50, 3 – 90, 4 – 120, 5 – 150.

Таблица 6.7. Аналитические характеристики метода ПИА/СФМ

Вещество	$H = \Delta A = a c + b$	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

В табл.6.8 приведены данные метрологической оценки результатов определения Caf и Tbr в модельных растворах.

Таблица 6.8 – Результаты метрологической оценки правильности и воспроизводимости определения Caf и Tbr в модельных растворах предложенным методом ПИА/СФМ

Вещество	Введено, мг/мл	Метод ПИА/СФ ($n=4, P=0.95$)		
		Найдено, мг/мл	s_r	ПП, %
Caf	0.02	0.019 ± 0.001	0.03	95.0
	0.05	0.051 ± 0.002	0.01	102.0
	0.10	0.098 ± 0.002	0.006	98.0
	0.15	0.150 ± 0.002	0.004	100.0
Tbr	0.02	0.020 ± 0.004	0.06	100.0
	0.04	0.039 ± 0.003	0.02	97.5
	0.10	0.101 ± 0.002	0.01	101.0
	0.20	0.202 ± 0.003	0.009	101.0

6.4 Анализ комбинированных фармацевтических препаратов, содержащих кофеин

Разработанный метод опробован при анализе фармацевтических препаратов, содержащих Caf, Trh или аминафиллин (Aph). Для каждого анализируемого препарата рассчитывали найденное количество вещества (величина \bar{x}) в процентах от сертифицированного значения содержания в таблетке или капсуле, которое принимают за 100 %. Результаты анализа препаратов приведены в табл.6.9. Применение простого теста Стьюдента показало, что различия между средними значениями результатов анализа и действительным значением незначимы.

Таблица 6.9 – Результаты анализа пуриновых алкалоидов в таблетированных лекарственных формах предложенным методом ($n = 5, P = 0.95$)

Препарат	Определяемое вещество	Сертифицированное содержание вещества, мг/табл.	Найдено методом ПИА, %
Кофеин	Caf	100	99.9 ± 0.2
Теопэк	Trh	300	99.7 ± 0.4
Эуфиллин	Aph	150	100.2 ± 0.3

Дальнейшие исследования показали, что спектрофотометрическое определение Caf в комбинированных лекарственных препаратах, содержащих парацетамол (Pc), дает неудовлетворительные результаты, так как последний также взаимодействует с МБТГ в присутствии окислителя. Поэтому с целью устранения мешающего влияния Pc в разработанную ПИ-систему дополнительно вводили сорбционную микроколону, которую помещали в поток пробы перед инжектором (рис.6.5б). Микроколону представляла собой стеклянную трубку высотой 50 мм и внутренним диаметром 6 мм, заполненную сильноосновным анионообменником Амберлит IRA-401 (SERVA, Германия) в ОН⁻-форме.

Эксперимент показал, что пропускание модельного раствора, содержащего смесь Caf и Pc, через колонку до инъекции обеспечивает практически количественное извлечение Pc сорбентом, при этом Caf не сорбируется. Подтверждением этому является сопоставление УФ-спектров поглощения, полученных до и после пропускания растворов Caf и Pc через колонку (рис.6.13).

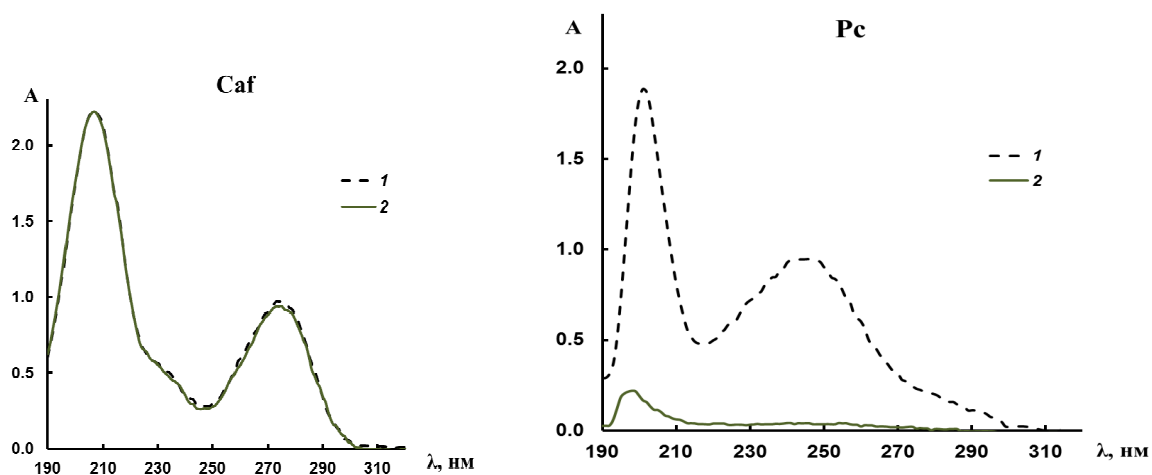


Рисунок 6.13 – УФ-спектры поглощения растворов Caf и Pc до (1) и после (2) их пропускания через микроколонку.

Применение ПИ-системы с on-line сорбционным извлечением Pc позволило исключить его мешающее влияние при определении Caf в комбинированных фармацевтических препаратах. Результаты анализа некоторых из них приведены в табл. 6.10.

Таблица 6.10 – Результаты определения Caf в комбинированных фармацевтических препаратах ($n=5, P=0.95$)

Препарат	Сертифицированное содержание активных веществ, мг/табл.	Найдено Caf, мг	ПП, %	s_{Γ}
Солпадеин	Кофеин – 30 Парацетамол – 500 Кодеина фосфат – 8	30.9 ± 0.5	103.0	0.013
Аскофен-П	Кофеин – 40 Ацетилсалициловая кислота – 200 Парацетамол – 200	40.4 ± 0.4	100.7	0.008
Кофицил Плюс	Кофеин – 50 Ацетилсалициловая кислота – 300 Парацетамол – 100	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

Таким образом, разработанные методы ПИА и ПосИА со спектрофотометрическим детектированием пуриновых алкалоидов по

хромогенной реакции совместного окисления с МБТГ характеризуются вполне удовлетворительными аналитическими характеристиками и могут быть рекомендованы для оценки качества лекарственных средств. Из сопоставления данных, приведенных в табл.6.4, 6.5, 6.7 и 6.8, можно заключить, что оба предложенных метода позволяют определять изученные вещества практически в одном и том же концентрационном диапазоне с одинаковой точностью. Однако чувствительность анализа в случае использования метода ПИА/СФМ оказалась выше. С другой стороны, применение метода ПослИА/СФМ позволило существенно снизить расход реагентов и полностью автоматизировать процесс выполнения анализа.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Проведено систематическое изучение вольтамперометрического поведения гидрокси- и аминопроизводных 7Н- и 9Н-пуринов на активированном углеситалловом 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 C2, C6 и C8 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Робинс, Р.К. Пурины и родственные соединения. / Р.К. Робинс // Гетероциклические соединения – М.: Мир, 1969. – Гл. 3. – Т. 8. – С. 130.
2. Hesse, M. Alkaloids. Nature's Curse or Blessing / M. Hesse // Weinheim:Wiley: VCH, 2002. – 413 p.
3. Voet, D. Biochemistry / D. Voet, J.G. Voet // – 4th ed. USA:Wiley, 2011. – 1520 p.
4. Самылинов, И.А. Лекарственные растения Государственной фармакопеи / И.А. Самылинов, В.А. Северцева // М.: АНМИ, 2003. – 534 с.
5. Глущенко, Н.Н. Фармацевтическая химия / Н.Н. Глущенко, Т.В. Плетнева, В.А. Попков // М.: ИЦ «Академия», 2004. – 320 с.
6. Graham, D.M. Caffeine – its identity, dietary sources, intake and biological effects / D.M. Graham // Nutr. Rev. – 1978. – V. 36. – № 4. – P. 97–102.
7. Tripathi, A. The role of salivary caffeine clearance in the diagnosis of chronic liver disease / A. Tripathi, A.B. Tiwari, R. Patil, V. Khanna, V. Singh // J. Oral. Biol. Craniofac. Res. – 2015. – V. 5 – P. 28–33.
8. Daneshvar, A. Evaluating pharmaceuticals and caffeine as indicator of fecal contamination in drinking water sources of the Greater Montreal region / A. Daneshvar, K. Aboulfadl, L. Viglino, R. Broséus, S. Sauvé, A.-S. Madoux-Humery, G.A. Weyhenmeyer, M. Prévost // Chemosphere – 2012. – V. 88. – P. 131–139.
9. Андреева, Е.Ю. Метилксантины: свойства и определение в различных объектах / Е.Ю. Андреева, С.Г. Дмитриенко, Ю.А. Золотов // Успехи химии. – 2012. – Т. 81. – № 5. – С. 397–414.
10. Talik, P. Analytical techniques used for determination of methylxanthines and their analogues – Recent advances / P. Talik, J. Krzek, R.J. Ekiert // Sep. Purif. Rev. – 2012. – V. 41. – № 1. – P. 1–61.
11. Пилипенко, В.П. Сравнительная характеристика методов определения кофеина / В.П. Пилипенко, О.В. Бибик, Н.И. Прихода // Вопросы химии и химической технологии. – 2009. – № 2. – С. 89–91.
12. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия: в 3 т. / Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина // М.: Высшая школа, 2000. – 479 с.

13. Марри, Р. Биохимия человека: в 2 т. / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл // М: Мир, 2004. – 381 с.
14. Hughes, S.E. New immunosuppressive drugs in organ transplantation / S.E. Hughes, S.A. Gruber. // *J. Clinic. Pharmacol.* – 1996. – V. 36. – № 12. – P. 1081–1092.
15. Солдатенков, А.Т. Основы органической химии лекарственных веществ / А.Т. Солдатенков, Н.М. Колядина, И.В. Шендрик // М.: Химия, 2001. – 398 с.
16. Noble, S. Ganciclovir. An update of its use in the prevention of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients / S. Noble, D. Faulds // *Drugs.* – 1998. – V. 56. – № 1. – P. 115–146.
17. De Clercq, E. Antiviral prodrugs – the development of successful prodrug strategies for antiviral chemotherapy / E. de Clercq, H.J. Field // *British J. Pharmacol.* – 2006. – V. 147. – P. 1–11.
18. Петров, П.Т. Определение пуриновых оснований с противогерпетической активностью методом ВЭЖХ (обзор) / П.Т. Петров, Т.В. Трухачева, Д.В. Моисеев, А.И. Жебентяев // *Хим. фарм. журн.* – 2004. – Т. 38. – № 7. – С. 44–53.
19. Swart, K.J. Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of acyclovir in plasma / K.J. Swart, H.K.L. Hundt, A.M. Groenewald // *J. Chromatogr. A.* – 1994. – V. 663. – P. 65–69.
20. Meyer, A. Determination of adenine, caffeine, theophylline and theobromine by HPLC with amperometric detection / A. Meyer, T. Ngiruwonsanga, G. Henze. // *Fresenius J. Anal. Chem.* – 1996. – V. 356. – P. 284–287.
21. Mei, D.A. Simultaneous determination of adenosine, inosine, hypoxanthine, xanthine, and uric acid in microdialysis samples using microbore column high-performance liquid chromatography with a diode array detector / D.A. Mei, G.J. Gross, K. Nithipatikom // *Anal. Biochem.* – 1996. – V. 238. – № 1. – P. 34–39.
22. Chen, Q. Simultaneous determination of caffeine, theobromine and theophylline in foods and pharmaceutical preparations by using ion chromatography / Q. Chen, S. Mou, X. Hou, Z. Ni. // *Anal. Chim. Acta.* – 1998. – V. 371. – P. 287–296.

23. Kulikov, A.U. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine, guaifenesin and preservatives in syrups by micellar LC / A.U. Kulikov, A.G. Verushkin // *Chromatogr.* – 2008. – V. 67. – P. 347–355.
24. Bispo, M.S. Simultaneous determination of caffeine, theobromine, and theophylline by high-performance liquid chromatography / M.S. Bispo, M.C.C. Veloso, H.L.C. Pinheiro, R.F.S. de Oliveira, J.O.N. Reis, J.B. de Andrade // *J. Chromatogr. Sci.* – 2002. – V. 40. – P. 45–48.
25. Лаврентьева, А.В. Определение теофиллина в плазме и крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / А.В. Лаврентьева, А.Б. Мелентьев // *Проблемы экспертизы в медицине.* – 2008. – Т. 8. – № 3–4. – С. 16–18.
26. Srinubabu, G. Development and validation of liquid chromatographic and UV derivative spectrophotometric methods for the determination of famciclovir in pharmaceutical dosage forms / G. Srinubabu, B. Sudharani, L. Sridhar, J.S. Rao // *Chem. Pharm. Bull.* – 2006. – V. 54. – № 6. – P. 819–822.
27. Yoshida, T. A simple, sensitive determination of ganciclovir in infant plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection / T. Yoshida, R. Takahashi, K. Imai, H. Uchida, Y. Arai, T. Ohishi // *J. Chromatogr. Sci.* – 2010. – V. 48. – P. 208–211.
28. García del Moral, P. Simultaneous determination of adenine and guanine in ruminant bacterial pellets by ion-pair HPLC / P. García del Moral, M.J. Arín, J.A. Resines, M.T. Díez // *J. Chromatogr. B.* – 2005. – V. 826. – P. 257–260.
29. Сенявина, Н.В. Соотношение концентраций пуриновых метаболитов в сыворотке крови у беременных женщин / Н.В. Сенявина, С.А. Хаустова, Д.А. Сахаров, Е.А. Тоневицкий, Т.К. Гребенник, О.В. Еремина, А.Г. Тоневицкий // *Биотехнология.* – 2013. – № 4. – С. 83–89.
30. Jin, L. Quantitative determination of acyclovir in aqueous humor by LC-MS / L. Jin, G. Wei, W.-Y. Lu, L.-J. Xu, J. Pan // *Chromatogr.* – 2006. – V. 63. – № 5–6. – P. 239–242.

31. Lu, J.-L. Determination of purine alkaloids and catechins in different parts of *Camellia assamica* var. *kucha* by HPLC-DAD/ESI-MS/MS / J.-L. Lu, D.-M. Wang, X.-G. Shi, D.-P. Yang, X.-Q. Zheng, C.-X. Ye // *J. Sci. Food Agric.* – 2009. – V. 89. – P. 2024–2029.
32. Vonaparti, A. Direct injection liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometric horse urine analysis for the quantification and confirmation of threshold substances for doping control. II. Determination of theobromine. / A. Vonaparti, E. Lyris, I. Panderi, M. Koupparis, C. Georgakopoulos // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2009. – V. 23. – P. 1020–1028.
33. Ptolemy, A.S. Quantification of theobromine and caffeine in saliva, plasma and urine via liquid chromatography–tandem mass spectrometry: a single analytical protocol applicable to cocoa intervention studies / A.S. Ptolemy, E. Tzioumis, A. Thomke, S. Rifai, M. Kellogg // *J. Chromatogr. B.* – 2010. – V. 878. – P. 409–416.
34. Singh, O. Determination of valganciclovir and ganciclovir in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometric detection / O. Singh, S. Saxena, S. Mishra, A. Khuroo, T. Monif // *Clin. Biochem.* – 2011. – V. 44. – P. 907–915.
35. Rahim, A.A. Simultaneous determination of diethylene glycol, diethylene glycol monoethyl ether, coumarin and caffeine in food items by gas chromatography / A.A. Rahim, B. Saad, H. Osman, N. Hashim, S. Yahya, K.M. Talib // *Food Chem.* – 2011 – V. 126. – P. 1412–1416.
36. Hasan, S. A new validated ultra-performance liquid chromatographic method for determination of acyclovir / S. Hasan, P. Chander, J. Ali, S. Baboot, M. Ali // *Drug Test. Anal.* – 2011. – V. 3. – P. 187–190.
37. Padullés, A. Determination of ganciclovir in human plasma by ultra-performance liquid chromatography–UV detection / A. Padullés, H. Colom, Y. Armendariz, G. Cerezo, A. Caldes, L. Pou, J. Torras, J.M. Grinyó, N. Lloberas // *Clinical Biochem.* – 2012. – V. 45. – P. 309–314.
38. Merodio, M. Development of a sensitive method for the determination of ganciclovir by reversed-phase high-performance liquid chromatography / M. Merodio,

- M.A. Campanero, T. Mirshahi, M. Mirshahi, J.M. Irache // *J. Chromatogr. A.* – 2000. – V. 870. – P. 159–167.
39. Mannur, V.S. RP-HPLC method development and validation for estimation of famciclovir in tablet dosage form / V.S. Mannur, B. Shravan Kumar, V.S. Masthiholimath // *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2009. – V. 3. – № 4. – P. 198–200.
40. Sugumaran, M. RP-HPLC method for the determination of valacyclovir in bulk and pharmaceutical formulation / M. Sugumaran, V. Bharathi, R. Hemachander, M. Lakshmi // *Pharma Chem.* – 2011. – V. 3. – № 4. – P. 190–194.
41. Ramesh, P.J. Development and validation of RP-HPLC method for the determination of ganciclovir in bulk drug and in formulations / P.J. Ramesh, K. Basavaiah, K.B. Vinay, C.M. Xavier // *ISRN Chromatogr.* – V. 2012. – 8 p. – Article ID 894965.
42. Mondal, P. Development of new simple and economic validated RP-HPLC method for the determination of famciclovir in bulk and tablet dosage / P. Mondal, B. Neeraja // *Pharm. Lett.* – 2013. – V. 5. – № 4. – P. 320–325.
43. Wang, A. Amperometric detection of three purine alkaloids following their separation by micellar electrokinetic capillary chromatography / A. Wang, L. Li, F. Zang, Y. Fang // *Anal. Chim. Acta* – 2000. – V. 419. – № 2. – P. 235–242.
44. Chen, G. Determination of purine and pyrimidine bases in DNA by micellar electrokinetic capillary chromatography with electrochemical detection / G. Chen, X. Han, L. Zhang, J. Ye // *J. Chromatogr. A.* – 2002. – V. 954. – P. 267–276.
45. Wang, J. Microchip capillary electrophoresis with a boron-doped diamond electrode for rapid separation and detection of purines / J. Wang // *J. Chromatogr. A.* – 2004. – V. 1022. – P. 207–212.
46. Peri-Okonny, U.L. Determination of caffeine and its metabolites in urine by capillary electrophoresis – mass spectrometry / U.L. Peri-Okonny, S.X. Wang, R.J. Stubbs, N.A. Guzman. // *Electrophoresis.* – 2005. – V. 26. – P. 2652–2663.

47. Regan, F. Rapid simultaneous determination of alkylxanthines by CZE and its application in analysis of pharmaceuticals and food samples / F. Regan, Yu. Shakalisava // *Anal. Chim. Acta.* – 2005. – V. 540. – P. 103–110.
48. Emre, D. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propyphenazone in ternary mixtures by micellar electrokinetic capillary chromatography / D. Emre, N. Ozaltin. // *J. Chromatogr. B.* – 2007. – V. 847. – P. 126–132.
49. Хасанов, В.В. Анализ энергетических напитков методом капиллярного электрофореза / В.В. Хасанов, Ю.Г. Слижов, В.В. Хасанов // *Журн. аналит. химии* – 2013. – Т. 68. – № 4. – С. 385–388.
50. Проблемы аналитической химии: Проточный химический анализ / под ред. Ю.А. Золотова – М.: Наука, 2014. – Т. 17. – 428 с.
51. Solich, P. Application of flow injection technique in pharmaceutical analysis. Part I.: spectrophotometric and chemiluminescence detection / P. Solich, H. Sklenářová, M. Polášek, R. Karlíček // *J. Flow Inj. Anal.* – 2001. – V. 18. – № 1. – P. 13–20.
52. Solich, P. Application of flow injection technique in pharmaceutical analysis. Part II.: Other spectroscopic methods and electroanalytical detection / P. Solich, H. Sklenářová, M. Polášek, R. Karlíček // *J. Flow Inj. Anal.* – 2001. – V. 18. – № 2. – P. 118–125.
53. Tzanavaras, P.D. Review of recent applications of flow injection spectrophotometry to pharmaceutical analysis / P.D. Tzanavaras, D.G. Themelis // *Anal. Chim. Acta.* – 2007. – V. 588. – P. 1–9.
54. Tzanavaras, P.D. Automated flow injection techniques in pharmaceutical analysis: a useful tool / P.D. Tzanavaras // *Pharm. Anal. Acta.* – 2011. – V. 2. – № 5. – P. 1–2.
55. Martinez Calatayud, J. Flow methods in pharmaceutical analysis / J. Martinez Calatayud, J.R. Albert-Garsia; ed. M. Trojanowicz // *Advanced in flow analysis* – Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH&Co, 2008. – Ch. 21. – P. 601.

56. Solich, P. Sequential injection technique applied to pharmaceutical analysis / P. Solich, M. Polášek, J. Klimundová, J. Ruzicka // *Trends Anal. Chem.* – 2003. – V. 22. – № 7. – P. 116–126.
57. Wu, C.H. HeMicro sequential injection lab-on-valve for process monitoring and bioanalytical assays / C.H. Wu, J.L. Liu // *Proc. Anal. Tech.* – 6 p.
58. *Flow Injection Analysis of Food Additives* / eds.: C. Ruiz-Capillas, L.M.L. Nollet. – NY: CRC Press, 2015. – 736 p.
59. Karlberg, B. Extraction based on the flow-injection principle. Part I. Description of the extraction system / B. Karlberg, S. Thelander // *Anal. Chim. Acta.* – 1978. – V. 98. – P. 1–7.
60. Garrigues, S. Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and caffeine in pharmaceuticals by flow injection with Fourier transform infrared detection / S. Garrigues, M. Gallignani, M. de la Guardia // *Talanta.* – 1993. – V. 40. – № 12. – P. 1799–1807.
61. Bouhsain, Z. Clean method for the simultaneous determination of propyphenazone and caffeine in pharmaceuticals by flow injection Fourier transform infrared spectrometry / Z. Bouhsain, S. Garrigues, M. de la Guardia // *Analyst.* – 1997. – V. 122. – P. 441–445.
62. Daghbouche, Y. Flow injection Fourier transform infrared determination of caffeine in soft drinks / Y. Daghbouche, S. Garrigues, M.T. Vidal, M. de la Guardia // *Anal. Chem.* – 1997. – V. 69. – P. 1086–1091.
63. Gil, E.P. Competitive heterogeneous enzyme immunoassay for theophylline by flow-injection analysis with electrochemical detection of p-aminophenol / E.P. Gil, H.T. Tang, H.B. Halsall, W.R. Helneman, A. Sanchez-Misiego // *Clin. Chem.* – 1990. – V. 36. – № 4. – P. 662–665.
64. Locascio-Brown, L. Liposome-based flow-injection immunoassay for determining theophylline in serum / L. Locascio-Brown, A.L. Plant, R. Chesler, M. Kroll, M. Ruddel, R.A. Durst // *Clin. Chem.* – 1993. – V. 39. – № 3. – P. 386–391.
65. Sánchez-Cabezudo, M. Fluorimetric-flow injection determination of theophylline based on its inhibitory effect on immobilized alkaline phosphatase / M. Sánchez-

- Cabezudo, J.M. Fernández-Romero, M.D. Luque de Castro // *Anal. Chim. Acta.* – 1995. – V. 308. – P. 159–163.
66. Ortega-Barrales, P. Simultaneous determination of paracetamol and caffeine by flow injection-solid phase spectrometry using C18 silica gel as a sensing support / P. Ortega-Barrales, R. Padilla-Weigand, A. Molina-Díaz // *Anal. Sci.* – 2002. – V. 18. – P. 1241–1246.
67. Domínguez-Vidal, A. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propyphenazone in pharmaceuticals by means of a single flow-through UV-multiparameter sensor / A. Domínguez-Vidal, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz // *Microchim. Acta.* – 2003. – V. 141. – P. 157–163.
68. Salinas-Vargas, M.E. On-line solid-phase extraction using a C18 minicolumn coupled to a flow injection system for determination of caffeine in green and roasted coffee beans / M.E. Salinas-Vargas, M.P. Canizares-Macias // *Food Chem.* – 2014. – V. 147. – P. 182–188.
69. Luque-Pérez, E. Spectrophotometric flow injection determination of caffeine in solid and slurry coffee and tea samples using supported liquid membranes / E. Luque-Pérez, A. Ríos, M. Valcárcel, L.-G. Danielsson, F. Ingman // *Lab. Autom. Inform. Manag.* – 1999. – V. 34. – P. 131–142.
70. Yamauchi, Y. Quasi-flow injection analysis for rapid determination of caffeine in tea using the sample pre-treatment method with a cartridge column filled with polyvinylpyrrolidone / Y. Yamauchi, A. Nakamura, I. Kohno, K. Hatanaka, M. Kitai, T. Tanimoto // *J. Chromatogr. A.* – 2008. – V. 1177. – P. 190–194.
71. Llorent-Martinez, E.J. Solid-phase ultraviolet sensing system for determination of methylxanthines / E.J. Llorent-Martinez, J.F. Garcia-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2005. – V. 382. – P. 158–163.
72. Lucena, R. Continuous flow autoanalyzer for the sequential determination of total sugars, colorant and caffeine contents in soft drinks / R. Lucena, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel // *Anal. Chim. Acta.* – 2005. – V. 530. – P. 283–289.
73. Lima, J.L.F.C. An automatic determination of caffeine in soft drinks using flow injection system with amperometric detection / J.L.F.C. Lima, C. Delerue-Matos,

- H.P.A. Nouws, M.C.V.F. Vaz // *Food Add. Contaminants*. – 1998. – V. 15. – № 3. – P. 265–269.
74. Silva, W.C. A simple strategy for simultaneous determination of paracetamol and caffeine using flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection / W.C. Silva, P.F. Pereira, M.C. Marra, D.T. Gimenes, R.R. Cunha, R.A.B. da Silva, R.A.A. Munoz, E.M. Richter // *Electroanal.* – 2011. – V. 23. – № 12. – P. 2764–2770.
75. Chaves, S.C. Simultaneous determination of caffeine, ibuprofen and paracetamol by flow-injection analysis with multiple-pulse amperometric detection on boron-doped diamond electrode / S.C. Chaves, P.N.C. Aguiar, L.M.F.C. Torres, E.S. Gil, R.C.S. Luz, F.S. Damos, R.A.A. Munoz, E.M. Richter, W.T.P. dos Santos // *Electroanal.* – 2015. – V. 27. – P. 1–8.
76. Hansen, B.H. Electrochemical oxidation of theophylline at the pyrolytic graphite electrode / B.H. Hansen, G. Dryhurst // *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* – 1971. – V. 32. – P. 405–414.
77. Ruzicka, J. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays / J. Ruzicka, G.D. Marshall // *Anal. Chim. Acta.* – 1990. – V. 237. – P. 329–343.
78. Ruzicka, J. Retro-review of flow-injection analysis / J. Ruzicka, E.H. Hansen // *Trends Anal. Chem.* – 2008. – V. 27. – № 5. – P. 390–393.
79. Liu, X.-Z. Simultaneous monitoring of aspirin, phenacetin and caffeine in compound aspirin tablets using a sequential injection drug-dissolution testing system with partial least squares calibration / X.-Z. Liu, S.-S. Liu, J.-F. Wu, Z.-L. Fang // *Anal. Chim. Acta.* – 1999. – V. 392. – № 2–3. – P. 273–281.
80. Dockendorff, B. Automated solid phase extraction of theophylline by sequential injection on renewable column / B. Dockendorff, D.A. Holman, G.D. Christian, J. Ruzicka // *Anal. Commun.* – 1998. – V. 35. – P. 357–359.
81. Timofeeva, I. Stepwise injection potentiometric determination of caffeine in saliva using single-drop microextraction combined with solvent exchange / I. Timofeeva,

- K. Medinskaia, L. Nikolaeva, D. Kirsanov, A. Bulatov // *Talanta*. – 2016. – V. 150. – P. 655–660.
82. Satinsky, D. Sequential injection chromatographic determination of paracetamol, caffeine, and acetylsalicylic acid in pharmaceutical tablets / D. Satinsky, I. Neto, P. Solich, H. Sklenarova, M. Conceicao, B.S.M. Montenegro, A.N. Araujo // *J. Sep. Sci.* – 2004. – V. 27. – P. 529–536.
83. Spohn, U. Chemiluminometric enzyme sensors for flow-injection analysis / U. Spohn, F. Preuschoff, G. Blankenstein, D. Janasek, M.R. Kula, A. Hacker // *Anal. Chim. Acta.* – 1995. – V. 303. – P. 109–120.
84. Sarker, A.K. Spectrophotometric flow-injection analysis for hypoxanthine based on the detection of superoxide anion / A.K. Sarker, H. Ukeda, D. Kawana, M. Sawamura // *Anal. Sci.* – 1999. – V. 15. – P. 1141–1144.
85. Nakashima, K. Flow-injection analysis with chemiluminescence detector of glucose and uric acid using immobilized enzyme reactor / K. Nakashima, N. Hayashida, S. Kawaguchi, S. Akiyama, Y. Tsukamoto, K. Imai // *Anal. Sci.* – 1991. – V. 7. – P. 715–718.
86. Song, Z.-H. Chemiluminescence assay for uric acid in human serum and urine using flow-injection with immobilized reagents technology / Z.-H. Song, S. Hou // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2002. – V. 372. – P. 327–332.
87. Kim, Y.-S. Determination of uric acid by chemiluminescence measurement using Tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II)-octylphenylpolyglycol ether system / Y.-S. Kim, J.H. Park, Y. Choi // *Bull. Korean Chem. Soc.* – 2004. – V. 25. – № 8. – P. 1177–1181.
88. Yang, C. A novel flow-injection chemiluminescence determination of uric acid based on diperiodateargentate(III) oxidation / C. Yang, Z. Zhang // *Talanta*. – 2010. – V. 81. – P. 477–481.
89. Ma, L. Investigation of a novel Ag(III) chemiluminescence system and its mechanism for determination of uric acid in human urine // L. Ma, L. Niu, W. Wang, W. Kang, H. Shi // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2014. – V. 25. – № 5. – P. 867–872.

90. Wang, J. Comparison of uric acid quantity with different food in human urine by flow injection chemiluminescence analysis / J. Wang, X. Tan, Z. Song // *J. Anal. Methods Chem.* – 2013. – V. 2013. – ID 854041. – 7 p.
91. Araújo, A.N. Kinetic determination of uric acid in urine based on single-line flow-system with multi-site detection / A.N. Araújo, J.A.M. Catita, J.L.F.C. Lima // *Anal. Sci.* – 1998. – V. 14. – P. 809–813.
92. Rocha, D.L. A flow-based procedure with solenoid micro-pumps for the spectrophotometric determination of uric acid in urine / D.L. Rocha, F.R.P. Rocha // *Microchem. J.* – 2010. – V. 94. – P. 53–59.
93. Liu, E. Flow injection determination of adenine at trace level based on luminol- $K_2Cr_2O_7$ chemiluminescence in micellar medium / E. Liu, B. Xue // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2006. – V. 41. – P. 649–653.
94. Moody, G.J. Chemically immobilised bi-enzyme electrodes in the redox mediated mode for the flow injection analysis of glucose and hypoxanthine / G.J. Moody, G.S. Sanghera, J.D.R. Thomas // *Analyst.* – 1987. – V. 112. – P. 65–70.
95. Yao, T. Development of a FIA system with immobilized enzymes for specific post-column detection of purine bases and their nucleosides separated by HPLC column / T. Yao, Y. Matsumoto, T. Wasa // *J. Biotechnol.* – 1990. – V. 14. – P. 89–97.
96. Numata, M. Flow-injection analysis for hypoxanthine in meat with dissolved oxygen detector and enzyme reactor / M. Numata, N. Funazaki, S. Ito, Y. Asano, Y. Yano // *Talanta.* – 1996. – V. 43. – P. 2053–2059.
97. Hassan, S.S.M. Miniaturized graphite sensors doped with metal-bathophenanthroline complexes for the selective potentiometric determination of uric acid in biological fluids / S.S.M. Hassan, N.M.H. Rizk // *Analyst.* – 1997. – V. 122. – P. 815–819.
98. Matos, R.C. Flow injection analysis-amperometric determination of ascorbic and uric acids in urine using arrays of gold microelectrodes modified by electrodeposition of palladium / R.C. Matos, M.A. Augelli, C.L. Lago, L. Angnes // *Anal. Chim. Acta.* – 2000. – V. 404. – P. 151–157.

99. Roy, P.R. Simultaneous electrochemical detection of uric acid and ascorbic acid at a poly(N,N-dimethylaniline) film-coated GC electrode / P.R. Roy, T. Okajima, T. Ohsaka // *J. Electroanal. Chem.* – 2004. – V. 561. – P. 75–82.
100. Garcia, M.B.Q. Automatic determination of uric acid in urine in a FIA system with a tubular amperometric detector / M.B.Q. Garcia, J.L.F.C. Lima, M.L. Silva, J.P. Sousa // *Port. Electrochim. Acta.* – 2004. – V. 22. – P. 249–262.
101. Silva, M.L.S. Multicommutated flow system with amperometric detection. Determination of uric acid in urine / M.L.S. Silva, M.B.Q. Garcia, J.L.F.C. Lima, J.L.M. Santos, E. Barrado // *Electroanal.* – 2005. – V. 17. – № 23. – P. 2156–2162.
102. Шайдарова, Л.Г. Проточно-инжекционное и порционно-инжекционное определение гидроксипуринов на электроде, модифицированном смешанно-валентными оксидами рутения и иридия / Л.Г. Шайдарова, И.А. Челнокова, Г.Ф. Махмутова, М.А. Дегтева, А.В. Гедмина, Г.К. Будников // *Журн. аналит. химии.* – 2014. – Т. 69. – № 9. – С. 946–956.
103. Zitka, O. A new approach how to define the coefficient of electroactivity of adenine and its twelve derivatives using flow injection analysis with amperometric detection / O. Zitka, H. Skutkova, V. Adam, L. Trnkova, P. Babula, J. Hubalek, I. Provaznik, R. Kizek // *Electroanal.* – 2011. – V. 23. – № 7. – P. 1556–1567.
104. Шайдарова, Л.Г. Вольтамперометрическое определение гуанина на электродах, модифицированных пленками из гексацианокобальтата рутения / Л.Г. Шайдарова, А.В. Гедмина, Э.Р. Жалдак, И.А. Челнокова, Г.К. Будников // *Уч. зап. Каз. ун-та. Естеств. науки.* – 2012. – Т. 154. – кн. 3. – С. 116–126.
105. Шайдарова, Л.Г. Селективное вольтамперометрическое и проточно-инжекционное определение гуанина и аденина на стеклоуглеродном электроде, модифицированном пленкой из гексахлороплатината рутения / Л.Г. Шайдарова, А.В. Гедмина, Э.Р. Жалдак, И.А. Челнокова, Г.К. Будников // *Журн. аналит. химии.* – 2014. – Т. 69. – № 8. – С. 815–824.
106. Thangaraj, R. A flow injection analysis coupled dual electrochemical detector for selective and simultaneous detection of guanine and adenine / R. Thangaraj,

- S. Nellaiappan, R. Sudhakaran, A.S. Kumar // *Electrochim. Acta.* – 2014. – V. 123 – P. 485–493.
107. Mayuri, P. In situ derivatization of an intrinsic iron impurity as a surface-confined iron(II)tris(2,2'-bipyridine) complex on MWCNT and its application to selective electrochemical sensing of DNA's purine bases / P. Mayuri, A.S. Kumar // *Langmuir.* – 2015. – V. 31. – P. 5945–5951.
108. Camp, C.L. Analysis of mono-phosphate nucleotides as a potential method for quantification of DNA using high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma-mass spectrometry / C.L. Camp, B.L. Sharp, H.J. Reid, J. Entwisle, H. Goenaga-Infante // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – V. 402. – P. 367–372.
109. Wang, J. Trace measurements of nucleic acid using flow injection amperometry / J. Wang, L. Chen, M. Chicharro // *Anal. Chim. Acta.* – 1996. – V. 319. – P. 347–352.
110. Passos, M.L.C. Estimation of postmortem interval by hypoxanthine and potassium evaluation in vitreous human with a sequential injection system / M.L.C. Passos, M.L.M.F.S. Saraiva, J.L.F.C. Lima // *Talanta.* – 2009. – V. 79. – P. 1094–1099.
111. Wang, Y. A highly sensitive and automated method for the determination of hypoxanthine based on lab-on-valve approach using Fe₃O₄/MWCNTs/ β -CD modified electrode / Y. Wang, L. Wang, T. Tian, G. Yao, X. Hu, C. Yang, Q. Xu // *Talanta.* – 2012. – V. 99. – P. 840–845.
112. Wang, Y. Metal-organic frameworks and β -cyclodextrin-based composite electrode for simultaneous quantification of guanine and adenine in lab-on-valve manifold / Y. Wang, H. Chen, Y. Wu, H. Ge, G. Ye, X. Hu // *Analyst.* – 2014. – V. 139. – P. 6197–6203.
113. Lv, J. On-line galvanic cell generated electrochemiluminescence determination of acyclovir based on the flow injection sampling / J. Lv, L. Luo, Z. Zhang // *Anal. Chim. Acta.* – 2004. – V. 510. – P. 35–39.
114. Long, X. Flow injection-chemiluminescence determination of acyclovir / X. Long, F. Chen // *Luminescence.* – 2012. – V. 27. – № 6. – P. 478–481.

115. Yang, M. Novel chemiluminescent system of acyclovir-H₂O₂-Co(II) and its application / M. Yang, Y. Zou, S. Yu, X. Li // *Fenxi Huaxue*. – 2004. – V. 32. – № 9. – P. 1237–1239.
116. Hu, X. Determination of acyclovir by flow-injection chemiluminescence analysis / X. Hu, L. Chen, W. Ling // *Fenxi Shiyanshi*. – 2011. – V. 30. – № 10. – P. 81–84.
117. Munira, A. Determination of acyclovir and gancyclovir using flow-injection chemiluminescence method / A. Munira, N. Wang, Y. Tang, T. Mhetaer // *Xi'an Jiaotong Daxue Xuebao, Yixueban*. – 2007. – V. 28. – № 6. – P. 707–710.
118. Wang, N. A new flow-injection chemiluminescence method for the determination of acyclovir and ganciclovir / N. Wang, Y. Tang, X. Xiong, X. Han, C. Yu // *Anal. Lett.* – 2006. – V. 39. – № 5. – P. 973–983.
119. Rezk, M.S. Dissolution testing and potentiometric determination of famciclovir in pure, dosage forms and biological fluids / M.S. Rezk, R.M. El Nashar // *Bioelectrochem.* – 2013. – V. 89. – P. 26–33.
120. Siangproh, W. Electrochemical detection for flow-based system: a review / W. Siangproh, W. Leesutthipornchai, W. Dungchai, O. Chailapakul // *J. Flow Injection Anal.* – 2009. – V. 26. – № 1. – P. 5–25.
121. Dryhurst, G. Electrochemical oxidation of some biologically-important purines. Relationship to biochemistry of purines / G. Dryhurst // *Bioelectrochem. Bioenergetics*. – 1974. – V. 1. – P. 49–66.
122. Goyal, R.N. Oxidation chemistry and biochemistry of some biologically important purines and indoleamines / R.N. Goyal // *Bioelectrochem. Bioenergetics*. – 1994. – V. 33. – P. 75–81.
123. Dryhurst, G. Electrochemical oxidation of adenine: reaction products and mechanisms / G. Dryhurst, P.J. Elving // *J. Electrochem. Soc.* – 1968. – V. 115. – P. 1014–1020.
124. Dryhurst, G. Electrochemical oxidation of guanine at the pyrolytic graphite electrode / G. Dryhurst, G.F. Pace // *J. Electrochem. Soc.* – 1970. – V. 117. – P. 1259–1264.

125. Goyal, R.N. Redox chemistry of guanine and 8-oxyguanine and a comparison of the peroxidase-catalyzed and electrochemical oxidation of 8-oxyguanine / R.N. Goyal // *J. Electroanal. Chem.* – 1982. – V. 135. – P. 75–91.
126. Oliveira-Brett, M.A. Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode / A.M. Oliveira-Brett, V. Diculescu, J.A.P. Piedade // *Bioelectrochem.* – 2002. – V. 55. – P. 61–62.
127. Хуан, В. Электрохимическое поведение гуанина и его определение с помощью электрода из угольной пасты, модифицированного натриевым монтмориллонитом / В. Хуан, Ш. Жан, Е. Ву // *Электрохимия.* – 2006. – Т. 42. – № 2. – С. 178–182.
128. Абдуллин, Т.И. Адсорбция и окисление пуриновых оснований и их производных на электроде, модифицированном углеродными нанотрубками / Т.И. Абдуллин, И.И. Никитина, О.В. Бондарь // *Электрохимия.* – 2008. – Т. 44. – № 12. – С. 1444–1448.
129. Abbaspour, A. Electrochemical studies on the oxidation of guanine and adenine at cyclodextrin modified electrodes / A. Abbaspour, A. Noori // *Analyst.* – 2008. – V. 133. – P. 1664–1672.
130. Ferapontova, E.E. Electrochemistry of guanine and 8-oxoguanine at gold electrodes / E.E. Ferapontova // *Electrochim. Acta.* – 2004. – V. 49. – P. 1751–1759.
131. Yin, H. Electrochemical oxidation behavior of guanine and adenine on graphene-Nafion composite film modified glassy carbon electrode and simultaneous determination / H. Yin, Y. Zhou, Q. Ma, S. Ai, P. Ju, L. Zhu, L. Lu // *Proc. Biochem.* – 2010. – V. 45. – P. 1707–1712.
132. Pogacean, F. Electrochemical oxidation of adenine using platinum electrodes modified with carbon nanotubes / F. Pogacean, A.R. Biris, M. Coros, F. Watanabe, A.S. Biris, S. Clichici, A. Filip, S. Pruneanu // *Phys. E.* – 2014. – V. 59. – P. 181–185.
133. Gonçalves, L.M. Electrochemical oxidation of adenine: a mixed adsorption and diffusion response on an edge-plane pyrolytic graphite electrode / L.M. Gonçalves,

- C. Batchelor-McAuley, A.A. Barros, R.G. Compton // *J. Phys. Chem. C.* – 2010. – V. 114. – P. 14213–14219.
134. Visor, G.C. Electrochemistry of purine derivatives 1: direct determination for the antiviral drug 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]guanine by anodic differential pulse voltammetry / G.C. Visor, S.E. Jackson, R.A. Kenley, G.C. Lee // *J. Pharm. Sci.* – 1985. – V. 74. – № 10. – P. 1078–1081.
135. Uslu, B. Electrochemical studies of ganciclovir at glassy carbon electrodes and its direct determination in serum and pharmaceuticals by square wave and differential pulse voltammetry / B. Uslu, B. Doğan, S.A. Özkan // *Anal. Chim. Acta.* – 2005. – V. 537. – P. 307–313.
136. Wang, F. Studies on electrochemical behaviors of acyclovir and its voltammetric determination with nano-structured film electrode / F. Wang, L. Chena, X. Chena, S. Hu // *Anal. Chim. Acta.* – 2006. – V. 576. – P. 17–22.
137. Shetti, N.P. Electrochemical behavior of an antiviral drug acyclovir at fullerene- C_{60} -modified glassy carbon electrode / N.P. Shetti, S.J. Malode, S.T. Nandibewoor // *Bioelectrochem.* – 2012. – V. 88. – P. 76–83.
138. Goyal, R.N. Oxidation chemistry of 3,7-dimethylxanthine - a central behavioural stimulant at solid electrodes / R.N. Goyal, A. Rastogi // *Croat. Chim. Acta.* – 2000. – V. 73. – P. 495–509.
139. Wang, Z. Voltammetric behavior of caffeine and theophylline at poly(4-aminopyridine) modified electrode and their simultaneous determination / Z. Wang, Z. Li, S. Zhou // *Chin. J. Anal. Chem.* – 2004. – V. 32. – № 3. – P. 305–308.
140. Yao, T. Anodic voltammetry and its analytical application to the detection and simultaneous determination of hypoxanthine, xanthine, and uric acid / T. Yao, Y. Taniguchi, T. Wasa, S. Musha // *Bull. Chem. Soc. Japan.* – 1978. – V. 51. – P. 2937–2941.
141. Spătaru, N. Anodic voltammetry of xanthine, theophylline, theobromine and caffeine at conductive diamond electrodes and its analytical application / N. Spătaru, B.V. Sarada, D.A. Tryk, A. Fujishima // *Electroanalysis.* – 2002. – V. 14. – P. 721–728.

142. Zhu, Y.-H. Electrochemical oxidation of theophylline at multi-wall carbon nanotube modified glassy carbon electrodes / Y.-H. Zhu, Z.-L. Zhang, D.-W. Pang // *J. Electroanal. Chem.* – 2005. – V. 581. – P. 303–309.
143. Malode, S. Voltammetric behavior of theophylline and its determination at multi-wall carbon nanotube paste electrode / S. Malode, N.P. Shetti, S.T. Nandibewoor // *Colloids Surf., B.* – 2012. – V. 97. – P. 1–6.
144. Mersal, G.A.M. Experimental and computational studies on the electrochemical oxidation of caffeine at pseudo carbon paste electrode and its voltammetric determination in different real samples / G.A.M. Mersal // *Food Anal. Methods.* – 2012. – V. 5. – P. 520–529.
145. Tadesse, Y. Cyclic voltammetric investigation of caffeine at anthraquinone modified carbon paste electrode / Y. Tadesse, A. Tadese, R.C. Saini, R. Pal // *Int. J. Electrochem.* – 2013. – ID 849327. – 7 p.
146. Жанатаев, А.К. Перспективы определения 8-гидрокси-2-дезоксигуанозина в качестве биомаркера окислительного стресса в эксперименте и клинике / А.К. Жанатаев, А.Д. Дурнев, С.Б. Середенин // *Вестник РАМН.* – 2002. – Т. 2. – С. 45–49.
147. Amare, M. Polymer modified glassy carbon electrode for the electrochemical determination of caffeine in coffee / M. Amare, S. Admassie // *Talanta.* – 2012. – V. 93. – P. 122–128.
148. Amare, M. Differential pulse voltammetric determination of theophylline at poly-(4-amino-3-hydroxynaphthalene sulfonic acid) modified glassy carbon electrode / M. Amare, S. Admassie // *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* – 2012. – V. 26. – № 1. – P. 73–84.
149. Gao, Y. Simultaneous determination of theophylline and caffeine by large mesoporous carbon/Nafion modified electrode / Y. Gao, H. Wang, L. Guo // *J. Electroanal. Chem.* – 2013. – V. 706. – P. 7–12.
150. Yang, S. Nafion/multi-wall carbon nanotubes composite film coated glassy carbon electrode for sensitive determination of caffeine / S. Yang, R. Yang, G. Li, L. Qu, J. Li, L. Yu // *J. Electroanal. Chem.* – 2010. – V. 639. – P. 77–82.

151. Шайдарова, Л.Г. Вольтамперометрическое определение ацикловира в лекарственных средствах на электроде, модифицированном пленкой из гексахлорплатината или гексацианокобальтата рутения / Л.Г. Шайдарова, А.В. Гедмина, Э.Р. Жалдак, И.А. Челнокова, Г.К. Будников // Хим.-фарм. журн. – 2014. – Т. 48. – № 11. – С. 37.
152. Zhang, M. Electrochemical behaviors and simultaneous determination of guanine and adenine based on highly ordered Pd-nanowire arrays-modified glassy carbon electrode / M. Zhang, F. Gan, F. Cheng // Anal. Methods – 2015. – DOI: 10.1039/c5ay00608b. – 7 p.
153. Ensafi, A.A. A new electrochemical sensor based on porous silicon supported Pt–Pd nanoalloy for simultaneous determination of adenine and guanine / A.A. Ensafi, M.M. Abarghoui, B. Rezaei // Sens. Actuat. B. – 2014. – V. 204. – P. 528–535.
154. Niu, X. Electrochemical behaviors and simultaneous determination of guanine and adenine based on graphene–ionic liquid–chitosan composite film modified glassy carbon electrode / X. Niu, W. Yang, J. Ren, H. Guo, S. Long, J. Chen, J. Gao // Electrochim. Acta. – 2012. – V. 80. – P. 346–353.
155. Ba, X. Poly(alizarin red)/graphene modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of purine and pyrimidine / X. Ba, L. Luo, Y. Dinga, Z. Zhang, Y. Chu, B. Wang, X. Ouyang // Anal. Chim. Acta. – 2012. – V. 752. – P. 94–100.
156. Sun, J.-Y. A graphene-based electrochemical sensor for sensitive determination of caffeine / J.-Y. Sun, K.-J. Huang, S.-Y. Wei, Z.-W. Wu, F.-P. Ren // Colloids. Surf. B – 2011. – V. 84. – P. 421–426.
157. Shah, B. Carbon nanotube based electrochemical sensor for the sensitive detection of valacyclovir / B. Shah, T. Lafleur, A. Chen // Faraday Discuss. – 2013. – DOI: 10.1039/c3fd00023k. – 12 p.
158. Ye, X. Fabrication of nano-ZnS coated PEDOT-reduced graphene oxide hybrids modified glassy carbon-rotating disk electrode and its application for simultaneous determination of adenine, guanine, and thymine / X. Ye, Y. Du, K. Duan, D. Lu, C. Wang, X. Shi // Sens. Actuat. B. – 2014. – V. 203. – P. 271–281.

159. Kalaivani, A. Simultaneous determination of adenine and guanine using cadmium selenide quantum dots-graphene oxide nanocomposite modified electrode / A. Kalaivani, S.S. Narayanan // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2015. – V. 15. – P. 4697–4705.
160. Arvand, M. A new microplatform based on titanium dioxide nanofibers/graphene oxide nanosheets nanocomposite modified screen printed carbon electrode for electrochemical determination of adenine in the presence of guanine / M. Arvand, N. Ghodsi, M. Ali Zanjanchi // *Biosens. Bioelectron.* – 2016. – V. 77. – P. 837–844.
161. Yari, A. New MWCNT-Fe₃O₄@PDA-Ag nanocomposite as a novel sensing element of an electrochemical sensor for determination of guanine and adenine contents of DNA / A. Yari, S. Derki // *Sens. Actuat. B.* – 2016. – V. 227. – P. 456–466.
162. Wang, H.-S. Simultaneous determination of guanine and adenine in DNA using an electrochemically pretreated glassy carbon electrode / H.-S. Wang, H.-X. Ju, H.-Y. Chen // *Anal. Chim. Acta.* – 2002. – V. 461. – P. 243–250.
163. Câmpean, A. Voltammetric determination of some alkaloids and other compounds in pharmaceuticals and urine using an electrochemically activated glassy carbon electrode / A. Câmpean, M. Tertiș, R. Săndulescu // *Cent. Eur. J. Chem.* – 2011. – V. 9. – № 4. – P. 688–700.
164. Câmpean, A. Electrochemical behavior of some purine derivatives on carbon based electrodes / A. Câmpean, M. Tertiș, R. Săndulescu // *Cent. Eur. J. Chem.* – 2011. – V. 9. – № 3. – P. 466–473.
165. Devadas, B. Simultaneous determination of adenine and thymine in presence of guanine at electrochemically activated glassy carbon electrode / B. Devadas, M. Rajkumar, S.-M. Chen // *Int. J. Electrochem. Sci.* – 2013. – V. 8. – P. 5241–5249.
166. Švorc, L. Modification-free electrochemical approach for sensitive monitoring of purine DNA bases: simultaneous determination of guanine and adenine in

- biological samples using boron doped diamond electrode / L. Švorce, K. Klacher // *Sens. Actuat. B.* – 2014. – V. 194. – P. 332–342.
167. Lourenção, B.C. Simultaneous voltammetric determination of paracetamol and caffeine in pharmaceutical formulations using a boron-doped diamond electrode / B.C. Lourenção, R.A. Medeiros, R.C. Rocha-Filho, L.H. Mazo, O. Fatibello-Filho // *Talanta.* – 2009. – V. 78. – P. 748–752.
168. Marsh, J.H. Voltammetric studies of glassy carbon electrodes activated in air and steam / J.H. Marsh, S.W. Orchard // *Carbon.* – 1992. – V. 30. – № 6. – P. 895–901.
169. Regisser, F. Randomly oriented graphite electrode. Part 1. Effect of electrochemical pretreatment on the electrochemical behavior and chemical composition of the electrode / F. Regisser, M.A. Lavoie, G.Y. Champagne, D. Bélanger // *J. Electroanal. Chem.* – 1996. – V. 415. – P. 47–54.
170. Bard, A.J. *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, 2nd ed. / A.J. Bard, L.R. Faulkner // N.Y.: John Wiley & Sons, Inc, 2001. – 864 p.
171. McCreery, R.L. *Carbon electrodes* / R.L. McCreery, K.K. Cline, eds: P.T. Kissinger, W.R. Heineman // *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*, 2nd ed. – N.Y.: Dekker, 1996. – Ch. 10. – P. 293.
172. Bjelica, L.J. Activation of glassy carbon electrode in aqueous and non-aqueous media / L.J. Bjelica, L.S. Jovanović // *Electrochim. Acta.* – 1992. – V. 37. – № 2. – P. 371–372.
173. Zhang, H. Effects of high-intensity ultrasound on glassy carbon electrodes / H. Zhang, L.A. Coury Jr. // *Anal. Chem.* – 1993. – V. 65. – P. 1552–1558.
174. Ilangovan, G. Mechanism of activation of glassy carbon electrodes by cathodic pretreatment / G. Ilangovan, K. Chandrasekara Pillai // *J. Solid State Electrochem.* – 1999. – V. 3. – № 6. – P. 357–360.
175. Будников, Г.К. *Основы современного электрохимического анализа* / Г.К. Будников, В.Н. Майстренко, М.Р. Вяселев – М: БИНОМ, 2003. – 592 с.
176. Goyal, R.N. Voltammetric quantification of adenine and guanine at C₆₀ modified glassy carbon electrodes / R.N. Goyal, S.P. Singh // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2006. – V. 6. – P. 3699–3704.

177. Wang, H.-S. Voltammetric behavior and detection of DNA at electrochemically pretreated glassy carbon electrode / H.-S. Wang, H.-X. Ju, H.-Y. Chen // *Electroanalysis* – 2001. – V. 13. – № 13. – P. 1105–1109.
178. Kepley, L.J. Ellipsometric, electrochemical, and elemental characterization of the surface phase produced on glassy carbon electrodes by electrochemical activation / L.J. Kepley, A.J. Bard // *Anal. Chem.* – 1988. – V. 60. – P. 1459–1467.
179. Chen, P. Control of electron transfer kinetics at glassy carbon electrodes by specific surface modification / P. Chen, R.L. McCreery // *Anal. Chem.* – 1996. – V. 68. – P. 3958–3965.
180. Shi, K. Scanning tunneling microscopic and voltammetric studies of the surface structures of an electrochemically activated glassy carbon electrode / K. Shi, K.-K. Shiu // *Anal. Chem.* – 2002. – V. 74. – P. 879–885.
181. Кабанова, О.Л. Углеситалловый электрод в аналитической химии / О.Л. Кабанова // *Журн. аналит. химии.* – 1981. – Т. 36. – № 7. – С. 1421–1428.
182. Татаринов, В.Ф. Углеситалл и его свойства / В.Ф. Татаринов, В.С. Виргильев, Е.С. Евдокимов // *Перспективные материалы.* – 1999. – № 4. – С. 41–45.
183. Волков, Р.Л. Исследование субмикронных полостей в углеситалле методом фокусированного ионного пучка / Р.Л. Волков, Н.И. Боргардт, В.Н. Кукин, А.В. Агафонов, В.О. Кузнецов // *Письма в ЖТФ.* – 2013. – Т. 39. – Вып. 18. – С. 53–60.
184. Алов, Н.В. Электрохимическая кристаллизация металлов при совместном осаждении меди и кадмия на поверхностях углеситалловых электродов / Н.В. Алов, К.Б. Калмыков, А.И. Каменев, К.В. Осколок // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия.* – 2000. – Т. 41. – № 4. – С. 244–246.
185. Доронин, А.Н. Фоновые токи углеситаллового электрода. Циклическая вольтамперометрия / А.Н. Доронин, С.М. Бенеаминова, О.Л. Кабанова // *Журн. аналит. химии.* – 1982. – Т. 37. – № 9. – С. 1619–1623.
186. Рожанчук, Т.С. Углеситалловый электрод, модифицированный пленкой SiO₂–гемоглобин–золото, как перспективный чувствительный элемент

- биосенсора / Т.С. Рожанчук, О.Ю. Тананайко, Е.А. Мазуренко, О.А. Егоров // Журн. аналит. химии. – 2012. – Т. 67. – № 2. – С. 191–197.
187. Goyal, R.N. Simultaneous voltammetric determination of hypoxanthine, xanthine, and uric acid / R.N. Goyal, A. Mittal, S. Sharma // *Electroanalysis*. – 1994. – V. 6. – P. 609–611.
188. Zen, Y.-M. Voltammetric determination of caffeine in beverages using a chemically modified electrode / Y.-M. Zen, Y.-S. Ting, Y. Shih // *Analyst*. – 1998. – V. 123. – P. 1145–1147.
189. Laviron, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems / E. Laviron // *J. Electroanal. Chem.* – 1979. – V. 101. – № 1. – P. 19–28.
190. Kenley, R.A. Electrochemistry of purine derivatives 2: Correlation of anodic differential pulse peak potentials with hammett substituent constants / R.A. Kenley, S.E. Jackson, J.C. Martin, G.C. Visor // *J. Pharm. Sci.* – 1985. – V. 74. – № 10. – P. 1082–1085.
191. Tu, X. Novel carboxylation treatment and characterization of multiwalled carbon nanotubes for simultaneous sensitive determination of adenine and guanine in DNA / X. Tu, X. Luo, S. Luo, L. Yan, F. Zang, Q. Xie // *Microchim. Acta*. – 2010. – V. 169. – P. 33–40.
192. Sadikoglu, M. Voltammetric determination of acyclovir in human urine using ultra trace graphite and glassy carbon electrode / M. Sadikoglu, G. Sadikoglu, S. Yagmur, E. Orta, S. Yilmaz // *Curr. Anal. Res.* – 2011. – V. 7. – P. 130–135.
193. Uslu, B. Electrooxidation of the antiviral drug valacyclovir and its square-wave and differential pulse voltammetric determination in pharmaceuticals and human biological fluids / B. Uslu, S.A. Özkan, Z. Şentürk // *Anal. Chim. Acta*. – 2006. – V. 555. – P. 341–347.
194. Таринк, Д. Определение валацикловира в фармацевтических препаратах и биологических жидкостях методами квадратно-волновой и дифференциальной импульсной вольтамперометрии / Д. Таринк, А. Гольцу // *Электрохимия*. – 2015. – Т. 51. – № 2. – С. 178–189.

195. Zhou, Y. Electrochemical studies of ganciclovir at boron-doped nanocrystalline diamond electrodes / Y. Zhou, J. Zhi, X. Zhang, M. Xu // *Diamond Related Materials*. – 2011. – V. 20. – P. 18–22.
196. Lau, Q.-W. Simultaneous determination of ascorbic acid, caffeine and paracetamol in drug formulation by differential-pulse voltammetry using a glassy carbon electrode / Q.-W. Lau, S.-F. Luk, Y.-M. Cheung // *Analyst*. – 1989. – V. 114. – P. 1047–1051.
197. Zen, J.-M. Simultaneous determination of caffeine and acetaminophen in drug formulation by square-wave voltammetry using a chemically modified electrode / J.-M. Zen, Y.-S. Ting // *Anal. Chim. Acta*. – 1997. – V. 342. – P. 175–180.
198. Saghavi, B.J. Simultaneous voltammetric determination of acetaminophen, aspirin and caffeine using an in situ surfactant-modified multiwalled carbon nanotube paste electrode / B.J. Saghavi, A.K. Srivastava // *Electrochim. Acta*. – 2010. – V. 55. – P. 8638–8648.
199. Смехова, И.Е. Оценка эквивалентности таблеток генериков ацикловира методом *in vitro* / И.Е. Смехова // *Вест. СПбГУ*. – 2009. – Сер. 11. – № 3. – С. 122–127.
200. Багирова, В.Л. Об общей фармакопейной статье «Растворение» / В.Л. Багирова, Л.Н. Взорова, Л.К. Граковская, А.Е. Добротворский, Г.С. Киселева, А.И. Тенцова // *Хим.-фарм. журн.* – 2001. – Т. 35. – № 4. – С. 39–41.
201. Арзамасцев, А.П. Сравнительная оценка уровня требований к испытанию «Растворение» / А.П. Арзамасцев, Н.П. Садчикова, Т.Ю. Лутцева // *Хим.-фарм. журн.* – 2003. – Т. 37. – № 1. – С. 39–45.
202. Brikl, R. Dissolution testing of solid products / R. Brikl // *Am. Pharm. Rev.* – 2010. – № 1. – P. 98–102.
203. Qureshi, S.A. Reporting and analyzing drug dissolution results: a systematic approach / S.A. Qureshi // *Am. Pharm. Rev.* – 2010. – P. 81–85.
204. Wang, Q. Analytical method selection for drug product dissolution testing / Q. Wang, D. Ma, J.P. Higgins // *Dissolution Technol.* – 2006. – № 8. – P. 6–13.

205. Kenley, R.A. Automated dissolution testing with flow-injection analysis dissolution profiles for the antiviral drugs, DHPG and acyclovir, in capsule formulation / R.A. Kenley, S.E. Jackson, G.C. Visor, J.S. Winterle // *Drug Dev. Ind. Pharm.* – 1987. – V. 13 – № 1. – P. 39–56.
206. Раменская, Г.В. Испытание «Растворение» в средах, моделирующих физиологические условия, как способ оценки поведения лекарственных средств *in vivo* / Г.В. Раменская, Е.И. Шохин, А.Ю. Савченко, Е.А. Волкова // *Биомед. химия.* – 2011. – Т. 57. – № 5. – С. 482–489.
207. Государственный стандарт качества лекарственных средств. Общая фармакопейная статья 42-0003-04 “Растворение”, 2004.
208. Basavaiah, K. Simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of acyclovir in pharmaceuticals / K. Basavaiah, H.C. Prameela, U. Chandrashekar // *Il Farmaco.* – 2003. – V. 58. – № 12. – С. 1301–1306.
209. Christian, G.D. Sequential injection analysis for electrochemical measurements and process analysis / G.D. Christian // *Analyst.* – 1994. – V. 119. – P. 2309–2314.
210. Pérez-Olmos, R. Sequential injection analysis using electrochemical detection: a review / R. Pérez-Olmos, J.C. Soto, N. Zárata, A.N. Araújo, M.C.B.S.M. Montenegro // *Anal. Chim. Acta.* – 2005. – V. 554. – P. 1–16.
211. Kubiak, W.W. The sequential injection system with adsorptive stripping voltammetric detection / W.W. Kubiak, R.-M. Latonen, A. Ivaska // *Talanta.* – 2001. – V. 53. – P. 1211–1219.
212. Daniel, A. Sequential flow analysis coupled with ACSV for on-line monitoring of cobalt in the marine environment / A. Daniel, A.R. Baker, C.M.G. van den Berg // *Frez. J. Anal. Chem.* – 1997. – V. 358. – № 6. – P. 703–710.
213. Economou, A. On-line stripping voltammetry of trace metals at a flow-through bismuth-film electrode by means of a hybrid flow-injection/sequential-injection system / A. Economou, A. Voulgaropoulos // *Talanta.* – 2007. – V. 71. – P. 758–765.
214. Wang, J. Subtractive anodic stripping voltammetry with flow injection analysis / J. Wang, H.D. Dewald // *Anal. Chem.* – 1984. – V. 56. – P. 156–159.

215. Fang, B. Microwave-assisted preparation of a carbon nanotube/La(OH)₃ nanocomposite, and its application to electrochemical determination of adenine and guanine / B. Fang, W. Zhang, G. Wang, H. Liu, S. Wei // *Microchim. Acta.* – 2008. – V. 162. – P. 175–180.
216. Liu, T. Simultaneous determination of adenine and guanine utilizing PbO₂-carbon nanotubes-ionic liquid composite film modified glassy carbon electrode / T. Liu, X. Zhu, L. Cui, P. Ju, X. Qu, S. Ai // *J. Electroanal. Chem.* – 2011. – V. 651. – P. 216–221.
217. Huang, K.-J. Novel Electrochemical sensor based on functionalized graphene for simultaneous determination of adenine and guanine in DNA / K.-J. Huang, D.-J. Niu, J.-Y. Sun, C.-H. Han, Z.-W. Wu, Y.-L. Li, X.-Q. Xiong // *Colloids Surf., B.* – 2011. – V. 82. – P. 543–549.
218. Jelen, F. Voltammetry of native double-stranded, denatured and degraded DNA's / F. Jelen, M. Fojta, E. Paleček // *J. Electroanal. Chem.* – 1997. – V. 427. – P. 49–56.
219. Дэвидсон, Дж. Биохимия нуклеиновых кислот / Дж. Дэвидсон // М.: Мир, 1976. – 400 с.
220. Thangaraj, R. Simultaneous detection of guanine and adenine in DNA and meat samples using graphitized mesoporous carbon modified electrode / R. Thangaraj, A.S. Kumar // *J. Solid State Electrochem.* – 2013. – V. 17. – P. 583–590.
221. Kato, D. Carbon-based electrode materials for DNA electroanalysis / D. Kato, O. Niwa // *Anal. Sci.* – 2013. – V. 29. – P. 385–392.
222. Способ оценки депуринизации нуклеиновых кислот и устройство для его осуществления: пат. 2390009 Рос. Федерация: МПК G01N27/26, B82B1/00 / Никитина И.И., Бондарь О.В., Абдуллин Т.И.; заявитель и патентообладатель ГОУ ВПО «Казанский гос. ун-т им. В.И. Ульянова-Ленина». – № 2008132249/28; заявл. 04.08.08; опубл. 20.05.10, Бюл. № 2.
223. Bemì, V. Deoxyadenosine metabolism in a human colon-carcinoma cell line (LoVo) in relation to its cytotoxic effect in combination with deoxycytosine / V. Bemì, N. Tazzini, S. Banditelli, F. Giorgelli, R. Pesi, G. Turchi, A. Mattana,

- F. Sgarrella, M.G. Tozzi, M. Camici // *Int. J. Cancer.* – 1998. – V. 75 – P. 713–720.
224. Goyal, R.N. Voltammetric determination of 2'-desoxyadenosine and adenine in urine of patient with hepatocellular carcinoma using fullerene-C₆₀-modified glassy carbon electrode / R.N. Goyal, S. Chatterjee, S. Bishoi // *Electroanal.* – 2009. – V. 21. – № 12. – P. 1369–1378.
225. Van Gennip, A.H. Defects in metabolism of purines and pyrimidines / A.H. Van Gennip // *Ned. Tijdschr. Klin. Chem.* – 1999. – V. 24. – P. 171–175.
226. Daoust, R.A. The colorimetric determination of caffeine in tablet mixtures / R.A. Daoust // *J. Am. Pharm. Ass.* – 1953. – V. XLII. – № 12. – P. 744–746.
227. Tavallali, H. Simultaneous kinetic determination of paracetamol and caffeine using Cu(II)-neocuproine in presence of dodecyl sulphate by H-point standart addition method / H. Tavallali, M. Sheikhaei. // *Indian J. Chem., Sect. A* – 2009. – V. 48A. – № 6. – P. 812–816.
228. Amin, A.S. Colorimetric method for the simultaneous determination of chlorphenoxamine hydrochloride and anhydrous caffeine in pure and dosage forms with rose Bengal / A.S. Amin, M.M. El-Henawee // *Mikrochim. Acta.* – 1995. – V. 118. – P. 177–183.
229. Беляева, Т.В. Спектрофотометрическое определение теофиллина / Т.В. Беляева, Е.К. Иванова; С.Г. Маякова // *Вестник Моск. ун-та. Сер. 2, Химия.* – 1991. – Т. 32. – № 2. – С. 164–169.
230. El-Shabouri, S.R. Colorimetric determination of theophylline and aminophylline with diazotized p-nitroaniline / S.R. El-Shabouri, S.A. Hussein, S.E. Emara // *Talanta.* – 1989. – V. 36. – P. 1288–1290.
231. Iturriaga, H. Kinetic-spectrophotometric determination of theophylline, dyphylline, and proxiphylline by use of partial least-squares regression / H. Iturriaga, J. Coello, S. MasPOCH, M. Porcel // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2002. – V. 374. – № 1. – P. 33–38.
232. Андреева, Е.Ю. Спектрофотометрическое определение кофеина и теофиллина по реакции азосочетания с тетрафторборатом 4-нитрофенилдиазония /

- Е.Ю. Андреева, С.Г. Дмитриенко, Ю.А. Золотов // Завод. лаб. Диагност. матер. – 2010. – Т. 76. – С. 21–23.
233. Singh, D.K. Spectrophotometric determination of caffeine and theophylline in pure alkaloids and its application in pharmaceutical formulations / D.K. Singh, A. Sahu // *Anal. Biochem.* – 2006. – V. 349. – P. 176–180.
234. Hunig, S. Oxidative coupling reactions of phenols and amines with MBTH / S. Hunig, K.H. Fritsch. // *Ann. Chem.* – 1957. – V. 609. – P. 143–160.
235. Ribeiro, D.S.M. Exploiting the oxidative coupling reaction of MBTH for indapamide determination / D.S.M. Ribeiro, J.A.V. Prior, J.L.M. Santos, J.A. Lopes, J.L.F.C. Lima // *Talanta.* – 2009. – V. 79. – P. 1161–1168.
236. Rao, M.S. Visible spectrophotometric methods for the quantitative estimation of milnacipran in their formulations / M.S. Rao, D.R. Kumar, V.S. Krishna, D. Ramachandran // *Int. J. Pharm. Tech. Res.* – 2012. – V. 4. – P. 970–974.
237. Subbayamma, A.V. Spectrophotometric determination of oxidative coupling reaction of nebivolol and trandolapril / A.V. Subbayamma, C. Rambabu // *Asian J. Chem.* – 2009. – V. 21. – № 6. – P. 4280–4284.
238. Prasad, A.V.S.S. Determination of minocycline by oxidative coupling and diazocoupling reactions in pharmaceutical formulations / A.V.S.S. Prasad, C.S.R. Lakshmi, C.S.P. Sastri, V.P. Uppuleti // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2002. – V. 30. – P. 491–498.
239. Vinay, K.B. Use of iron(III) chloride for the sensitive and selective assay of etamsylate in pharmaceuticals / K.B. Vinay, H.D. Revanasidappa, O.D. Zenita, K. Basavaiah // *Jordan J. Chem.* – 2010. – V. 5. – P. 291–305.
240. Bartsch, R.A. Mechanism of oxidation of 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride by potassium ferricyanide in aqueous methanol / R.A. Bartsch, S. Hunig, H. Quast // *J. Am. Chem. Soc.* – 1970. – V. 92. – P. 6007–6011.