

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б. Н. Ельцина»

На правах рукописи

Ивойлова Александра Всеволодовна

**Вольтамперометрическое определение противовирусных средств:
Триазавирин® и Триазида. Механизмы их электропревращений**

1.4.2. Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Екатеринбург – 2022

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химико-технологического института ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина»

Научный руководитель:

КОЗИЦИНА Алиса Николаевна, доктор химических наук, доцент

Официальные оппоненты:

МАЙСТРЕНКО Валерий Николаевич, доктор химических наук, член-корреспондент Академии наук Республики Башкортостан, профессор, ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», г. Уфа, заведующий кафедрой аналитической химии,

СТОЖКО Наталия Юрьевна, доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Уральский государственный экономический университет», г. Екатеринбург, заведующий кафедрой физики и химии;

ПОРФИРЬЕВА Анна Вениаминовна, кандидат химических наук, доцент, ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань, доцент кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова

Защита состоится «21» декабря 2022 года в 12 часов 00 минут на заседании диссертационного совета 2.6.02.07 по адресу: 620002, г. Екатеринбург, ул. Мира, 19, И-420 (зал Ученого совета).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина»:

<https://dissovet2.urfu.ru/mod/data/view.php?d=12&rid=4111>

Автореферат разослан « ____ » ноября 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Семенищев Владимир Сергеевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

По данным Всемирной организации здравоохранения до 80 % инфекционных заболеваний вызвано вирусами. На сегодняшний день наибольшую угрозу здоровью человека представляют РНК-вирусы, потому что вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза не имеет способности к коррекции ошибок. Эта особенность приводит к появлению все новых штаммов, устойчивых к уже известным средствам борьбы с ними.

К подцарству РНК-вирусов относятся вирусы гриппа и коронавирусы, которые имеют значительный пандемический потенциал. Для борьбы с вирусными инфекциями применяют комплексный подход: своевременная вакцинация, симптоматическое лечение и применение противовирусных препаратов. Довольно ограниченный выбор средств противовирусной терапии и развитие резистентности диктует необходимость разработки и практического внедрения новых оригинальных инновационных эффективных средств профилактики и лечения вирусных заболеваний.

Фармацевтический анализ играет ключевую роль в разработке новых высокоэффективных и безопасных лекарственных средств. Фарманализ имеет свои характерные особенности: он должен быть достаточно специфичен, чувствителен, точен по отношению к нормативам, обусловленным в государственной Фармакопее (ГФ), выполняться в короткие промежутки времени с использованием минимальных количеств испытуемых лекарственных средств и реактивов.

На сегодняшний день для оценки содержания действующего вещества лекарственных средств используют, как правило, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Основными минусами данного метода являются большая продолжительность пробоподготовки образцов, значительная стоимость оборудования и расходных материалов, высокие требования к квалификации специалистов, продуцирование большого количества отходов, включая токсичные органические растворители, которые требуют дальнейшей правильной утилизации. Электрохимические методы анализа (ЭХМА) лишены этих недостатков. Из ЭХМА в традиционном исполнении по ГФ применяют главным образом потенциометрию, потенциометрическое титрование и кулонометрию. Вольтамперметрические методы анализа в ГФ представлены слабо, тогда как современные исследования показывают, что вольтамперметрия является конкурентоспособным методом и имеет ряд преимуществ перед ВЭЖХ-методом. Однако вольтамперметрия может применяться только для электроактивных молекул.

С другой стороны, электрохимические методы могут позволить анализировать состав препарата, а также способны помочь в понимании механизма путей метаболизма фармацевтических соединений, протекающих с участием окислительно-восстановительных процессов малых органических молекул, которые не всегда возможно воспроизвести с помощью методов органического синтеза.

Разработка любой методики количественного определения новых синтезированных веществ сложных органических молекул для получения оптимального аналитического сигнала требует также определения возможного механизма этих реакций.

В последние десятилетия нитросоединения ароматической и гетероциклической природы привлекают значительное внимание исследователей, поскольку широко используются во всем мире в качестве противомикробных, противовирусных, противопаразитарных и радиосенсибилизирующих агентов. Некоторое подобие электрохимических и биологических реакций позволяет предположить, что механизмы реакций окисления/восстановления, происходящих на электроде и в клетках живого организма, могут протекать по схожим принципам. Известно, что протекание редокс-реакций с участием лекарственных средств может играть важную роль в механизме терапевтического эффекта. Некоторыми авторами описана связь процесса восстановления нитрогруппы

с биологическим, в частности, противовирусным действием этих соединений. Однако электропревращение каждой молекулы является уникальным ввиду разности структуры и ее окружения и требует индивидуального подхода к изучению ее редокс-механизма.

Получение новых знаний о физико-химических свойствах лекарственных соединений, в том числе окислительно-восстановительных, поможет не только понять возможные метаболизмы протекания редокс-процессов, оценить их фармакологическую активность, но и развить подходы по созданию новых способов количественного определения изучаемых препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 17-13-01096), Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-29-08015 мк), Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (государственный контракт № FEUZ-2020-0058 (H687/42Б.223/20)).

Степень разработанности темы исследования

Ярким представителем гетероциклических соединений является класс азоло[1,2,4]триазинов, привлекающий интерес вследствие структурного сходства с азотистыми основаниями, из которых строятся нуклеиновые кислоты живых организмов – ДНК или РНК. Благодаря этой особенности они могут выступать в роли антиметаболитов, оказываясь эффективными противовирусными и противоопухолевыми препаратами.

На основе нитросодержащих азолоазиниевых соединений сотрудниками ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Института органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН, НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева Минздрава России разработаны новый класс веществ, потенциальных лекарственных средств с широким спектром противовирусной активности. Первый препарат, созданный на базе этого класса соединений, Триазавирин® (натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат), включен в реестр лекарственных средств РФ (РФ, № ЛП-002604 от 28.12.2014 г.). Препарат также имеет успешный опыт применения на базе ковидных госпиталей в качестве этиотропного средства при терапии коронавирусной инфекции и в качестве средства медикаментозной профилактики.

Среди ряда структурных аналогов Триазавирин® перспективным соединением является Триазид (аргининовая соль 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-α]пиримидин-7-она, моногидрат) в качестве молекулы, имеющей более высокую противовирусную активность в отношении различных штаммов вируса в системах *in vivo*. В настоящее время Триазид прошел I фазу клинических исследований, которая также показала безопасность, хорошую переносимость и быстрое всасывание препарата.

Наличие электроактивной нитрогруппы в этих молекулах делает возможным использование ЭХМА для создания методик количественного анализа, что будет альтернативой ВЭЖХ-методам. Кроме того, как упоминалось ранее, электрохимические методы исследования (ЭХМИ) позволяют изучать сложные редокс-механизмы превращений вещества *in vitro* приближенные к *in vivo*. Комбинирование ЭХМИ с ЭПР- и ЯМР-спектроскопией, квантово-химическими расчетами, спектрофотометрией, ВЭЖХ и масс-спектроскопией высокого разрешения (МСВР) дадут возможность установить химические структуры разнообразных промежуточных, побочных и конечных продуктов электрохимических (ЭХ) реакций. Результаты исследований механизма редокс-реакций позволят создать чувствительную методику количественного определения Тризида и Триазавирин® в лекарственных средствах.

Целью диссертационной работы является исследование превращений натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата (Триазавирин®) и аргининовой соли 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-α]пиримидин-7-

она, моногидрата (Тризида) физико-химическими методами и создание новых вольтамперометрических методик количественного определения основного вещества в субстанциях и лекарственных формах.

Для осуществления поставленной цели необходимо решить ряд задач.

1. Исследовать электрохимические превращения Тризида и Триазавирина® методом вольтамперометрии: определить лимитирующую стадию процесса, термодинамические параметры, рассчитать число электронов и протонов, участвующих в реакции.

2. Исследовать и установить возможную структуру промежуточных продуктов, образующихся в процессе электровосстановления изучаемых соединений с использованием комбинированных методов: вольтамперометрии/ЭПР-спектроскопии, ВЭЖХ/МСВР, ЯМР-спектроскопии.

3. Изучить влияние материала трансдьюсера, методов модифицирования рабочей поверхности трансдьюсера, влияние режимов вольтамперометрических измерений на аналитический сигнал Триазавирина® и Тризида.

4. Разработать методики количественного вольтамперометрического определения основного вещества Триазавирина® и Тризида в субстанциях и лекарственных формах.

5. Провести валидационную оценку разработанных методик с известными ВЭЖХ-методами количественного определения основного вещества Триазавирина® и Тризида в противовирусном препарате Триазавирин® и фармацевтической субстанции Тризид соответственно актуальным требованиям Государственной Фармакопеи РФ XIV издания.

Методология и методы диссертационного исследования

Для определения кинетических и термодинамических свойств Триазавирина®, Тризида и их производных использованы методы циклической вольтамперометрии, хроноамперометрии, катодной линейной вольтамперометрии в совокупности с методом вращающегося дискового электрода (ВДЭ).

Величины r_{Ka} для Тризида определены спектрофотометрическим методом, для Триазавирина® – потенциометрическим. Электролиз Тризида и Триазавирина® был проведен с использованием метода хронопотенциометрии. Продукты электролиза Тризида и Триазавирина® анализировали методом ВЭЖХ в тандеме с масс-спектрометрией, методом ЯМР, спектрофотометрическим и химическим (качественные реакции на ионы) методами.

Для обнаружения частиц радикальной природы использованы прямой ЭПР-метод, комбинированный метод (ЭПР-циклическая вольтамперометрия/хроноамперометрия), метод регистрации ЭПР-спектров ловушками и зондами. Энергетический расчет молекул проведен методом квантово-химических расчетов в программе ORCA.

Для изготовления толстопленочных углеродосодержащих электродов применен метод трафаретной печати. Для активации ТУЭ использованы электрохимические методы: циклической вольтамперометрии, хроноамперометрии. Для активации и функционализации углеродных наноматериалов – методы кипячения в смеси кислот при ультразвуковой обработке с последующей промывкой и центрифугированием. При модификации поверхности ТУЭ углеродными наноматериалами применен «капельный» метод. Размеры и морфология модифицированных электродов исследованы методом сканирующей электронной микроскопии. Электрохимические характеристики модифицированных электродов были изучены методом импедансной спектроскопии, циклической вольтамперометрии и хроноамперометрии с применением модельной/опорной системы гексацианоферрата калия.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты исследований механизма реакций восстановления натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата (Триазавирин®) и аргининовой соли 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-α]пиримидин-7-она, моногидрата (Триазид). Закономерности влияния рН среды, заместителей, сопутствующих ионов (Na^+ , Li^+ , Bu_4N^+) на процесс электровосстановления Триазид и Триазавирин®. Результаты изучения термодинамических и кинетических параметров Триазавирин® и Триазид.
2. Результаты исследования промежуточных, побочных и конечных продуктов реакций электровосстановления натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата и аргининовой соли 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-α]пиримидин-7-она, моногидрата.
3. Вероятные механизмы процессов электровосстановления Триазид и Триазавирин® при рН 2-6.
4. Результаты исследования влияния материала трансдьюсера, методов модифицирования рабочей поверхности, влияние режимов вольтамперометрических измерений, результаты исследований влияния массы и природы наномодификатора на аналитический сигнал восстановления Триазавирин® и Триазид.
5. Новые вольтамперометрические методики количественного определения основного вещества в лекарственном средстве Триазавирин® и в фармацевтической субстанции Триазид.
6. Результаты протоколов валидационных испытаний разработанных методик количественного определения Триазавирин® и Триазид.

Научная новизна результатов исследования

Изучены особенности электропревращений натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата (Триазавирин®) и аргининовой соли 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-α]пиримидин-7-она, моногидрата (Триазид). Выявлены закономерности влияния рН среды, заместителей, сопутствующих ионов и катионов на электровосстановление этих веществ.

Показано, что электропревращение нитроазоло-азинов может протекать в одну или две стадии в зависимости от структуры молекул. Установлено, что существенное влияние на электровосстановление нитрогруппы исследуемых веществ оказывает рН среды. Выявлено, что присутствие в растворе Na^+ и Li^+ ионов изменяет не только скорость протонирования дианионных радикалов исследуемых соединений, но и региоселективность этих реакций.

Установлено, что электропревращение Триазавирин® в водной среде происходит благодаря двухступенчатому необратимому восстановлению нитрогруппы, сопряженной с ароматическим кольцом. Показано, что при потенциалах первой стадии при рН 2-6 основным процессом превращений является четырехэлектронное восстановление нитрогруппы через образование анион-радикала. Выделены и охарактеризованы промежуточные и конечные продукты восстановления Триазавирин®. Предложен возможный механизм электровосстановления натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата (Триазавирин®).

Установлено, что в кислой водной среде электровосстановление нитрогруппы Триазид протекает необратимо в одну шестиэлектронную стадию через образование анион-радикала с образованием соответствующего гетероциклического амина. Выделены и охарактеризованы промежуточные и конечные продукты восстановления Триазид. Предложен возможный механизм электровосстановления аргининовой соли 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-α]пиримидин-7-она, моногидрата (Триазид) в водной среде рН=2.

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследовано влияние различных углеродных наномодификаторов (сажа, функционализированная сажа, углеродные нанотрубки) на аналитический сигнал Триазид. Количественно охарактеризована связь между природой модификатора и аналитическим сигналом нитрогруппы препарата Триазид.

Разработана методика количественного вольтамперометрического определения Триазавирина® в лекарственных и фармацевтических субстанциях на толстопленочном углеродосодержащем электроде (ТУЭ). Проведена валидация разработанной методики вольтамперометрического определения Триазавирина® в лекарственной форме на ТУЭ. В рамках выбранного диапазона концентраций была доказана правильность, прецизионность и линейность методики. Показано, что минимально определяемая концентрация действующего вещества в препарате Триазавирин® – 0,12 мг/дм³, что почти в два раза ниже по сравнению с методом ВЭЖХ со спектрофотометрической детекцией.

Разработана и валидирована методика количественного вольтамперометрического определения Триазид в фармацевтической субстанции на стеклоуглеродном электроде (СУЭ). Установлена минимально определяемая концентрация Триазид в фармацевтической субстанции – 6,3 мг/дм³. В рамках выбранного диапазона концентраций были доказаны правильность, прецизионность и линейность методики.

Разработана новая методика количественного вольтамперометрического определения Триазид в фармацевтической субстанции, включающая создание нового электрохимического сенсора. Установлено, что минимально определяемая концентрация Триазид в фармацевтической субстанции – 9,3 мг/дм³. Предел количественного определения Триазид по разработанной методике почти в 50 раз превосходит метод ВЭЖХ.

Методика количественного определения Триазид методом вольтамперометрии защищена патентом РФ № 2733397.

Степень достоверности полученных результатов и апробация работы

Достоверность полученных данных определяется использованием в работе современных физико-химических методов исследования, высокотехнологического оборудования и валидацией разработанных методик количественного определения основных веществ противовирусного препарата Триазавирин® и фармацевтической субстанции Триазид с использованием в том числе независимого метода ВЭЖХ, проведенного на базе ИОХ им. И. Я. Постовского УрО РАН.

Основные положения диссертационной работы доложены на научных конференциях: IX, X Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа с международным участием и Молодежной научной школе «ЭМА» (Екатеринбург – Ленёвка, 2016; Казань, 2020), XXVI, XXVII, XXIX, XXX, XXXII Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии» (Екатеринбург, 2016, 2017, 2019, 2020, 2022), Третьем съезде аналитиков России (Москва, 2017), XIX Всероссийском совещании с международным участием «Электрохимия органических соединений ЭХОС» (Новочеркасск, 2018), III, IV, Междисциплинарном Симпозиуме по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике МОБИ-Хим-Фарма (Севастополь, 2017; Новый свет (Крым), 2018), 4-й Всероссийской конференции по медицинской химии с международным участием “MedChem Russia” (Екатеринбург, 2019), II Международной (XII Украинской) научной конференции для студентов и молодых ученых “Current Chemical Problems” (Винница, Украина, 2019), I Всероссийской конференции «Органические радикалы: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2021), III, V Международной научно-практической конференции «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (Екатеринбург, 2019, 2021).

Публикации

Основные результаты диссертационной работы представлены в 15 научных работах, из них 5 статей, опубликованных в рецензируемых научных журналах, определённых ВАК РФ и Аттестационным советом УрФУ и проиндексированных в международных базах Scopus и Web of Science; 1 патент РФ на изобретения.

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в выполнении исследований и общей постановке задач, в проведении анализа и статистической обработке полученных результатов; в написании статей и докладов, апробации и внедрении результатов исследования в разработку вольтамперометрических методик определения Триазавирина® и Триазиды в лекарственных средствах.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, семи глав, заключения и списка литературы. Работа изложена на 161 печатных страницах и содержит 42 рисунка и 25 таблиц. Список литературы включает 277 наименований работ российских и зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** раскрыты актуальность и степень разработанности темы диссертационной работы, определены цели и задачи исследования, сформулированы научная новизна, теоретическая и практическая значимость, а также положения, выносимые на защиту.

В **первой главе** рассмотрены основные достижения в области исследований механизмов электропревращений нитроароматических и нитрогетероциклических производных. Описаны основные проблемы по установлению промежуточных, конечных и побочных продуктов редокс-реакций нитрогруппы. Рассмотрены работы российских и зарубежных ученых за последние 30 лет в области аналитического контроля лекарственных средств. Особое внимание уделено направлениям исследований, в которых получены наиболее интересные результаты либо представлены новые методы анализа и пробоподготовки, а также методы улучшения аналитического отклика, требующие применения самых современных методов аналитической химии. Оценены их возможные достоинства и недостатки; представлен краткий обзор электрохимических сенсоров; дана их классификация; описаны принципы работы некоторых датчиков и области их применения. Представлены обоснование, цель и задачи исследования.

Во **второй главе** представлены сведения о реактивах, материалах, методологической и инструментальной базе диссертационного исследования.

Третья глава посвящена исследованию вероятного механизма электропревращения действующего вещества препарата Триазавирин®.

Циклические вольтамперограммы (ЦВА) ряда веществ класса 2-R-6-X-4,7-дигидро1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазины-7 (соединения **I-IV**), содержащих и не содержащих нитрогруппу в буферном растворе Бриттона-Робинсона (ББР) pH 2 представлены на рисунке 1, А. Электропревращение соединений **I, II, III** протекает благодаря необратимому двуступенчатому электровосстановлению (ЭВ) нитрогруппы этих соединений, на ЦВА соединения **IV** пиков восстановления в данном интервале потенциалов не наблюдается. Результаты ЭВ соединений **I-III** в неводной среде с добавлением эквивалентного количества NaOH к раствору **II** (рисунок 1, Б) указывают на то, что соединения **I** и **III** в апротонной среде восстанавливаются в ионном виде, вероятнее всего, в виде ионной пары с катионом Na⁺; а в водной среде – в виде протонированной формы.

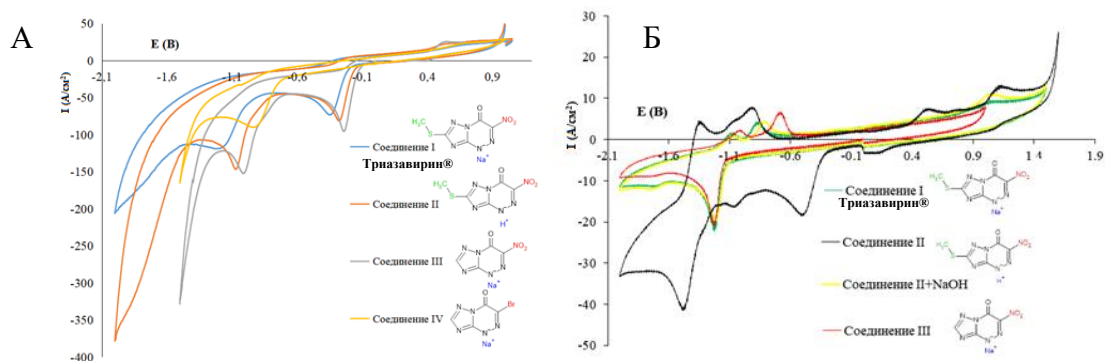


Рисунок 1 – ЦВА соединений ($C = 5 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³) $v = 50$ мВ/с vs Ag/AgCl/KCl_{sat.}:
 А – в растворе ББР (рН 2): синяя линия – **I**, оранжевая линия – **II**, серая линия – **III**,
 желтая линия – **IV**; Б – в ДМФА (0,1 моль/дм³ Bu₄NBF₄): зеленая – **I**, черная – **II**, красная – **III**,
 желтая – **II** с добавлением эквивалента NaOH

При добавлении доноров протонов (бензойной, уксусной кислот или фенола) раствору соединения **I** в ДМФА наблюдается рост тока первого пика. Следовательно, в присутствии доноров протонов протонирование является основной реакцией анион-радикала соединения **I**. Линейная зависимость тока первой стадии от концентрации дает основание предполагать, что ЭВ соединения **I** в кислых средах на первой стадии не осложняется реакциями второго порядка.

Эффективное число электронов n_e , участвующих в ЭХ реакции ЭВ-соединения **I** на первой стадии, рассчитано шестью параллельными способами (таблица 1).

Таблица 1 – Средние значения рассчитанного числа электронов n_e , участвующих в ЭВ $K_3[Fe(CN)_6]$ и первой стадии соединения **I** ($n = 5$, $P = 95$ %)

Соединение ($C = 5 \cdot 10^{-3}$ моль/дм ³ , раствор ББР рН = 2)	ХА					ЦВА			ВДЭ	
	I_1 сек, мА	$\int_1^2 Q$, Кл	n_e^1	n_e^2	n_e^3	I_p , мА	n_e^4	n_e^5	I_p^* , мА	n_e^6
I	-0,56	$(4,42 \pm 0,03) \cdot 10^{-4}$	3,96	4,08	4,17	-81,5	2,95	3,20	1,07	3,68
$Fe(CN)_6^{3-}/$ $Fe(CN)_6^{4-}$	-0,14	$(1,02 \pm 0,02) \cdot 10^{-4}$	–	1,02	–	-23,6	–	0,97	0,29	0,98

Примечание. $n^{1,3,4}$ находили отношением токов/ количества электричества с током/ количества электричества модельной редокс-пары $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$; n^2 – по уравнению Коттрелла, принимая во внимание, что значение D для нитроароматических соединений в водных средах близко к 10^{-5} см²/с; n^5 – по уравнению Ренделса – Шевчика; n^6 – по уравнению Левича; * предельный ток восстановления соединения **I** и $K_3Fe(CN)_6$ при $\omega = 600$ об./мин.

Зависимость предельного тока (I_d) ЭВ-соединения **I** при потенциале -0,50 В от скорости вращения имеет линейный вид $I_d(\text{мА}) = -0,135 \cdot \omega^{0,5}$ ($R^2 = 0,9914$), свидетельствует о диффузионном характере ЭВ в данных условиях. Однако зависимость тока пика ЭВ на ЦВА от $v^{1/2}$ не линейна, причем степень отклонения от прямой зависит от кислотности среды. Наклон графика $\lg I - \lg t$ в интервале $1 < t < 2$ с равен -0,53, что является несколько выше значения, характерного для ЭХ-реакции, контролируемой диффузией (-0,5). Эти результаты можно объяснить, исходя из основных свойств соединения **I** и подвижности водорода при атоме азота кольца.

Влияние кислотности среды на параметры ЭВ-соединения **I** представлено на рисунке 2. Наличие зависимости потенциала от рН однозначно свидетельствует об участии

протонов в ЭХ-процессе до переноса электронов и одновременно с ним. Величина $pK_a = 3,11$, следовательно, в зависимости от pH среды Триазавирин® может находиться либо в ионизированной, либо в протонированной форме. Рассматривая влияние pH на ток и потенциал первого пика ЭВ-соединения **I**, можно предполагать наличие кислотно-основных равновесий с участием как пиразинового (в положении 4), так и азольного (положение 3) атомов азота в субстрате (рисунок 2, Б, вставка).

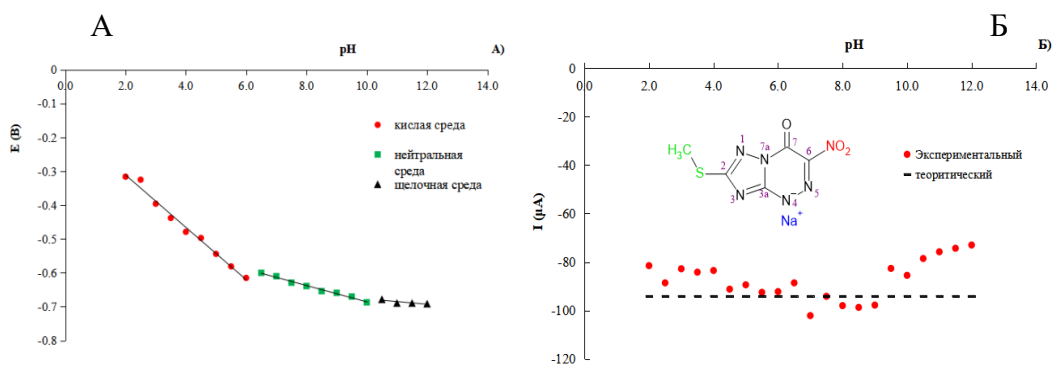


Рисунок 2 – Зависимость потенциала (А) и тока (Б) первого пика ЭВ-соединения **I** ($C = 5 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³) от значения pH в растворе ББР, $v = 50$ мВ/с, vs Ag/AgCl/KCl_{sat}:

А – красный – кислая среда, зеленый – нейтральная, черный – щелочная;
Б – красный – экспериментальный ток соединения **I**, черный – теоретический уровень тока переноса 4-х электронов, рассчитанный по уравнению Ренделса – Шевчика для необратимых ЭХ-реакций

Поскольку субстратом ЭВ в данных условиях может являться не ионная, а протонированная форма Триазавирин®, следует рассматривать механизм восстановления с точки зрения реакционной способности анион-радикала активированных нитроолефинов или нитрогетероциклических соединений. Тогда лимитирующей стадией ЭВ-соединения **I** в интервале pH 2–4 следует считать медленную дегидратацию N,N-дигидрокси-производного (рисунок 3).

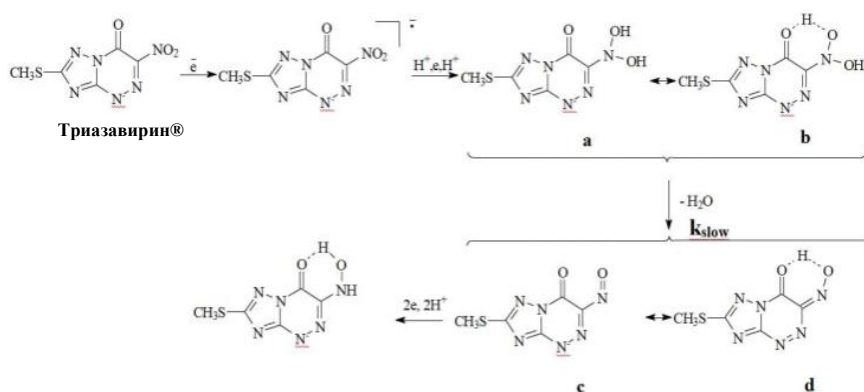


Рисунок 3 – Схема ЭВ-соединения **I** в кислой среде

Для исключения реакции протонирования продуктов ЭВ Триазавирин® и фиксации первичных продуктов переноса электрона было рассмотрено ЭХ-поведение этого соединения в апротонном ДМФА. При реверсе потенциала предельного тока первой стадии с концентрацией исходного соединения $0,1-0,4 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ на ВА появлялся небольшой анодный пик при $-1,28$ В ($\Delta E = 150$ мВ). Можно предполагать, что при переносе электрона на ионную пару соединения **I** образующийся в данных условиях дианион-радикал нестабилен и успевает протонироваться водой, приводя к образованию анион-радикала, который окисляется при потенциалах анодного пика. Полученные ЭХ-данные

свидетельствуют о том, что первичные продукты переноса электрона на гетероциклическую молекулу Триазавирина® нестабильны не только в протонодонорной, но и в апротонной среде.

Полученные во всем диапазоне pH ЭПР-спектры являются результатом взаимодействия спинового зонда ТМТН и ЭХ генерированного нестабильного радикала соединения I. ЭВ сопровождалось пропорциональным увеличением количества предполагаемых радикалов и количества электричества, потребляемого в ЭХ-реакции. Таким образом, можно предположить, что промежуточные нестабильные радикалы образуются за счет ЭХ-генерации соединения I в водной среде.

Так как ЭПР-спектры зондов дают лишь косвенное доказательство наличия интермедиата радикальной природы, был проведен препаративный электролиз соединения I при постоянном токе потенциала первой волны восстановления. Выделенные продукты определяли методом ВЭЖХ в тандеме с МСВР. Продукты представляют собой смесь шести соединений. Наличие продуктов C-F (рисунок 4) и зарегистрированные ЭПР-сигналы аддукта спин-зонда ТМТН с продуктом ЭВ соединения I делают возможным предположение об образовании короткоживущего анион-радикала нитрогруппы Триазавирина®. На основе полученных данных и изученной литературы был предложен механизм протекания процесса ЭВ Триазавирина® (рисунок 4).

Согласно расчетным и экспериментальным данным электропревращение Триазавирина® происходит посредством необратимого ЭВ нитрогруппы, сопряженной с ароматической системой. Основным направлением превращений на первой стадии (pH 2-6) является четырехэлектронная схема восстановления нитрогруппы соединения, лимитирующей стадией является медленная дегидратация гидроксиаминопроизводного вследствие внутримолекулярных переносов протонов между атомами азота цикла и кислорода нитрогруппы. Реакция сопровождается образованием дианион-радикала, промежуточными продуктами реакции ЭВ являются димеры.

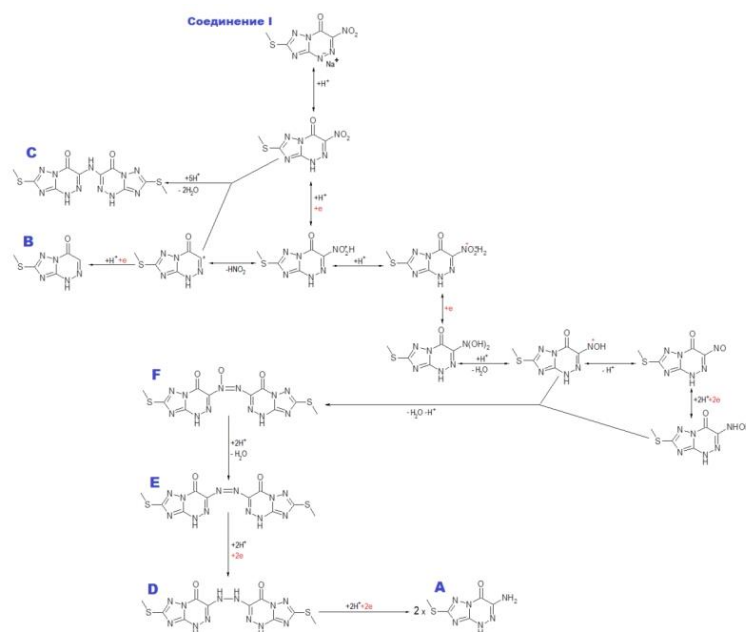


Рисунок 4 – Возможный механизм электровосстановления Триазавирина®

Четвертая глава включает в себя результаты исследования ЭХ-определения действующего вещества препарата Триазавирин® на ТУЭ. На основании результатов иссле-

дования (гл. 3) в качестве аналитического сигнала был выбран максимальный ток первого пика восстановления нитрогруппы соединения **I** (диапазон потенциалов от 0,0 до -0,4 В). В качестве рабочей среды была выбрана 0,1 моль/дм³ HNO₃. Рабочим электродом принят ТУЭ на основе чернил марки Electrode PF 407С. Проведен выбор условий регистрации ВА, оптимизация параметров выбранного режима регистрации. Полученные результаты показывают, что аналитический сигнал соединения **I** линейно зависит от концентрации в интервале 0,1–180,0 мг/дм³ (таблица 2). Это позволяет использовать метод стандартных добавок для определения Триазавирина® в режиме прямой КВВ ВА. Минимально определяемая концентрация (МОК) (0,12 мг/дм³) почти в 2 раза ниже по сравнению с методом ВЭЖХ со спектрофотометрической детекцией.

Таблица 2 – Характеристики градуировочных графиков Триазавирина®

Параметр	Величина
Диапазон линейности, мг/дм ³	0,1–180,0
Наклон кривой, мкКл/(мг/дм ³)	0,068
Отрезок, мкКл	-0,0106
Коэффициент корреляции	0,9996
СО наклона	$3,01 \cdot 10^{-4}$
СО отрезка	$8,38 \cdot 10^{-4}$
Предел обнаружения (ПрО), мг/дм ³	0,04
МОК, мг/дм ³	0,12

Результаты проверки специфичности, правильности и прецизионности разработанной методики представлены в таблицах 3, 4, 5 соответственно.

Таблица 3 – Результаты проверки специфичности методики

Показатель	Метрологические характеристики количественного определения Триазавирина в растворах ($n = 6, P = 95 \%$)	
	А	Б
Среднее значение <i>recovery</i> , <i>R</i> , %	99,8	100,2
Стандартное отклонение	0,54	0,64
Коэффициент вариации, %	0,5	0,6
<i>t</i> -критерий	$t_{\text{экср}} = 0,26$ $t_{\text{табл}} = 2,23 (f = 10)$	
<i>F</i> -критерий	$F_{\text{экср}} = 1,10$ $F_{\text{табл}} = 5,05 (f_1 = f_2 = 5)$	

Таблица 4 – Оценка правильности методики ($n = 9, P = 95 \%$)

С Триазавирин®, %	50,0	100,0	150,0	R ср ± ΔR, %	СО	RSD, %
<i>R</i> , %	100,4	100,4	100,4	$99,9 \pm 0,7$	0,70	0,7
	98,8	99,0	99,7			
	99,2	100,6	100,3			

Таблица 5 – Оценка прецизионности ($n = 6, P = 95 \%$)

Критерий	Найденное содержание, г/дм ³	СО	RSD, %	
			Расчет	Рекомендованное значение
Сходимость	1,00 ± 0,01	0,011	1,0	≤ 1
Внутри- лабораторная прецизионность	1,01 ± 0,02	0,018	1,8	≤ 2

Валидационные испытания показали, что разработанная методика анализа соответствует критериям прецизионности для электроанализа, является правильным и селективным, что позволяет использовать его для анализа лекарственных форм Триазавирина® на содержание основного вещества.

Разработанная методика была успешно применена для анализа капсул Триазавирина® с минимальной подготовкой пробы к анализу (растворение точной навески в воде). Результаты анализа лекарственной формы, полученные вольтамперометрическим и ВЭЖХ-методами, приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Применение предложенного ВА-метода для определения Триазавирина® в капсулах ($n = 6, P = 95 \%$)

Заявленное содержание (250,0 мг Триазавирина® на капсулу)	Вольтамперометрия	ВЭЖХ
Найденное содержание Триазавирина® (мг на капсулу)	249,5 ± 2,5	250,5 ± 2,3
RSD, %	0,94	0,90
<i>t</i> -критерий	$t_{\text{экс}} = 0,26$ $t_{\text{табл}} = 2,23 (f = 10)$	
<i>F</i> -критерий	$F_{\text{экс}} = 1,10$ $F_{\text{табл}} = 5,05 (f_1 = f_2 = 5)$	

Найденные значения близки к заявленному содержанию. Сравнение полученных обоими методами результатов по *F*- и *t*-критериям показало, что рассчитанные величины не превышают табличные (теоретические) значения. Это подтверждает отсутствие сколько-нибудь существенных различий между результатами обоих методов. Между методами не наблюдается существенных различий по точности (RSD не превышает 1 %).

Пятая глава посвящена исследованию вероятного механизма электропревращения Триазида. ЦВА ряда веществ класса 5-R-6-X-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидида (соединения **V-VII**), содержащих и не содержащих нитрогруппу, и l-аргинина в HNO₃ и в растворе ББР pH 2 представлены на рисунке 5, А и Б. Необратимое восстановление соединений **V** и **VI** при потенциалах соответственно -0,71 и -0,56 В обусловлено протеканием процесса ЭВ нитрогруппы, связанной с сопряженной ароматической системой. Соединение **VII** и l-аргинин не проявили ЭХ не восстанавливаются в видимой области потенциалов. Как показали ЦВА-исследования веществ **V** и **VI**, различие ЭВ нитрогруппы этих соединений связано с наличием Na⁺ в соединении **VI**.

Эффективное число электронов n_e , участвующих в ЭХ-реакции ЭВ Триазида, рассчитано шестью параллельными способами (таблица 7).

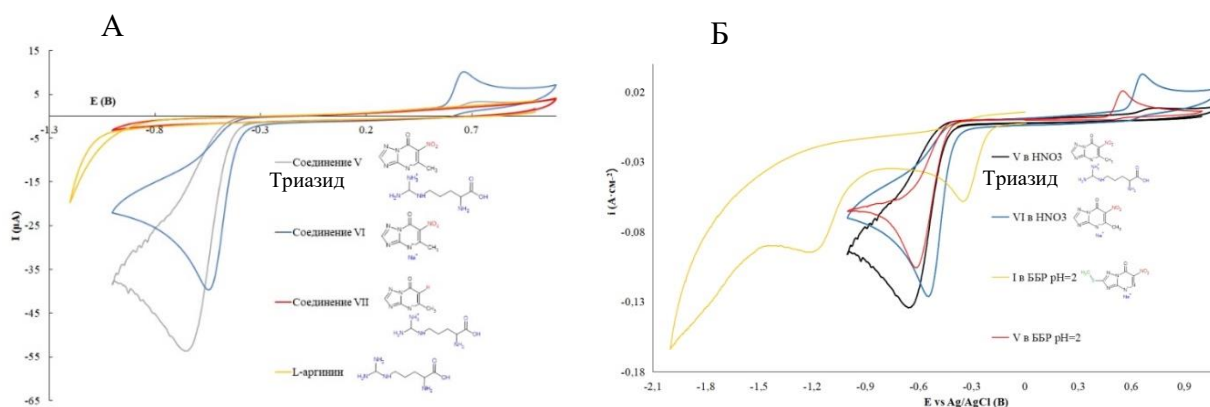


Рисунок 5 – ЦВА соединений в кислых средах:

А – ЦВА соединений **V-VII** и L-аргинина, зарегистрированные на СУЭ в растворе 0,1 моль/дм³ азотной кислоты без добавления и после добавления $5 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³, $\nu = 50$ мВ/с;

Б – ЦВА соединений ($C = 5 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³) на СУЭ, $\nu = 50$ мВ/с: черная линия – **V**, синяя линия – **VI** в 0,1 моль/дм³ HNO₃; желтая линия – **I**, красная линия – **V** в растворе ББР pH 2

Таблица 7 – Средние значения рассчитанного числа электронов n_e , участвующих в ЭВ $K_3[Fe(CN)_6]$ и соединения **V** ($n = 5$, $P = 95\%$)

Соединение ($C = 5 \cdot 10^{-3}$ моль/дм ³ , раствор ББР pH = 2)	ХА					ЦВА			ВДЭ	
	$I_{1 \text{ сек}},$ мА	Q ₁₋₂ , Кл	n_e^1	n_e^2	n_e^3	I_p	n_e^4	n_e^5	$I_d^*,$ мА	n_e^6
V	-0,79	$(5,98 \pm 0,01) \cdot 10^{-4}$	5,64	5,72	5,86	-136,7	5,79	5,63	-1,37	4,59
$Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$	-0,14	$(1,02 \pm 0,02) \cdot 10^{-4}$	–	1,02	–	-23,6	–	0,97	-0,29	0,98

Примечание. $n^{1,3,4}$ находили отношением токов/ количества электричества с током/ количества электричества модельной редокс-пары $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$; n^2 – по уравнению Коттрелла; n^5 – по уравнению Ренделса – Шевчика; n^6 – по уравнению Левича; *пределный ток восстановления соединения **I** и $K_3Fe(CN)_6$ при $\omega = 600$ об./мин.

График изменения предельного тока ЭВ-соединения **V** в pH 2 на ВА, полученных при различных скоростях ВДЭ, линейен, но не проходит через начало координат: $I_d = -0,336 \omega^{0,5} + 1,017$ ($R^2 = 0,956$). Ток пика ЭВ на ЦВА от $\nu^{0,5}$ растет нелинейно, степень отклонения от прямой зависит от кислотности среды. ЭВ-соединение **V** остается необратимым во всем диапазоне pH и при всех ν .

С увеличением pH раствора фонового электролита от $3 < pH < 6$ потенциал ЭВ-соединения **V** смещается в сторону отрицательных значений потенциала (рисунок 6), $\Delta E/\Delta pH = 30$ мВ, $pH > 6$ практически не меняется.

При добавлении 40 об.% ДМФА к раствору ББР только в интервале $9 > pH > 12$ на ЦВА соединения **V** наблюдается две волны ЭВ, однако обе стадии остаются необратимыми. Эти результаты свидетельствуют о высокой скорости протонирования образующихся промежуточных частиц, в результате чего образуются электрохимически активные при данных потенциалах соединения.

Суммируя вышеизложенные данные, можно предположить, что электровосстановление Триазида контролируется кинетикой.

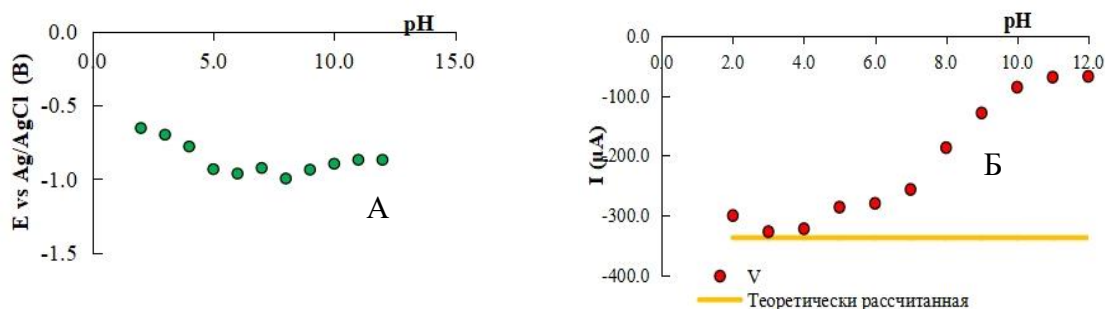


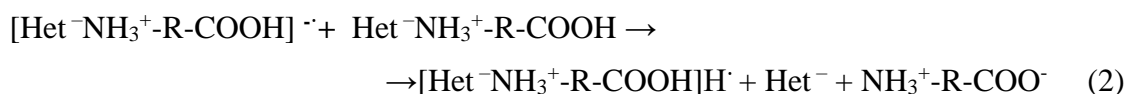
Рисунок 6 – Значения потенциала (А) и тока (Б) первого пика ЭВ **V** ($5 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³) при изменении pH раствора, $v = 0,1$ В/с:

Б – красные точки – экспериментально полученный уровень тока. Желтая линия – теоретически рассчитанный уровень тока 6 электронов по уравнению Ренделса – Шевчика для необратимых ЭХ-реакций

Согласно результатам квантово-химических расчетов энергий низшей вакантной и высшей занятой молекулярных орбиталей гетероциклического аниона, при его ЭВ образуется дианион-радикал, перенос электронов на нитрогруппу и атом азота в 4 положении шестичленного кольца гетероцикла которого можно считать наиболее вероятным.

Поскольку соединение **V** представляет собой соль, образованную гетероциклическим анионом и аминокислотой, можно полагать, что перенос первого электрона при потенциалах первой стадии сопровождается быстрым протонированием образующегося продукта ЭВ исходным деполаризатором, т. е. самопротонированием. Значение pK_a соединения **V** в воде равно 3,45, и следовательно, в апротонной среде Триазид может выступать в роли донора протонов. Зависимость тока первого пика восстановления соединения **V** от $v^{0,5}$ в апротонной среде линейна и проходит через начало координат лишь в области малых скоростей наложения потенциалов < 2 В/с.

Полученные данные позволяют предполагать, что при потенциалах первой стадии восстановления Триазида наиболее быстрой реакцией является самопротонирование, приводящее к образованию ЭХ, не активного при E_1 гетероциклического аниона Het^- :



$[Het^-NH_3^+-R-COOH]^-$ = анион Триазида

Перенос протона может протекать не только межмолекулярно, но и внутримолекулярно, а также по нескольким реакционным центрам. В результате возможно образование радикалов с различным положением спиновой плотности неспаренного электрона и, следовательно, различной реакционной способностью.

Постепенное добавление щелочи Vu_4NOH к раствору Триазида в ДМФА вызывает уменьшение и полное исчезновение тока первой стадии при эквивалентном содержании щелочи, при этом величина тока второй стадии практически не меняется. В этих условиях анодный пик -1,54 В увеличивается и значение I_a/I_k составляет 0,7 при содержании Vu_4NOH , в два раза превышающем концентрацию соединения **V**. Это подтверждает предположение о том, что образующийся при потенциалах второй стадии ЭВ Триазида дианион-радикал исчезает в результате реакции протонирования.

Был получен прямой ЭПР-сигнал ЭХ генерированного анион-радикала Триазиды в ДМФА в присутствии Bu_4NOH (рисунок 7 А). Дополнительным доказательством структуры образующихся при ЭВ Триазиды радикалов являются полученные ЭПР-спектры аддуктов спиновой ловушки ТМРО с продуктом его ЭВ (рисунок 7 Б) в ДМФА. Полученные ЭПР-спектры могут быть описаны как суперпозиция, по крайней мере, ЭПР спектров двух аддуктов, в одном из которых центром взаимодействия спиновой ловушки с предполагаемым радикалом является $-\text{NO}_2$, во втором – атом азота в 4 положении в шестичленном гетероцикле.

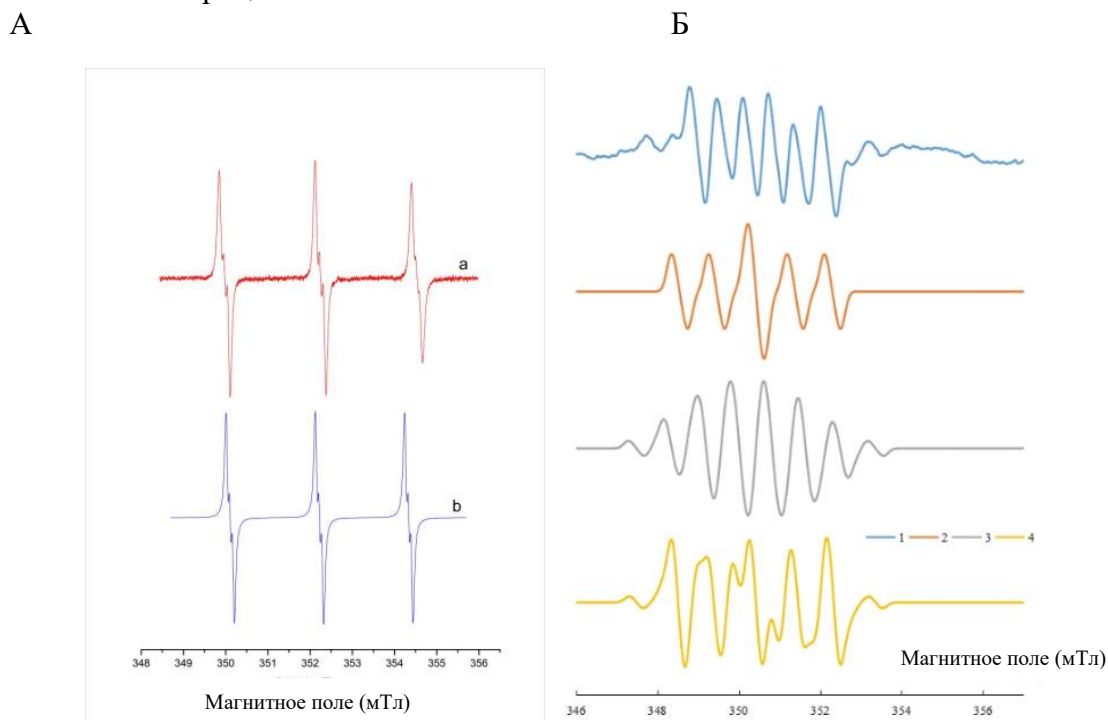


Рисунок 7 – ЭПР-спектры соединения **V** в ДМФА:

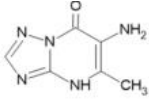
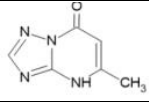
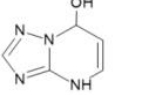
А – ЭПР-спектры соединения **V**: а – экспериментальный ($0,1 \text{ моль/дм}^3 \text{ Bu}_4\text{NClO}_4$) с добавлением эквимольного количества Bu_4NOH ; б – симулированный сектор ($g_i = 2,0059$, $a_N = 2,12 \text{ мТл}$, $aN = 0,7 \text{ мТл}$, $LW = 0,065 \text{ мТл}$, $L/G = 0,1$);

Б – ЭПР-спектры аддуктов спиновой ловушки ТМРО с продуктом ЭВ-соединения **V** в ДМФА: 1 – экспериментальный спектр; 2 – расчетный спектр аддукта ловушки после взаимодействия с нитрогруппой радикала; 3 – расчетный спектр аддукта ловушки после взаимодействия с атомом азота в 4 положении в шестичленном гетероцикле; 4 – суперпозиция 2 и 3 спектров в соотношении радикалов 1:1. Расчетные спектры смоделированы с $LW = 0,2 \text{ мТл}$, $L/G = 0,1$. Расчетные константы СТВ, g_{iso} , загружены из *.pror файлов соответствующих расчетов Orca.

Ошибка симулирования между 1 и 4 (СКО) $r^2 = 2,12 \%$

Для идентификации структуры продуктов восстановления Триазиды был проведен электролиз соединения **V**. Выделенные продукты, определенные методом ВЭЖХ, представляют собой смесь 3 соединений (таблица 8). Конечный продукт ЭВ, 5-Метил-6-амино-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидин (J), был выделен с выходом 82 % после электролиза раствора Триазиды в растворе ББР при pH 2. Он выпадал в виде осадка при охлаждении католита и не был связан с l-аргинином. Вероятно, вещества К и L являются побочными продуктами реакции ЭВ нитрогруппы соединения **V**. Возможный механизм ЭВ Триазиды представлен на рисунке 8.

Таблица 8 – Данные ВЭЖХ/МСВР смеси продуктов электролиза соединения V

Соединение	Молекулярная формула	Теоретическая масса	Практическая масса	Предлагаемая химическая структура
J	C ₆ H ₇ N ₅ O	165,09558	165,09343	
K	C ₆ H ₆ N ₄ O	150,08064	150,08064	
L	C ₅ H ₅ N ₄ O ₂	137,0717	137,0723	

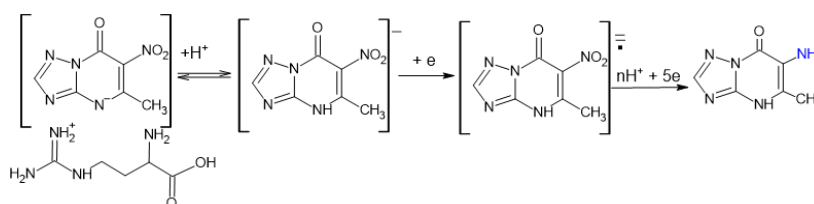


Рисунок 8 – Возможный механизм электровосстановления Триазида

Результаты исследования ЭХ-поведения Триазида (5-метил-6-нитро-7-оксо-4,7-дигидро-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинид моногидрата L-аргинина) в кислой водной среде показали, что электровосстановление нитрогруппы этого соединения протекает необратимо в одну шестиэлектронную стадию с образованием соответствующего гетероциклического амина через образование радикала, локализованного как на нитрогруппе, так и на атоме азота в 4 положении кольца гетероцикла. В водных и кислых средах Триазид присутствует в качестве протонированной частицы. В водных средах ЭВ Триазида осложненно кинетическим контролем.

Шестая глава включает в себя результаты исследования ЭХ-определения действующего вещества фармацевтической субстанции Триазид на СУЭ. На основании результатов исследования (гл. 5) в качестве аналитического сигнала был выбран максимальный ток ЭВ нитрогруппы (диапазон потенциалов от 0,0 до -0,7 В). В качестве рабочей среды была выбрана ББР pH = 4 в условиях физической продувки раствора инертным газом. Проведены выбор условий регистрации ВА, оптимизация параметров выбранного режима регистрации. Полученные результаты показывают, что аналитический сигнал Триазида линейно зависит от концентрации в интервале 20–180 мг/дм³ (таблица 9). Это позволяет использовать метод стандартных добавок для определения Триазида в режиме прямой КвВ ВА.

Таблица 9 – Характеристики градуировочных графиков Триазида

Параметр	Величина
Диапазон линейности, мг/дм ³	10–500
Наклон кривой, мКл/(мг/дм ³)	0,1176
Отрезок, мКл	0,317
Коэффициент корреляции	0,9998
СО наклона	0,0002
СО отрезка	0,069
ПрО, мг/дм ³	1,9
МОК, мг/дм ³	5,8

Результаты проверки специфичности, правильности и прецизионности разработанной методики представлены в таблицах 10, 11, 12 соответственно.

Таблица 10 – Результаты проверки специфичности методики

Показатель	Метрологические характеристики количественного определения Триазида в растворах	
	А	В
Среднее значение \bar{x} , %	99,8	100,2
Стандартное отклонение	0,54	0,64
Коэффициент вариации, %	0,5	0,6

Таблица 11 – Результаты проверки правильности методики

Уровень концентрации, %	Найденное содержание Триазида, мг/дм ³	Показатель правильности, %
50	49,3	98,6
	50,0	99,9
	49,7	99,4
100	101,0	101,0
	100,8	100,8
	100,5	100,5
150	150,8	100,5
	150,6	100,4
	150,9	100,6

Таблица 12 – Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении внутрилабораторной прецизионности

Статистические характеристики	Результаты
Наименьшее значение, %	99,0
Наибольшее значение, %	100,7
Среднее значение, %	100,5
Стандартное отклонение	1,03
Коэффициент вариации (относительное стандартное отклонение среднего результата), %	1,0
Граничные значения доверительного интервала среднего результата ($x \pm \Delta x$)	(100,4 \pm 1,1)

Валидационные испытания показали, что разработанный метод соответствует критериям прецизионности для электроанализа, является правильным и селективным, что позволяет использовать его для анализа фармацевтических субстанций Триазида на содержание основного вещества.

Седьмая глава включает в себя результаты исследования ЭХ-определения действующего вещества фармацевтической субстанции Триазид на модифицированном ТУЭ. При сравнении величины, формы и воспроизводимости аналитического Триазида на разных электродах замечено, что наибольшая величина и лучшая воспроизводимость достигаются при использовании ТУЭ на основе чернил марки Electrodag PF 407C. Этот

электрод был выбран в качестве рабочего. Триазид на ТУЭ имеет слабовыраженный сигнал по сравнению с СУЭ. Попытки ЭХ-активации поверхности электрода с целью улучшения его ЭХ-характеристик не принесли удовлетворительных результатов. Исследовано влияние различных углеродных наномодификаторов ТУЭ: сажа (ТУЭ/С), функционализированная сажа (ТУЭ/С-ф), углеродные нанотрубки (ТУЭ/УНТ) – на аналитический сигнал Триазида.

Для изучения ЭХ-характеристик модифицированного ТУЭ был использован метод циклической вольтамперометрии и импедансной спектроскопии с применением $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ в качестве редокс-зонда. ЦВА и импедансные спектры, полученные для нативной и модифицированной поверхности электрода, представлены на рисунке 8. Данные для СУЭ взяты за эталон. Результаты обработки ЦВА приведены в таблице 13.

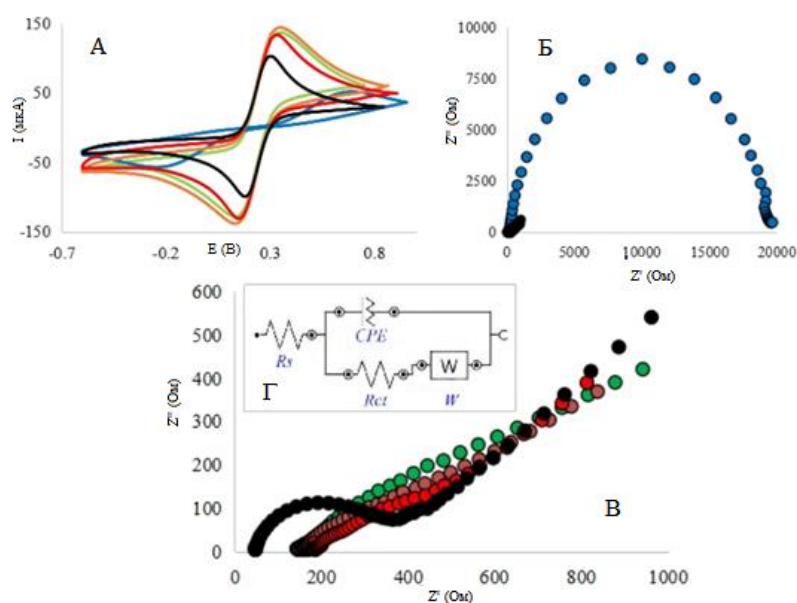


Рисунок 8 – Состав раствора:

ББР (рН $7,0 \pm 0,2$) + $5 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, электрод:
 черная линия – СУЭ, синяя линия – ТУЭ, красная линия – ТУЭ/УНТ, зеленая линия – ТУЭ/С,
 оранжевая линия – ТУЭ/С-ф; А – ЦВА, зарегистрированные $v = 0,10$ В/с; Б – импедансные
 спектры, зарегистрированные при потенциале 0,25 В; В – выделение графика
 полного сопротивления комплексной плоскости в области высоких частот (Б);
 Вставка Г – эквивалентная схема, используемая в инструменте электрохимической подгонки круга

Таблица 13 – Электрохимические характеристики электродов

Электрод	ББР (рН $7,0 \pm 0,2$) + 200 мг/дм ³ Триазида			
	E_p , В	I_{pk} , мкА	$i_{ист.}^*$, мкА/ см ²	σ , В
СУЭ	-0,85	22,0	268	0,21
ТУЭ	-1,28	6,5	224	0,35
ТУЭ/УНТ	-0,78	32,2	277	0,15
ТУЭ/С	-0,78	32,7	311	0,15
ТУЭ/С-ф	-0,75	35,9	292	0,16

Примечание. $i_{ист.}^*$ – расчет на электроактивную площадь поверхности;
 $I_{pk/a}$ – величина пика катода/анода;
 ФШ – фактор шероховатости, рассчитанный как отношение электроактивной площади поверхности к геометрической;
 σ – полуширина пика;
 W – импеданс Варбурга;
 R_s – сопротивление электролита;
 R_{ct} – сопротивление межфазной передачи заряда

Продолжение таблицы 13

Электрод	ББР (pH 7,0 ± 0,2) + 5 · 10 ⁻³ моль/дм ³ [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-}								
	<i>I</i> _{рк} , мкА	<i>I</i> _{ра} , мкА	<i>I</i> _к / <i>I</i> _а	Δ <i>E</i> , В	ΦШ	σ, В(<i>I</i> _{рс})	<i>R</i> _с , Ом	<i>R</i> _{сг} , Ом	W, мСм
СУЭ	-96,3	94,7	1,02	0,12	1,17	0,22	51,3	300,0	11,800
ТУЭ	-34,2	29,9	1,14	0,87	0,29	0,41	168,0	15600,0	1,700
ТУЭ/УНТ	-136,2	134,3	1,01	0,17	1,16	0,28	171,0	19,3	0,634
ТУЭ/С	-130,1	136,1	0,96	0,19	1,11	0,33	169,0	39,9	0,190
ТУЭ/С-ф	-144,2	149,2	0,97	0,20	1,23	0,35	163,0	13,5	0,265

Для всех типов модифицированных электродов наблюдается улучшение ЭХ-свойств. Однако увеличение аналитического сигнала Триазиды по большей части связано с увеличением развитости электроактивной поверхности, о чем может говорить истинная плотность тока. Осаждение и распределение дисперсии изучаемых наноматериалов на поверхности электрода анализировали с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). На рисунке 9 приведены микрофотографии поверхности ТУЭ, ТУЭ/С, ТУЭ/С-ф и ТУЭ/УНТ. Полученные результаты снимков согласовываются с электрохимическими характеристиками сенсоров.

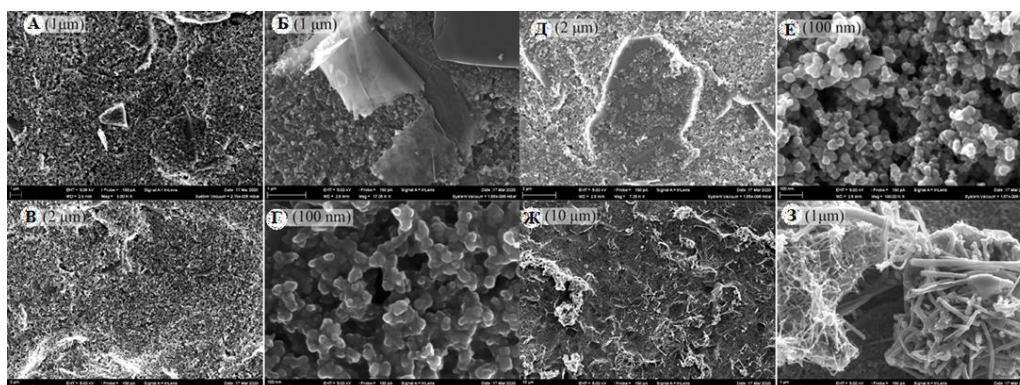


Рисунок 9 – Электронная микрофотография распределения УНМ на рабочей поверхности:
А, Б – ТУЭ; В, Г – ТУЭ/С; Д, Е – ТУЭ/С-ф; Ж, З – ТУЭ/УНТ методом СЭМ

Для всех электродов были получены линейные зависимости тока и площадь пика восстановления Триазиды от его концентрации в растворе в диапазоне 25–200 мг/дм³. Однако среди модификаторов только углеродные нанотрубки дают приемлемую точность анализа Триазиды с показателем правильности около 100 %, что позволяет использовать именно этот электрод в аналитических целях.

Проведена апробация химического способа удаления кислорода из растворов электролита. В качестве рабочей среды была выбрана ББР pH = 7 в условиях химического связывания кислорода Na₂SO₃. Ранее разработанная методика количественного определения Триазиды на СУЭ (гл. 6) была успешно применена на ТУЭ/УНТ. Полученные результаты показывают, что аналитический сигнал Триазиды линейно зависит от концентрации в интервале 25–200 мг/дм³ (таблица 14). Это позволяет использовать метод стандартных добавок для его определения в режиме прямой КвВ ВА.

Таблица 14 – Характеристики градуировочных графиков Триазида

Параметр	Величина
Диапазон линейности, мг/дм ³	25–200
Наклон кривой, мкКл/(мг/дм ³)	0,0262
Отрезок, мкКл	0,0908
Коэффициент корреляции	0,9975
СО наклона	0,0003
СО отрезка	0,0226
ПрО, мг/дм ³	2,8
МОК, мг/дм ³	9,3

Наименьшее значение предела обнаружения Триазида было получено в кислом растворе ББР (рН 4,0) после продувки инертным газом для СУЭ (1,9 мг/дм³). При определении основного лекарственного вещества увеличение предела обнаружения Триазида на 30 % при использовании ТУЭ/УНТ вместо СУЭ не является значимым критерием при условии многократного (в 4–5 раз) снижения времени анализа и значительного упрощения процедуры анализа в условиях химического связывания растворенного кислорода в растворе ББР + 0,04 моль/дм³ Na₂SO₃.

Разработанный ЭХ-сенсор был успешно применен для определения Триазида в фармацевтической субстанции «Триазад». Результаты анализа лекарственной формы, полученные вольтамперометрическим и ВЭЖХ-методами, приведены в таблице 15.

Таблица 15 – Результаты определения Триазида в фармацевтической субстанции «Триазад» ($n = 5$, $P = 95$ %)

Заявленное содержание Триазида 100 ± 2 %	Вольтамперометрия	ВЭЖХ
Найденное содержание Триазида	99,6 ± 1,2 %	99,9 ± 0,4 %
RSD, %	0,96	0,36
<i>t</i> -критерий	<i>t</i> эксп = 0,26 <i>t</i> табл = 2,37 (<i>f</i> = 8)	
<i>F</i> -критерий	<i>F</i> эксп = 0,55 <i>F</i> табл = 6,39 (<i>f</i> ₁ = <i>f</i> ₂ = 4)	

Найденные значения близки к заявленному содержанию. Сравнение полученных обоими методами результатов по *F*- и *t*-критериям показало, что рассчитанные величины не превышают табличные (теоретические) значения. Важно отметить, что предел обнаружения и минимально определяемая концентрация для Триазида по данным ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием (135 и 450 мг/дм³ соответственно) почти в 50 раз превышают разработанный вольтамперометрический метод.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Показано, что необратимое восстановление натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата происходит за счет нитро-группы, сопряженной с ароматической системой. Согласно расчетным и экспериментальным данным электровосстановление Триазавирин® на первой стадии (рН 2-6) протекает по четырехэлектронной схеме восстановления нитрогруппы. Лимитирующей стадией процесса является медленная дегидратация гидроксиминопроизводного вследствие внутримолекулярных переносов протонов между атомами азота цикла и кислорода

нитрогруппы. Реакция сопровождается образованием анион-радикала, промежуточными продуктами реакции восстановления являются димеры. На ток и потенциал восстановления Триазавирин® в апротонной среде в значительной степени влияют ионы Na^+ : изменяется не только скорость протонирования анионных радикалов исследуемого соединения, но и региоселективность этой реакции. В водной среде восстановление Триазавирин® идет в протонированной форме, и наличие в растворе Na^+ не влияет на аналитический сигнал.

2. Выбраны аналитический сигнал и условия регистрации вольтамперограмм ($0,1 \text{ моль/дм}^3 \text{ HNO}_3$). Разработана методика количественного анализа основного действующего вещества препарата Триазавирин® с использованием режима прямой квадратно-волновой вольтамперометрии. Получена линейная зависимость аналитического сигнала Триазавирин® от концентрации в интервале $0,1\text{--}180,0 \text{ мг/дм}^3$. Предел обнаружения, рассчитанный по калибровочной кривой, составляет $0,04 \text{ мг/дм}^3$. Минимально определяемая концентрация – $0,12 \text{ мг/дм}^3$, что почти в два раза ниже по сравнению с методом ВЭЖХ со спектрофотометрической детекцией.

3. Установлено, что необратимое восстановление 5-метил-6-нитро-7-оксо-4,7-дигидро-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидинид моногидрата L-аргинина происходит за счет восстановления нитрогруппы, сопряженной с ароматической системой. Установлено, что электровосстановление Триазиды протекает в одну шестиэлектронную стадию с образованием соответствующего гетероциклического амина через образование дианион-радикала. На ток и потенциал восстановления Триазиды в апротонной среде в значительной степени влияют ионы щелочных металлов (Na^+ , Li^+): изменяется не только скорость протонирования дианионных радикалов исследуемого соединения, но и региоселективность этой реакции. В водной среде восстановление Триазиды также идет в протонированной форме, при наличии в растворе Na^+ процесс электровосстановления нитрогруппы исследуемого соединения облегчается.

4. Разработана и валидирована методика количественного вольтамперометрического определения Триазиды в фармацевтической субстанции на СУЭ в условиях продувки растворов инертным газом. Минимально определяемая концентрация Триазиды в фармацевтической субстанции – $6,3 \text{ мг/дм}^3$. В рамках выбранного диапазона концентраций была доказана правильность, прецизионность и линейность методики.

5. Проведены исследования по созданию электрохимического сенсора на ТУЭ. Исследовано влияние различных углеродных наномодификаторов (сажа, функционализированная сажа, углеродные нанотрубки) на аналитический сигнал Триазиды. Количественно охарактеризована связь между природой модификатора и аналитическим сигналом нитрогруппы препарата Триазиды. Разработана новая методика для количественного вольтамперометрического определения Триазиды в фармацевтической субстанции, включающая создание электрохимического сенсора. Минимально определяемая концентрация Триазиды в фармацевтической субстанции – $9,3 \text{ мг/дм}^3$. Результаты определения Триазиды методом вольтамперометрии в фармацевтической субстанции совпали с известной методикой определения Триазиды методом ВЭЖХ. При этом предел количественного определения Триазиды разработанной методикой почти в 50 раз превосходит метод ВЭЖХ.

Перспективы дальнейшей разработки темы исследований заключаются в расширении круга объектов, к которым можно отнести не только лекарственные средства, содержащие нитрогруппу, но и новые оригинальные синтезированные соединения на основе азоло-азинового ряда с электроактивными группировками. Планируется разработка единого подхода к исследованиям механизма реакции и разработки методик вольтамперометрического анализа пробы. Изучение взаимосвязи между биологической активностью и редокс-свойствами позволит предлагать возможные метаболизмы протекания

редокс-процессов, оценивать их фармакологическую активность, а также развивать подходы по созданию новых методик количественного определения изучаемых лекарственных веществ. Разработанные количественные методики определения Триазавирина® и Триазида могут быть использованы для контроля качества сырья и готовой продукции фармацевтической отрасли промышленности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК РФ и Аттестационным советом УрФУ

1. Malakhova, N. Development and Validation of Voltammetric Method for Quantitation of New Antiviral Drug Triazavirin using Bare Carbon Screen-Printed Electrodes / Nataliya Malakhova, Anton Tsmokalyuk, **Alexandra Ivoilova**, Andrey Tumashov, Vladimir Rusinov, Alla Ivanova and Alisa Kozitsina // Analytical and Bioanalytical Electrochemistry. – 2019. – Vol. 11. – Is. 3 – P. 292–303. (0,75 п. л. / 0,25 п. л.) (*Scopus, Web of Science*).

2. Малахова, Н. А. Количественное определение основного вещества противовирусного препарата Триазид® с использованием метода вольтамперометрии / Малахова Н. А., **Ивойлова А. В.**, Замана А. А., Русинов В. Л., Алямовская И. С., Иванова А. В., Козицина А. Н. // Журнал аналитической химии. – 2020. – Т. 75. – №. 3. – С. 266–272. (0,5 п. л. / 0,19 п. л.).

Malakhova, N. A. Quantitative Determination of the Main Substance of the Triazid® Antiviral Drug by Voltammetry / N. A. Malakhova, **A. V. Ivoilova**, A. A. Zamana, V. L. Rusinov, I. S. Alyamovskaya, A. V. Ivanova, A. N. Kozitsina // Journal of Analytical Chemistry. – 2020. – V. 75. – Is. 3. – P. 396–401. (0,5 п. л. / 0,19 п. л.) (*Scopus, Web of Science*).

3. **Ивойлова, А. В.** Окислительно-восстановительные превращения нового противовирусного препарата Триазавирин®: электрохимическое исследование и ЭПР-спектроскопия / **Ивойлова А. В.**, Михальченко Л.В., Цмокалюк А.Н., Козицина А.Н. Иванова А.В., Русинов В.Л. // Известия АН. Серия химическая. – 2021. – №. 6. – С. 1099–1108. (0,625 п. л. / 0,19 п. л.).

Ivoilova, A. V. Redox conversions of new antiviral drug Triazavirin®: Electrochemical study and ESR spectroscopy / **A.V. Ivoilova**, L.V. Mikhal'chenko, A.N. Tsmokalyuk, A. N. Kozitsina, A. V. Ivanova, V. L. Rusinov // Russian Chemical Bulletin. – 2021. – V. 70. – Is. 6. – P. 1099–1108. (0,625 п. л. / 0,19 п. л.) (*Scopus, Web of Science*)

4. **Ivoilova, A.** Redox Conversions of 5-Methyl-6-nitro-7-oxo-4,7-dihydro-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidinide L-Arginine Monohydrate as a Promising Antiviral Drug / **Alexandra Ivoilova**, Ludmila V. Mikhalchenko, Anton Tsmokalyuk, Marina Leonova, Andrei Lalov, Polina Mozharovskaya, Alisa N. Kozitsina, Alla Ivanova, Vladimir L. Rusinov // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – Is. 16. – P. 5087. (п. л. / 0,25 п. л.) (*Scopus, Web of Science*).

5. **Ivoilova, A.** Study of Different Carbonaceous Materials as Modifiers of Screen-Printed Carbon Electrodes for Detection of the Triazid as Potential Antiviral Drug / **Alexandra Ivoilova**, Nataliya Malakhova, Polina Mozharovskaia, Alexandra Nikiforova, Andrey Tumashov, Alisa Kozitsina, Alla Ivanova, Vladimir Rusinov // Electroanalysis. – 2022. (0,625 п. л. / 0,190 п. л.) (*Scopus, Web of Science*).

Патенты

6. Патент No 2733397 РФ Способ количественного определения Триазида методом вольтамперометрии/ Н. А. Малахова, А. В. Ивойлова, А. Н. Цмокалюк, А. Н. Козицина, А. В. Иванова, В. Л. Русинов; заявл. 21.02.2019; опубл. 01.10.2020. (0,9 п.л./0,150 п.л.)

Другие публикации

7. **Баушева (Ивойлова) А.В.** Исследование процесса восстановления нитрогруппы в препарате «Триазавирин»® с использованием электрохимических методов и ЭПР-спектроскопии /Баушева А.В., Цмокалюк А.Н., Иванова А.В., Козицина А.Н // Сборник тезисов XXVI Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии». – Екатеринбург, 2016 г. – С. 106. (0,06 п.л. / 0,015 п.л.)

8. **Баушева (Ивойлова) А.В.** Исследование окислительно-восстановительных превращений препарата «Триазавирин»® с использованием вольтамперометрии и ЭПР-спектроскопии/Баушева А.В., Цмокалюк А.Н., Иванова А.В., Козицина А.Н / Сборник тезисов XXVII Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии». – Екатеринбург, 2017 г. – С. 394. (0,06 п.л. / 0,015 п.л.)

9. **Баушева (Ивойлова) А.В.** Исследование противовирусного препарата «Триазид» с использованием электрохимических методов / А. В. Баушева, А. Н. Цмокалюк, К.С. Саватеев, Е. К. Воинков, Е.Н. Уломский, А. В. Иванова, А. Н. Козицина, В. Л. Русинов // Сборник тезисов докладов «III Междисциплинарного Симпозиума по Медицинской, Органической и Биологической Химии и Фармацевтике». – Севастополь, Крым, 2017 г. – С.95. (0,06 п.л. / 0,015 п.л.)

10. **Ивойлова А.В.** Исследование электропревращений натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-он /А.В. Ивойлова. А.Н. Цмокалюк, В.А. Шевырин, А.Н. Козицина, Е.Н. Уломский, Л.В. Михальченко, А.В. Иванова, В.Л. Русинов // Сборник тезисов докладов «XIX Всероссийского совещания с международным участием Электрохимия органических соединений». – Новочеркасск, 2018г, с.35. (0,06 п.л. / 0,015 п.л.)

11. Никифорова А.А. Влияние модифицирования поверхности электрода на ток восстановления Триазид/ Никифорова А.А., **Ивойлова А.В.**, Малахова Н.А., Козицина А.Н., Иванова А.В. // Сборник тезисов XXIX Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии». – Екатеринбург, 2019 г. – С. 114. (0,06 п.л. / 0,015 п.л.)

12. Никифорова А.А. Выбор методики активации углеродных нанотрубок для оценки влияния модифицирования поверхности электрода на электрохимические характеристики восстановления Триазид/ Никифорова А.А., **Ивойлова А.В.**, Малахова Н.А., Козицина А.Н., Иванова А.В. // Сборник тезисов XXX Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии». – Екатеринбург, 2020 г. – С. 135. (0,06 п.л. / 0,015 п.л.)

13. Селянина Т.В. Вольтамперометрическое определение потенциального лекарственного вещества натриевой соли 2-этилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло-[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она с использованием стеклоуглеродного электрода/ Селянина Т.В., **Ивойлова А.В.**, Малахова Н.А., Козицина А.Н., Иванова А.В. // Сборник тезисов XXX Российской молодежной научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной химии». – Екатеринбург, 2020 г. – С. 144. (0,06 п.л. / 0,015 п.л.)

14. **Ивойлова А.В.** Применение метода препаративного электролиза для исследования путей превращения 5-метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинида аргинина моногидрата /А.В. Ивойлова, Л.В. Михальченко, М.Ю. Леонова, В.Л. Русинов, А.В. Иванова, А.Н. Козицина // Сборник тезисов докладов «III Международной научно-практической конференции «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов»» – Екатеринбург, 2020г. (0,06 п.л. / 0,015 п.л.)

15. **Ивойлова А.В.** Исследование продуктов электрохимического восстановления потенциального лекарственного препарата Триазид комбинированными методами / А.В. Ивойлова, Л. В. Михальченко, А. В. Лалов, А. Н. Цмокалюк, А. Н. Козицина, А. В. Иванова, В. Л. Русинов // Сборник тезисов «V Международной научно-практической конференции «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» – Екатеринбург, 2021 г. (0,06 п.л. / 0,015 п.л.)