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

Химико-технологический институт Кафедра аналитической химии

Alexendes -

На правах рукописи

Ивойлова Александра Всеволодовна

ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВОВИРУСНЫХ СРЕДСТВ: ТРИАЗАВИРИНА® И ТРИАЗИДА. МЕХАНИЗМЫ ИХ ЭЛЕКТРОПРЕВРАЩЕНИЙ

1.4.2. Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

> Научный руководитель: доктор химических наук, доцент Козицина Алиса Николаевна

Екатеринбург – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ6
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР16
1.1 Пути электровосстановления ароматических нитропроизводных 17
1.1.1 Влияние протонирования среды на процесс восстановления
ароматических нитропроизводных 17
1.1.2 Влияние строения вещества на восстановление ароматических
нитропроизводных
1.1.3 Образование анион-радикалов в процессе восстановления
ароматических нитропроизводных
1.2 Вольтамперометрия в фармацевтическом анализе
1.2.1 Вольтамперометрия лекарственных веществ, содержащих
электроактивную нитрогруппу29
1.2.2 Выбор материала индикаторного электрода
1.2.3. Подготовка поверхности толстопленочного углеродосодержащего
электрода
1.3 Обоснование, цель и задачи исследования
Выводы к главе 146
ГЛАВА 2 АППАРАТУРА И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА
2.1 Оборудование и средства измерения
2 2 Реактивы и объекты исспелования 51
2.3 Подготовка, модифицирование поверхности электрода.
приготовление дисперсии углеродных наноматериалов
ГЛАВА 3 МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО
ПРЕВРАЩЕНИЯ ТРИАЗАВИРИНА®

3.1 Электрохимическое восстановление соединений 2-R-6-X-1,2,4-
триазоло [5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов
3.2 ЭПР-спектроскопия продуктов электровосстановления
Триазавирина®
Выводы к главе 3
ГЛАВА 4. МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИАЗАВИРИНА® 70
4.1 Выбор условий регистрации вольтамперограмм
4.2 Оптимизация параметров квадратно-волновой вольтамперометрии 72
4.3 Построение калибровочной кривой Триазавирина
4.4 Валидация методики определения Триазавирина
<i>4.4.1 Специфичность</i> 75
4.4.2 Правильность
4.4.3 Прецизионность
4.5 Определение Триазавирина® в капсуле77
Выводы к главе 478
ГЛАВА 5. МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО
ПРЕВРАЩЕНИЯ ТРИАЗИДА
5.1 Электрохимическое восстановление соединений
5-R-6-X-7-оксо-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]пиримидинидов
5.2 ЭПР-спектроскопия продуктов электровосстановления Триазида91
5.3 Электросинтез продуктов восстановления Триазида
Выводы к главе 596
ГЛАВА 6. МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИАЗИДА НА
СТЕКЛОУГЛЕРОДНОМ ЭЛЕКТРОДЕ

6.1 Апробация химического способов удаления кислорода из растворов
электролита
6.2 Выбор условий вольтамперометрического определения Триазида на
стеклоуглеродном электроде
6.3 Оптимизация параметров регистрации аналитического сигнала
Триазида 100
6.4 Характеристики градуировочных графиков Триазида102
6.5 Валидация методики определения Триазида104
6.5.1 Специфичность и правильность104
6.5.2 Прецизионность
Выводы к главе 6109
ГЛАВА 7. МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИАЗИДА НА
ТОЛСТОПЛЕНОЧНОМ УГЛЕРОДОСОДЕРЖАЩЕМ ЭЛЕКТРОДЕ 110
7.1 Выбор условий регистрации вольтамперограмм
7.1.1. Электрохимическое восстановление Триазида на толстопленочном
углеродосодержащем электроде 111
7.1.2 Электрохимические характеристики модифицированных сенсоров
7.1.3 Характеристика поверхности модифицированного
электрохимического сенсора с помощью сканирующей электронной
микроскопии117
7.1.4 Сравнительные характеристики электродов для Триазида 120
7.2 Применение электродов модифицированных углеродными
нанотрубками для определения Триазида в фармацевтической субстанции
«Триазид»123
Выволы к главе 7 124

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	125
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	130

введение

Актуальность темы

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 [1-3]. 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 [4, 5]. Для борьбы с вирусными инфекциями применяют комплексный подход: своевременная вакцинация, симптоматическое лечение и применение противовирусных препаратов. Довольно ограниченный выбор средств противовирусной терапии [6-12] и развитие резистентности диктует необходимость разработки и практического внедрения новых оригинальных инновационных эффективных средств профилактики и лечения вирусных заболеваний [13-16].

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 [17].

На сегодняшний день для оценки содержания действующего вещества лекарственных средств используют, как правило, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Основными минусами данного метода является 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 традиционном исполнении по ГФ применяют образом потенциометрию, потенциометрическое титрование главным И кулонометрию. Вольтамперметрические методы анализа в ГФ представлены слабо. современные исследования тогда как показывают, ЧТО вольтамперометрия является конкурентоспособным методом и имеет ряд преимуществ перед ВЭЖХ-методом [18-26]. Однако ВА может применяться только для электроактивных молекул.

С другой стороны, электрохимические методы могут позволить не только анализировать состав препарата, но и способны помочь в понимании механизма путей метаболизма фармацевтических соединений, протекающих с участием окислительно-восстановительных процессов малых органических молекул [27], 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 ароматической последние десятилетия нитросоединения И гетероциклической природы привлекают значительное внимание исследователей, поскольку широко используются во всем мире в качестве противомикробных, противовирусных, противопаразитарных И радиосенсибилизирующих [28, 29]. 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 [30-37]. 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 [29, 38]. Однако электропревращение каждой молекулы является уникальным ввиду разности структуры и ее окружения, и требует индивидуального подхода к изучению ее редоксмеханизма.

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 была 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 (Н687/42Б.223/20)).

Степень разработанности темы исследования

Ярким представителем гетероциклических соединений является класс азоло[1,2,4]триазинов, который привлекает интерес из-за 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 [32].

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 [32, 34, 35]. 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 так же имеет успешный опыт применения на базе ковидных госпиталей в качестве этиотропного средства при терапии коронавирусной инфекции и в качестве средства медикаментозной профилактики [36, 37, 39, 40].

Среди ряда структурных аналогов Триазавирина® перспективным соединением является Триазид (аргениниевая соль 5-метил-6-нитро-1,2,4триазоло[1,5-α]пиримидин-7-она, моногидрат) в качестве молекулы, имеющей более высокую противовирусную активность в отношении различных штаммов вируса в системах *in vivo* [41, 42]. В настоящее время Триазид прошел I фазу клинических исследований, которая также показала безопасность, хорошую переносимость и быстрое всасывание препарата [41].

Наличие электроактивной нитрогруппы в этих молекулах делает возможным использование ЭХМА для создания методик количественного будет альтернативой ВЭЖХ-методам. анализа, что Кроме того, как ранее, электрохимические методы исследования (ЭХМИ) упоминалось позволяют изучать сложные редокс-механизмы превращений вещества in vitro приближенные к *in vivo*. Комбинирование ЭХМИ с ЭПР-ЯМР-И спектроскопией, квантово-химическими расчетами, спектрофотометрией, ВЭЖХ масс-спектроскопией (MCBP) И высокого разрешения 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 Триазида И Триазавирина[®] 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 (Триазавирина®) и аргининовой соли 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-α]пиримидин-7-она, моногидрата (Триазида) 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 Триазида 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-спектрометрии.

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

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

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

Методология и методы диссертационного исследования

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

Величины рКа для Триазида определены спектрофотометрическим методом, для Триазавирина® – потенциометрическим. Электролиз Триазида и Триазавирина® был проведен с использованием метода хронопотенциометрии. Продукты электролиза Триазида 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 последующей промывкой И центрифугированием. с При модификации поверхности ТУЭ углеродными наноматериалами применен «капельный» метод. Размеры и морфология модифицированных электродов исследованы методом сканирующей электронной микроскопии. Электрохимические характеристики модифицированных электродов были циклической изучены методом импедансной спектроскопии, вольтамперометрии и хроноамперометрии с применением модельной/опорной системы гексацианоферрата калия.

Положения, выносимые на защиту

1. исследований реакций Результаты механизма восстановления натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата (Триазавирина®) и аргининовой соли 5-метил-6-нитро-1,2,4триазоло[1,5-α]пиримидин-7-она, моногидрата (Триазида). Закономерности влияния pH среды, заместителей, сопутствующих ионов (Na⁺, Li⁺, Bu₄N⁺) на электровосстановления Триазида и Триазавирина[®] Результаты процесс изучения термодинамических и кинетических параметров Триазавирина® и Триазида.

2. Результаты исследования промежуточных, побочных и конечных продуктов реакций электровосстановления натриевой соли 2-метилтио-6нитро-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 Триазида и Триазавирина® при pH 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 Триазавирина® и Триазида.

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 Триазавирина® и Триазида.

Научная новизна результатов исследования

Изучены особенности электропревращений натриевой соли 2-метилтио-6нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата (Триазавирина®) и аргининовой соли 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-α]пиримидин-7-она, моногидрата (Триазида). Выявлены закономерности влияния pH 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 pH 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 Триазавирина® в водной среде происходит благодаря двухступенчатому необратимому восстановлению нитрогруппы, сопряженной с ароматическим кольцом. Показано, что при потенциалах первой стадии при pH 2-6 основным процессом превращений является четырехэлектронное восстановление нитрогруппы через образование анион-радикала. Выделены и охарактеризованы промежуточные и конечные продукты восстановления Триазавирина[®]. Предложен возможный механизм электровосстановления натриевой соли 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата (Триазавирина[®]).

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

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследовано влияние различных углеродных наномодификаторов (сажа, функционализированная сажа, углеродные нанотрубки) на аналитический сигнал Триазида. 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 Триазида в фармацевтической субстанции на стеклоуглеродном электроде (СУЭ). Установлена минимально определяемая концентрация Триазида 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 Триазида в фармацевтической субстанции, включающая создание нового электрохимического сенсора. Установлено, что минимально определяемая концентрация Триазида в фармацевтической субстанции – 9,3 мг/дм³. Предел количественного определения Триазида по разработанной методике почти в 50 раз превосходит метод ВЭЖХ.

Методика количественного определения Триазида 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-ХимФарма (Севастополь, 2017; Новый свет (Крым), 2018), 4-й Всероссийской конференции медицинской химии с международным участием "MedChem Russia" ПО (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 научнопрактической конференции «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов функциональных И материалов» (Екатеринбург, 2019, 2021).

Публикации

Основные результаты по материалам диссертации опубликованы в 5 статьях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 9 тезисах докладов в материалах всероссийских и международных научных конференций и отражены в патенте РФ (№ 2733397 дата приоритета: 21.02.2019).

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 Триазида 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.

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

Нитрогруппа считается универсальной и уникальной функциональной группой в медицинской химии. Она обладает сильными электро-донорными свойствами, что создает локальные электрон-дефицитные участки внутри молекул. В итоге молекула взаимодействует с биологическими биомишенями, присутствующими в живых системах, такими как белки, аминокислоты, нуклеиновые кислоты и ферменты [43-50].

Не только в исследовательской, но и в патентной литературе [51-56] соединений, подчеркивается влияние содержащих нитрогруппу, опосредованное ее биовосстановлением. Некоторыми авторами, такими как Вардман, Виоде и Кеддерис была выявлена связь между биологической активностью препаратов и образованием радиальных частиц, прежде всего, $ArNO_2^{-}$ анион-радикала при восстановлении ароматических И гетероциклических нитросоединений in vivo под действием некоторых (глутатиона, биологических субстратов аскорбиновой кислоты И дp.) [28, 29, 57]. Однако, несмотря на столь широкое применение и достаточно углубленное изучение механизмов этих реакций, рассмотрение возможных путей превращения (ЛC) требует нового лекарственного средства индивидуального подхода, так как на восстановление нитрогруппы влияет целый ряд факторов (заместители в молекуле, сопутствующие электролиты, среда и тд). Понимание механизма редокс-реакций является так же необходимым в выборе условий получения оптимального аналитического сигнала.

Поэтому разработка любой методики количественного определения новых синтезированных веществ особенно сложных органических молекул для получения оптимального аналитического сигнала требует так же определения механизма этих реакций для установления природы влияния мешающих факторов.

1.1 Пути электровосстановления ароматических нитропроизводных

1.1.1 Влияние протонирования среды на процесс восстановления ароматических нитропроизводных

При электровосстановлении нитроароматических соединений существенно различаются направление процессов и природа продуктов электролиза в кислых, нейтральных и щелочных средах. В кислой среде восстановление ароматических нитросоединений, во всяком случае на катодах с высоким перенапряжением водорода (стеклоуглерод, ртуть), происходит по заключающемуся электрохимическому механизму, В ступенчатом присоединении к нитрогруппе протонов и электронов [61-64]. Исключением могут являться о- и п-нитрофенолы и нитроанилины, у которых в кислых и средах может протекать общий шестиэлектронный процесс основных восстановления [65]. Зависимость потенциала полуволны первой стадии восстановления объясняется протонированием аниона-радикала, генерируемого обратимым одноэлектронным восстановлением [66]:

$$ArNO_2 + e^- \leftrightarrow ArNO_2^-$$
(1)

$$ArNO_2^{-}+H^{+} \leftrightarrow ArNO_2H^{-}$$
(2)

$$ArNO_2H^{-} + e^{-} \rightarrow ArNO_2H^{-}$$
(3)

$$ArNO_2H^- + e^- \leftrightarrow ArNO + H_2O \tag{4}$$

$$ArNO + 2e^{-} + 2H^{+} \leftrightarrow ArNHOH$$
(5)

Пока протонирование аниона-радикала в реакции (2) достаточно быстро преобразует весь радикальный анион в радикал ArNO₂H⁻, первый пик восстановления соответствует четырехэлектронному переносу. Это происходит, если присутствует вода или другой донор протонов, который не сильно адсорбирован. Быстрый последовательный перенос трех электронов в последовательности (3)-(5) обусловлен тем, что как радикальный ArNO₂H⁻, так и нитрозосоединение ArNO, образованные в качестве промежуточных соединений на поверхности электрода, легче восстанавливаются (при более положительных

потенциалах) в реакциях (3), (5), чем исходное соединение ArNO₂ на стадии (1) [66].

В буферных растворах нитробензольных производных, которые содержат более 20 об.% ДМФА или более 50 об.% этанола, высота первой четырехэлектронной ступени уменьшается с увеличением pH. График уменьшения от тока, соответствующего четырехэлектронному процессу, к токовой характеристике одноэлектронного процесса как функции рН, имеет форму кривой диссоциации [65]. Различие между поведением в водных и смешанных растворителях объясняется уменьшением скорости протонирования (2) из-за конкурентной адсорбции органического сорастворителя. При достаточно высоком pH (обычно выше 10) скорость протонирования в реакции (2) на поверхности электрода настолько уменьшается, что на первом этапе происходит только одноэлектронный процесс (1). Одновременно при более образуется отрицательных потенциалах новая трехэлектронная волна, соответствующая восстановлению:

$$ArNO_2^{-}+3 e^{-}+4 H^+ \rightarrow ArNHOH + H_2O$$
(6)

Аналогичные изменения токов и образование двух волн, первая из которых соответствует одноэлектронному процессу, были зарегистрированы в присутствии некоторых поверхностно-активных веществ [65]. В таких системах скорость протонирования аниона радикала уменьшается зачёт конкурентной адсорбции поверхностно-активного вещества.

Дегидратация арилгидроксиламинов присутствует в таких молекулах, где продукт дегидратации стабилизируется путем удлинения связи и легко восстанавливается. Первый пример, связанный с этой реакцией, представляет собой восстановление о- и п-нитрофенолов и о- и п-нитранилинов [65]. Гидроксиламинофенол подвергается дегидратации, образуя 0-ИЛИ Пхинонимин, и о- или п-гидроксиламиноанилин аналогичным образом дает оили п-хинондиамин. Поскольку хинонидные виды восстанавливаются легче, чем исходное нитросоединение, восстановление В условиях, когда дегидратация происходит быстро, приводит к образованию аминофенолов или диаминобензолов. Таким образом, вероятность образования арилгидроксиламина или ариламина зависит от скорости обезвоживания. Дегидратация катализируется как основанием, так и кислотой. Высота полярографической волны о-, п-нитрофенолов и нитранилинов в диапозоне pH 4-10 соответствует четырехэлектронному восстановлению и увеличивается с понижением pH ниже 4 или увеличением выше 10. В сильнокислой и сильнощелочной среде наблюдается только одна шестиэлектронная волна.

Однако существует ряд работ [67, 68], в которых наблюдалась одна шестиэлектронная волна восстановления нитрогруппы во всем диапазоне pH. Такое поведение нироароматических веществ авторы так же объясняют быстрой химической реакцией дегидратации гидроксиламинового производного.

Один из возможных путей восстановления -NO₂ может идти через образование димеров. Реакция конденсации может происходить как реакция, заключенная между двумя передачами электронов, если электровосстановление (ЭВ) нитросоединение также относится к ароматическому кольцу, которое может взаимодействовать с арилгидроксиламинами. Такие реакции конденсации могут быть медленными и влиять на результаты электродов с контролируемым потенциалом. Более быстрые реакции конденсации проявляются в результате образования новых волн на полярограммах, соответствующих ЭВ продукта конденсации. Наконец, самые быстрые конденсации дают новые пики даже в линейной вольтамперометрии (ЛВА).

Арилгидроксиламиногруппа, образованная в четырехэлектронном восстановлении, может конденсироваться либо с формильной группой в исходном нитробензальдегиде, либо с формильной группой в других арилгидроксиламинах. Продукты конденсации представляют собой диариловые нитроны, которые восстанавливаются [69] в два этапа, что соответствует расщеплению связи -NO и гидрированию азометиновой связи.

Арилгидроксиламины, присутствующие в растворе, также могут взаимодействовать с нитрозобензолами. В ходе исследований восстановления

19

нитробензолов с помощью циклической вольтамперометрии нитросоединение может быть восстановлено до арилгидроксиламина, который ЭХ окисляется до нитрозобензола во время обратного сканирования, от отрицательного до положительных потенциалов. Нитрозобензолы, образующиеся таким образом, могут взаимодействовать с арилгидроксиламинами с получением азоксибензолов по реакции (7). Такие реакции проявляются при образовании отдельного пика азоксибензола в кислотных или основных растворах [65].

$$ArNO + ArNHOH \rightarrow ArN(O) = ArN + H_2O$$
(7)

Образование азоксибензолов может также осложнять препаративные электролизы на основе нитробензолов. Взаимодействие арилгидроксиламинов с нитрозобензолов образованием осложняет, например, электросинтез нитрозобензолов, несущих электроноакцепторные заместители. Такие электролизы состоят из двух этапов. В первом случае нитробензолы ЭВ до арилгидроксиламинов. Bo втором – генерируемый арилгидроксиламин электроокисляют до целевого нитрозосоединения. Если восстановление и окисление проводят в виде двух последовательных стадий в периодической процедуре, например, с использованием той же электролитической ячейки, реакционная смесь содержит арилгидроксиламины и нитрозобензолы в сопоставимых концентрациях. Это приводит к конкурентной реакции, дающей азоксибензол. Вклад этой реакции может быть сведен к минимуму с использованием диапазона pH среды, где реакция (7) является медленной, когда нитробензол задействованы незамещенный или нитробензолы c электронодонорными группами. Тем не менее, для гидроксиламина И нитрозопроизводных, полученных при восстановлении нитробензолов, несущих электроноакцепторные группы, реакция (7) и, возможно, другие побочные реакции происходят так быстро, что выходы целевых нитрозобензольных производных низки [65, 70].

Некоторые промежуточные соединения, образующиеся при восстановлении нитросоединений, могут взаимодействовать с арилгироксиламинами, образованными на поверхности электрода [66, 70]. В постоянно-токовой полярографии простая последовательность реакций может быть доказана соотношением 2:1 первой и второй ступеней при pH 4. При использовании капельного ртутного электрода вместе с квадратно-волновой (КвВ) поляризацией напряжения, отношение катодной волны исходного материала и анодной волны продукта, арилгидроксиламина, может быть также строго 2:1.

$$ArNO_2 + 4 e^- + 4H^+ \rightarrow ArNHOH + 2H_2O$$
(8)

$$ArNHOH + H^{+} \leftrightarrow [ArNHOH]H^{+}$$
(9)

$$[ArNHOH]H^+ + 2 e^- + H^+ \rightarrow ArNH_2 + H_2O$$
(10)

Сотношения токов I_{ArNHOH}:I_{ArNO} и I_{ArNO2}:I_{ArNHOH} практически не зависят от pH в диапазоне pH 4-10, это доказывает, что присоединение ArNHOH к ArNO, катализируемое кислотно-щелочной системой, не имеет значения. Поскольку отношение I_{ArNO2}:I_{ArNHOH}:I_{ArNO} не зависит от исходной концентрации нитросоединения, а в смеси ArNO₂ и ArNHOH (в отсутствие кислорода) концентрация участвующих ароматических соединений не меняется, можно исключить взаимодействие исходного материала с продуктами реакции [65].

Таким образом pH среды, благодаря предшествующей реакции протонизации -NO₂ и дегидратации некоторых продуктов ее ЭВ, оказывает большое влияние не только на форму и вид вольтамперограммы (ВА), но и на продукты ее ЭВ (как промежуточные, так и конечные). Общая схема ЭВ ароматического нитропроизводного на примере мононитробензола (рисунок 1.1) была представлена Байзером [43].

Данном разделе были рассмотрены монозамещенные нитросоединения. Однако реальные нитроароматических и нитрогетероциклических ЛС зачастую в своем строении имеют множество заместителей, которые также могут оказывать влияние на процесс восстановления нитрогруппы. Поэтому большой интерес представляют работы, в которых получилось установить связь между структурой молекулы нитросоединения и его потенциалом восстановления.



Рисунок 1.1 – Схема электровосстановления мононитробензола

1.1.2 Влияние строения вещества на восстановление ароматических нитропроизводных

На многочисленных примерах ЭВ органических соединений Шиката и Тачи [71] вывели «правило электроотрицательности» потенциалов устанавливающее восстановления, зависимость между количеством электроотрицательных групп, введённых в молекулу, и легкостью ее восстановления. В соответствии с этим правилом органическое соединение восстанавливается тем легче, чем больше электроотрицательных групп введено в его молекулу. Степень влияния заместителей, вводимых, например, в

молекулу нитробензола, различна. Авторами [71] установлено, что ЭВ нитробензола затрудняется с введением заместителей в следующем порядке:

 $NO_2 \rightarrow CO \rightarrow галоген \rightarrow CH_3.$

В работе С. Болло [72] исследовали поведение производных йоднитроимидазола, таких как 1-метил-4-иод-5-нитроимидазол и 1-метил-2,4дииодо-5-нитроимидазол и исходное соединение 1-метил-5-нитроимидазол. Во всех средах эффект введения йода в качестве заместителя в нитроимидазольном кольце вызывал снижение энергетических потребностей ЭВ нитрогруппы. Этот факт может быть объяснен удалением электронов из йодозамещенного заместителя, который уменьшает электронную плотность на нитрогруппе, что облегчает их восстановление.

Данный порядок влияния заместителей на эффективность процесса ЭВ нитроароматических соединений был подтвержден и другими авторами [73-75], которые изучали изомерии однозамещенных влияние производных ниробензола на потенциалы полярографических полуволн. Например, при ЭВ нитробензойных кислот удалось показать, потенциалы ЧТО полуволн сдвигаются в сторону положительных значений при введении заместителей в следующем порядке: пара- \rightarrow мета- \rightarrow орто-положение. Эти данные относятся лишь к первой стадии четырехэлектроного перехода, соответствующего образованию арилгидроксиламина, так как до pH=4 различие в E_{1/2} процессов ЭВ трех изомеров нитробензойной кислоты велико. При рН>4 значения потенциалов полуволн трех изомеров отличаются гораздо заметнее [73, 74]. В статье [75] сообщается, что при ЭВ нитробензола и его производных орто-, мета-, пара-нитроанилина и пара-нитробензальдегида в смешанных водноорганических средах (5 об.% метанол, KCl 0,5 моль/дм³) мета-нитроанилин восстанавливается легче примерно на 80 мВ, чем орто-нитроанилин, а паранитробензальдегид восстанавливается легче, чем пара-нитроанилин, поскольку он имеет электроноакцепторный заместитель.

Так как молекула Триазавирина® является натриевой солью является полезным рассмотреть влияние катионов щелочных металлов на процесс

электропревращения нитрогруппы. В литературе [76-78] сообщается, что образование ионных пар приводит к изменению распределения электронной плотности в анион-радикале, что влияет на потенциал восстановления соединений. Термодинамические и кинетические описания этих процессов сильно зависят от природы катиона в растворе: степень ионного спаривания увеличивается с уменьшением кристаллографического радиуса вовлеченного.

Чаухан Б. и другие [79] проводили количественное исследование влияния катиона электролита на кинетику переноса электрона к органической молекуле в апротонных растворителях. ЭПР-исследования соответствующих анионрадикалов показали, что электронная плотность на -NO₂ увеличивается при переходе от нитробензола к нитромезитилену. Это наблюдение может быть объяснено как индуктивным эффектом -CH₃, увеличивающих плотность заряда в кольце, так и стерическим эффектом о-замещенных групп, который предотвращает копланарность -NO₂ с бензольным кольцом, значительно снижая взаимодействие между системами на заместителе и кольце.

Орто-заместители также стерически препятствуют образованию ионных пар, не позволяя катиону приближаться к анион-радикалу так близко, как это происходит в случае нитробензола. Таким образом, величина константы ассоциации для нитромезитилена значительно меньше.

На процесс ЭВ нитрогруппы в значительной степени влияют не только заместители в структуре вещества, но и сопутствующие ионы и катионы в растворе электролита. В разделе 1.1.1 и 1.1.2 косвенно рассмотрена тема анион радикалов, образующихся в процессе ЭВ нитрогруппы. Следует подробно рассмотреть продукты радикальной природы, так как их наличии может обуславливать не только биологическую активность молекул [29, 49, 50], но и участие в формировании некоторых промежуточных и/или конечных продуктах реакции [61].

1.1.3 Образование анион-радикалов в процессе восстановления ароматических нитропроизводных

Первые анион-радикалы нитроароматических производных обычно получали с помощью химического восстановления щелочных металлов или методом электрохимической генерации на ртутной капле в апротонных растворителях [80]. Концентрация радикалов обычно не превышает 10⁻⁵ или 10⁻⁶ моль/дм³ [81], при условии, что реакция идет в объеме. Однако, при исследовании электрохимического превращения нитрогруппы, реакция идет в приэлектродном слое, следовательно концентрация радикальных частиц в разы уменьшается. Однако она является для всех практических целей самой низкой стационарной концентрацией, обнаруживаемой с разрешением электронной парамагнитной (или спиновой) резонансной спектроскопии.

Применение методики ЭВ в ячейке, расположенной непосредственно в резонаторе ЭПР-спектрометра, позволяет получить и изучить свойства, строение и реакционную способность радикалов большого числа органических соединений [81]. Среди них особое внимание было обращено на ArNO₂, которые обладают большим сродством к электрону и имеют довольно низкие потенциалы восстановления. Эти исследования позволили выяснить механизм восстановления нескольких нитроароматических соединений, реакции установить зависимость между параметрами ЭПР-спектров, потенциалами полуволн восстановления [28, 81]. Сверхтонкая структура (СТС) является одним из наиболее информативных параметров ЭПР-спектров для подобных систем. Она определяется взаимодействием неспаренного электрона с магнитными ядрами, входящими в состав радикала, на которых есть спиновая плотность (так называемое сверхтонкое взаимодействие (СТВ)).

В работах [82, 83] было показано, что при получении анион-радикала с помощью щелочных металлов происходит образование ионной пары «анионкатион» и ЭПР-спектр осложняется СТС от ядра щелочного металла. Получение анион-раликала при ЭХ генерации в апротонном растворителе, используя методику ЭВ [84-91], позволило проследить взаимное влияние заместителей на параметры ЭПР-спектров анион-радикалов ди- и тризамещенных нитробензолов и получить сведения о распределении плотности неспаренного электрона.

Характерной особенностью ЭПР-спектров моно-, ди- и три-замещенных нитробензолов, является, как указывалось выше, наличие основного триплетного расщепления от ядра ¹⁴N нитрогруппы [81]. Причем величина азотной константы СТС (а_N) изменяется в довольно широком интервале в зависимости от донорно-акцепторных свойств заместителей и их положения в бензольном кольце. Влияние заместителей на протонные константы СТС является не значительным [92-94].

Анализ констант СТС атома азота и характера расщепления ЭПР-спектра анион-радикала нитроароматических соединений дает возможность сравнить влияние разных по силе и одноименных по электронным свойствам заместителей, проследить их взаимное влияние на константы СТС атома азота, а также провести сравнительный анализ зависимости между а_N и E_{1/2} первой стадии восстановления нитрогруппы. Было показано, что чем более положителен E_{1/2}, тем меньше значения a_N [95]. Эта зависимость показала, что введение в молекулу электроноакцепторного заместителя приводит к понижению энергии нижней вакантной молекулярной орбитали и этот заместитель конкурирует за плотность неспаренного электрона с нитрогруппой. подобная Более того, зависимость является качественным критерием первичности исследованных анион-радикалов [87].

Вследствие высокой реакционной способности промежуточных продуктов восстановления нитрогруппы стационарные концентрации таких радикалов низки, что несколько затрудняет их непосредственное обнаружение методом электронного парамагнитного резонанса [81]. Для регистрации ЭПР-спектров короткоживущих радикалов часто применяют спиновые ловушки и зонды [96, 97]. Спиновые ловушки или зонды – это соединения, которое эффективно реагирует с короткоживущими радикалами, давая гораздо более

долгоживущие радикалы; таким образом, последние могут увеличиваться до легко обнаруживаемых концентраций ЭПР-методом.

Обычно в качестве улавливающих агентов (или спиновых ловушек) используются либо нитрозо-, либо нитроновые соединения, поскольку присоединение радикала приводит к образованию стабильного или полустабильного нитроксильного радикала (или нитроксида, спинового аддукта) [81]. Относительные преимущества нитрозо- и нитроновых спиновых ловушек обсуждаются в обзоре Янзена [98].

Рассмотрев возможные пути электропревращения нитропроизводных, мешающие факторы и некоторые особенности данного процесса можно сделать вывод, что, класс нитрогетероциклических веществ представлен достаточно большим разнообразием соединений, отличающихся между собой химической структурой, биологической активностью и способностью вступать в разные по механизмам реакции. Анализ литературных данных показал, что для получения оптимального аналитического сигнала при создании вольтамперометрической методики количественного определения лекарственного вещества в ЛС оказывается полезным проведение исследования электрохимического поведения оригинальных органических молекул.

1.2 Вольтамперометрия в фармацевтическом анализе

К инструментальным методам количественного анализа, которые обычно используются В лабораториях фармацевтического контроля, относятся титриметрия, хроматография, спектрофотометрия и ЭХ методы [99, 100]. В современных фармакопеях традиционно используются такие ЭХ методы, как рН-метрия, потенциометрическое титрование в неводных средах, ионометрия, кулонометрия (определение воды) [101, 102]. Возможности электроанализа для решения задач фармацевтического контроля несравненно шире. Электрогравиметрия, кондуктометрия, полярография, вольт- и амперометрия также являются основными ЭХМА, которые применяют для контроля готовых ЛС. Однако наибольшее применение в фарманализе нашла вольтамперометрия [18-26, 100].

Многие активные компоненты ЛС, в отличие от наполнителей, могут легко окисляться или восстанавливаться. Селективность метода ВА обычно очень высока за счет того, что идентификацию вещества проводят по потенциалу пика его окисления или восстановления [103].

В последнее десятилетие было опубликовано большое количество методик вольтамперометрического определения действующих веществ для различных классов лекарственных препаратов [103], например: анальгетиков [104-106], коагулянтов [107], антитромбоцитарных [108], глистогонных [109], успокоительных [110, 111], желудочно-кишечных [112, 113], антидепрессантов [114, 115], антиаритмических [116], опиоидных анальгетиков [117], витаминов [118-120], антихолинэстеразы [121], антиадренергических [122], для лечения болезни Паркинсона [123], антиаллергенных [124], против СПИДа [125].

Анализ литературных данных показал, что в случае нитросоединений наиболее полезным для количественного определения является сигнал ЭВ нитрогруппы. К преимуществам сигнала можно отнести как большое количество тока, вырабатываемое на моль электроактивного соединения, так и относительно низкую потребность в энергии для ее восстановления. Это позволяет получать высокое отношение ток / концентрация при низких потенциалах. Эти преимущества дают возможность использования большого количества ЭХ методов, применяемых для изучения биологического значения нитросоединений.

Так как объектами анализа данной диссертационной работы являются вещества, содержащие нитрогруппу, необходимо подробно рассмотреть вольтамперометрические методики определения всевозможных ЛС, содержащих эту электроактивную группу.

1.2.1 Вольтамперометрия лекарственных веществ, содержащих электроактивную нитрогруппу

Для определения некоторых нитросоединений методами вольтамперометрии обычно используются такие варианты как: ДИП-, ЛВА, КвВ-, ПИИА- и методы, которые имеют стадию концентрирования на поверхности рабочего электрода: КИ-, Ад-, АдК-, КвВАд-, ДИАд- и т.д.

Одним из наиболее важных семейств нитросоединений являются производные нитроимидазола. В последние несколько десятилетий, нитроимидазолы были источником многих исследований из-за их свойств, как антибиотиков и радиосенсибилизаторов [126, 127]. Метронидазол® является наиболее важным препаратом группы 5-нитроимидазола и несколько ЭХ-исследований были описаны для его определения [128, 129]. Полярографически было произведено определение Метронидазола® с пределом обнаружения 10⁻⁷ моль/дм³ [130]. Методом ДИП-вольтамперометрии Метронидазол® был пределен на СУЭ [129] с пределом обнаружения 10⁻⁶ моль/дм³, на ртутной капле [130] – 10⁻⁷ моль/дм³, а на СУЭ модифцированном [131] – 10⁻⁹ моль/дм³.

Был опубликован ряд работ по определению Секнидазола® в лекарственных препаратах с помощью ДИП- и Ад-вольтамперометрии [132] на ртутной капле, методом полярографии [133], в биологических жидкостях методом ДИ- [134], в моче методом Ад-вольтамперометрии[133].

Другие производные нитроимидазола, обычно используемые в качестве терапевтического агента против болезни Шагаса, это Бензниназолы®, которые были определены вольтамперометрическим [133], методом ДИП- на модифицированном СУЭ [135] и на ртутной капле [136]. Полярографическое определение Бензнидазола® также было проведено в неводной среде [136], а его ЭХ поведение изучали с помощью циклической вольтамперометрии [137].

Определение Тинидазола® в таблетках было проведено с помощью метода ДИП-вольтамперометрии в водном растворе с предварительным восстановлением, 98,7 % с 3 % СКО и на ртутной капле [138]. Простой и

быстрый метод для определения Тинидазола® в таблетках, используя СУЭ, активированный путем выдерживания при постоянном потенциале [138]. Так же активацию СУЭ использовали при определении Орнидазола® в лекарственных формах [139].

Мегазол®, высоко активное соединение используется против нескольких штаммов туберкулеза, возбудителем болезни Шагаса, был ЭХ изучен методом ДИП-вольтамперометрии на ртутной капле с пределом обнаружения до 10⁻⁶ моль/дм³ [140].

Вольтамперометрическая методика определения Нитроимидазопурана®, препарата для лечения туберкулеза, проведено методами ДИП- и ДИволтамперометрии при pH=7 на СУЭ и ртутной капле [141].

Другим важнейшим семейством нитросоединений являются производные нитрофурана, которые широко используются в качестве антибактериальных средств. Метод АдК-вольтамперометрии был использован для определения Фуразолидона®, Фуралтодона® и Фурацилина® в лекарственных препаратах, в моче и образцах сыворотки крови, на ртутном капающем электроде [141, 142].

Нитрофурантоин® был определен при потенциале -0,173 В, pH 5,5 [143] с помощью КИ-вольтамперометрии на ртутно-капающем электроде с ПрО 10⁻⁹ моль/дм³. Очень чувствительный метод для определения Нитрофурантоина® в лекарственных препаратах и биологических жидкостях с помощью КАдИвольтамперометрии был описан в работе [144]. Кроме того, Нитрофурантоин® был определен с использованием вольтамперометрии на ТУЭ. Эта методика была также использована для проведения исследований Нитрофурантоина® в кислой и щелочной среде [145].

Поведение Нифуроксима® исследовали с помощью циклической и ДИПвольтамперометрией на СУЭ [146]. Определение основного вещества в капсулах Нифуроксазида® исследовали в ДИП-режиме [147], ПрО 10⁻⁷ моль/дм³. Кроме определения Нифуроксазида® в капсулах, была разработана методика его определения в сыворотке крови человека в Ад-режиме [148] на поверхности ртутного капающего электрода. Кроме того, в [149] сообщалось об определении Нифуроксазида® с помощью полярографии и Адвольтамперометрии на ТУЭ. В последнем, электроды модифицировали путем добавления неполярных частиц полистирола и дивинилбензола.

Вольтамперометрическое определение Нифедипина® основано на восстановлении препарата на поверхности СУЭ [150]. Простая, чувствительная и селективная методика КВАд-волтамперометрии была разработана и утвержден для определения Нифедипина® в плазме крови [151]. Так же метод КВАд-вольтамперометрии был оптимизирован для определения Нифедипина® в следовых количествах в сыворотке крови человека и лекарственных смесях [152]. Методика ДИАд-вольтамперометрии была разработана для определения Нифедипина® и Нимодипина® на ТУЭ и модифицированном глиной ТУЭ.

ДИП-вольтамперометри была успешно Метолика применена для непосредственного определения Нифедипина® и Нимодипина® в твердых образцах лекарственных формах, моче И сыворотки [153]. крови Электрохимическое поведение Нитрендипина® и его определение в таблетках и моче было предложено на СУЭ в работе [154]. Прямой вольтамперометрией был определен Никардипина гидрохлорид в таблетках на модифицированном ТУЭ, а также ДИП-полярографией [155, 156].

Аналитическое определение Нисолдипина® было разработано с использованием как анодной, так и катодной вольтамперометрией [157, 158]. Эти электрохимические методы также были использованы для определения Нисолдипина® в капсулах.

Метод ДИП-вольтамперометрии был успешно применен к анализу Лерканидипин® в таблетках с целью проверки основного вещества в ЛС [159]. Нимесулид® [160] и Ранитидин® [161] были так же определены ЭХ методами.

Лоратадин®, сильнодействующий антигистаминный препарат, не подвергается прямому ЭВ на капающем ртутном электроде. Однако с помощью процедуры нитрования было получено производное нитролоратадина. Методами полярографии и циклической вольтамперометрии было изучено электрохимическое восстановление этого производного при различных pH и

концентрациях [162]. Разработана аналитическая методика определения Лоратадина® в лекарственных формах методом ДИП-вольтамперометрии на ртутной капле.

Шистосомоцидный препарат Празиквантел® так же не подвергается ЭВ на ртутном электроде, но с помощью нитрования было получено электроактивное производное нитропразиквантела. С помощью циклической и ДИПвольтамперометрии было исследовано адсорбционное поведение производного нитропразиквантела на электроде с висячей ртутной каплей [163].

Анализ литературных данных не только подтвердил суждение о необходимости проведения предварительного ЭХ исследования механизма превращения препарата, но и показал на сколько важен правильный выбор режима волтамперометрии и материала электрода для создания чувствительной методики количественного определения основного вещества в ЛС.

1.2.2 Выбор материала индикаторного электрода

Как было обеспечения выше замечено, для метрологических характеристик анализа, в первую очередь чувствительности определения и воспроизводимости величин токов, решающее значение имеют природа материала и геометрия рабочего электрода, а также состояние его поверхности. Выбор материала электрода определяется, прежде всего, тем, какая целевая электродная реакция предполагается протекать на электроде: реакция электродного окисления или восстановления.

Вольтамперометрическое определение ЛС наиболее часто осуществляют в водных растворах [164-187], в которых электродные процессы ограничены с катодной стороны выделением водорода, а с анодной стороны – выделением кислорода или окислением самого материала электрода. Все остальные электродные реакции восстановления и окисления возможно осуществить, если они происходят при потенциалах, имеющих промежуточное значение между потенциалами указанных выше процессов. При этом рабочий электрод должен удовлетворять следующим условиям:

- быть простым в эксплуатации;

- иметь воспроизводимую или легко кондиционируемую поверхность;

- быть стабильным во времени, не подверженным явлениям «усталости» или отравления вследствие протекания электрохимических реакций;

- состояние его поверхности должно быть наиболее благоприятным для протекания электродных реакций и явлений массопереноса;

- иметь широкий диапазон рабочих потенциалов (для катодных или анодных процессов);

 иметь как можно меньший остаточный ток для обеспечения более высокой чувствительности.

В наибольшей мере этим требованиям отвечают ртутные электроды. Поэтому наибольшее распространение получили ртутные электроды различных конструкций – стационарные (ртутный капельный и ртутный пленочный) и нестационарные (ртутный капающий и ртутный статический). Использование ртути позволяет получать электроды co строго определенными характеристиками поверхности, которая легко и воспроизводимо обновляется. Еще одним достоинством ртутных электродов является высокое перенапряжение выделения водорода на ртути. Поэтому регистрацию ВА можно проводить в достаточно широкой области потенциалов: от +0,1 до -1,8 В в нейтральных растворах KCl, от +0.4 до -1.8 В в растворах NaClO₄. В анодной области применение ртутных электродов ограничено протеканием процессов окисления ртути, а в катодной – восстановлением катионов фонового электролита (Na⁺ или K⁺) [188]. Но самым главным минусом применения данного типа электродов является его острая токсичность и необходимость в правильной утилизации и хранении выработанной ртути.

Главной сферой применения металлических твердых электродов из благородных металлов, например золота или платины, является та область потенциалов, где ртуть подвержена анодному окислению [189]. На платине водород выделяется при потенциалах, близких к равновесным. В кислых растворах выделение водорода на платине происходят при потенциалах, незначительно отличающихся от нулевого значения, а в щелочных – при потенциалах около -0,6 В. Выделение водорода на ртути происходит при более отрицательных потенциалах, чем равновесные значения, т.е. водород на ртути выделяется с перенапряжением. В кислых растворах разряд ионов H₃O⁺ начинается при потенциалах около -1 В, а в нейтральных и щелочных выделение водорода происходит при более отрицательных потенциалах. В анодной области потенциалов использование ртутного электрода ограничено вследствие анодного окисления ртути. Таким образом, платиновый электрод может быть использован преимущественно для осуществления электродных реакций окисления неорганических и органических соединений. На платине можно также проводить восстановление сильных окислителей.

В вольтамперометрии для определения лекарственных веществ в качестве рабочих электродов используются широко стеклоуглеродные И толстопленочные углеродосодержащие электроды на основе углеродных чернил и паст [190]. СУЭ имеют форму стержня, впрессованного в пластмассовый корпус или скрепленного с ним при помощи клея. Рабочая область потенциалов таких электродов в нейтральных водных растворах простирается от -1,5 до +1,5 В (отн. НКЭ). Столь широкий диапазон рабочих потенциалов является преимуществом перед ртутно-капающим, золотым или платиновым электродами [188, 189]. Более того СУЭ, в отличии от электродов из благородных металлов, не является катализатором многих побочных реакций таких как димеризация [191]. Однако электроды СУЭ отличает высокую стоимость, эффект «память» и необходимость многоступенчатой механической регенерации поверхности в процессе эксплуатации. Указанных недостатков лишены ТУЭ, которые дешевы и просты в изготовлении, характеризуются хорошей воспроизводимой поверхностью, автоматизацией и миниатюризации процесса анализа [192].

34

ТУЭ являются одноразовыми, которые могут быть специально адаптированы для обнаружения целевых аналитов. Данные сенсоры представляют собой небольшие полоски, которые изготавливают путем последовательного нанесения методом трафаретной печати на непроводящую подложку.

ЭХ сенсоры на основе углеродосодержащих материалов изготавливаются либо из лабораторных углеродных паст, состоящих из частиц графита, малолетучей органической жидкости И электрохимически активных модификаторов, либо из коммерческих углеродных чернил, состоящих из сажи, частиц графита, полимерных связующих и других запатентованных добавок для улучшения дисперсии, печати и адгезии [193]. Различия в составе пасты, а также в процессах печати и отверждения сильно влияют на ЭХ свойства такие переноса электронов, фоновый как: кинетика ток, высота вольамперометрического пика и импеданс [194]. Поэтому зачастую сложные органические молекулы имеют слабый или не выраженный аналитический сигнал на нативной поверхности ТУЭ [195-197]. Предварительная обработка углеродных электродов может оказать значительное влияние на улучшение скоростей переноса электронов для большого количества соединений в растворе [198, 199], поэтому рассмотрения способов активации поверхности ТУЭ является необходимой задачей исследования.

1.2.3. Подготовка поверхности толстопленочного углеродосодержащего электрода

Предварительная подготовка поверхности сенсора может быть различной, и включать выдержку электрода при постоянном потенциале в течение короткого периода времени [200, 201, 194], циклирование потенциала до экстремальных потенциалов [202], термообработку [203], ультразвуковую полировку [204], обработку кислородной плазмой [205] или механическую активацию [206, 207]. Улучшенные результаты электроанализа после активации электрода могут быть связаны с увеличением гидрофильности поверхности

35

[198, 208], увеличением количества углерод-кислородных функциональных групп на поверхности [209, 210], увеличением шероховатости поверхности [211] и / или удалением органических компонентов чернил или загрязняющих веществ, попадающих на этап печати [198].

Подготовка поверхности электрода методом термообратки, ультразвуковой полировкой, обработкой кислородной плазмы ИЛИ механическим способом представляют собой достаточно сильные механическое повреждения самого материала электрода, а также могут спровоцировать его отхождение от подложки. Так как состав коммерческих паст является тайной, нет возможности прогнозировать какие из этих методов могут быть непригодны для подготовки ТУЭ ввиду разрушения полимерных связующих части пасты электрода. Данные методы активации требуют дополнительного оборудования, энергетических и финансовых затрат. Кроме того, работах не сообщается о «времени жизни» таких электродов, следовательно, не позволяют использовать ТУЭ в полевых условиях.

Что нельзя сказать о ЭХ способах подготовки поверхности электрода. Чтобы сохранить метод активации простым и совместимым с приборами, используемыми для последующих измерений, предварительная электрохимическая обработка *in situ* является многообещающей для решения этой задачи.

Вонг и др. [213] изучили электроаналитические характеристики и методы электрохимической активации для ТУЭ. Было замечено, что сенсоры на основе этих ТУЭ демонстрируют широкий диапазон ЭХ-активности для эталонных редокс-систем с различными фоновыми токами. Они также отметили, что благоприятные электроаналитические характеристики коммерческого ТУЭ на основе углеродных чернил сильно различаются в зависимости от типа применяемых конкретных электрохимических методов (например, импульсной вольтамперометрии и амперометрии). Кратковременное предварительное анодирование (от 30 с до 3 мин в диапазоне от +1,5 до +2,0 В) ТУЭ на основе двух различных коммерческих углеродных чернил в фосфатном буферном растворе (0,05 моль/дм³), по-видимому, увеличивает функциональность и
шероховатость их поверхности или удаляет поверхностные загрязнения аналогично другим способам активации угольных электродов, что приводит к усилению электрохимической активности в отношении различных необратимых и квазиобратимые окислительно-восстановительные системы.

В работе [213] на ТУЭ предварительно проводят развертку потенциалов от -0,5 до 2 В в течение 10 циклов в 0,05 моль/дм³ растворе фосфатного буфера. Этот электрод обеспечил лучшую производительность по сравнению с неактивированным. Кроме того, он обеспечивает селективное и чувствительное определение Метронидазола® в диапазоне линейных концентраций 0,05-563,00 мкмоль/дм³ и 753-2873 мкмоль/дм³, а ПрО 0,01 мкмоль/дм³.

В работе Гонсалес-Санчес и др. [214] электроды подвергались различным методам ЭХ активации, а в качестве тестового зонда использовался отклик на электроанализ H₂O₂. Особенно эффективным оказалось сочетание методов активации с использованием агрессивных сред смесей H₂SO₄ и H₂O₂, которые привели к снижению сопротивления переноса заряда и функционализации некоторыми углеродно-кислородных групп на поверхности углеродных чернил. Использование двухэтапного протокола с 0,5 моль/дм³ H₂SO₄ и 0,001 моль/дм³ H₂O₂ в условиях циклирования потенциалов было наиболее эффективной процедурой подготовки поверхности, исследованной в данной статье, и привело к повышению чувствительности в 518 раз по сравнению с необработанными ТУЭ при электроокислении H₂O₂. Также были показаны электрохимические поведения ацетаминофена, гидрохинона и дофамина в качестве доказательства концепции оптимально активированных ТУЭ.

Наибольший интерес представляет статья Ракеля де Оливейра Силвы и др. [215], в которой ТУЭ электрохимически активировали методом КвВвольтамперометрии в 0,04 моль/дм³ буферном растворе Бриттона-Робинсона pH 5,0 со сдвигом потенциала рабочего электрода ТУЭ в диапазоне потенциалов от +0,3 до +1,0 В в течение 5 последовательных сканирований. Затем подготовленный электрод непосредственно использовали для дальнейших экспериментов. Полученные на данном электроде линейные зависимости тока пика Сульфентразона® от концентраций в диапазоне 1,0–25,0 мкмоль/дм³, R² = 0,9995, ПрО были ниже 0,8 мкмоль/дм³ для чистой воды. Коэффициенты восстановления для измерений в пробах соевого молока и грунтовых вод составили 98,67 и 99,00 % соответственно.

Несмотря на то, что ЭХ способ подготовки ТУЭ довольно широко используется для улучшения качеств аналитического сигнала ЛС, его может быть недостаточно. Вторым способом улучшением свойств сенсоров является модификация его рабочей поверхности. Конструкция и технология изготовления ТУЭ позволяют легко модифицировать их поверхность путем иммобилизации модификатора на поверхности электрода путем капельного литья или добавления его в чернила перед изготовлением электрода [216].

Научных исследований и разработок, связанных с модифицированием поверхности электрода для придания электроду специфических свойств при обнаружении и количественном определении различных веществ, существует Модифицированием большое электродной количество. поверхности токопроводящими материалами можно создать настолько благоприятные условия, аналитический сигнал будет не специфичным, что только но И высокочувствительным. модифицировании При электрода возникает морфологии необходимость контроля его поверхности с применением современных физических методов, например, сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) или импеданс. Метод спектроскопии электрохимического импеданса позволяет прояснить различия между электрохимическими характеристиками чистого ТУЭ и модифицированного ТУЭ, где преобладает специфическая адсорбция, а также извлечь информацию об электрохимических характеристиках материалов модификаторов, скорости переноса заряда и сопротивлении раствора [189]. А СЭМ делает возможным изучения размера, формы и распределения наночастиц на поверхности электросенсора.

Методики модифицирования электродов можно разделить на несколько групп [216-219]:

1) адсорбционный (хемосорбционный) метод модификации поверхности;

2) химический способ закрепления модификатора с образованием ковалентных связей;

3) метод включения модификатора в объем электрода;

4) метод осаждения на электроде полимеров с ЭХ активными группами, которые электростатически притягивают модификатор к поверхности;

5) метод включения модификатора в полимерную или неорганическую пленку, осажденную на электроде;

6) метод электрохимического синтеза модификатора на металлический, углеродный или полимерной поверхности.

Оптимальный способ модифицирования поверхности электрода выбирают исходя из свойств подложки и модифицирующего соединения. При этом должна обеспечиваться прочная связь модификатора с поверхностью электрода, а обмен электронами между подложкой и электроактивным веществом в объеме раствора или на поверхности электрода должен осуществляться с высокой скоростью. Необходимо также обеспечить высокую концентрацию активных центров на поверхности электрода для получения больших токов. Кроме того, молекулы модификатора должны сохранять основные химические свойства, которыми они обладали, находясь в растворе.

Наиболее просто закрепление модификатора на поверхности электрода осуществляется с помощью физической или химической адсорбции. Ее преимущество состоит в том, что она не требует специальных реагентов для присоединения модификатора к электроду достаточно провести активацию и очистку поверхности перед модифицированием. Однако время жизни такого электрода относительно невелико, поскольку модификатор постепенно уходит в раствор вследствие десорбции. Этот способ модифицирования электродной поверхности широко применяется в инверсионной вольтамперометрии [216].

Наиболее распространенным методом введения модификатора на поверхность электрода является «капельный» метод, заключающийся в следующем: на рабочую зону электрода с помощью дозатора наносят необходимый объем раствора приготовленной суспензии и сушат на воздухе до

полного высыхания модификатора [216, 220]. Эта простая процедура модификации электродов требует контроль объема модификатора, необходимого для нанесения на рабочую поверхность, в зависимости от его концентрации. Кроме того, важным является влияние природы модификатора на аналитические характеристики электрода для определения аналита.

Присутствие на поверхности ТУЭ углеродных наноматериалов (УНМ), например таких, как углеродные нанотрубки [221, 222], сажа без дополнительной обработки [223, 224] или после функционализации [225, 226] может влиять на его активность, увеличивая скорость электронных переходов и изменяяобратимость ЭХ процесса [227].

УНM наиболее являются универсальных одним ИЗ классов, охватывающего различные аллотропные формы углерода и химические и физические свойства. Эти материалы могут варьироваться от микро- до наноразмерных частиц, от изолирующих до проводящих, от плоских до пористых поверхностей, от простых до сложных структур и композитов и так далее. Учитывая эту изменчивость форм и свойств, УНМ были успешно изучены В различных областях исследований, таких как разработка электронных компонентов для портативных устройств и устройств накопления энергии, медицинских имплантатов и биосенсоров [228].

В настоящее время УНМ, такие как нанотрубки, сажа, графен, показали хорошие результаты в разработке ЭХ сенсоров. Им посвящен большой объем Разработанные на их основе ЭХ научных работ. системы показали повышенную чувствительность и снижение пределов обнаружения между Также усовершенствованиями аналитических данных. они другими характеризуются широким диапазоном рабочих потенциалов благодаря своей химической инертности, устойчивости к широкому спектру растворителей и низкому фоновому току. Присутствие данных модификаторов на поверхности рабочих электродов может улучшить аналитические характеристики за счет усиления переноса электронов между поверхностью модифицированных

40

электродов. Исходя из вышеперечисленных преимуществ, данные наноматериалы все чаще используются в электрохимии [220].

Одним из простых в использовании, доступных и дешевых материалов, а также распространенных модификаторов в электрохимии является углеродная сажа, благодаря высокой электропроводности, диспергируемости в органических растворителях и воде, универсальности для химической функционализации, большой удельной поверхности.

Углеродная сажа представляет собой мелкий черный порошок почти чистого углерода с минимальным количеством кислорода, водорода и азота. Ее структура состоит из сферической формы, которая может образовывать агрегаты [212]. Ее изготавливают либо частичным сжиганием, либо термическим разложением газообразных или жидких углеводородов в контролируемых условиях, оптимизированных для получения разнообразных сортов сажи, имеющих определенные диапазоны свойств (например, удельную площадь поверхности, размер и структуру частиц, проводимость и цвет) [229].

В работе [230] сообщается об улучшениях аналитического сигнала благодаря использованию модифицированных сажей электродов, увеличение скорости переноса электронов и повышение аналитической чувствительности. Исследовательская группа отмечает, что большинство соответствующих свойств сажи аналогичны или лучше, чем другие широко используемые УНМ, в дополнение к важному его преимуществу – низкой стоимости. Кроме того, в литературе все чаще встречается разработка ЭХ сенсоров на основе сажи для аналитического анализа различных ЛС, так как она позволяет достичь повышенной стабильности и точности наряду с низкими ПрО.

Авторы статьи [231] сравнили ЭХ характеристики чистого электрода и модифицированного сажей (марка N220) электрода (ТУЭ/С) при анализе ферроцианида, адреналина, норэпинефрина, бензохинона и восстановленного НАД, где ТУЭ/С показал значительно выше ЭХ активность, чем чистый ТУЭ.

В [232] электроды с трафаретной печатью, модифицированные сажей, продемонстрировали способность обнаруживать фосфомолибдатный комплекс

при низком приложенном потенциале И с удовлетворительной чувствительностью, что позволяет количественно определять фосфат в воде. Результаты показали не только низкий ПрО (0,1 мкмоль/дм³), но и отсутствие силикатных помех. Согласие между данными, полученными в реальных пробах воды (питьевой, водопроводной, речной, аквариумной и сточных вод) с использованием предлагаемого сенсора и эталонного спектрофотометрического метода, подтвердило его пригодность И В реальных образцах, продемонстрировав, что этот экономически эффективный, миниатюрный и стабильный сенсор (по крайней мере, 3 месяца в сухом состоянии при комнатной температуре) является ценным выбором.

В работе [220] сообщается 0 сравнительном исследовании с модифицированных сажей, использованием электродов, одностенными углеродными нанотрубками (ТУЭ/УНТ), оксидом графена (ТУЭ/ОГ) и восстановленным оксидом графена (ТУЭ/ВОГ) для анализа ферроцианида, восстановленного НАД, аскорбиновой кислоты и цистеина. ТУЭ/С показал лучшую гетерогенную константу переноса электрона присутствии В ферроцианида по сравнению с другими модифицированными ТУЭ. Кроме того, улучшение в отношении пониженного перенапряжения и / или низкого фонового тока было обнаружено В случае аскорбиновой кислоты, восстановленного НАД и цистеина. Такое поведение может быть приписано более равномерному сажевому покрытию рабочего электрода, чем УНТ / ОГ / BOΓ.

ЭХ свойства Принимая внимание экономическую BO сажи, эффективность, способность легко получать стабильную и гомогенную дисперсию, заслуживает широкого применения при разработке она наномодифицированных электрохимических сенсоров.

В работах [233, 234] говорится об опыте функционализации сажи в целях улучшения ее ЭХ характеристик в качестве модификатора ТУЭ. Авторами работы [233] замечено, что удельная площадь поверхности сажи после ее функционализации была уменьшена на 44 %, что указывает на то, что

используемая обработка приводила к значительным изменениям в структуре модификатора. Было высказано предположение, что поверхностные группы кислорода фиксируются на входе микропор после функционализации, блокируя диффузию частиц в них. Результаты рентгеноструктурного анализа показали, что после функционализации произошло изменение местоположения пиков. Этот эффект можно объяснить включением оксигенированных групп в Для образца XC72R-HNO₃ структуру сажи. токи на циклических вольтамперограммах увеличились после функционализации. Такое поведение, вероятно, связано с нарушением гидрофобности и/или увеличением количества поверхностно ЭХ активных групп.

В работе [234] описано применение химически функционализированной сажи для разработки чувствительных электрохимических биосенсоров. Отмечено, что химически предварительная обработка повысила смачиваемость материала за счет повышения концентрации поверхностных кислородсодержащих функциональных групп, подтвержденных элементным анализом. Кроме того, электрод, модифицированный функционализированной сажей, обнаруживал перенос электрона редокс пары $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ в 100 раз быстрее по сравнению с электродом, модифицированным нефункционализированной.

Вторым по популярности использования модификатором являются углеродные нанотрубки (УНТ). Они обладают уникальными электронными, химическими и механическими свойствами [194], которые превосходят свойства многих материалов, что делает их применение незаменимым материалом во многих отраслях науки. Данный материал представляют собой протяженные цилиндрические структуры диаметром от одного до нескольких десятков нанометров и длиной до нескольких сантиметров, состоящие из одной или нескольких свернутых в трубку гексагональных графитовых плоскостей и заканчивающиеся обычно полусферической головкой, которая может рассматриваться как половина молекулы фуллерена. По форме УНТ могут быть однослойными и многослойными (рисунок 1.2), с цилиндрическим и расположением слоев, изогнутые, коническим атомных прямые И

спиралевидные и напоминающие кольца или торы [235]. Многослойность структуры данного наноматериала дает значительно более широкое разнообразие форм и конфигураций. Это разнообразие структур проявляется как в продольном, так и в поперечном направлениях.



Рисунок 1.2 – Строение УНТ: (а) однослойные; (б) многослойные

В работе [236] оптимизирована процедура модификации поверхности ТУЭ многостенными карбоксилированными УНТ при анализе дофамина и перекиси водорода. Экспериментальные результаты показали, что ЭХ активная площадь поверхности модифицированного электрода увеличилась примерно на 50 %, а стабильность модифицированных ТУЭ обеспечивается в течение 2 месяцев.

УНТ необходимо активировать, освобождая от крышек [237, 238], удаляя образующийся одновременно с ними, на них и в них аморфный углерод и продукты распада металлических катализаторов. Существующие методы связаны, В том числе, ИХ высокотемпературной обработкой И С В высокоокислительных средах, прежде всего в концентрированных растворах HNO₃ H_2SO_4 [237]. Одновременно И ee смесях с происходит И функционализация УНТ, когда помимо их раскрытия протекает поверхностное присоединение функциональных групп.

В работе [239] были исследованы два образца многостенных УНТ "Sigma Aldrich" и "Sun Nanotech" в сыром состоянии и после активации в смеси кислот с помощью ультразвукового диспергирования. Показано, что ЭХ активная площадь поверхности всех образцов углерода увеличивается, способность к

накоплению заряда повышается, и кинетика переноса электрона, измеренная редокс парой $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$, повышается при активации. Авторы статьи подчеркивают, что морфология наноматериала крайне важна: УНТ с гофрированными стенками демонстрировали более быстрый перенос электронов и псевдо-емкостную редокс кинетику, чем с гладкими. Это объясняется более высокой долей краевых и дефектных участков, которые известны как более ЭХ активные.

1.3 Обоснование, цель и задачи исследования

В связи с выше изложенным, целью данной 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 (Триазавирина®) и аргининовой соли 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5-α]пиримидин-7-она, моногидрата (Триазида) 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 Триазида и Триазавирина® методом вольтамперометрии: определить лимитирующую стадию процесса, термодинамические параметры, рассчитать число электронов и протонов, участвующих в реакции.

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

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

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

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

Решение этих задач позволит внести вклад как в развитие направленного синтеза веществ с определенной биологической активностью, так и в расширение инструментальных методов контроля фармацевтической продукции в ГФ.

Выводы к 1 главе

Оригинальных кандидатов, особенно молекул, уже ставших ЛС, во всем мире насчитывается единицы. За последние несколько лет в России только 10 оригинальных препаратов появилось в аптеке, среди которых – Триазавирин®. Среди ряда структурных аналогов Триазавирина® перспективным соединением является Триазид В качестве молекулы, имеющей более высокую противовирусную активность в отношении различных штаммов вирусов. Фарманализ играет ключевую роль в разработке новых высокоэффективных и безопасных ЛС. Новым трендом в фарманализе является применение ЭХМА для контроля основного вещества ЛС при условии его электроактивности в качестве альтернативы традиционным методам.

Каждый новый лекарственный препарат, созданный на основе нитрогеретоциклических соединений, является сложной уникальной молекулой, содержащей различные заместители. Из анализа вышеприведенных в обзоре литературы данных следует, что на ЭВ -NO₂, даже в рамках одного ряда соединений, влияет множество факторов, что может влиять и на аналитический сигнал. В случае разработки методики количественного определения ЛС для получения оптимального аналитического сигнала необходимо изучить все параметры влияющие на процесс ЭВ молекулы.

Перспективным направлением в аналитической химии является создание толстопленочных ЭХ сенсоров на основе УНМ для количественного определения ЛС. Зачастую сложные органические молекулы имеют слабый аналитический сигнал на нативной поверхности сенсора. Её предварительная подготовка помогает устранить эту проблему, поэтому рассмотрения способов активации и модификации поверхности ТУЭ является необходимой задачей исследования.

ГЛАВА 2 АППАРАТУРА И ТЕХНИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

2.1 Оборудование и средства измерения

Взвешивание навесок проводили на аналитических весах Shimadzu AUX220 (Япония) 1-го класса точности.

ЦВА и ХА регистрировали с помощью потенциостата / гальваностата µAutolab Type III (Metrohm, Швейцария). Стеклоуглеродные диски (диаметр 2 или 5 мм, Metrohm, Швейцария), служили рабочими электродами (неподвижным или вращающимся соответственно). Перед каждым измерением поверхность рабочего электрода механически очищалась. В качестве вспомогательного электрода использовали стеклоуглерода (Metrohm, Швейцария). стержень ИЗ Хлорсеребряный электрод Ag / AgCl / KCl_{salt} (Metrohm, Швейцария) служил электродом сравнения в водных растворах. Потенциалы рабочего электрода в апротонных растворах были измерены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения с двумя мембранами Ag / AgCl / KCl_{salt}/ДМФА или насыщенного каломельного электрода.

ХА регистрировали при потенциалах предельного тока ЭВ соединений во временном интервале 0<t<5c, логарифмический анализ ХА проводили в интервале 1<t<2c. Перед каждым измерением рабочие растворы продували аргоном в течение 15 минут. Водные буферные растворы Бриттона-Робинсона (ББР) или азотной кислоты 0,1 моль/дм³ использовали в качестве фоновых электролитов.

Измерения pH проводили на иономере «Эксперт-pH» («Эконикс-эксперт», Россия) и иономере универсальном ЭВ-74.

Электролиз Триазида осуществляли в двухэлектродной ячейке открытого типа с анодным и катодным отделениями, разделенными катионо-обменной мембраной. Католит – раствор ББР, pH 1,8-2,2, анолит – 15 % H₂SO₄. В качестве катода использовали стеклоуглеродный стакан с изолирующей подставкой, площадь рабочей поверхности $\approx 43,2$ см². Анод - графитовый стержень с геометрической площадью рабочей поверхности $\approx 85,3$ см². Католит перемешивали магнитной мешалкой и продували аргоном. Электролиз проводили в гальваностатическом режиме при плотности тока 5 мА/см². контролировали Изработку исходного вещества электроаналитическими методами. Через раствор пропустили 6 Г/моль, конверсия 85 %. Осадок, выпавший во время электролиза и в результате охлаждения католита, дионизированной водой, растворяли в промывали ацетоне И досуха высушивали под вакуумом.

Электрохимические исследования и измерения спектроскопии электрохимического импеданса проводили в стандартной трехэлектродной ячейке с использованием потенциостата /гальваностата µAutolab Type III (Metrohm, Швейцария) в комплекте с магнитной мешалкой. Синусоидальное возмущение напряжения амплитудой 10 мВ применялось в диапазоне частот 0,1-106,0 Гц при предварительно выбранных потенциалах модельной системы по данным циклических вольтамперограмм $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$.

Индикаторными электродами служили стеклоуглеродный диск, впрессованный во фторопласт диаметром 0,3 см (Metrohm, Швейцария), ТУЭ на основе чернил Circalok Electrodag PF-407C от Acheson (Нидерланды), Lord Corp. Ltd (USA) и ТУЭ модифицированные УНМ. Площадь рабочей $c M^2$. ТУЭ В поверхности индикаторных составляла 0.1 качестве использовали стержень вспомогательного электрода из стеклоуглерода диаметром 0,2-0,3 см (Metrohm, Швейцария). Электродом сравнения служил хлоридсеребряный электрод (Metrohm, Швейцария).

ТУЭ были изготовлены в лаборатории на машине для трафаретной печати TIC-50B (Китай). Углерод содержащую чернила наносили через сетчатый трафарет на полимерную подложку из стекловолокна толщиной 0,035 см (ЗАО «Электроизолит», Россия) в виде полос размером 0,2×3,8 см и со слоем толщиной около 40 мкм. Полосы подвергались термообработке в сушильном шкафу в соответствии с инструкциями производителя чернил и изолированы. Ультразвуковую обработку и центрифугирование УНМ проводили с использованием ультразвуковой ванны с подогревом ПСБ-5760.05 объемом 5,7 дм³ и мощностью 450 Вт (ПСБ-Галс, Россия) и центрифуги высокоскоростной лабораторной с охлаждением SIGMA 3-30K, соответственно.

Морфологию полученных ТУЭ анализировали с помощью растрового электронного микроскопа Merlin (Carl Zeiss, Германия).

Эксперименты по ЭПР проводили с использованием резонатора ER4122SHQE Bruker Elexsys E 500 (Германия) и спектрометра Bruker EMX 6/1, оборудованного прямоугольным резонатором ER4102ST и двухэлектродной выпуклой Pt-Pt-электролитической ячейкой, управляемой потенциостатом Zahner IM-6.

ЭХ генерирование продуктов восстановления Триазида и Триазавирина® концентрацией 0,01 моль/дм³ проводили с добавлением спинового зонда ТМТН 0,01 моль/дм³ в течение 1/5/10/15 минут. После указанных промежутков времени аликвоту раствора отбирали и регистрировали ЭПР спектр. Для контроля количества зондов, возникающих в фоновом растворе аналогичным образом, проводили генерацию продуктов при том же потенциале без добавления аналита. Аликвоты отбирали после 1/5/10/15 мин ЭВ, регистрировали ЭПР спектр.

Подбор эквивалентной электрической схемы импедансных спектров проводили с использованием программного обеспечения NOVA1.11 на основании [51] и полученных данных.

Эксперимент с одновременной генерацией продукта ЭХ восстановления и развертки магнитного поля был использован для обнаружения парамагнитных частиц во время восстановления V. Спектры анион-радикала регистрировали при потенциале -2 В в двухэлектродной Pt / Pt-электрохимической ячейке, помещенной в резонатор спектрометра ЭПР. Период полураспада обнаруженных видов составляет менее 0,01 с.

Все квантово-химические расчеты в области ЭПР выполнены программой ORCA [240-242] версия 5.0.0. включая программный пакет, использующий гибридный функционал плотности РВЕ0 [243] в трехзета-базисе с двумя def2-TZVPP [244] поляризационными функциями И попарно-атомной поправкой на дисперсию со схемой демпфирования Беке-Джонсона [245] во всех расчетах. Везде применялись критерии конвергенции TightSCF. Полная оптимизация геометрии с критериями сходимости TightOpt была проведена для поиска стационарных точек на поверхностях потенциальной энергии. Численные расчеты частот гармоник использовались для получения термодинамических величин и проверки того, что все найденные стационарные точки являются локальными минимумами.

Регистрацию ЭПР спектров со спиновой ловушкой ТМПО [246, 247] проводили после предварительной генерации продуктов восстановления V концентрации 0,1 моль/дм³ в ДМСО в стандартной электрохимической ячейке в течение 15 мин в присутствие спиновой ловушки. Отбирали аликвоту полученного раствора и регистрировали ЭПР спектр.

Типичные настройки спектрометра ЭПР: амплитуда модуляции 3-5 Гс, разрешение 1024 точки или 512 точек, центр поля 3513 Гс, мощность 20 мВт, от двух до тридцати сканирований.

Оптимизацию молекул проводили с параметрами, описанными выше в базисе def2-TZVP в программе Orca 4.2.1. Электронная плотность Низшей Свободной Молекулярной Орбитали (НСМО) у оптимизированной молекулы визуализирована в GaussView 6 [248]. Симуляцию и визуализацию расчетных ЭПР спектров выполняли в пакете EasySpin 5.3

2.2 Реактивы и объекты исследования

Объекты исследования

2-R-6-X-1,2,4-триазол [5,1-*c*][1,2,4] триазин-7 (соединения I-IV), 5-Метил-6нитро-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-*a*]пиримидин (соединения V-VII) (рисунок 2.1) и L-аргинин -синтезированы на кафедре органической и биомолекулярной химии УрФУ имени первого Президента России Б. Н. Ельцина. Структура соединений была определена с помощью ЯМР-спектроскопии, ИК- и УФ-спектроскопии и элементного анализа [249, 250].



Рисунок 2.1 – Структурные формулы соединений I-VII (объекты исследования)

 $\dot{N}H_2$

VII

Для проведения исследования ЭВ веществ использовали водные растворы 0,1 моль/дм³ азотной кислоты марки «х.ч.» от производителей США- Sigma-Aldrich. Принимая во внимание приближенность водной среды к физиологическим условиям, дальнейшие исследования проводили в растворе ББР. Растворы ББР готовили смешением ортофосфорной, уксусной и борной кислот, доводя до необходимого рН гидроксидом натрия согласно [251]. Использовали кислоты и соли марки «х.ч.» от производителей США PanReac без дополнительной очистки. Для приготовления растворов использовали деионизированную воду, полученную на установке ДВС-М/1НА(18)-N от «Медиана фильтр», Россия.

Для проведения исследования в апротонных растворах использовали ацетонитрил марки «о.с.ч» от производителей США PanReac без дополнительной очистки и ДМФА, ДМСО «о.с.ч» от производителей США Sigma-Aldrich с предварительной перегонкой [252] в присутствии наносит. Использовали перхлорат лития, тетрабутиламмония тетрафторбората «о.с.ч» от производителей США Sigma-Aldrich.

Для обнаружения радикала в качестве спинового зонда использовали N-(1-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-ил-)-2-метилпропанамид гидрохлорид (ТМТН) (Новосибирский институт органической химии, Россия) [253, 254] и спиновую ловушку 3,3,5,5-тетраметил-1-пирролин N-оксид (ТМПО) (Sigma-Aldrich кат. номер 244007) [255, 256].

Для разработки ВА методики количественного определения Триазида в фармсубстанции «Триазид» использовали водные растворы стандартного образца (СО) состава субстанции Триазид и фармацевтической субстанции «Триазид», предоставленные разработчиком – Институтом органического синтеза им. И. Я. Постовского УрО РАН. Около 0,5 г (точная навеска) СО или субстанции высушивали при температуре от 96 до 97 °С не менее 5 ч в течение нескольких дней до постоянной массы. Основной водный раствор Триазида с концентрацией 10 г/дм³ готовили из СО и хранили в темноте при комнатной температуре. Рабочие растворы СО Триазида готовили разведением основного раствора. Использовали кислоты и соли марки «х.ч.» от российских производителей, этанол медицинский 95 %, многостенные гофрированные углеродные нанотрубки диаметром 110-170 нм и длиной 5-9 мкм (Sigma-Aldrich, USA) > 98 %, углеродную сажу марки N220 от Cabot Corporation (Ravenna, Italy). Все реактивы использовались без дополнительной очистки.

Для разработки BA методики количественного определения Триазавирина в лекарственном препарате Триазавирин® использовали около 0,025 г содержимого капсулы Триазавирина® (точная навеска) растворяли в деионизированной воде в мерной колбе на 25 см³, доводили объем раствора до метки деионизированной водой и тщательно перемешивали. Аликвоту раствора помещенную в электрохимическую ячейку, рассчитывали образца, В с уравнением регрессии по калибровочной соответствии кривой Триазавирина[®].

2.3 Подготовка, модифицирование поверхности электрода. Приготовление дисперсий углеродных наноматериалов

Электрохимическую активацию поверхности ТУЭ проводили тремя различными способами.

1 способ: выдерживание ТУЭ в растворе ББР (pH = 7,2±0,2). при потенциале +2,0 В в течение 300 с.

2 способ: активацию поверхности ТУЭ проводили десятью ЛЦВА от -1,5 В до +1,5 В со скоростью сканирования 1,0 В/с

3 способ: выдерживание ТУЭ в 1 моль/дм³ растворе Na₂CO₃ при потенциале +1,2 В в течение 300 с.

Модификацию поверхности ТУЭ проводили капельным методом. На рабочую зону ТУЭ дисперсии УНМ наносили в два этапа: по 2 мкл для СВ и СВ-ф и по 5 мкл для УНТ, после чего электроды (ТУЭ/СВ, ТУЭ/СВ-ф и ТУЭ/УНТ) оставляли на воздухе до полного высыхания осадка.

Функционализацию сажи осуществляли следующим способом: 30 мг образца СВ в 60 см³ концентрированной смеси серной и азотной кислот в объемном соотношении 1:1 подвергали ультразвуковой обработке в течение 30 мин с использованием ультразвуковой ванны при температуре 25 °C. После полученную смесь промывали дистиллированной водой с последующим центрифугированием, промывной раствор сливали. Данную процедуру повторяли до достижения промывного раствора над осадком с pH 6,5-7,0. Полученную суспензию СВ-ф в небольшом количестве воды оставляли на воздухе до полного высыхания.

Для *активации VHT* использовали смесь концентрированных серной и азотной кислот в объемном соотношении 3:1; объем активирующей смеси кислот составлял 16 см³; для активации брали навеску VHT 10 мг. Углеродный материал в смеси кислот подвергали ультразвуковой обработке в течение 3 ч с использованием ультразвуковой ванны при температуре 50-60 °C. После процедуры активации полученную смесь промывали дистиллированной водой с последующим центрифугированием для осаждения нанотрубок, промывной раствор сливали. Данную процедуру повторяли 5-6 раз до получения раствора с pH = 3,0-4,0 [40]. Полученную суспензию VHT в небольшом количестве воды оставляли на воздухе до полного высыхания.

Для *получения дисперсий УНМ* водно-спиртовые (1:1) суспензии УНТ, СВ и СВ-ф подвергали ультразвуковой обработке в течение 30 мин.

ГЛАВА 3 МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ ТРИАЗАВИРИНА®

3.1 Электрохимическое восстановление соединений 2-R-6-X-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]триазин-7-онов

Для установления природы сигналообразующего процесса было изучено ЭХ поведение ряда веществ класса 2-R-6-X-4,7-дигидро1,2,4-триазоло[5,1с][1,2,4]триазины-7 (соединения I-IV), содержащих и не содержащих нитрогруппу методом циклической вольтамперометрии (рисунок 2.1). Соединения I-IV в кислой среде при рН 2 ЭВ в две стадии (рисунок 3.1). Из представленных ВА на рисунке 3.1 видно, что пики ЭВ в области потенциалов от -0,23 до -0,29 В принадлежат соединения I, II, III имеющим в структуре нитрогруппу. На ВА соединения IV катодных пиков в данном интервале потенциалов не наблюдается.



Рисунок 3.1 – ЦВА растворов соединений (C = $5 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³) в растворе ББР (pH 2), vs Ag/AgCl/KCl_{salt}, v = 0,050 B/c:

синяя линия –I, оранжевая линия –II, серая линия –III, желтая линия – IV

Потенциалы восстановления первых стадий ЭВ и эффективное число электронов рассчитано как отношение тока пика вещества к току пика одноэлектронного восстановления ферроцианида калия в тех же условиях представлены в таблице 3.1. Таблица 3.1 – Потенциалы пика (E_p) и эффективное число электронов (n) первой стадии ЭВ соединения **I-IV** (C = 5·10⁻³ моль/дм³) в растворе ББР pH = 2, полученные методом ЦВА, v = 0,050 B/c

Соелинение	ББР рН 2				
Coedimente	E _p , B vs Ag/AgCl/KCl _{salt}	n			
Ι	-0,29	2,95			
II	-0,27	3,70			
III	-0,23	3,16			
IV	-0,86	2,00			

Следует отметить, что соединения I и III представляют собой соли, образованные катионом Na⁺ и гетероциклическими анионами, восстановление которых должно было бы протекать при более отрицательных потенциалах по сравнению с II. Как было установлено [257] при изучении полярографии близких по структуре молекул, наличие или отсутствие -SMe заместителя заметно не влияет на потенциал ЭВ нитрогетероциклов. Поэтому можно полагать, что сходство ЭХ поведения соединений I, II и III в растворах при pH 2 свидетельствует о том, что гетероциклические анионы соединений I и III протонируются в кислой среде и на электроде ЭВ не гетероциклический анион, а соответствующая протонированная частица.

Известно [258], что нитросоединения, имеющие электроотрицательные заместители в структуре, легко восстанавливаются в кислых средах. Первично образующийся анион-радикал нитросоединения в кислой среде редко стабилен и чаще всего протонируется по нитрогруппе, вследствие этого потенциал ЭВ сдвигается в положительную область [258]. То есть первый катодный пик для соединений **I**, **II**, **III** (рисунок 3.1) может быть связан с ЭВ нитрогруппы. Значения разности потенциала пика E_p и потенциала при половинном значении тока $E_{1/2}$ составляет 56, 65, 58 и 95 мВ для соединений **I**, **II**, **III** и **IV** соответственно. При изменении направления развертки от потенциала предельного тока первой стадии на анодной ветви ЦВА отсутствует пик окисления анион-радикала даже при высоких скоростях сканирования потенциала (v>10 B/c). Эти данные свидетельствуют, что первые стадии ЭВ всех исследованных соединений необратимы в данных условиях.

Для подтверждения высказанных предположений было проведено исследование ЭВ соединений I-III в неводной среде ДМФА (рисунок 3.2).



Рисунок 3.2 – ЦВА растворов соединений (C=5 \cdot 10⁻³ моль/дм³) в ДМФА (0,1 моль/дм³ Bu₄NBF₄), v = 0,05 B/c, vs Ag/AgCl/KCl_{salt}: зеленая линия – I, черная линия –

II; красная линия – III; желтая линия –II с добавлением эквивалента NaOH

На ВА, зарегистрированных в апротонном растворителе, потенциалы первых катодных пиков соединений I и III совпадают, но имеют значение на 700 мВ отрицательнее, чем для II, что можно объяснить отрицательным зарядом восстанавливающихся частиц в случае I и III (рисунок 3.2). Анодные пики на реверсивной части ВА несколько отличаются по потенциалу, что, вероятно, связано с влиянием заместителя CH₃S-, присутствующим в структуре молекулы I, на потенциал окисления образующихся анионов. Показано, что при добавлении эквивалентного количества щелочи NaOH к раствору II в ДМФА, потенциал пика его ЭВ становится равным -1,20 В, при этом ЦВА практически совпадает с ЭВ I (рисунок 3.2 желтая линия). Следовательно, можно полагать, что соединения I и III в апротонной среде восстанавливаются в ионном виде, вероятнее всего, в виде ионной пары с катионом Na⁺.

Необходимо подчеркнуть, что первая стадия ЭВ соединений I–III в ДМФА необратима в интервале концентраций 1-10·10⁻³ моль/дм³. То есть первичный продукт ЭВ даже в апротонном ДМФА вступает в последующие реакции с высокой скоростью. Наличие двух молекул воды в структуре исходного соединения не позволяет считать, что ЭВ I протекает в абсолютно сухой среде, поэтому можно полагать, что именно вода является участником превращений первично образующихся продуктов восстановления. Добавление доноров протонов (бензойной, уксусной кислот или фенола) раствору соединения I в ДМФА приводит к росту тока первого пика. Причем увеличение тока происходит тем в большей степени, чем сильнее добавленная кислота. Этот факт еще раз может указывать на то, что в присутствии доноров протонов протонов и реакцией анион-радикала соединения I.

Таким образом, рассмотрено влияние заместителей и сопутствующих ионов в растворе на ток и потенциал восстановления соединения **I**. Следующей важной целью работы являлось исследование кинетики электродных реакций.

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. Форма ЦВА соединения I (рисунок 3.3) при изменении направления развертки при потенциале предельного тока первой стадии, аналогична пикам на кривой ЭВ нитробензола в кислой среде. Пики окисления-восстановления на анодной части ВА после случаях нитро-1,2,4-триазола реверса потенциала, как и в [259] или мононитробензолов [43], объяснить можно окислением гидроксиламинопроизводного до нитрозосоединения (5).

Для установления кинетических параметров процесса ЭХ поведение I было изучено с помощью методов циклической вольтамперометрии, хроноамперометрии и ВДЭ. Использование различных методов исследования позволило рассчитать количество электронов принимающих участие на первой стадии ЭВ соединения I (таблица 3.2).



Рисунок 3.3 – ЦВА соединения I (2,9·10⁻³ моль/дм³) в растворе ББР pH=1,8, v=0,1 В/с, vs НКЭ.

Как видно из таблицы 3.2, значение электронов n_e (ВДЭ) несколько ниже значения четырех. Как показали расчеты этой величины при ω от 600 до 1000 об/мин, значения n_e не зависят от скорости вращения электродов и составляют в среднем 3,68. Величина предельного тока (I_d) ЭВ соединения I при потенциале -0,50 B, на ВА линейно меняется с увеличением $\omega^{0,5}$ и график этой зависимости проходит через начало координат (рисунок 3.4), что должно свидетельствовать о диффузионном характере ЭВ в данных условиях. Однако зависимость I_p ЭВ на ЦВА от $v^{1/2}$ не линейна (рисунок 3.5), причем степень отклонения от прямой зависит от кислотности среды.

Таблица 3.2 – Средние значения рассчитанного числа электронов n_e , участвующих в ЭВ K₃[Fe(CN)₆] и первой стадии соединения I (n = 5, P = 95 %)

Соединение	XA				ЦВА			ВДЭ		
$(C = 5 \cdot 10^{-3})$	I _{1 сек} ,	$\int_{1}^{2} O_{1}$	n_e^1	n_e^2	n_e^3	$I_p,$	n_e^4	n_e^5	$I_p^*,$	n_e^6
моль/дм ³ ,	мА	уг су Кл				мА			мΑ	
раствор ББР		101								
pH = 2)										
Ι	-0,56	$(4,42\pm0,03)$ \cdot 10 ⁻⁴	3,96	4,08	4,17	-81,5	2,95	3,20	1,07	3,68
$Fe(CN)_{6}^{3-}/$	-0,14	$(1,02\pm0,02)\cdot10^{-4}$		1,02	_	-23,6	_	0,97	0,29	0,98
$Fe(CN)_{6}^{4}$										

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 K₃Fe(CN)₆ при ω = 600 об./мин.



Рисунок 3.4 – Зависимость предельного тока ЭВ соединения I (C=5 \cdot 10⁻³ моль/дм³) от $\omega^{0,5}$ в растворе ББР pH = 2, v = 0.05 B/c



Рисунок 3.5 – Изменение тока первого пика ЭВ соединения I (5·10⁻³ моль/дм³) от *v*^{1/2} в растворе ББР при рН: синяя линия – рН 2, оранжевая линия – рН 7, серая линия – рН 12, пунктирная линия – теоретически рассчитанный уровень тока по уравнению Рендлса–Шевчика для необратимых электрохимических реакций для 4 е

Уменьшение тока пика для щелочных сред (pH>10) с ростом скорости развертки потенциала может объясняться [43] недостаточной скоростью протонирования анион-радикала вследствие низкой концентрации протонов. Как видно из рисунка 3.5, в нейтральной области pH уровень тока пика ЭВ соединения I отклоняется от теоретически рассчитанного по уравнению Рендлса-Шевчика для необратимых процессов [260] лишь при высоких значениях $v \ge 1$ B/c. А при pH 2 ток пика заметно ниже, чем в нейтральной среде,

даже при невысоких v. Еще одним фактом, свидетельствующим о кинетическом контроле реакции в данных условиях, может являться логарифмический анализ ХА при E =-0,50 В. Наклон графика lg(I)-lg(t) в интервале 1 < t < 2c равен -0,53, что является несколько выше значения, характерного для ЭХ реакции, контролируемой диффузией (-0,50) [260]. Эти результаты можно объяснить, исходя из осно́вных свойств соединения I и подвижности водорода при атоме азота кольца. Влияние кислотности среды на параметры ЭВ соединения I представлено на рисунке 3.6.



Рисунок 3.6 – Зависимость потенциала (А) и тока (Б) первого пика ЭВсоединения I (С = 5 ·10⁻³ моль/дм³) от значения pH в растворе ББР, v = 50 мB/c, 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

Из рисунка 3.6 следует, что кислотность среды заметно влияет как на величину тока пика ЭВ соединения I, так и на его потенциал. Потенциал первой катодной стадии в кислой среде (2<pH<6) резко сдвигается в отрицательную область с увеличением значения pH, $\Delta E/\Delta pH=77$ мB, в нейтральной и слабощелочной средах значение $\Delta E/\Delta pH$ составляет 24 мB, а в щелочной, 10<pH<12, потенциал пика практически не меняется. Наличие зависимости потенциала от pH однозначно свидетельствует об участии протонов в ЭХ процессе до переноса электронов и одновременно с ним. При этом протонирование возможно не только по кислороду нитрогруппы, участвующей в ЭХ реакции при данных потенциалах, но и по имеющимся в молекуле другим Величина рКа реакционным центрам, например атомам азота колец. спектрофотометрически, Триазавирина®, определенная равна 3,11, следовательно, в зависимости от рН среды, он может находиться либо в ионизированной, либо в протонированной форме. Поскольку его ЭВ в данных условиях необратимо, из графика зависимости потенциала от рН вычислить число протонов, участвующих в суммарном процессе, не представляется возможным. Однако, рассматривая влияние рН на ток и потенциал первого катодного пика можно предполагать наличие кислотно-основных равновесий с участием как пиразинового (в положении 4), так и азольного (положение 3) атомов азота в субстрате (рисунок 2.1).

Как видно из рисунка 3.6, ток первого катодного пика в интервале значений pH от 2 до 5 составляет величину на 10-15 % меньшую, чем теоретически рассчитанный уровень тока четырехэлектронного ЭВ. В нейтральной среде (pH 6-10) ток пика близок к этому уровню и падает с ростом значений pH в щелочной области. В щелочной среде вследствие недостатка доноров протонов скорость протонирования промежуточных продуктов ЭВ замедляется, ток пика становится пологим и заметно меньше по току, чем в кислых средах. При этом также, как и в кислых средах на реверсе при потенциалах первой стадии ЭВ отсутствует пик окисления продукта переноса одного электрона – дианион-радикала.

Поскольку субстратом ЭВ в данных условиях может являться, как показано выше, не ионная, а протонированная форма соединения I, следует восстановления с рассматривать механизм точки зрения реакционной способности активированных нитроолефинов анион-радикалов или нитрогетероциклических соединений [261, 262]. Вероятно, протонирование первичного продукта восстановления соединения I в интервале pH 2-4 не является лимитирующей стадией суммарного процесса. По аналогии с результатами ЭХ исследования нитро-1,2,4-триазола [191, 263], лимитирующей N.Nстадией дегидратацию следует считать медленную

дигидроксипроизводного, что приводит к уменьшению наблюдаемого числа электронов, участвующих в ЭВ, в соответствии со схемой на рисунке 3.7.

N,N-Образующееся при переносе двух электронов дигидроксиаминосоединение (а) в случае рассматриваемых структур может быть стабилизировано внутримолекулярными водородными связями (b), что может приводить к снижению скорости дегидратации. Кроме того, в результате реакции дегидратации а, в классической схеме, приводящей к образованию нитрозосоединения с, может образоваться соответствующий оксим d. Поскольку оксимы [43] могут проявлять ЭХ активность при потенциалах, более отрицательных, чем нитрозопроизводные, при потенциалах первой стадии ЭВ субстрата происходит снижение наблюдаемого числа электронов (таблица 3.2). Естественно, снижение ne проявляется в наибольшей степени при высоких скоростях развертки потенциала, то есть при исследовании реакции методами циклической вольтамперометрии и ВДЭ, в то время как значения ne, полученные методом хроноамперометрии близки к значению 4 (таблица 3.2).



Рисунок 3.7 – Схема ЭВ соединения I в кислой среде

Полученные данные свидетельствуют о том, что при потенциалах первой стадии ЭВ соединение I при pH от 2 до 6 основным направлением превращений является четырехэлектронная схема ЭВ нитрогруппы. Отличительной особенностью восстановления можно считать замедленную дегидратацию гидроксиаминопроизводного вследствие возможности внутримолекулярных

переносов протонов между атомами азота кольца и кислорода нитрогруппы. Вторая стадия его ЭВ (рисунок 3.1) протекает при более отрицательных потенциалах и, вероятно, отвечает дальнейшему восстановлению гидроксиламинов, образующихся на первой ступени электропревращения.

Для того, чтобы практически исключить реакции протонирования продуктов ЭВ соединения I и зафиксировать первичные продукты переноса необходимо рассмотреть ЭХ-поведение электрона, этого соединения В апротонном ДМФА. Анализ зависимости тока первого пика на ВА от концентрации и *v* привел к выводу о кинетическом характере ЭВ в данных условиях. При изменении направления развертки потенциала при потенциалах первой стадии на ВА отсутствовал предельного тока анодный пик, соответствующий катодному ЭВ соединения I вплоть до v = 10 B/c, если концентрация исходного соединения составляла 1-16·10⁻³ моль/дм³. Но при концентрации исходного соединения 0,1-0,4 · 10⁻³ моль/дм³ на реверсе появлялся небольшой анодный пик при -1,28 В (рисунок 3.8).



Рисунок 3.8 – ЦВА раствора соединения I (0,36·10⁻³ моль/дм³) в ДМФА (0,1 моль/дм³ Ви₄NBF₄) на СУЭ при *v* = 1 В/с, *vs* НКЭ

Разность потенциалов катодного и анодного пиков составляет около 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 по реакции:

 $(Na^+...HetNO_2) 2H_2O + e \rightarrow (Na^+...HetNO_2) 2H_2O \rightarrow$

 \rightarrow (Na⁺...HetNO₂H⁻.) H₂O OH⁻(11)

Таким образом, полученные ЭХ данные свидетельствуют о том, что первичные продукты переноса электрона на гетероциклическую молекулу соединения I нестабильны не только в протонодонорной, но и в апротонной среде.

Поскольку известно [28], что именно радикальные частицы, образующиеся из лекарственных средств, обладают активностью в отношении бактерий или вирусов, была предпринята попытка зафиксировать ЭПР-спектр электрохимически генерированного нестабильного анион-радикала Триазавирина®.

3.2 ЭПР-спектроскопия продуктов электровосстановления Триазавирина®

Предварительное электрохимическое генерирование метаболита при потенциале максимума тока не привело к существенному увеличению парамагнитной активности продукта ЭХ реакции. По-видимому, продукт восстановления радикальной природы слишком быстро вступает в последующие реакции, что не дает возможности надежно зафиксировать его образование не только в кислых средах, но и при pH 12.

Спиновый зонд класса гидроксиламина, а именно, ТМТН, использовался для обнаружения предполагаемых короткоживущих анион-радикал. Продукт восстановления соединения I (5·10⁻³ моль/дм³) электрогенерировали в электрохимической ячейке в присутствии спинового зонда ТМТН (5·10⁻³ моль/дм³) и аликвоты полученного раствора переносился в ЭПР-резонатор для записи спектров.

Интенсивность ЭПР-сигнала увеличивается с увеличением pH (рисунок 3.9), что, скорее всего, связано с малым временем жизни анион-радикала в кислой среде. В этом случае количество парамагнитных форм линейно увеличивается с увеличением количества электричества, затрачиваемого на ЭВ соединения I (рисунок 3.9, Б). Обнаруженный ЭПР-сигнал состоял из трех спектральных линий. Расщепление линии равно 17 Гс, g-фактор равен 2,0043. Этот спектр полностью соответствует ЭПР-спектру нитроксильного радикала (спинового зонда ТМТН), что подтверждает радикальную природу продукта ЭВ I. Для исключения образования радикалов при электрогенерации спинового зонда ТМТН был проведен холостой эксперимент без добавления соединения I. При этом радикал ТМТН, образующийся непосредственно при электрогенерации, не обнаружен. Таким образом, можно предположить, что образование стабильного радикала нитроксила является результатом взаимодействия спинового зонда ТМТН и нестабильного радикала соединения I [265, 266].



Рисунок 3.9 – ЭПР-спектры продукта взаимодействия спиновой ловушки ТМТН с соединением I (C = 5·10⁻³ моль/дм³) после ЭВ: А: синяя – pH 2, оранжевая – pH 7, серая – pH 8; Б: в растворе ББР (pH 2), время проведения электролиза: синяя – 0 мин, красная – 20 мин, зеленая – 40 мин и желтая – 60 мин; ЭПР-спектры продукта приведены после вычитания фоновой линии

Полученные экспериментальные данные могут свидетельствовать об образовании радикалов в растворе ЭХ ячейки соединения I при потенциале восстановления. ЭВ сопровождалось пропорциональным увеличением

количества предполагаемых радикалов и количества электричества, потребляемого в ЭХ реакции. Таким образом, можно предположить, что промежуточные нестабильные частицы могут образовываться за счет ЭХ генерации соединения I в водной среде.

Так как ЭПР-спектры зондов дают лишь косвенное доказательство наличия интермедиата радикальной природы, следующей задачей исследования являлось идентификация продуктов восстановления первой ступени, которые могут указать на наличие анион-радикалов. С этой целью провели препаративный электролиз Триазавирина® при постоянном токе потенциала первой волны восстановления. Выделенные продукты определяли методом ВЭЖХ в тандеме с МСВР. Продукты представляют собой смесь 6 соединений (таблица 3.3).

По данным, представленным в [42], для ArNO₂ характерен радикальный механизм образования продуктов димерного строения. Наличие продуктов C-F и зарегистрированные ЭПР-сигналы аддукта спин-зонда ТМТН с продуктом ЭВ соединения I, делают возможным предположение об образовании короткоживущего AP в процессе ЭВ -NO₂, рассматриваемого ряд соединений. На основе полученных данных и изученной литературы можно предположить возможный механизм протекания процесса ЭВ Триазавирина® (рисунок 3.10).

Соединение	Время удержани	Молекулярная формула	Теоретическая масса	Практическая масса	Предлагаемая химическая структура
A	я (мин) 1,27	C5H6N6OS	199,0400	199,0397	S NNN NH2
В	1,37	C5H5N5OS	184,0288	184,0288	
С	1,45	$C_{10}H_9N_{11}O_2S_2$	380,0462	380,0455	
D	1,65	$C_{10}H_{10}N_{12}O_2S_2$	395,0568	395,0564	
E	1,83	$C_{10}H_8N_{12}O_2S_2$	393,0413	393,0407	
F	1,88	$C_{10}H_8N_{12}O_3S_2$	409,0361	409,0357	

Таблица 3.3 – Данные ВЭЖХ/МСВР смеси продуктов ЭВ Триазавирина®



Рисунок 3.10 – Вероятная схема электровосстановления Триазавирина®

Выводы к 3 главе

Основным направлением превращений Триазавирина® на первой стадии (pH 2-6) является необратимая четырехэлектронная схема восстановления нитрогруппы. Лимитирующей стадией является медленная дегидратация гидроксиаминопроизводного вследствие внутримолекулярных переносов протонов между атомами азота гетероцикла и кислорода нитрогруппы. Реакция сопровождается образованием анион-радикала, промежуточными продуктами реакции восстановления являются димеры.

ГЛАВА 4 МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИАЗАВИРИНА®

Анализ литературных данных в 1 главе и полученные результаты исследования, описанные в главе 3, термодинамических и кинетических характеристик, а также диапазона линейной зависимости величины тока первой стадии ЭВ Триазавирина® от концентрации, зарегистрированной на СУЭ (от 10^{-4} до $1,6\cdot10^{-2}$ моль/дм³, I = -1,93 °C, R² = 0,9977 (в ЛВА)) позволили разработать методику количественного ВА определения Триазавирина®. На основании результатов исследования в качестве аналитического сигнала был выбран максимальный ток первого пика восстановления нитрогруппы (диапазон потенциалов от 0,0 до -0,4 В). В качестве рабочей среды была выбрана 0,1 моль/дм³ HNO₃.

Сравнение величины, формы и воспроизводимости АС Триазавирина® на разных электродах (таблица 4.1) показало, что наибольшая величина и лучшая воспроизводимость АС достигается при использовании ТУЭ Electrodag. Этот электрод был выбран в качестве рабочего.

Таблица 4.1 – Сравнение АС Триазавирина® для разных электродов, зарегистрированных в растворе 0,1 моль/дм³ HNO₃ + 40 мг/дм³ Триазавирина® в КвВ режиме при *v* 0,06 B/c, шаге развертки 6 мВ, амплитуде импульса 20 мВ и частоте 50 Гц. (*n* = 18, *P* = 95 %)

A	CVD	ТУЭ	ТУЭ	
Аналитический сигнал	CyJ	«Lord»	«Electrodag»	
Потенциал пика, мВ	-182 ±1	-246 ±3	-150 ±2	
Полуширина пика, мВ	67 ±1	107 ±2	69 ±1	
Ток пика, мкА	$4,160 \pm 0,005$	3,910 ± 0,015	$7,050 \pm 0,007$	
% RSD	0,3	0,8	0,2	

4.1 Выбор условий регистрации вольтамперограмм

Сравнение различных вариантов вольтамперометрии, представленных на рисунке 4.1, позволило сделать вывод о том, что оптимальным при работе с Триазавирином[®] является КвВ-режим в кислой среде. В этом случае пик соединения I симметричен и может быть измерен с высокой точностью, в отличие от ЛВА, а величина АС выше в два раза по сравнению с ДИП-режимом. Поэтому дальнейшие исследования проводили в КвВ-режиме.



Рисунок 4.1 – ВА, зарегистрированные на ТУЭ (Electrodag) на фоне 0,1 моль/дм³ HNO₃ без и с добавлением 40 мг/дм³ Триазавирина® при различных вариантах ВА: ЛВА (А), ДИП (Б), КвВА (В). *v* = 0,06 В/с, шаг развертки 6 мВ, амплитуда импульса 20 мВ, частота 50 Гц

Предварительная выдержка электрода в перемешиваемом растворе с целью возможного адсорбционного концентрирования Триазавирина® на поверхности ТУЭ в течение 5-120 с в интервале потенциалов 0,2-1,0 В, в котором аналит не подвергается ЭХ превращениям, не оказывает сколь-нибудь существенного влияния на его АС. Это позволяет исключить стадию предварительного накопления исследуемого вещества и использовать метод прямой ВА для его определения.

4.2 Оптимизация параметров квадратно-волновой вольтамперометрии

При частоте 50 Гц и шаге развертки 6 мВ АС Триазавирина® линейно растет с увеличением амплитуды импульса в области 2-50 мВ. Линейная зависимость тока его ЭВ от частоты импульса при амплитуде импульса 20 мВ и шаге развертки 6 мВ наблюдается в области 15-150 Гц, после чего рост АС прекращается (рисунок 4.2). При этом в интервале частот от 50 до 150 Гц прирост сигнала по абсолютной величине не значителен (не превышает 9 %), а базовая линия остаточного тока растет на порядок, что существенно уменьшает соотношение полезный сигнал/остаточный ток, затрудняет регистрацию пика аналита и ухудшает воспроизводимость результатов измерения. В дальнейших исследованиях использовали как наиболее приемлемую частоту 50 Гц.



Рисунок 4.2 – Влияние частоты импульса на АС Триазавирина® (С = 40 мг/дм³). Параметры развертки: *v* = 0,06 B/c, шаг 6 мB, амплитуда и 20 мВ

Влияние скорости развертки потенциала на величину максимального тока ЭВ 40 мг/дм³ I изучали в области 2-240 мВ/с при частоте 50 Гц с амплитудой импульса 50 мВ. Установлено, что величина тока восстановления I растет с увеличением скорости развертки.
4.3 Построение калибровочной кривой Триазавирина

При оптимальных условиях регистрации ток пика линейно растет от концентрации Триазаврина® в растворе в интервале 0,1-80,0 мг/дм³ (рисунок 4.3 А). Площадь пика восстановления линейно зависит от концентрации аналита в более широком интервале 0,1-180,0 мг/дм³ (рисунок 4.4 Б). Предпочтительнее использовать в качестве АС площадь пика.



Рисунок 4.3 – Зависимость площади и высоты пика восстановления **I** от его концентрации в растворе 0,1 моль/дм³ HNO₃. Параметры развертки: *v* = 0,120 B/c, шаг 12 мB, амплитуда импульса 50 мB, частота импульса 50 Гц

Из рисунка 4.4 видно, что при содержании в растворе 0,1 мг/дм³ Триазавирина® удается зарегистрировать четкий и хорошо выраженный пик его восстановления. Полученные результаты показывают, что AC линейно зависит от концентрации в интервале 0,1-180,0 мг/дм³ (таблица 4.2) Это позволяет использовать метод стандартных добавок для определения Триазавирина® в режиме прямой КвВ ВА. Предел обнаружения, рассчитанный по калибровочной кривой, составляет 0,04 мг/дм³. МОК (0,12 мг/дм³) почти в 2 раза ниже по сравнению с методом ВЭЖХ со спектрофотометрической детекцией [267].



Рисунок 4.4 – КвВВА Триазавирина® А: для низких концентраций а – фоновый раствор, b – 0,1 мг/дм³, с – 0,2 мг/дм³, d – 0,5 мг/дм³, е – 1,0 мг/дм³, f – 2,0 мг/дм³. На вставке приведен соответствующий ГГ; Б: для 20-180 мг/дм³ с шагом 20 мг/дм³

Таблица 4.2 – 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	3,01.10-4
СО отрезка	8,38.10-4
ПрО / (мг/дм ³)	0,04
МОК / (мг/дм ³)	0,12

4.4 Валидация методики определения Триазавирина

Валидацию методики проводили с учетом рекомендаций [268].

4.4.1 Специфичность

Для специфичности проверки методики сравнивались значения количественного вольтамперометрического определения Триазавирина®, полученные по методу «введено – найдено», при исследовании стандартных 100 % от Триазавирина[®], содержащих ожидаемого растворов уровня концентраций определяемого вещества (50 мг/дм³) на фоне 0,1 моль/дм³ HNO₃ (раствор А) и в растворе плацебо (раствор Б), содержащем вспомогательное вещество (стеарат кальция) и идентифицированную примесь в концентрациях, соответствующих составу лекарственной формы (0,8 % и 1,0 % соответственно). Исследование каждого раствора проводили в 6 параллелях. Метрологические характеристики полученных результатов представлены в таблице 4.3.

	Метрол	огические
	характеристи	ки количественного
Показатель	определения	Триазавирина в
	растворах (n =	= 6, P = 95 %):
	Α	Б
Среднее значение recovery (R) %	99,8	100,2
Стандартное отклонение	0,54	0,64
Коэффициент вариации, %	0,5	0,6
t -критерий	t эксn=(),26
	t табл =	$=2,23 \ (f=10)$
F критерий	F эксп =	= 1,10
	F табл :	=5,05 ($f_1 = f_2 = 5$)

Таблица 4.3 – Результаты проверки специфичности методики

Сравнение полученных результатов анализа в обоих растворах по F и t критериям показало, что рассчитанные F и t величины не превышают

табличные (теоретические) значения. Это указывает на отсутствие статистически значимого влияния матрицы пробы на результат анализа.

4.4.2 Правильность

Правильность методики оценена на растворах стандартного образца Триазавирина®, содержащих 50, 100 и 150 % от ожидаемого уровня концентраций определяемого вещества по методу «введено-найдено».

Стандартный образец Триазавирина® в количестве 50, 100 и 150 % от ожидаемого уровня в 50 мг/дм³ вводили в матрицу пробы (раствор В, плацебо). Показатель правильности рассчитан для каждого уровня концентраций Триазавирина®. В итоге исследовались 3 концентрации растворов с 3-кратным определением для каждой концентрации. Оценка проводилась путем расчета показателя правильности и доверительного интервала его среднего значения, стандартного отклонения (СО), коэффициента вариации (RSD, %) Полученные результаты представлены в таблице 4.4. Как видно из таблицы 4.4, показатель правильности для различных уровней концентраций близок к 100 %. Коэффициент вариации менее 1,0 %. Доверительный интервал среднего результата анализа включает 100 % значение.

С _{Триазавирин®} , %	50,0	100,0	150,0	R cp $\pm \Delta R$, %	СО	RSD, %
R, %	100,4	100,4	100,4			
	98,8	99,0	99,7	$99,9\pm0,7$	0,70	0,7
	99,2	100,6	100,3			

Таблица 4.4 – Оценка правильности методики (n = 9, P = 95 %)

4.4.3 Прецизионность

Сходимость (повторяемость) методики была оценена по результатам 6 определений для образца с содержанием анализируемого вещества, близким к

номинальному. Каждый испытуемый водный раствор стандартного образца Триазавирина® готовился из точной навески. Результат единичного определения был получен по методу стандартной добавки.

Внутрилабораторную прецизионность методики оценена в условиях работы одной лаборатории: разные дни, разные исполнители. Полученные результаты приведены в таблице 4.5.

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

Таблица 4.5 - Оценка прецизионности (n = 6, P = 95 %)

Разработанная методика анализа соответствует критериям прецизионности для электроанализа [268], является правильным и селективным, что позволяет использовать его для анализа лекарственных форм Триазавирина® на содержание основного вещества.

4.5 Определение Триазавирина® в капсуле

Разработанная методика был успешно применена для анализа капсул Триазавирина® с минимальной подготовки пробы к анализу (растворение точной навески в воде). Анализ проведен согласно процедуре, описанной в экспериментальной части. Результаты лекарственной формы. анализа полученные методами вольтамперометрии и ВЭЖХ приведены в таблице 4.6. 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 сколь-нибудь существенных различий между результатами обоих методов. Между методами не наблюдается существенных различий по точности. (RSD не превышает 1 %).

Таблица 4.6 – Применение предложенного ВА метода для определения Триазавирина® в капсулах (n = 6, P = 95 %)

Заявленное содержание (250,0 мг	Вольтамперометрия	ВЭЖХ	
Триазавирина® на капсулу)			
Найденное содержание Триазавирина®	$249,5\pm2,5$	$250,5 \pm 2,3$	
(мг на капсулу)			
RSD, %	0,94	0,90	
t -критерий	t эксn=0,26		
	t табл =2,23 (f =	10)	
F критерий	F эксп = 1,10		
	F табл =5,05 (f ₁ =	$f_2 = 5)$	

Выводы к 4 главе

Разработан вольтамперометрическая методика определения действующего вещества в препарате Триазавирин® на ТУЭ. Замена СУЭ на ТУЭ позволила кардинально упростить анализ, сократить его время в 4-5 раз и снизить его стоимость. Результаты анализа лекарственной формы Триазавирина®, полученные вольтамперометрии и ВЭЖХ-методами показали, что между методами не наблюдается существенных различий по точности.

ГЛАВА 5 МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО ПРЕВРАЩЕНИЯ ТРИАЗИДА

5.1 Электрохимическое восстановление соединений 5-R-6-X-7-оксо-1,2,4-триазоло[5,1-с][1,2,4]пиримидинидов

Для исследования электропревращений 5-R-6-X-7-оксо-1,2,4триазоло[5,1-с][1,2,4]пиримидинидов было изучено ЭХ поведение ряда веществ класса 5-R-6-X-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5-а]пиримидинида (соединения V-VII), содержащих и не содержащих нитрогруппу и 1-аргинина (рисунок 2.1) методом циклической вольтамперометрии (рисунок 5.1).



Рисунок 5.1 – ЦВА соединений V-VII и L-аргинина, зарегистрированные на СУЭ в растворе 0,1 моль/дм³ HNO₃ без и после добавления 5·10⁻³ моль/дм³

Из представленных ВА видно, что пики ЭВ в области потенциалов от -0,65 до -0,45 В принадлежат соединениям V, VI, имеющим в структуре нитрогруппу. На ЦВА соединения VII и 1-аргенина катодных пиков в данных интервалах потенциалов не наблюдается. Исследованные соединения V и VI в восстанавливаются необратимо 0.1 моль/дм³ HNO₃ при потенциалах соответственно -0.71 -0.56 Β, сопоставимых И с потенциалами гетероциклических нитросоединений, имеющих в своей структуре нитрогруппу [29, 43, 45, 269]. Следовательно, полученные катодные сигнал, вероятно, обусловлены протеканием процесса ЭВ нитрогруппы, связанной с сопряженной ароматической системой.

Значение потенциала ЭВ соединения V в буферном растворе при рН 2 составляет -0,63 В. Сравнение ЦВА соединения V с ранее изученным I в буферном растворе показало, что последний восстанавливается в тех же условиях (ББР рН 2) на 250 мВ положительнее (рисунок 5.2). Различие ЭΒ потенциалов связано, вероятно, с наличием дополнительного электроотрицательного атома азота в шестичленном кольце конденсированной гетероциклической системы соединения I (рисунок 2.1). Еще одним отличием ЭХ поведения является тот факт, что І в кислых и нейтральных средах ЭВ в две последовательные необратимые стадии, в то время как необратимый катодный пик соединения V является единственным до потенциала разряда фона.



Рисунок 5.2 – ЦВА соединений (C = $5 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³) на СУЭ, v = 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

Как видно из рисунка 5.2, на анодной части ВА после изменения направления развертки потенциала наблюдаются необратимые пики продуктов ЭВ соединений V и VI зарегистрированных в азотной кислоте при потенциалах +0,68 и 0,67 В соответственно. Вероятно, при данных потенциалах окисляется анион соответствующего гидроксиламино производного. Близость значений этих потенциалов окисления может указывать на образование близких по структуре продуктов их ЭВ.

При сравнении ЦВА соединений V и VI (рисунок 5.2) было замечено, что токи их ЭВ практически равны, а потенциалы ЭВ этих соединений в 0,1 моль/дм³ HNO₃ заметно отличаются приблизительно на 150 мВ, в то время как в кислой среде оба соединения должны протонироваться и восстанавливаться в одной и той же протонированной форме. Вероятно, различие в потенциалах ЭВ соединений V и VI связано с влиянием ионов Na⁺: в раствор вместе с молекулой VI вносится $5 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ Na⁺, а в случае ЭВ соединения V объемный катион аминокислоты должно быть мало влияет на распределение электронной плотности в анион-радикале соединения V. В растворе ББР при pH 2 наблюдается некоторое уменьшение тока пика и небольшой сдвиг потенциала ЭВ соединения V в положительную область (-0,63 В) по сравнению с раствором HNO₃, возможно, связаны с присутствием ионов Na⁺.

Таким образом было рассмотрено влияние заместителей и сопутствующих ионов в растворе на ток и потенциал восстановления соединения V. Следующим этапом исследования являлось изучение кинетики электропревращения Триазида.

Подобно исследованиям соединения I, для V было рассчитано эффективное число электронов, участвующих в электропревращении (таблица 5.1). Значение эффективного числа электронов n_e первой стадии ЭВ соединения V приближается к величине 6 электронов. Можно полагать, что промежуточно образующиеся продукты его ЭВ ЭХ активны близких потенциалах, в отличие от продуктов электропревращения соединения I, которые восстанавливаются при более отрицательных потенциалах.

Таблица 5.1 – Средние значения рассчитанного числа электронов n_e , участвующих в ЭВ K₃[Fe(CN)₆] и соединения V (n = 5, P = 95 %)

Соединение	XA					ЦВА		ВД	ĘЭ	
(C = 5 · ·10 ⁻³ моль/дм ³ , раствор ББР pH = 2)	I _{1 сек} , мА	Q ₁₋₂ , Кл	n_e^1	n_e^2	n_e^3	Ip	n_e^4	n_e^5	<i>I</i> [*] _d , мА	n_e^6
V	-0,79	$(5,98\pm0,01)^{\cdot}10^{-4}$	5,64	5,72	5,86	-136,7	5,79	5,63	-1,37	4,59
$Fe(CN)_{6}^{3-}$	-0,14	$(1,02\pm0,02)$ ·10 ⁻⁴	_	1,02	_	-23,6	_	0,97	-0,29	0,98
$/{\rm Fe}({\rm CN})_{6}^{4-}$										

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; *предельный ток восстановления соединения I и K₃Fe(CN)₆ при ω = 600 об./мин.

График изменения предельного тока ЭВ соединения V (I_d) при pH 2 на BA, полученных при различных скоростях вращения дискового электрода (ω), в координатах I_d от $\omega^{0,5}$ линеен, но не проходит через начало координат (рисунок 5.3).



Рисунок 5.3 – Зависимость предельного тока ЭВ соединения V (C=5 \cdot 10⁻³ моль/дм³) от $\omega^{0,5}$ в ББР pH=2, зарегистрированная на СУЭ

Ток пика ЭВ Триазида на ЦВА от корня из скорости сканирования потенциала растет нелинейно (рисунок 4.4), причем степень отклонения от прямой зависит от кислотности среды. На рисунках 5.4 и 5.5 Б, в кислой и нейтральной области значение катодного тока пика ЭВ соединения V

отклоняется от теоретически рассчитанного по уравнению Рендлса-Шевчика для необратимых процессов [260] при высоких значениях v ≥0,75 B/c. Уменьшение тока катодного пика в щелочных средах (pH > 10) при всех [43] значениях скорости развертки потенциала объясняться может недостаточной скоростью протонирования анион-радикала вследствие низкой концентрации протонов. Тем нет менее, ЭВ соединения V остается необратимым и в этих условиях.



Рисунок 5.4 – Изменение тока пика ЭВ соединения V (5·10⁻³ моль/дм³) от *v*^{0,5} в растворе ББР при: 1 – pH 2, 2 – pH 7, 3 – pH 12 и 4 – теоретически рассчитанный уровень тока шести электронов по уравнению Рендлса–Шевчика

С увеличением pH раствора фонового электролита от 3 < pH < 6 максимум пика восстановления соединения V смещается в сторону отрицательных значений потенциала (рисунок 5.5 A), $\Delta E / \Delta pH = 30$ мB, а при pH > 6 практически не меняется. Таким образом можно предположить, что электрохимическая реакция ЭВ Триазида контролируется кинетикой.

Известно [45], что при добавлении органического растворителя к водным буферным растворам в некоторых случаях шестиэлектронный пик ЭВ -NO₂ можно разделить на две стадии. При добавлении 40 % ДМФА к раствору ББР в интервале 9>pH>12 на ЦВА соединения V наблюдали 2 стадии ЭВ, однако обе стадии оставались необратимыми. В кислых и нейтральных средах добавление

от 40 % до 55 % ДМФА не привело к разделению катодного пика (рисунок 5.6). Эти результаты свидетельствует о высокой скорости протонирования образующихся промежуточных частиц, в результате которого образуются ЭХ активные при данных потенциалах соединения.



Рисунок 5.5 – Значения потенциала (А) и тока (Б) первого пика ЭВ соединения V (5·10⁻³ моль/дм³) при изменении pH раствора, v = 0,1 В/с. Б: красные точки – экспериментально полученный уровень тока. Желтая линия – теоретически рассчитанный уровень тока шести электронов по ур. Ренделса – Шевчика



Рисунок 5.6 – ЦВА соединения V (5·10⁻³ моль/дм³) в смеси 60 об.% ББР с добавлением 40 об.% ДМФА, *v*=0,05 В/с: 1 – pH=2; 2 – pH=9; 3 – pH=12

В апротонной среде образующиеся при восстановлении анионные промежуточные частицы медленнее протонируются, чем в водной среде. Поэтому были проведены исследования соединения V в ДМФА с целью зарегистрировать промежуточные частицы ЭВ. На ЦВА в ДМФА наблюдается

два пика ЭВ Триазида (рисунок 5.7). Первый из них – необратимый пологий пик ЭВ при -1,22 В, последующая стадия при -1,63 В.



Рисунок 5.7 – ЦВА V в растворе ДМФА vs НКЭ (0,1 моль/дм³ Bu₄NClO₄) v = 0,1 В/с при С 1,2-3,0 ммоль/дм³

Согласно данным ЦВА и ХА величина тока первой катодной стадии восстановления заметно ниже тока пика одноэлектронного окисления ферроцена в этих же условиях и нелинейно меняется в интервале концентраций от 0,6 до 8,0·10⁻³ моль/дм³ (рисунок 5.8 А). В интервале рабочих концентраций 1-3·10⁻³ моль/дм³ ток первого пика приблизительно наполовину меньше тока одноэлектронного переноса.

Следует подчеркнуть, что, как показали результаты ЦВА хлоргидрат lаргинина, ни катион l-аргинина, ни его анион, полученный при добавлении щелочи, в этих условиях не восстанавливаются. В растворах l-аргинина не было также зафиксировано парамагнитной активности. То есть, скорее всего, электрон переносится на гетероциклическую часть соли соединения V. 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 (рисунок 5.9).



Рисунок 5.8 – Значения тока на ЦВА соединения V от концентрации *v* = 0,1 В/с: А: при: 1 – потенциалах первой, 2 – второй стадии; Б: Изменение отношения токов при потенциалах второй и первой стадии I₂/I₁ от концентрации V



Рисунок 5.9 – Визуализация расчета энергий НВМО: А – гетероциклического аниона, Б – энергии ВЗМО, образующегося дианион-радикала при ЭВ соединения V

Поскольку Триазид 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 деполяризатором, так называемое самопротонирование [270, 271]. Аминокислота (*l*-аргинин), входящая в состав молекулы V, является хорошим донором протонов, значение ее pK_a первой стадии в водной среде равно 2,17 [272]. Значение рКа соединения V в воде, определенное потенциометрически, равно 3,45, и, следовательно, в апротонной среде Триазид может выступать в роли донора протонов.

Зависимость тока первого пика I_1 восстановления соединения V от $v^{0,5}$ в апротонной среде (рисунок 5.10) линейна и проходит через начало координат лишь в области малых скоростей наложения потенциалов более 2 В/с.



Рисунок 5.10 – Изменение тока пиков ЭВ соединения V (3·10⁻³ моль/дм³) от v^{0,5} в ДМФА (0,1 моль/дм³ Bu₄NBF₄) vs НКЭ: синие точки – первый катодный пик, оранжевые точки – второй катодный пик

Полученные данные позволяют предполагать, что при потенциалах первой стадии ЭВ Триазида наиболее быстрой реакцией является самопротонирование, приводящее к образованию ЭХ неактивного при *E*₁ гетероциклического аниона Het⁻:

Het⁻NH₃⁺-R-COOH + e → [Het⁻NH₃⁺-R-COOH]⁻ E_1 (12) [Het⁻NH₃⁺-R-COOH]⁻ + Het⁻NH₃⁺-R-COOH → →[Het⁻NH₃⁺-R-COOH]H⁻ + Het⁻ + NH₃⁺-R-COO⁻ (13) [Het⁻NH₃⁺-R-COOH]⁻ =анион Триазида

Перенос протона может, вероятно, 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:

$$[\text{Het}^{-}\text{NH}_{3}^{+}\text{-}\text{R-COOH}]\text{H}^{-}\rightarrow [\text{Het}\text{H}_{2}]^{\cdot} + \text{NH}_{3}^{+}\text{-}\text{R-COO}^{-}$$
(14)

$$[Het^{-}NH_{3}^{+}-R-COOH]H^{-} \rightarrow [Het H]^{-} + NH_{3}^{+}-R-COOH \qquad (15)$$

$$[HetH_{2}]^{+} e \rightarrow HetH_{2}^{-} \qquad (16)$$

$$[Het H]^{+} e \rightarrow HetH^{-} \qquad (17)$$

$$[Het H]^{-} + Het^{-}NH_{3}^{+}-R-COOH \rightarrow^{-}[Het H]^{-}[Het H]^{+}+NH_{3}^{+}-R-COO^{-} \qquad (18)$$

$$^{-}[Het H]^{-}[Het H]^{+} e \rightarrow^{-}[Het H]^{-}[Het H]^{-} \qquad (19)$$

 $[\text{Het H}]-[\text{Het H}]^- + \text{Het}^-\text{NH}_3^+-\text{R-COOH} \rightarrow$

 $\rightarrow \text{-[Het H]-[Het H]H + Het^- + NH_3^+-R-OO^-}$ (20)

Вторая стадия ЭВ соединения V квазиобратима, на реверсивной кривой после второго пика в интервале концентраций $1,6-3,0\cdot10^{-3}$ моль/дм³ регистрируется анодный пик при E = -1,54 B, Δ Ep составляет около 90 мВ. Величина тока при потенциалах второй стадии ЭВ I_2 растет с увеличением концентрации (рисунок 5.8 A), но линейный график зависимости I_2 в интервале $C_V 0,6-3,0\cdot10^{-3}$ моль/дм³ не проходит через начало координат. С ростом концентрации Триазида увеличивается и отношение величин токов при потенциалах второй I_2 и первой I_1 стадий I_2/I_1 (рисунок 5.8 Б), что позволяет предполагать восстановление при потенциалах второй стадии продукта химической реакции второго порядка. Вероятно, при потенциалах второго пика восстанавливается в основном гетероциклический анион, образующийся при потенциалах первой стадии ЭВ соединения V.

$$\operatorname{Het}^{-} + e \to [\operatorname{Het}]^{\cdot =} \qquad \qquad E_2 \qquad (21)$$

Пик окисления дианион-радикала на реверсе при потенциале -1,54 В составляет приблизительно половину второго катодного пика при v = 0,1 В/с (рисунок 5.7), а с увеличением v до 5 В/с значение *Ia/Ic* увеличивается до 0,74.

Ток пика второй стадии ЭВ соединения V от $v^{0.5}$ в апротонной среде меняется нелинейно (рисунок 5.10). Увеличение скорости сканирования приводит к относительному снижению токов обоих катодных пиков, причем отношение I_2/I_1 при высокой скорости развертки (выше 2 В/с) остается постоянным и приблизительно равным 2, в то время как при v = 0,05 В/с оно превышает значение 4. Можно предположить, что при невысоких значениях v успевает протекать реакция протонирования дианион-радикала (исходным

соединением и/или донорными примесями в растворе), что приводит увеличению второго катодного пика и уменьшению анодного пика при -1,54 В на ЦВА соединения V.

Постепенное добавление щелочи Вu4NOH вызывает уменьшение и полное исчезновение тока первой стадии (рисунок 5.11 А) при эквивалентном содержании щелочи, при этом величина тока второй стадии практически не меняется.



Рисунок 5.11 – ЦВА соединения V (3·10⁻³ моль/дм³) в растворе ДМФА (0,1 моль/дм³ Ви₄NBF₄) vs НКЭ, v = 0,1 В/с А: серая – фон, синяя – V, желтая, оранжевая – V с добавлением водного раствора Ви₄NOH (0,14 и 2,9 ммоль/дм³ соответственно); Б: черная – V, красная, зеленая и синяя – V с добавлением водного раствора NaOH (1, 2 и 4 ммоль/дм³ соответственно)

В этих условиях анодный пик -1,54 В увеличивается и значение Іа/Ік 0,7 содержании Bu₄NOH в составляет при два раза превышающем результат V. Этот считать концентрацию можно подтверждением предположения о том, что образующийся при потенциалах второй стадии ЭВ V ДАР исчезает в результате реакции протонирования. Увеличение скорости наложения потенциалов или уменьшение содержания доноров протонов за счёт добавления щелочи позволяет регистрировать больший ток его окисления при потенциале -1,54 В:

$$Het^{-}NH_{3}^{+}-R-COOH + OH^{-} \rightarrow Het^{-} + NH_{3}^{+}-R-COO^{-} + H_{2}O$$
(22)

$$\operatorname{Het}^{-} + e \to [\operatorname{Het}]^{\cdot =}$$
(23)

Образование дианион-радикалов было показано также для ряда 1,2,4нитротриазолов [273].

Необходимо отметить, что добавление к раствору соединения V водного раствора NaOH иначе влияет на катодные пики ЦВА соединения (рисунок 5.11 Б). Добавление NaOH в ДМФА также приводит к исчезновению первой стадии ЭВ Триазида. Вторая стадия становится необратимой, при этом потенциал ЭВ сдвигается в катодную область, а ток растет (рисунок 5.11 В). Видимо, эти изменения можно связать с образованием ионных пар гетероциклического аниона V с ионами Na⁺, в которых электронная плотность на реакционном центре увеличена под влиянием катиона и протонирование дианион-радикала протекает с большей скоростью. Когда вместо NaOH в раствор добавляли Вu₄NOH (рисунок 5.11 А), ионных пар с гетероциклическим анионом не образовалось, поскольку в объемном катионе Bu₄N⁺ плотность заряда существенно меньше, чем у иона Na⁺. В результате на ЦВА наблюдается обратимое ЭВ аниона V.

Для того, чтобы исключить влияние воды, добавляемой вместе со щелочью к раствору ДМФА и изучить влияние катиона еще меньшего размера, чем Na⁺, было зарегистрированы ЦВА соединения V в присутствии добавленного LiClO₄ (рисунок 5.12). Сравнивая влияние LiClO₄ и NaOH, можно отметить, что присутствие LiClO₄, в отличие от NaOH, не влияет на первую стадию ЭВ Триазида, но вторая стадия ЭВ в присутствии обоих соединений становится необратимой и увеличивается ток восстановления, вероятно, из-за протонирования образующихся продуктов. Кроме того, и в том, и в другом случае на анодной реверсивной кривой появляются пики окисления при близких потенциалах в области от -0,5 до -0,3 В. Не исключено, что в присутствии щелочных металлов меняется не только скорость протонирования дианион-радикала соединения V, но и региоселективность химической реакции. Следует подчеркнуть, что в присутствии ионов Li⁺, при добавлении LiOH к раствору соединения V в ДМФА, ЭПР сигнал зафиксировать не удалось.



Рисунок 5.12 – ЦВА соединения V (1,3·10⁻³ моль/дм³) зарегистрированные в ДМФА *vs* НКЭ в присутствии LiClO₄, *v*= 0,1 B/c

5.2 ЭПР-спектроскопия продуктов электровосстановления Триазида

Из расчетов плотности НСМО гетероциклического аниона V можно предположить два возможных пути образования радикалов: как наиболее вероятный – восстановление нитрогруппы с образованием нитроксильного радикала и альтернативный - образование радикала на азоте в 4 положении шестичленного кольца гетероцикла (рисунок 2.1).

Для обнаружения образование радикальных продуктов при ЭВ Триазида, было проведено предварительное восстановление соединения V при потенциале пика (E=-1,7 В vs Ag/AgCl/KCl) в растворе ДМСО в присутствии спинового зонда ТМТН. Полученные экспериментальные данные указывают на появление радикалов в растворе ЭХ-ячейки при электролизе и значительный рост числа парамагнитных центров в растворе электрохимической ячейки в течение всего процесса электролиза (рисунок 5.13, A), при этом наблюдается линейная зависимость между количеством спинов и временем, затраченным на электрогенерацию продуктов соединения V (рисунок 5.13, Б).

Высокая реакционная способность анионных частиц, образующихся при ЭВ Триазида, прежде всего в реакциях протонирования, затрудняет получение ЭПР спектров с высокой интенсивностью. Поэтому ЭВ соединения V в было проведено с одновременной генерацией продукта ЭХ восстановления и развертки магнитного поля в присутствии Bu₄NOH.



Рисунок 5.13 – А: ЭПР спектры продуктов реакции ЭВ соединения V с зондом ТМТН; Б: относительное число парамагнитных центров после ЭВ в диапозоне 0-15 мин при -1,7 В, зарегистрированных в ДМСО (0,1 моль/дм³ Bu₄NBF₄)

На рисунке 5.14 приведены примеры экспериментальных и симулированных спектров генерации анион-радикалов, зарегистрированных при потенциале -2 В в двухэлектродной Pt/Pt-электрохимической ячейке, помещенной в резонатор ЭПР-спектрометра. Время жизни обнаруженного вида менее 0,01 секунды.



Рисунок 5.14 – ЭПР-спектры V: А экспериментальный, зарегистрированный в ДМФА (0,1 моль/дм³ Bu₄NClO₄) с добавлением эквимолярного количества Bu₄NOH; Б: симулированный сектор (gi = 2,0059, aN = 2,12 мТл,

aN = 0,7 мТл, LW = 0,065 мТл, L / G = 0,1)

Дополнительным доказательством структуры образующихся при ЭВ V радикалов являются полученные ЭПР спектры аддуктов спиновой ловушки ТМПО с продуктом восстановления соединения V (рисунок 5.15).

Полученный ЭПР-спектр (рисунок 5.15 (1)) может быть описан как суперпозиция, по крайней мере, ЭПР-спектров двух аддуктов, в одном из которых центром взаимодействия спиновой ловушки с предполагаемым радикалом является нитрогруппа, во втором – атом азота в 4 положении в шестичленном гетероцикле (рисунок 2.1).



Рисунок 5.15 – ЭПР спектры аддуктов спиновой ловушки ТМПО с продуктом ЭВ V: 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 мТл, L/G=0,1. Расчетные константы СТВ, g_{iso}, загружены из *.prop файлов соответствующих расчетов Огса. Ошибка симулирования между 1 и 4, (СКО) r²=2,12 %.

5.3 Электросинтез продуктов восстановления Триазида

Одной из целей настоящего исследования являлось проведение исследований по идентификации продуктов ЭВ V. С этой целью был проведен электролиз соединения V. Выделенные продукты определяли методом МСВР. Продукты представляют собой смесь 3 соединений (таблица 5.2).

Соединение	Молекулярная	Теоретическая	Практическая	Предлагаемая химическая
	формула	масса	масса	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	N N NH CH3
L	C5H5N4O2	137,0717	137,0723	N N N

Таблица 5.2 – Данные ВЭЖХ/МСВР смеси продуктов электролиза Триазида

Конечный продукт ЭВ, 5-Метил-6-амино-7-оксо-1,2,4-триазоло[1,5а]пиримидин (**J**), был выделен с выходом 82 % после электролиза раствора соединения **V** в растворе ББР при рН 2. Он выпадал в виде осадка при охлаждении католита и не был связан с *l*-аргинином. Было выдвинуто предположение, что вещества **K** и **L** являются побочными продуктами реакции ЭВ нитрогруппы соединения **V**.

5.1 Основываясь на данных, полученных В главе И данных исследования, ЯМР- и МАСС-спектров продуктов электрохимического электросинтеза V, было сделано предположение, что субстратом электропревращения Триазида в данных условиях является, не ионная, а протонированная форма, а ЭВ V в водных кислых средах протекает по нитрогруппе соединения через образование анион-радикала участием бе на молекулу и приводит к образованию соответствующего гетероциклического амина (рисунок 5.16).



Рисунок 5.16 – Вероятный механизм электровосстановления Триазида.

Выводы к 5 главе

Результаты исследования электрохимического поведения соединения V (Триазида) в кислой водной среде показали, что ЭВ нитрогруппы этого соединения протекает необратимо в одну шестиэлектронную стадию с образованием соответствующего гетероциклического амина через образование дианион-радикала, субстратом электропревращения Триазида в данных условиях является протонированная форма. Лимитирующая стадия процесса электропревращения осложнена кинетическим контролем, ионы щелочным металлов влияют не только на скорость протонирования нитрогруппы Триазида, но и на региоселективность всей реакции.

ГЛАВА 6 МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИАЗИДА НА СТЕКЛОУГЛЕРОДНОМ ЭЛЕКТРОДЕ

Анализ литературных данных главы 1 и полученные результаты исследования, описанные в главе 5, термодинамических и кинетических характеристик позволили разработать методику количественного ВА определения Триазида в ФС. На основании результатов исследования в качестве аналитического сигнала был выбран максимальный ток ЭВ -NO₂V (диапазон потенциалов от 0,4 до -0,8 В) при pH=2,5-4,5.

6.1 Апробация химического способов удаления кислорода из растворов электролита

Катодный ток Триазида на СУЭ (зеленая линия на рисунке 6.1) регистрируется в водных растворах в области волны ЭВ растворенного кислорода (желтая линия на рисунке 6.1), что не позволяет получить корректную аналитическую информацию.



Рисунок 6.1 – ККвВА Триазида, зарегистрированные на СУЭ в: желтая линия – растворе ББР (7,2 ± 0,2), зеленая линия – ББР + 80 мг/дм³, красная линия – ББР + 0,04 моль/дм³ Na₂SO₃ через 1 мин, синяя линия – 2 мин, черная линия – 60 мин. Параметры развертки КвВ: шаг импульса 0,005 В, амплитуда

импульса 0,05 В, частота 30 Гц, скорость сканирования 0,15 В/с

Ранее в п. 6.1-6.2 кислород из раствора удаляли продувкой инертным газом аргоном чистотой 99,99 %. Процедура поэтапная, достаточно сложная по технике и длительная (не менее 15-20 мин). К недостаткам продувки можно отнести необходимость использования дорогостоящего инертного газа высокой чистоты и дополнительного оборудования.

Было предложено использовать известный химический метод удаления кислорода из раствора [274], основанный на окислении сульфита растворенным в воде кислородом в нейтральных и щелочных растворах:

$$O_2 + 2Na_2SO_3 \rightarrow 2Na_2SO_4 \tag{24}$$

Концентрация кислорода в растворах, контактирующих с воздухом, 0.005 моль/дм³. Экспериментально близка к установлено [274], что концентрации сульфита натрия 0,04 моль/дм³ достаточно для удаления кислорода из анализируемого раствора в нейтральных и щелочных растворах. Для определения времени взаимодействия Na₂SO₃ с растворенным кислородом комнатной температуре в нейтральном растворе ББР (pH 7.0) при регистрировали величину волны ЭВ растворенного кислорода (рисунок 6.1) после добавления рекомендуемого количества Na₂SO₃. Одной минуты достаточно для почти полного связывания растворенного кислорода с Na₂SO₃ в перемешиваемом растворе. Надежное связывание растворенного кислорода после добавления указанного количества сульфита наблюдается в течение часа.

6.2 Выбор условий вольтамперометрического определения Триазида на стеклоуглеродном электроде

Сравнение различных режимов вольтамперометрии: ЛВА, ДИП, КвВ представленных на рисунке 6.2, позволило сделать вывод о том, что оптимальным при работе с Триазидом с использованием СУЭ в растворе ББР при 4,0 после продувки аргоном является КвВ-режим. В этом случае аналитический сигнал ЭВ симметричен и может быть измерен с высокой точностью, в отличие от ЛВА, а величина тока ЭВ выше примерно в два раза по сравнению с ДИП-режимом.

Аналогичные результаты получены в растворе ББР при рН 7,0 после продувки аргоном и растворе ББР + 0,04 моль/дм³ Na₂SO₃ (рН 7,0) (таблица 6.1). Поэтому дальнейшие исследования проводили в КвВ-режиме.



Рисунок 6.2 – ВА Триазида, зарегистрированные на СУЭ в растворе ББР (pH 4,0) без и с добавлением 280 мг/дм³ при различных режимах вольамперометрии: А – ЛВА, Б – КвВ, В – ДИП (амплитуда импульса 0,02 В. *v* = 0,05 В/с)

Таблица 6.1 – Влияние различных вариантов вольтамперометрии на величину тока ЭВ Триазида (остальные условия как на рисунке 6.7)

Ток, мкА					
Режим измерений	линейный	ДИП	КвВ		
Состав раствора					
ББР + 0,04 моль/дм ³ Na ₂ SO ₃ (pH	25,9	8,9	16,4		
7,0)					
ББР (рН 7,0)	26,6	9,2	16,8		
ББР (рН 4,0)	38,0	13,3	24,1		

6.3 Оптимизация параметров регистрации аналитического сигнала Триазида

Влияние скорости развертки потенциала на величину максимального тока ЭВ 180 мг/дм³ Триазида было изучено в области 0,025-1,000 В/с при шаге развертки 0,005 В с амплитудой импульса 0,015 В. Зависимость АС от скорости развертки показана на рисунке 6.2. Как видно из рисунков, величина тока восстановления резко возрастает в интервале 0,025-0,150 В/с, после чего рост существенно замедляется. Для аналитических целей выбрана скорость развертки 0,15 В/с.

При скорости развертки 0,15 В/с и шаге развертки 0,005 В АС Триазида растет практически линейно с увеличением амплитуды импульса в области 0,01-0,05 В (рисунок 6.3). При дальнейшем увеличении амплитуды до 0,10 В величина АС возрастает нелинейно, после чего рост прекращается (рисунок 6.4) Для аналитических целей выбрана амплитуда импульса 0,05 В.



Рисунок 6.3 – Зависимость аналитического сигнала Триазида (C=180 мг/дм³) для от *v*, полученная в: А – растворе ББР + 0,04 моль/дм³ Na₂SO₃ pH=7,0, Б – ББР при pH 7,0, В – ББР при pH 4,0 (шаг развертки = 5 мВ, амплитуда импульса = 15 мВ)



Рисунок 6.4 – Влияние амплитуды импульса на ток ЭВ Триазида (180 мг/дм³) в растворах: А – ББР + 0,04 моль/дм³ Na₂SO₃ при pH=7,0, Б – ББР при pH 7,0, В – ББР при pH 4,0 (шаг развертки = 5 мВ, *v* = 0,15 В/с)

Предварительная выдержка СУЭ в перемешиваемом ББР с добавлением 180 мг/дм³ Триазида в течение 300 с в интервале потенциалов 1,0-0,1 В, в котором он ЭХ не активен, не приводит к увеличению АС за счет возможной адсорбции аналита на поверхности индикаторного электрода (таблица 6.2). Это позволяет использовать метод прямой ВА для определения Триазида.

Таблица 6.2 – Зависимость АС Триазида для 40 мг/дм³ от времени и потенциала предварительного накопления в растворе ББР + 0,04 моль/дм³ Na₂SO₃ (pH=7) (шаг развертки = 5 мВ, амплитуда импульса = 15 мВ, *v* = 0,15 В/с)

Потенциал накопления, В	Время накопления, с	Высота пика, мкА
1	2	3
	0	3,6
	30	3,6
1,0	60	3,5
	120	3,5
	180	3,3
	300	2,9

1	2	3
0,50	0	3,6
	30	3,7
	60	3,6
	120	3,5
	180	3,2
	300	3,0
	0	3,7
	30	3,6
0,10	60	3,5
	120	3,5
	180	3,1
	300	3,0

Продолжение таблицы 6.2

6.4 Характеристики градуировочных графиков Триазида

При оптимальных условиях регистрации (таблица 6.3) ток пика линейно растет от концентрации Триазида в интервале 20-180 мг/дм³ в растворах ББР при pH 7,0 или 4,0 (рисунок 6.5). В таблице 6.4 представлены характеристики ГГ Триазида, полученные при разной кислотности раствора ББР, в диапазоне концентраций 20-180 мг/дм³. Характеристики ГГ Триазида, полученные на чистых растворах в оптимальных условиях (рисунок 6.4 Б) приведены в таблице 6.5. Уравнение регрессии имеет вид: Q (мкКл) = (0,01333·± 0,00008) C + (0,05372 ± 0,00837).

Наилучшая чувствительность по отношению к аналитическому сигналу аналита (наклон ГГ) достигается в растворе ББР при рН 4,0 после продувки инертным газом. При рН 7,0 наклоны ГГ, полученные в растворе ББР + 0,04 моль/дм³ Na₂SO₃ и растворе ББР после продувки инертным газом, практически

совпадают и уменьшаются примерно на 30 % по сравнению с ГГ, полученным при рН 4,0. При этом значение коэффициента корреляции ближе к 1 в присутствии сульфита натрия.

Дальнейшие исследования проводились в условиях химического связывания кислорода в ББР + 0,04 моль/дм³ Na₂SO₃ (pH = 7,2 ± 0,2), что позволило значительно упростить и ускорить процедуру измерения тока восстановления Триазида.

Режим регистрации	Квадратно-волновой
Амплитуда импульса	0,05 B
Частота импульса	30 Гц
Шаг развертки	0,005 B
Начало развертки	(-0,4) В (pH 7) или 0,0 В (pH 4)
Конец развертки	(-1,4) B (pH 7) или (-1,25) B (pH 4)

Таблица 6.3 – Оптимальные условия регистрации АС Триазида



Рисунок 6.4 – Зависимость тока ЭВ Триазиада от его концентрации в растворах: А – ББР + 0,04 моль/дм³ Na₂SO₃ при pH=7,0, Б – ББР при pH 7,0 (Б), В – ББР при pH 4,0 (Условия регистрации приведены в таблице 6.3)

Состав раствора	Уравнение регре	R ²	
(С _{Триазида} =20-180 мг/дм ³)	<i>k</i> , мкКл/(мг/дм ³)	<i>b</i> , мкА·	
ББР + 0,04 моль/дм ³ Na ₂ SO ₃ (pH 7,0)	0,0887	0,704	0,9973
ББР (рН 7,0)	0,0851	1,750	0,9906
ББР (рН 4,0)	0,1250	0,918	0,9980

Таблица 6.4 – Характеристики ГГ Триазида, при разной рН ББР

Таблица 6.5 – Характеристики градуировочных графиков Триазида

Параметр	Величина
Линейность (мг/дм ³)	20 - 180
Коэффициент корреляции	0,9989
Коэффициент чувствительности (мкКл/(мг/дм ³))	0,01333
СО аналитического сигнала	0,0084
Предел обнаружения, ПрО (мг/дм ³) = $3,3 \times \delta / S$	2,1
Предел количественного определения, ПКО (мг/дм ³)	6,3

6.5 Валидация методики определения Триазида

6.5.1 Специфичность и правильность.

Правильность оценена на растворах стандартного образца Триазида, содержащих 50, 100 и 150 % от ожидаемого уровня концентраций определяемого вещества по методу «введено-найдено». В итоге исследовались 3 концентрации растворов с трехкратным определением для каждой концентрации (n = 9) (таблица 6.6).

Оценка проводилась путем расчета показателя правильности, стандартного отклонения, коэффициента вариации и доверительного интервала среднего значения (Р = 95 %). Полученные результаты представлены в таблице 6.7. Показатель правильности для различных уровней концентраций близок к 100 %. Коэффициент вариации менее 2,0 %. Среднее значение для процента

восстановления составило 100,2 % и находится внутри установленного диапазон 98-102 %. Доверительный интервал среднего результата анализа включает 100 % значение.

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

Таблица 6.6 – Результаты установления правильности методики

Таблица 6.7 – Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении правильности для R % (n = 9, P = 95 %)

Статистические характеристики	Результаты
Среднее значение, %	100,2
Стандартное отклонение	0,78
Коэффициент вариации (относительное стандартное	0,8
отклонение среднего результата), %	
Нижняя граница доверительного интервала среднего	99,6
результата	
Верхняя граница доверительного интервала среднего	100,8
результата	

Для проверки специфичности методики сравнивались значения количественного ВА определения Триазида, полученные при исследовании стандартных растворов Триазида, содержащих 100 % от ожидаемого уровня концентраций определяемого вещества на фоне ББР (раствор А) и в присутствии 2 % идентифицированной примеси (стандартный образец 5-метил-7-оксо-4,7дигидро-1,2,4-триазоло[*1,5-а*]пиримидинида *l*-аргининия, (раствор **B**). Исследование каждого раствора проводили в 6 параллелях. Метрологические характеристики полученных результатов представлены в таблице 6.8.

Как видно из таблицы 6.8, примесь не оказывает существенного влияния на метрологические характеристики количественного определения Триазида. Разработанная методика анализа является правильным и селективным, что позволяет использовать его для анализа лекарственной субстанции «Триазид» на содержание основного вещества. *Вывод:* методика соответствует критериям приемлемости по показателям специфичность и правильность.

	Метрологи	ические характеристики
Показатель	Показатель количественного определения Триазида в	
	А	В
Среднее значение х, %	99,8	100,2
Стандартное отклонение	0,54	0,64
Коэффициент вариации, %	0,5	0,6

Таблица 6.8 – Результаты установления специфичности методики

6.5.2 Прецизионность.

Сходимость методики оценена по результатам определений для 6 испытуемых растворов субстанции «Триазид» с содержанием, близким к номинальному. Каждый испытуемый водный раствор субстанции «Триазид» был готовлен из точной навески. Результат единичного определения получен по методу стандартной добавки. Полученные результаты представлены в таблицах 6.9 и 6.10. Коэффициент вариации менее 1,5 % (при n = 6). Вывод: методика соответствует заявленным критериям приемлемости по показателю повторяемость (сходимость).

Обозначение	Навеска субстанции	Найденное
пробы	«Триазид», г	содержание Триазида, %
Проба 1	0,0102	100,5
Проба 2	0,0101	99,2
Проба 3	0,0103	101,5
Проба 4	0,0100	99,0
Проба 5	0,0102	101,2
Проба 6	0,0104	100,7

Таблица 6.9 – Результаты установления повторяемости методики

Таблица 6.10 – Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении повторяемости (сходимости)

Статистические характеристики	Результаты
Наименьшее значение, %	99,0
Наибольшее значение, %	100,7
Среднее значение, %	100,1
Стандартное отклонение	0,68
Коэффициент вариации (относительное	0,7
стандартное отклонение среднего результата), %	
Граничные значения доверительного	$(100, 1 \pm 0, 7)$
интервала среднего результата ($x \pm \Delta x$)	

Внутрилабораторная прецизионность методики оценена в условиях работы одной лаборатории в разные дни. Полученные результаты представлены

в таблицах 6.11 и 6.12. Коэффициент вариации 2,5 %. *Вывод:* методика соответствует заявленным критериям приемлемости по показателю внутрилабораторная прецизионность.

Таблица 6.11 – Результаты установления внутрилабораторной прецизионности методики

Обозначение	Навеска ФС	Найденное
пробы	«Триазид», г	содержание, %
Проба 1	0,0100	99,0
Проба 2	0,0101	100,2
Проба 3	0,0103	100,7
Проба 4	0,0101	99,6
Проба 5	0,0102	100,7
Проба б	0,0101	100,6

Таблица 6.12 – 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	1,0
(относительное стандартное отклонение	
среднего результата), %	
Граничные значения доверительного	$(100, 4 \pm 1, 1)$
интервала среднего результата ($x \pm \Delta x$)	
Выводы к 6 главе

Разработана и валидирована методика количественного определения Триазида на стеклоуглеродном индикаторном электроде в условиях химического связывания растворенного кислорода (pH=7) в квадратно-волновом режиме. Выбраны параметры регистрации вольтамперограмм. В рамках выбранного диапазона концентраций (от 80 до 120 %) была доказана правильность, прецизионность и линейность методики.

ГЛАВА 7. МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИАЗИДА НА ТОЛСТОПЛЕНОЧНОМ УГЛЕРОДОСОДЕРЖАЩЕМ ЭЛЕКТРОДЕ

Так как современные технологии определения основного вещества в фармации требуют минимизации и автоматизации процесса, следующим этапом работы была разработка электрохимического сенсора на основе ТУЭ.

7.1 Выбор условий регистрации вольтамперограмм

ВА Триазида были зарегистрированы в КвВ-режиме с химическим способом удаления кислорода в соответствии с параметрами, подобранными для определения Триазида на СУ п. 6.4.

Сравнение величины, формы и воспроизводимости аналитического сигнала Триазида для разных электродов (таблица 7.1) показали, что наибольшая величина и лучшая воспроизводимость достигается при использовании ТУЭ Electrodag. Этот электрод был выбран в качестве рабочего.

Таблица 7.1 – Сравнение АС Триазида для разных электродов, зарегистрированных в растворе ББР (pH=2) + 200 мг/дм³ в КвВ режиме при v= 0,06 В/с, шаге развертки 6 мВ, амплитуде импульса 20 мВ и частоте 50 Гц(n = 18, P = 95 %)

	ТУЭ	ТУЭ	ТУЭ	
AC	«Dupont»	«Lord»	«Electrodag»	
Потенциал пика, мВ	-135 ±2	-164 ±1	-128 ±2	
Полуширина пика, мВ	40 ±1	107 ±3	35 ±1	
Ток пика, мкА	$2,16 \pm 0,003$	$1,03 \pm 0,009$	6,5 ±0,010	
% RSD	0,7	0,6	0,4	

7.1.1. Электрохимическое восстановление Триазида на толстопленочном углеродосодержащем электроде

На рисунке 7.1 представлены КвВВА, зарегистрированные в ББР при pH 7,2±0,2 в присутствии раствора Na₂SO₃ на СУЭ (оранжевая линия), ТУЭ без ЭХ активации (синяя линия), ТУЭ после ЭХ активации в ББР (pH = 7,2 ± 0,2), при потенциале +2 В в течение 300 с (зеленая линия, акт 1) и десятью ЦВА развертками от -1,5 до +1,5 В со скоростью сканирования 1 В/с (желтая линия, акт 2), в 1 моль/дм³ Na₂CO₃ при потенциале +1,2 В в течение 300 с (черная линия, акт 3).



Рисунок 7.1 – КвВВА вольтамперограммы Триазида (100 мг/дм³), зарегистрированные в растворе ББР + 0,04 моль/дм³ Na₂SO₃ (pH = 7,2 ± 0,2) на: оранжевая линия – СУЭ, синяя линия – ТУЭ без ЭХ активации, зеленая линия – ТУЭ акт 1, желтая линия – ТУЭ акт 2, черная линия – ТУЭ акт 3

Как видно из рисунка 7.1, процесс восстановления Триазида затруднен на ТУЭ и значительно облегчается на ТУЭ после ЭХ активации в ББР при потенциале +2 В. Пик восстановления смещен на 0,1 В в анодную область по сравнению с СУЭ. КвВВА, зарегистрированные на СУЭ и ТУЭ в растворе ББР + 0,04 моль/дм³ Na₂SO₃ (pH = 7,2 ± 0,2) для 0-400 мг/дм³ Триазида с шагом 50 мг/дм³ и соответствующие концентрационные зависимости представлены на рисунке 7.2 и рисунке 7.3.

По мере увеличения концентрации ток ЭВ Триазида на ТУЭ акт 2 и ТУЭ акт 3 разделяется на две волны, которые трудно измерить. В случае ТУЭ акт 1 регистрируются два пика ЭВ при потенциале – 0,7 В (пик 1) и -1,17 В (пик 2).



Рисунок 7.2 – КвВ, зарегистрированные на СУЭ и ТУЭ в растворе ББР + 0,04 моль/дм³ Na₂SO₃ (pH = 7,2 \pm 0,2) для 0-400 мг/дм³ Триазида с шагом 50 мг/дм³

При этом пик 1 практически не растет с увеличением концентрации Триазида в растворе. На неактивированном ТУЭ и ТУЭ акт 1 (пик 2) пики восстановления регистрируются при концентрации аналита в растворе не менее 150 мг/дм³ и 100 мг/дм³ соответственно. Отсутствие прямо пропорциональной зависимости восстановления тока от концентрации существенно усложняет использование этих электродов для определения аналита методом добавок. В этом случае целесообразно исследовать влияние УНМ как модификатора на электрохимические и электроаналитические характеристики ТУЭ/УНМ.

112



Рисунок 7.3 – Калибровочные кривые Триазида, зарегистрированные на: А – ТУЭ без активации; Б – ТУЭ после активации 1 (1 пик); В – ТУЭ после активации 2 (1 пик); Г – ТУЭ после активации 3 (1 пик)

7.1.2 Электрохимические характеристики модифицированных сенсоров

Ввиду слабого отклика сигнала Триазида на ТУЭ, была модифицирована поверхность электрода углеродными наноматериалами (ТУЭ/УНМ): сажей (ТУЭ/С), функцианализированной сажей (ТУЭ/С-ф), углеродными нанотрубками (ТУЭ/УНТ). Конструкция и технология изготовления ТУЭ позволяют легко модифицировать их поверхность путем иммобилизации модификатора на поверхности электрода путем капельного литья. Методика модифицирования ТУЭ и приготовление дисперсий УНМ описана в п.2.3.

Для изучения ЭХ характеристик ТУЭ и ТУЭ/УНМ (сажи, функцианализиованной сажи, углеродных нанотрубок) был использован метод ЦВА и импедансной спектроскопии с применением Fe(CN)₆³⁻/Fe(CN)₆⁴⁻ в качестве редокс зонда. ЦВА и импедансные спектры, полученные для ТУЭ и

113

ТУЭ/УНМ, представлены на рисунке 7.4. Данные для СУЭ взяты за эталон. Результаты обработки ЦВА приведены в таблице 7.2. Электроактивная площадь поверхности исследуемых сенсоров рассчитана с использованием уравнения Рэндлса – Шевчика для обратимых систем [260]



Рисунок 7.4 – Состав раствора: ББР (pH 7,0 ± 0,2) + 5 ммоль/дм³ [Fe(CN)₆]^{4-/3-}, электрод: черная линия – СУЭ, синяя линия – ТУЭ, красная линия – ТУЭ/УНТ, зеленая линяя – ТУЭ/С, оранжевая линия – ТУЭ/С-ф; А – ЦВА, зарегистрированные *v* = 0,10 B/c; Б – Импедансные спектры, зарегистрированные при потенциале 0,25 B; В – выделение графика полного сопротивления комплексной плоскости в области высоких частот (Б); Вставка Г – эквивалентная схема, используемая в инструменте

электрохимической подгонки круга

Электрод	ББР (pH 7,0 ± 0,2) + 200								
	мг/дм ³ Триазида								
	$E_{\rm p}, { m B}$	Ірк,	і * 1 _{ист.,} *	σ, Β					
		мкА	мкА/						
			см ²						
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					
Электрод		ББР	(pH 7,0	± 0,2) +	5 · 10	-3 моль/	'дм ³ [Fe	$(CN)_6]^{3-/4}$	-
	<i>I</i> _{рк} ,	<i>I</i> _{pa} , мк	I_{κ}/I_{a}	$\Delta E, \mathbf{B}$	ФШ	σ,	R _S , Ом	R _{ct} , Ом	W, мСм
	мкА	А				$\mathrm{B}(I_{pc})$			
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

Таблица 7.2 – Электрохимические характеристики электродов

Примечание. **i*_{*ucm.*} – расчет на электроактивную площадь поверхности;

I_{рк/а} – 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

Для немодифицированного ТУЭ (таблица 7.2) значение разницы потенциалов пиков для токов окисления/восстановления (ΔE) пары [Fe(CN)₆]^{3-/4-} составляет 0,87 В, что указывает на необратимый характер процесса. По сравнению с СУЭ для всех типов ТУЭ/УНМ наблюдается существенный (в 3-5 раз) рост токов окисления/восстановления редокс-пары при уменьшении значений ΔE в 4-5 раз до 0,17-0,20 В, а соотношение I_a/I_k близко к 1, что характерно для квазиобратимых процессов. Полуширина пика восстановления (σ ,) уменьшается в ряду ТУЭ, ТУЭ/С-ф, ТУЭ/УНТ, ТУЭ/С. По критериям обратимости [260] ТУЭ/УНТ наиболее близок к СУЭ.

Наличие шероховатости поверхности из-за наноструктур или дефектов поверхности, таких как ступеньки, отверстия, изгибы и выступы, может привести к тому, что реальная площадь поверхности электрода будет больше геометрической [275]. Отношение электроактивной поверхности к геометрической поверхности характеризуется фактором шероховатости (ФШ). ФШ является количественной оценкой топографии поверхности (макро- и микро-шероховатости), гомогенности/гетерогенности поверхности, дисперсности модификатора. ФШ был рассчитан для каждого электрода (таблица 7.2).

Значения площади электроактивной поверхности, полученные для ТУЭ/УНТ, увеличиваются примерно в 4 раза по сравнению с для ТУЭ без покрытия. ТУЭ/С-ф демонстрирует самое высокое значение пикового тока и, следовательно, самую высокую электроактивную площадь. Эту особенность можно объяснить тем, что при функционализации сажей идет присоединение электроактивных групп, что существенно увеличивает как смачиваемость поверхности, так и скорость передачи электрона [276, 234].

Модифицирование поверхности ТУЭ наноматериалами привело также и к улучшению электрохимических характеристик ТУЭ/УНТ по сравнению с немодифицированным ТУЭ для определения Триазида (таблица 7.2). Потенциал катодного пика сдвигается в анодную область на 0,5 В, полуширина пика уменьшается почти в 2 раза, ток восстановления растет в 5-6 раз. Причем, наибольший ток восстановления Триазида регистрируется также на ТУЭ/С-ф.

Аппроксимация импедансных спектров выполнялась с использованием показанной Γ. эквивалентной электрической схемы, на рисунке 7.4 Эквивалентная электрическая схема включает сопротивление электролита R_s (около 170 Ом), последовательно с параллельной комбинацией R_{ct} (сопротивление межфазной передаче заряда), *W* (диффузия аналита в растворе) и СРЕ (элемент постоянной фазы). Определение элемента постоянной фазы, СРЕ, было необходимо из-за неоднородной поверхности рабочего электрода и моделируется как не идеальный конденсатор с емкостью С и коэффициентом (фактором) шероховатости / неоднородности.

На рисунке 7.4 показаны графики Найквиста для СУЭ, ТУЭ без покрытия и ТУЭ/УНМ. Значение R_{ct} для чистого ТУЭ намного выше ($R_{ct} = 15,6$ кОм), чем для СУЭ и наномодифицированного ТУЭ. ТУЭ/УНМ показали R_{ct} ниже, чем СУЭ (13,5-39,9 и 300,0 Ом соответственно). Это можно объяснить очень хорошей электропроводностью УНМ, а также их прикреплением к поверхности электрода с трафаретной печатью [276]. Однако увеличение аналитического сигнала Триазида на ТУЭ/УНМ по большей части связано с увеличением развитости электроактивной поверхности, о чем может говорить истинная плотность тока (*i*_{ucm}.) [220].

7.1.3 Характеристика поверхности модифицированного электрохимического сенсора с помощью сканирующей электронной микроскопии

Анализ осаждения распределения дисперсии изучаемых И наноматериалов на поверхности электрода был проведен с помощью сканирующей электронной микроскопии. Ha Рисунке 7.5 приведены микрофотографии поверхности ТУЭ, ТУЭ/С, ТУЭ/С-ф и ТУЭ/УНТ. На плоскости ТУЭ выявлены микрометрические хлопья графита неправильной формы (рисунок 7.5 А и Б), случайно ориентированные в исходных чернилах вместе с небольшими частицами, приписываемыми сшивающим агентам.

В работе [234] сообщается, что некоторые способы функционализации могут значительно изменить морфологию сажи, что приводит к уменьшению площади поверхности самого материала. В этом исследовании существенных различий между изображениями СЭМ для сажи и функционализированной сажи не наблюдалось. СЭМ-микрофотографии ТУЭ/С (рисунок 7.5 В, Г) и ТУЭ/С-ф (рисунок 7.5 Д, Е) показали, что наночастицы полностью и равномерно покрывают поверхность рабочего электрода, образуя многочисленные агломераты, похожие на «цветную капусту» (рисунок 7.5 Г, Е). Равномерное распределение С-ф по всей рабочей плоскости сенсора может свидетельствовать о сохранении морфологии поверхности после обработки [276, 234]. Причем, функционализацией размер агломератов функционализированной сажи на электроде меньше в сравнении с размерами чешуек неимененной сажи: для С-ф средний размер чешуек составил 22 нм, для сажи – 33 нм. Вероятно, уменьшение среднего размера чешуек и привело к увеличению электроактивной площади поверхности ТУЭ/С-ф по сравнению с ТУЭ/С.

В отличии от электродов, модифицированных сажами, ТУЭ/УНТ характеризуется наличием случайно распределенных одиночных длинных и губчатых кластеров нанотрубок, образованию которых в значительной степени способствует очень высокая удельная поверхность данного наноматериала и, как следствие, их склонность к агломерации (рисунок 7.5 Ж, 3). Губчатые кластеры УНТ локализованы преимущественно на микрометрических хлопьях графита неправильной формы, которые выступают над поверхностью электрода. Вероятно, концентрирование наноматериала около или на поверхностях микрометрических хлопьев графита, которые по литературным источникам [220] являются активными электрохимическими центрами, может обеспечивать лучшие электрохимические характеристики ТУЭ/УНТ в сравнении с немодифицированным ТУЭ.



Рисунок 7.5 – Электронная микрофотография распределения УНМ на рабочей поверхности А, Б – ТУЭ, В, Г – ТУЭ/С, Д, Е – ТУЭ/С-ф, Ж, З – ТУЭ/УНТ методом

7.1.4 Сравнительные характеристики электродов для Триазида

Проведено сравнение характеристик градуировочных зависимостей Триазида для ТУЭ/УНМ и контрольного СУЭ. Полученные результаты показаны на рисунке 7.6. На рисунке 7.7 представлены соответствующие вольтамперограммы для свежеприготовленных ТУЭ/УНМ.



Рисунок 7.6 – Зависимость высоты (мкА) (1)/площади (мкКл) (2) пика восстановления Триазида от его концентрации (мг/дм³) для: А – СУЭ, Б -ТУЭ/УНТ, В – ТУЭ/С, Г – ТУЭ/С-ф в растворе ББР + 0,04 моль/дм³ + Na₂SO₃ диапазон концентраций 25-200 мг/дм³ с шагом 25 мг/дм³

Как видно из рисунка 7.6, для всех электродов ток и площадь пика восстановления Триазида линейно зависят от его концентрации в растворе в диапазоне 25-200 мг/дм³. При этом коэффициент корреляции ближе к значению 1. При измерении площади пика восстановления Триазида предпочтительнее использовать в качестве аналитического сигнала площадь пика.



Рисунок 7.7 – КвВВА Триазида, зарегистрированные на: А – СУЭ, Б – ТУЭ-УНТ, В – ТУЭ-С, Γ – ТУЭ-С-ф в растворе ББР + 0,04 моль/дм³ + Na₂SO₃ (pH = 7,2 ± 0,2) диапазон концентраций 0-200 мг/дм³ с шагом 25 мг/дм³

Показатель правильности для 25 мг/дм³ Триазида (n = 3, P = 95 %) были получены по пиковому току в диапазоне $117\pm6\%$ (RSD = 2.0 %), $120\pm7\%$ (RSD = 2,9 %), 185±12 % (RSD=2,7 %), 153±16 % (RSD = 4,3 %) на ТУЭ, ТУЭ/УНТ, ТУЭ/С и ТУЭ/С-ф соответственно. Что касается оценки по площади пика, восстановление составило 99 ± 7 % (RSD = 3,0 %), 101 ± 8 % (RSD = 3,1 %), 163±11 % (RSD = 2,8 %), 130±15 % (RSD = 4,8 %) для ТУЭ, ТУЭ/УНТ, ТУЭ/С и ТУЭ/С-ф соответственно. Следовательно, в качестве отклика предпочтительно использовать площадь пика, так как этом случае чувствительность для Триазида на ТУЭ/УНМ близка к контрольному электроду СУЭ. Но среди ТУЭ/УНМ только ТУЭ/УНТ дает приемлемую точность анализа Триазида с показателем правильности около 100 %, что позволяет использовать именно этот электрод в аналитических целях (определение Триазида В его лекарственных формах методом стандартных добавок).

В случае использования ТУЭ/С и ТУЭ/С-ф восстановление указывает на возможность значительного систематического завышения результатов анализа. Кроме того, ТУЭ/С-ф (рисунок 7.7 Г) отличается от других ТУЭ/УНМ более высоким фоновым током. Это ограничивающий фактор в аналитических приложениях из-за вклада зарядных токов в фон. Кроме того, на фоне в области восстановления аналита регистрируется сигнал неясного характера: происходит раздвоение пика. Так как образование электроактивных групп происходит при функционализации технического углерода, возможно, что одноволновой шестиэлектронный процесс электропревращения Триазида разделяется на 2 волны, соответствующие, предположительно, присоединению двух и четырех электронов. Такая форма катодного сигнала неприемлема для аналитических целей. Однако эта особенность электрода может представлять интерес для изучения механизма процессов электрических превращений Триазида и его аналогов.

Расчет предела обнаружения Триазида на выбранном электроде был проведен по градуировочному графику в интервале концентраций 25-125 мг/дм³. Уравнение регрессии имеет вид: Q (мкКл) = $(0,02619\pm0,00027)$ ·C + $(0,09075\pm0,02259)$ с коэффициентом корреляции 0,9990. Предел обнаружения Триазида составляет 2,8 мг/дм³, предел количественного определения – 9,3 мг/дм³. При определении основного вещества в лекарственной форме повышение ПрО Триазида на 30 % при использовании ТУЭ/УНТ по сравнению со СУЭ не является значимым критерием при условии многократного (4-5 раз) снижения времени анализа и существенного упрощения его процедуры в условиях химического связывания растворенного кислорода на фоне раствора ББР + 0,04 моль/дм³ Na₂SO₃. Важно отметить, что ПрО и ПКО для Триазида методом ВЭЖХ со спектрофотометрической детекцией [277] составляет 135 и 450 мг/дм³ соответственно. Это почти в 50 раз выше по сравнению с разработанным вольтамперометрическим методом.

7.2 Применение электродов модифицированных углеродными нанотрубками для определения Триазида в фармацевтической субстанции «Триазид»

Анализ проводили согласно процедуре, описанной в п 7.2. Результаты анализа ЛФ Триазида, полученные ВА и ВЭЖХ, приведены в таблице 7.10.

Таблица 7.10 – Результаты определения Триазида в фармацевтической субстанции «Триазид» (n = 5, P = 95 %)

Заявленное содержание	Вольтамперометрия	ВЭЖХ [46]	
Триазида			
100±2 %			
Найденное содержание	99,6±1,2 %	99,9±0,4 %	
Триазида			
RSD, %	0,96	0,36	
t -критерий	<i>t эксп=0,26</i>		
	t табл =2,37 (f = 8)		
<i>F критерий</i>	F эксп = 0,55		
	F табл =6,39 ($f_1 = f_2 = 4$)		

Найденные значения близки к заявленному содержанию. Сравнение полученных обоими методами результатов по F и t критериям показало, что рассчитанные F и t величины не превышают табличные (теоретические) значения. По пределам определения и количественного метода оценки в 50 раз превосходит известную методику определения Триазида с применением ВЭЖХ [277]. Таким образом, вольтамперометрия является достойной недорогой альтернативой хроматографии, когда объект анализа имеет не очень сложную матрицу, как лекарственные препараты.

Выводы к 7 главе

Разработана вольтамперометрическая методика количественного ТУЭ определения Триазида фармацевтической субстанции на В модифицированном УНТ. Замена СУЭ на ТУЭ позволила кардинально упростить анализ, сократить его время в 4-5 раз и снизить его стоимость. Этот факт является полезным для дальнейшего развития экономичного и трудоемкого рутинного фармацевтического анализа. По пределам определения и количественного метода оценки в 50 раз превосходит известную методику определения Триазида с применением ВЭЖХ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Показано, что необратимое восстановление натриевой соли 2метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1-*c*]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрата происходит за счет нитрогруппы, сопряженной с ароматической системой. Согласно расчетным и экспериментальным данным электровосстановление Триазавирина® на первой стадии (pH 2-6) протекает по четырехэлектронной схеме восстановления нитрогруппы. Лимитирующей стадией процесса является дегидратация гидроксиаминопроизводного медленная вследствие внутримолекулярных переносов протонов между атомами азота цикла и сопровождается образованием кислорода нитрогруппы. Реакция анионрадикала, промежуточными продуктами реакции восстановления являются димеры. На ток и потенциал восстановления Триазавирина® в апротонной среде в значительной степени влияют ионы Na⁺: изменяется не только скорость протонирования анионных радикалов исследуемого соединения, но И В региоселективность этой реакции. водной среде восстановление Триазавирина® идет в протонированной форме, и наличие в растворе Na⁺ не влияет на аналитический сигнал.

2. Выбраны аналитический сигнал и условия регистрации вольтамперограмм

(0,1 моль/дм³ HNO₃). Разработана методика количественного анализа основного действующего вещества препарата Триазавирин® с использованием режима квадратно-волновой вольтамперометрии. Получена линейная прямой зависимость аналитического сигнала Триазавирина® от концентрации в 0,1-180,0 $M\Gamma/ДM^3$. Предел обнаружения, интервале рассчитанный ПО калибровочной кривой, составляет 0,04 мг/дм³. Минимально определяемая концентрация – 0,12 мг/дм³, 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

сопряженной происходит за счет восстановления нитрогруппы, с ароматической системой. Установлено, что электровосстановление Триазида протекает в одну шестиэлектронную стадию с образованием соответствующего гетероциклического амина через образование дианион-радикала. На ток и потенциал восстановления Триазида 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 Триазида также идет в протонированной форме, при наличии в растворе Na⁺ процесс электровосстановления нитрогруппы исследуемого соединения облегчается.

4. Разработана И валидирована методика количественного Триазида вольтамперометрического определения В фармацевтической субстанции на СУЭ в условиях продувки растворов инертным газом. Минимально определяемая концентрация Триазида в фармацевтической субстанции – 6,3 мг/дм³. 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 Триазида. Количественно охарактеризована связь между природой модификатора и аналитическим сигналом нитрогруппы препарата Триазид. Разработана новая методика для количественного вольтамперометрического определения Триазида в фармацевтической субстанции, включающая создание электрохимического сенсора. Минимально определяемая концентрация Триазида в фармацевтической субстанции – 9,3 мг/дм³. Результаты определения фармацевтической субстанции Триазида методом вольтамперометрии в совпали с известной методикой определения Триазида методом ВЭЖХ. При этом предел количественного определения Триазида разработанной методики 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 определения Триазавирина® количественные методики и Триазида могут быть использованы для контроля качества сырья и готовой продукции фармацевтической отрасли промышленности.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- СРЕ элемент постоянной фазы;
- DI относительное число парамагнитных центров;
- *Е*_{*p*} потенциал пика;
- *f*-частота импульса;
- *i* плотность тока;
- *I*_{*d*} диффузионный ток;
- I_p высота тока пика;
- *n* количество электронов;
- *Q* количество электричества;
- *R*_{ct} сопротивление межфазной передачи;
- R_s сопротивление электролита;
- *v* скорость сканирования потенциала электрода;
- *w* скорость вращения электрода;
- W импеданс Варбурга;
- σ-полуширина пика;
- ББР буфер Бриттона-Робинсона;
- ВА вольтамперограмма;
- ВЗМО высшая занятая молекулярная орбиталь;
- ГГ градуировочный график;
- ДИП дифференциально-импульсный;
- КвВ квадратно-волновой;
- ЛС лекарственное средство;
- МОК минимально-определяемая концентрация;
- МСВР масс-спектроскопия высокого разрешения;
- НВМО низшая вакантная молекулярная орбиталь;
- С-сажа;
- С-ф фунционализированная сажа;

Триазид – аргениновая соль 5-метил-6-нитро-1,2,4-триазоло[1,5α]пиримидин-7-она, моногидрат;

ТМПО – 3,3,5,5-тетраметил-1-пирролин N-оксид;

ТМТН – N-(1-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-4-ил-)-2метилпропанамид гидрохлорид;

Триазавирин® – натриевая соль 2-метилтио-6-нитро-1,2,4-триазоло[5,1с]-1,2,4-триазин-7-она, дигидрат;

ТУЭ – толстопленочный углеродосодержащий электрод;

УНМ – углеродные наноматериалы;

УНТ – углеродные нанотрубки;

ФШ – фактор шероховатости;

ХА – хроноамперограмма;

ЦВА – циклическая вольтамперограмма;

ЭВ – электровосстановление;

ЭХ – электрохимический.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

 Steinhauer, D. A. Rapid evolution of RNA viruses [текст] / D. A.
 Steinhauer, J. J. Holland //Annual Reviews in Microbiology. – 1987. – V. 41. – Is. 1. – P. 409-431.

Sanjuán, R. Viral mutation rates [текст] / R. Sanjuán, M. R. Nebot, N. Chirico [et.al.]//Journal of virology. – 2010. – V. 84. – Is. 19. – Р. 9733-9748.

3. Prescott, L. M. Microbiología (5a edn) [текст] / L. M. Prescott, J. P. Harley, D. A. Klein //International Microbiology. – 2004. – V. 7. – Is. 3. – P. 234.

4. Abdelrahman, Z. Comparative review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and influenza a respiratory viruses [текст] / Z. Abdelrahman, M. Li, X. Wang //Frontiers in immunology. – 2020. – V. 11. – Is. 2. – P. 1-14.

 Официальный сайт НИИ Гриппа им. Смородинцева/Система надзора за гриппом / Эпидемиологическая ситуация /Еженедельный бюллетень по гриппу

<u>https://www.influenza.spb.ru/system/epidemic_situation/laboratory_diagnostics/</u> (дата обращения: 06.03.2022).

6. Gu, R. X. Structural and energetic analysis of drug inhibition of the influenza A M2 proton channel [τεκcτ] / R. X. Gu, L. A. Liu, D. Q. Wei //Trends in pharmacological sciences. – 2013. – V. 34. – Is. 10. – P. 571-580.

 Pielak, R. M. Structural investigation of rimantadine inhibition of the AM2-BM2 chimera channel of influenza viruses [текст] / R. M. Pielak, K. Oxenoid, J. J. Chou //Structure. – 2011. – V. 19. – Is. 11. – Р. 1655-1663.

8. Jefferson, T. Amantadine and rimantadine for influenza A in adults [текст] /T. Jefferson, V. Demicheli, C. Di Pietrantonj, [et. al.]// Cochrane Database Syst. Rev. – Wiley, 2006. – Chap. RESULTS. – P. 5-9.

9. Wang, M. Z. Mechanism by which mutations at His274 alter sensitivity of influenza A virus N1 neuraminidase to oseltamivir carboxylate and zanamivir [текст] / M. Z. Wang, C. Y. Tai, D. B. Mendel //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2002. – V. 46. – Is. 12. – P. 3809-3816.

10. Han, N. Exploring the mechanism of zanamivir resistance in a neuraminidase mutant: a molecular dynamics study [текст] / N. Han, X. Liu, Y. Mu // Plots one.– 2012. – V. 7. – Is. 9. – Р. e4405-e4405.

11. Anderson, G. Melatonin: roles in influenza, Covid-19, and other viral infections [текст] / G. Anderson, R. J. Reiter //Reviews in medical virology. – 2020.
– V. 30. – Is. 3. – Р. e2109-e2113.

12. Andrade, F. B. The weight of obesity in immunity from influenza to COVID-19 [текст] / F. B. Andrade, A. Gualbert, C. Rezende [et. al.] //Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2021. – V. 11. – P. 1-14.

Reddy, D. Responding to pandemic (H1N1) 2009 influenza: the role of oseltamivir [текст] / D. Reddy //Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2010. – V.
 65. – Is. suppl 2. – P. ii35-Ii40.

14. Sheu, T. G. Update: Drug Susceptibility of Swine-Origin Influenza A (H1N1) Viruses [текст] / T. G. Sheu, R. Garten, C. Smith [et. al.] // Morbidity and Mortality Weekly Report. – 2009. – V. 58. – Р. 1-3.

15. Tan, Q. Ostavimir is ineffective against COVID-19: in silico assessment, in vitro and retrospective study [текст] / Q. Tan, Y. Jin //medRxiv. – 2020. – V. 5. – P. 1-15.

16. Sevilla-Castillo, F. Both chloroquine and lopinavir/ritonavir are ineffective for COVID-19 treatment and combined worsen the pathology: a single-center experience with severely ill patients [текст] / F. Sevilla-Castillo, O. J. Roque-Reyes, F. Romero-Lechuga [et. al.] //BioMed Research International. – 2021. – V. 2021. – P. 1-12.

17. Дельцов, А. Основы фармацевтической химии (фармакопейные методы анализа лекарственных веществ) : учеб. пособие [текст] / А. Дельцов, Н. Данилевская. – Москва: ИД Научная библиотека, 2014. –168 с.

18. Pysarevska, S. Voltammetry of local anesthetics: theoretical and practical aspects [текст] / S. Pysarevska, S. Plotycya, L. Dubenska //Critical Reviews in Analytical Chemistry. – 2021. – V. 51. – Is. 4. – Р. 339-352.

19. Santos, A. L. Electrochemical, spectrophotometric and liquidchromatographic approaches for analysis of tropical disease drugs [текст] / A. L. Santos, R. M. Takeuchi, N. R. Stradiotto //Current Pharmaceutical Analysis. – 2009. – V. 5. – Is. 1. – P. 69-88.

20. Siddiqui, M. Analytical techniques in pharmaceutical analysis: A review [текст] / M. Siddiqui, Z. A. AlOthman, N. Rahman //Arabian Journal of chemistry. – 2017. – V. 10. – P. S1409-S1421.

21. El-Maali, N. A. Voltammetric analysis of drugs [текст] / N. A. El-Maali //Bioelectrochemistry. – 2004. – V. 64. – Is. 1. – Р. 99-107.

22. Kauffmann J. M., Vire J. C. Pharmaceutical and biomedical applications of electroanalysis: a critical review [текст] / J. M. Kauffmann, J. C. Vire //Analytica chimica acta. – 1993. – V. 273. – Is. 1-2. – Р. 329-334.

23. Aboul-Enein, H. Y. Electroanalytical Methods in Pharmaceutical Analysis and Their Validation [текст] / H. Y. Aboul-Enein, S. A. Ozkan //Chromatographia. – 2012. – V. 75. – Is. 13. – Р. 811-823.

24. Ozkan, S. A. Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences: Voltammetry, Amperometry, Biosensors, Applications : Monographs in Electrochemistry [текст] / S. A. Ozkan, J.-M. Kauffmann, P. Zuman ; Ser. Edit. F. Scholz. – Potsdam, New York: Springer, 2015. –350 p.

25. Mirceski, V. Square-wave voltammetry: theory and application : Monographs in Electrochemistry [текст] / V. Mirceski, S. Komorsky-Lovric, M. Lovric Edit. F. Scholz. – New York: Springer Science & Business Media, 2007. – 200 p.

26. Пучковская, Е. С. Инверсионная вольтамперометрия азитромицина дигидрата [текст]: автореф. дис. ... канд. хим. наук : 02.00.02 :защита 15.11.2006 : утв. 15.07.2007 / Пучковская Елена Сергеевна. – Томск., 2006. – 19 с.

27. Baumann, A. Metabolic studies of tetrazepam based on electrochemical simulation in comparison to in vivo and in vitro methods [текст] / A. Baumann, W.

Lohmann, B. Schubert [et. al.] //Journal of Chromatography A. – 2009. – V. 1216. – Is. 15. – P. 3192-3198.

28. Kedderis, G. L. The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents [TEKCT] / G. L. Kedderis, G. T. Miwa // Drug metabolism reviews. – 1988. – V.
19. – Is. 1. – P. 33-62.

29. Wardman, P. Application of pulse radiolysis methods to study the reactions and structure of biomolecules [TEKCT] / P. Wardman //Reports on Progress in Physics. – 1978. – V. 41. – Is. 2. – P. 259-271.

30. Grunberg, E. Chemotherapeutic properties of heterocyclic compounds: monocyclic compounds with five-membered rings [текст] / E. Grunberg, E. H. Titsworth //Annual review of microbiology. – 1973. – V. 27. – P. 317-346.

31. Fuchi, Y. Artificial Host Molecules to Covalently Capture 8-NitrocGMP in Neutral Aqueous Solutions and in Cells [текст] / Y. Fuchi, H Murase, R Kai [et. al.] //Bioconjugate Chemistry. – 2021. – V. 32. – Is. 2. – P. 385-393.

32. Rusinov, V. L. Biologically active azolo-1, 2, 4-triazines and azolopyrimidines [текст] / V. L. Rusinov, V. N. Charushin, O. N. Chupakhin //Russian Chemical Bulletin. – 2018. – V. 67. – Is. 4. – Р. 573-599.

33. Lioznov, D. A. Practice of application of domestic anti-viral drug in etiotropic therapy of acute respiratory viral infection [текст] / D. A. Lioznov, K. S. Volkov, A.A. Alekseeva [et. al.]// Terapevticheskii Arkhiv. – 2021. – V. 92. – P. 59-63.

34. Tihonova, E. P. Nitrosynthones in the synthesis of nitrodividuals of azolo [1, 5-a] pyrimidines and azolo [5, 1-c]-1, 2, 4-triazines [текст] / Е. Р. Tihonova, T Yu, A. A. Kuzmina, Y. Anisimova [et. al.] //Eksperimentalnaya klynicheskaya Farmacol. – 2018. – V. 350. – P. 25-32.

35. Karpenko, I. Antiviral properties, metabolism, and pharmacokinetics of a novel azolo-1, 2, 4-triazine-derived inhibitor of influenza A and B virus replication [τεκcτ] / I. Karpenko, S. Deev, O. Kiselev [et. al.] //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2010. – V. 54. – Is. 5. – P. 2017 – 2022.

36. Sabitov, A. U. Experience of the preventive use of the drug Riamilovir in the foci of coronavirus infection (COVID-19) [текст] / A. U. Sabitov, P. V. Sorokin,
S. Y. Dashutina //Terapevticheskii arkhiv. – 2021. – V. 93. – Is. 4. – P. 435-439.

37. Kasyanenko, K. V. Evaluation of the effectiveness of Riamilovir in the complex therapy of patients with COVID-19 [текст] / К. V. Kasyanenko, K. V. Kozlov, O. V. Maltsev [et. al.] //Terapevticheskii arkhiv. – 2021. – V. 93. – Is. 3. – Р. 290-294.

38. Maya, J. D. Trypanosoma cruzi: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives [текст]/ J. D. Maya, S. Bollo, L. J. Nunez-Vergara [et. al.] //Biochemical pharmacology. – 2003. – V. 65. – Is. 6. – Р. 999-1006.

39. Kováč, I. M. J. Č. G. Triazavirin might be the new hope to fight Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) [текст] / I. M. J. Č. G. Kováč, M. P. L. Hudecová //Ceska a Slovenska farmacie: casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti. – 2021. – V. 70. – Is. 1. – P. 18-25.

40. Shahab, S. Triazavirin-Potential inhibitor for 2019-nCoV Coronavirus M protease: A DFT study [текст] / S. Shahab, M. Sheikhi //Current molecular medicine. – 2021. – V. 21. – Is. 8. – P. 645-654.

41. Deyeva, E. G. New antiviral drug TRIAZID. Results of first phase of clinical trial / E. G. Deyeva, Yu. I. Shevchik, A. A. Shaldzhan [et. al.] //Razrab. Regist. Lek. Sredstv. – 2018. – V. 3. – P. 172-180.

42. Slepukhin P. A., Synthesis and X-ray structural studies of 5-methyl-6nitro-7-oxo-4, 7-dihydro-1, 2, 4-triazolo [1, 5-a] pyrimidine L-arginine and piperidine salts [TERCT] / P. A. Slepukhin, E. K. Voinkov, E. N. Ulomskiy [et. al.] //Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 2019. – V. 55. – Is. 10. – P. 989-992.

43. Lund, H. Organic Electrochemistry : An Introduction and a Guide [текст] / H. Lund, Ed. M. Baizer. – New York: Marcel Dekker, 1983. – 1393 р.

44. Kornilov, M. Y. Nitroazines. 13. Aromaticity of nitroazoloazines with nitrogen bridge [TEKCT] / M. Y. Kornilov, A. V. Turov, A. V. Myasnikov [et. al.] // Journal of Organic Chemistry. -1991. - V. 27. - Is. 1. - P. 144-148.

45. Zuman, P. Half a century of research using polarography [текст] / P. Zuman //Microchemical journal. – 1997. – V. 57. – Is. 1. – P. 4-51.

46. Головенко, Н. Н. Механизмы реакций метаболизма ксенобиотиков в биологических мембранах/ Н. Н. Головенко. — Киев : Наук. думка, 1981.— 220 с.

47. Iwasaki, K. Reduction of tertiary amine N-oxide by purified cytochrome P-450 [текст] / K. Iwasaki, H. Noguchi, R. Kato [et. al.] //Biochemical and biophysical research communications. – 1977. – V. 77. – Is. 4. – P. 1143-1149.

48. Kato, R. The reduction of tertiary amine N-oxides by hepatic microsomes and mitochondria [TEKCT] / R. Kato, M. Sugiura //Biological oxidation of nitrogen: Proc. 2nd Int Symp. London. – 1977. – V. 5. – P. 420-461.

49. Sugiura, M. Evidence for the involvement of cytochrome P-450 in tiaramide N-oxide reduction [TEKCT] / M. Sugiura //Life sciences. – 1974. – V. 15. – Is. 8. – P. 1433-1442.

50. Bickel, M. H. Formation and metabolism of the N-oxide of imipramine in vitro and in vivo [текст] / M. H. Bickel, H. J. Weder //4th Meeting Fed. Europ. Biochem. Soc. – 1967. – V. 3. – P. 27.

51. Mason, R. P. Mechanism of microsomal and mitochondrial nitroreductase. Electron spin resonance evidence for nitroaromatic free radical intermediates [TEKCT] / R. P. Mason, J. L. Holtzman //Biochemistry. – 1975. – V. 14. – Is. 8. – P. 1626-1632.

52. Wardman, P. Electron transfer and oxidative stress as key factors in the design of drugs selectively active in hypoxia [TEKCT] / P. Wardman //Current medicinal chemistry. -2001. - V. 8. - Is. 7. - P. 739-761.

53. Nepal, I. K. Nitro-group-containing drugs [текст] / I. K. Nepal, H. Y. Lee, J. P Liou. //Journal of medicinal chemistry. – 2018. – V. 62. – Is. 6. – P. 2851 – 2893.

54. Patent 2004214798A1 U.S., Nitro Phosphoramide Compositions and Methods for Targeting and Inhibiting Undesirable Cell Growth or Proliferation: publ. 28.10.2004 / Hu L. ; 2 p. 55. Patent WO 2006/043839 A1 U.S.A. Nitrobenzindoles and Their Use in Cancer Therapy : publ. 27.03.2006 / Denny, W. A.; Wilson, W. R.; Stevenson, R. J.; Tercel, M.; Atwell, G. J.; Yang, S.; Patterson, A. V.; Pruijn, F. B. – 3 p.

56. Patent WO 2008/151253 A1 U.S.A. Activated Prodrugs of Antineoplastic Agents. : publ. 11.12.2008 / Jiao, H.; Lewis, J.; Matteucce, M.; Sun, D. Hypoxia. – 5 p.

57. Viodé, C. Enzymatic reduction studies of nitroheterocycles / C. Viodé, N.
Bettache, N. Cenas [et. al.] //Biochemical pharmacology. – 1999. – V. 57. – Is. 5. – P.
549 – 557.

58. Patent WO 2009/018163 A1 U.S.A. Activated Prodrugs of Anthracyclines. : publ. 5.02.2009 / Cai X. H.; Duan J. X.; M. M. Hypoxia. – 3 p.

59. Patent WO 2013/096687 A1 U.S.A. Administration of Hypoxia Activated Prodrugs in Combination with CHK1 Inhibitors for Treating Cancer. : publ. 27.06.2013 / Hart C.; Meng, F.; Sun, J. – 5 p.

60. Patent WO2016/161342 A2 U.S.A. Nitrobenzyl Derivatives of Anti-Cancer Agents. : publ. 6.10.2016 / Duan J. X.; Cao Y.; Cai X.; Jiao H.; Jing Y.; Matteucci M. – 5 p.

 61. Лукашевич, В.О. Восстановление нитросоединений ароматического ряда [текст] / В.О. Лукашевич // Органические продукты и красители. – 1948.-№ 17. – С. 692-698.

62. Laviron, E. The reduction mechanism of aromatic nitro compounds in aqueous medium: Part V. The reduction of nitrosobenzene between pH 0.4 and 13 [текст] / E. Laviron, A. Vallat, R. Meunier-Prest //Journal of Electroanalytical Chemistry. – 1994. – V. 379. – Is. 1-2. – P. 427-435.

63. Laviron, E. The reduction mechanism of aromatic nitro compounds in aqueous medium: Part II. The reduction of 4-nitropyridine between H0=- 6 and pH
9.6 [ΤΕΚCΤ] / Ε. Laviron, R. Meunier-Prest, A. Vallat [et al.] //Journal of Electroanalytical Chemistry. – 1992. – V. 341. – Is. 1-2. – P. 227-255.

64. Lacasse, R. The reduction mechanism of aromatic nitro compounds in aqueous medium Part III. The reduction of 4-nitropyridine-N-oxide between H0=-6

and pH 9 [текст] /R. Lacasse //Journal of Electroanalytical Chemistry. – 1993. – V. 359. – Is. 1-2. – P. 223-239.

65. Zuman, P. Half a century of research using polarography [текст] / P. Zuman //Microchemical journal. – 1997. – V. 57. – Is. 1. – P. 4-51.

66. Zuman, P. Polarographic and electrochemical studies of some aromatic and heterocyclic nitro compounds, part I: General mechanistic aspects [текст] / P. Zuman, Z. Fijalek, D. Dumanovic [et. al.] //Electroanalysis. – 1992. – V. 4. – Is. 8. – P. 783-794.

67. Morales, A. Voltammetric behaviour of nitrofurazone, furazolidone and other nitro derivatives of biological importance [текст] / A. Morales, P. Richter, M. I. Toral //Analyst. – 1987. – V. 112. – Is. 7. – Р. 965-970.

68. Stočesová, D. Polarographic reduction of aromatic nitrocompounds
[текст] / D. Stočesová //Collection of Czechoslovak Chemical Communications. –
1949. – V. 14. – Р. 615-625.

69. Zuman, P. Exner O. Oxime derivatives. VIII. Polarographic reduction of O-and N-substituted oximes [текст] / P. Zuman //Collection of Czechoslovak Chemical Communications. – 1965. – V. 30. – Is. 6. – P. 1832-1852.

70. Karakus, C. Electrosynthesis of nitrosobenzenes bearing electron withdrawing substituents [текст] / C. Karakus, P. Zuman //Journal of the Electrochemical Society. – 1995. – V. 142. – Is. 12. – P. 4018.

71. Shikata, M. Polarographic Studies with the Dropping Mercury Cathode, Part LXXIV [текст] / M. Shikata, I. Tachi //The Electronegativity Rule of the Reduction Potentials of Organic Compounds. Collection. – 1938. – V. 10. – P. 368-379.

72. Bollo, S. Nitroradical Anion Formation from some Iodo-Substituted Nitroimidazoles / S. Bollo, L. J. Nún ez-Vergara, C. Barrientos, J. [et al.] //Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis. – 2005. – V. 17. – Is. 18. – P. 1665-1673.

73. Dennis, S. F. The Reduction of Substituted Nitrobenzenes at the Dropping Mercury Cathode [текст] / S. F. Dennis, A. S. Powell, M. J Astle. //Journal of the American Chemical Society. – 1949. – V. 71. – Is. 4. – P. 1484-1487.

74. Page, J. E. Polarographic Behavior of Aromatic Nitro Compounds. I. Mononitro Compounds [текст] / J. E. Page, J. W. Smith, J. G. Waller //The Journal of Physical Chemistry. – 1949. – V. 53. – Is. 4. – Р. 545-562.

75. Bakeer, S. N. Studying the effect of substituent on the electrochemical reduction of nitrobenzene and its Derivatives [τεκcτ] / S. N. Bakeer // Chemistry and Materials Research. – 2015. – V.7. - Is 9. – P. 63-68.

76. Holleck, L. Influence of ions of supporting electrolyte on polarographic reduction of aromatic nitro compounds in acetonitrile and DMF [текст] / L. Holleck, D. Becher //J. Electroanal. Chem. – 1962. – V. 4. – P. 321-331.

77. Parker, V. D. The association reactions of ion radicals with neutral molecules. I. thermodynamic parameters for the association of benzaldehyde anion radical with alcohols in n, n-dimethylformamide [TEKCT] / V. D. Parker //Acta chemica Scandinavica. Series B. Organic chemistry and biochemistry. – 1984. – V. 38. – Is. 2. – P. 125-130.

78. Krygowski, T. M. Ion pair formation effects in the reversible electroreduction of nitrobenzene in N, N-dimethylformamide [TEKCT] / T. M. Krygowski, M. Lipsztajn, Z. Galus //Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry. – 1973. – V. 42. – Is. 2. – P. 261-269.

79. Chauhan, B. G. The influence of ion pairing on the electroreduction of nitromesitylene in aprotic solvents. 1. Thermodynamic aspects [текст] / B. G. Chauhan, W. R. Fawcett, A. Lasia //The Journal of Physical Chemistry. – 1977. – V. 81. – Is. 15. – P. 1476 – 1481.

 Кунаев, Е.Н. Спектрометрия электроно-паромагнитрого резонанса: учебн.-метод. Пособие [текст] / Е.Н. Кунаев, А.Ю. Куксин, А.О. Тишкина. – Москва : Издат МФТИ, 2014. – 38 с. 81. Huie, W. R. Nitrone spin traps for biological studies.(Volumes I and II) :
Doctoral dissertation of chemistry [текст] / W. R. Huie. - Louisiana State University
and Agricultural & Mechanical College, 1987. – 67 p.

82. Ward, R. L. Electron Spin Resonance Studies of the Potassium Salt of m-Dinitrobenzene Negative Ion [текст] / R. L. Ward //The Journal of Chemical Physics. – 1960. – V. 32. – Is. 2. – P. 410-416.

83. Ward, R. L. An Electron Spin Resonance Study of Nitro Group-Alkali Metal Interactions in Aromatic Hydrocarbons [текст] / R. L. Ward //Journal of the American Chemical Society. – 1961. – V. 83. – Is. 6. – Р. 1296 – 1300.

84. Казакова, В. М. Анион-радикалы различных производных метадинитробензола [текст] /В. М. Казакова, В. Б. Писков // Журн. структ. химии. – 1973. – Т. 14. – № 4. – С. 734-737.

85. Казакова, В. М. Спектры ЭПР анион-радикалов некоторых производных мета-динитробензола [текст] / В. М. Казакова, В. И. Ковнер, И. Г. Макаров // Журн. структ. химии. –1974. – Т. 15. – № 6. – С.1071-1075.

86. Минина, Н. Е. Анион-радикалы нитробензонитрилов и метадинитробензонитрилов [текст] / Н. Е. Минина, В. М. Казакова, В. Б. Писков // Журн. общ. химии. –1982. – Т. 52. – № 5. – С. 961-967.

87. Казакова, В. М. Химическая связь и строение молекул [текст] / В.
М. Казакова, Н. Е.Минина. – Москва : Наука, 1984. – 152 с.

88. Минина, Н. Е. Полярографическое поведение ряда замещенных нитро- и м-ди-нитробензолов и спектры ЭПР их анион-радикалов [текст] / Н. Е. Минина, В. М. Казакова, В. Б. Писков // Журн. общ. химии. –1989. – Т. 58. – № 5. – С. 1178-1183.

89. Минина, Н. Е. Электрохимическая реакционная способность некоторых замещенных мета-динитробензолов [текст] / Н. Е. Минина, В. М. Казакова, В. Б. Писков // Журн. общ. химии. – 1985. – Т. 55. – № 5. – С. 1132-1136.

90. Минина, Н. Е. Спектры ЭПР анион-радикалов некоторых замещенных нитро-бензолов [текст] / Н. Е. Минина, В. М. Казакова, Юн Сер Ин // Журн. общ. химии. – 1991. – Т. 61. – № 6. – С. 1439-1442.

91. Казакова, В. М. Анион-радикалы некоторых замещенных 2,4динитробензолов [текст] /В. М. Казакова, Н. Е. Минина, И. Ю. Кокорева // Журн. общ. химии. – 1997. – Т. 67. – № 9.– С. 1565-1568.

92. Geske, D. H. Steric effects of nitrogen hyperfine coupling in methyl substituted mono- and dinitrobenzene anion-radical [текст] / D. H. Geske, J. L. Ragle // J. Am. Chem. Soc. – 1961. –V. 83. – Is. 20. – P. 3532-3533.

93. Bernal, I. Electron spin resonance studies of aromatic polynitrocompounds [текст] / I. Bernal, G. K. Fraenkel // J. Am. Chem. Soc. – 1964. – V. 86. – Is. 18. – P. 1671 – 1675.

94. Ward, R. L. Spin distribution in sodium-meta-dinitrobenzene [текст] / R. L. Ward // J. Am.Chem. Soc. -1961. - V. 83. - Is. 5. - P. 1286 - 1300.

95. Казакова, В. М. Анион-радикалы замещенных нитро- и динитробензолов [текст] / В. М. Казакова, Н. Е. Минина //Вестник МИТХТ. – 2007. – Т. 2. – №. 5. – С. 3-10.

96. Kokkinidis, G. Use of Pt/M (UPD)(M Pb, Tl, Bi) modified electrodes to the catalytic electroreduction of heterocyclic nitro compounds—I. 3-nitro-1H-1, 2, 4-triazole [текст] / G. Kokkinidis, K. Hasiotis, D. Sazou //Electrochimica acta. – 1990. – V. 35. – Is. 11. – P. 1957 – 1964.

97. Dumanović D., Polarographic and electrochemical studies of some aromatic and heterocyclic nitro compounds, part II: Electroreduction of mono-and dinitropyrazoles and-imidazoles [текст] / D. Dumanović, J. Jovanović, D. Sužnjević [et. al.] //Electroanalysis. – 1993. – V. 5. – Is. 7. – P. 868-879.

98. Janzen, E. G. Spin trapping [текст] / E. G. Janzen //Accounts of Chemical Research. – 1971. – V. 4. – Is. 1. – Р. 31-40.

99. Kissinger, P.T. Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry [текст] / P.T. Kissinger, W.R. Heineman, ed. N.Y. : Dekker. – 1996. – 960 с. 100. Будников, Г. К. Фармацевтический анализ [текст] / Г.К. Будников Под ред. С.Ю. Гармонова // Проблемы аналитической химии. Т. 16. – Москва : Аргамак-Медиа, 2013. – 774 с.

101. Государственная фармакопея Российской Федерации Том [текст]. –
 XIV изд. – Москва : Медицина, 1989. – 7019 с.

102. The International Pharmacopoeia. 4-th ed., including First Suppl. WHO.– Geneva : 2008. – 351 p.

103. Малахова, Н.А. Вольтамперометрия в фармацевтическом анализе [текст] / Н.А. Малахова, А.В. Иванова, А.Н. Козицина [и др.]// Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2014. – Т. 7. – № 2. – С. 90-99.

104. Adhoum, N. Determination of naproxen in pharmaceuticals by differential pulse voltammetry at a platinum electrode [текст] / N. Adhoum, L Monser, M Toumi [et. al.] //Analytica chimica acta. – 2003. – V. 495. – Is. 1. – P. 69-75.

105. Abbaspour, A. Electrochemical monitoring of piroxicam in different pharmaceutical forms with multi-walled carbon nanotubes paste electrode [текст] / A. Abbaspour, R. Mirzajani //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2007. – V. 44. – Is. 1. – P. 41-48.

106. Ghoneim, M. M. Adsorptive stripping voltammetric determination of the anti-inflammatory drug celecoxib in pharmaceutical formulation and human serum [текст] / M. M. Ghoneim, A. M. Beltagi //Talanta. – 2003. – V. 60. – Is. 5. – P. 911-921.

107. Goyal, R. N. Voltammetric biosensors for the determination of paracetamol at carbon nanotube modified pyrolytic graphite electrode [текст] / R. N. Goyal, V. K. Gupta, S. Chatterjee //Sensors and Actuators B: Chemical. – 2010. – V. 149. – Is. 1. – P. 252-258.

108. Türköz, E. Determination of ticlopidine in pharmaceutical products [текст] / E. Türköz, A. Nur Onar //Analytical letters. – 2007. – V. 40. – Is. 11. – P. 2231-2240. 109. Argekar, A. P. Simultaneous determination of mebendazole and pyrantel pamoate from tablets by high performance liquid chromatography-reverse phase (RP-HPLC) [текст]/ A. P. Argekar, S. V. Raj, S. U. Kapadia //Talanta. – 1997. – V. 44. – Is. 11. – P. 1959-1965.

110. Alpar, N. Voltammetric method for the simultaneous determination of melatonin and pyridoxine in dietary supplements using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode [текст]/ N. Alpar, P. T. Pınar, Y. Yardım [et.al.] //Electroanalysis. – 2017. – V. 29. – Is. 7. – Р. 1691-1699.

111. El-Hefnawey, G. B. Voltammetric behavior and quantification of the sedative-hypnotic drug chlordiazepoxide in bulk form, pharmaceutical formulation and human serum at a mercury electrode [текст] / G. B. El-Hefnawey, I. S. El-Hallag, E. M. Ghoneim [et. al.] //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2004. – V. 34. – Is. 1. – P. 75-86.

112. Yardımcı, C. Electrochemical studies and differential pulse polarographic analysis of lansoprazole in pharmaceuticals [текст] / C. Yardımcı, N. Özaltın //Analyst. – 2001. – V. 126. – Is. 3. – Р. 361-366.

113. Carrazón, J. M. P. Electroanalytical study of sulphamerazine at a glassycarbon electrode and its determination in pharmaceutical preparations by HPLC with amperometric detection [текст]/ J. M. P. Carrazón, A. D. Recio, L. M. P. Diez //Talanta. – 1992. – V. 39. – Is. 6. – P. 631-635.

114. El-Enany, N. Voltammetric analysis of trazodone HCl in pharmaceuticals and biological fluids [текст] / N. El-Enany, F. Belal, M. S. Rizk //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2002. – V. 30. – Is. 2. – P. 219-226.

115. Nouws, H. P. A. Electrochemical determination of citalopram by adsorptive stripping voltammetry–determination in pharmaceutical products [текст] / H. P. A. Nouws, C. Delerue-Matos, A. A. Barros //Analytical letters. – 2006. – V. 39. – Is. 9. – P. 1907-1915.

116. Demircan, Ş. Electroanalytical characterization of verapamil and its voltammetric determination in pharmaceuticals and human serum [текст] / Ş.

Demircan, S. Kır, S. A Ozkan. //Analytical letters. – 2007. – V. 40. – Is. 6. – P. 1177-1195.

117. Kalanur, S. S.Electrochemical Studies of Buzepide Methiodide and their analytical applications [текст]/ S. S. Kalanur, J. Seetharamappa, U. Katrahall [et. al.]//Int. J. Electrochem. Sci. – 2008. – V. 3. – Р. 711-720.

118. Siddiqui, I. Voltammetric determination of vitamins in a pharmaceutical formulation [TEKCT] / I. Siddiqui, K. S. Pitre //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. -2001. - V. 26. - Is. 6. - P. 1009-1015.

119. Wu, Y. H. Voltammetric Investigation of Vitamin B_6 at a Glassy Carbon Electrode and Its Application in Determination [текст] / Y. H. Wu, F. J. Song//Bulletin of the Korean Chemical Society. – 2008. – V. 29. – Is. 1. – P. 38-42.

120. El-Desoky, H. S. Stripping voltammetric determination of silymarin in formulations and human blood utilizing bare and modified carbon paste electrodes [текст]/ H. S. El-Desoky, M. M. Ghoneim //Talanta. – 2011. – V. 84. – Is. 1. – P. 223-234.

121. Jain, R. Adsorptive stripping voltammetric behavior and determination of anticholinergic agent oxybutynin chloride on a mercury electrode [текст] / R. Jain, K. Radhapyari, N. Jadon //Journal of colloid and interface science. – 2007. – V. 314. – Is. 2. – P. 572-577.

122. Altiokka, G. Voltammetric determination of doxazosin in tablets using rotating platinum electrode [текст] / G. Altiokka //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2001. – V. 25. – Is. 4. – Р. 387-391.

123. Abasq, M. L. Determination of entacapone by differential pulse polarography in pharmaceutical formulation [текст] / M. L. Abasq, P. Courtel, G. Burgot //Analytical letters. – 2008. – V. 41. – Is. 1. – Р. 56-65.

124. Ghoneim, M. M. Polarographic behaviour of loratadine and its direct determination in pharmaceutical formulation and human plasma by cathodic adsorptive stripping voltammetry [текст] / M. M. Ghoneim //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2001. – V. 25. – Is. 5. – P. 933-939.

125. Bozal, B. A review of electroanalytical techniques for determination of anti-HIV drugs [текст] / B. Bozal, B. Uslu, S. A. Özkan //International Journal of Electrochemistry. – 2011. – V. 2011. – P. 1235-1246.

126. Nair, M. D. Nitroimidazoles as chemotherapeutic agents [текст] / M. D. Nair, K. Nagaraja //Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progrès des recherches pharmaceutiques. – 1983. – V. 27. – P. 163-252.

127. Cavalleri, B. Nitroimidazole chemistry. I. Synthetic methods Review [текст] / B. Cavalleri //NATO advanced study institutes series. Series A. Life sciences. – 1982. – V. 42. – P. 9-33.

128. Brett, A. M. O. Voltammetric behavior of nitroimidazoles at a DNA-biosensor [текст] / A. M. O. Brett, S. H. P. Serrano, I. Gutz [et. al] //Electroanalysis. – 1997. – V. 9. – Is. 14. – Р. 1132-1137.

129. Özkan, S. A. Electrochemical reduction of metronidazole at activated glassy carbon electrode and its determination in pharmaceutical dosage forms [текст] / S. A. Özkan, Y. Özkan, Z. Şentürk //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 1998. – V. 17. – Is. 2. – P. 299-305.

130. El-Sayed, G. O. Polarographic determination of metronidazole in pharmaceutical formulations and urine [текст] / G. O. El-Sayed //Microchemical journal. – 1997. – V. 55. – Is. 1. – Р. 110-114.

131. Lichtig, J. Determination of secnidazol in pharmaceutical tablets and intestinal fluids by differential pulse polarography [текст] / J. Lichtig, R. F. Andrade, J. M. Vaz //Analytica chimica acta. – 1996. – V. 332. – Is. 2-3. – Р. 161-164.

132. Radi, A. E. Determination of secnidazole in urine by adsorptive stripping voltammetry [текст] / A. E. Radi, A. Hassanein //Chemical and pharmaceutical bulletin. – 2000. – V. 48. – Is. 5. – Р. 600-602.

133. Radi, A. Electrochemical reduction of secnidazole and its determination in tablets [текст] / A. Radi, S. El-Laban, A. G. El-Kourashy //Electroanalysis. – 1997.
– V. 9. – Is. 8. – Р. 625-628.
134. Lichtig J., Andrade R. F., Vaz J. M. Determination of secnidazol in pharmaceutical tablets and intestinal fluids by differential pulse polarography [текст] / J. Lichtig, R. F. Andrade, J. M. Vaz //Analytica chimica acta. – 1996. – V. 332. – Is. 2-3. – P. 161-164.

135. La-Scalea, M. A. Voltammetric behavior of benznidazole at a DNAelectrochemical biosensor [текст] / M. A. La-Scalea //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2002. – V. 29. – Is. 3. – Р. 561-568.

136. Barbeira, P. J. S. Polarographic determination of benznidazole in DMSO [текст] / P. J. S. Barbeira, B. Uslu, H. Y. Aboul-Enein [et. al.] //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 1999. – V. 20. – Is. 4. – P. 723-726.

137. Arguelho, M. G. Electroreduction of benznidazole in dimethylsulfoxide [текст] / M. G. Arguelho, M. Silva, N. R. Stradiotto //Journal of The Electrochemical Society. – 2001. – V. 148. – Is. 2. – P. D1-D3.

138. Zuhri, A. Z. A. Electrochemical study on the determination of tinidazole in tablets [текст] / A. Z. A. Zuhri //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 1999. – V. 21. – Is. 4. – P. 881-886.

139. Özkan, S. A. Determination of ornidazole in pharmaceutical dosage forms based on reduction at an activated glassy carbon electrode [текст] / S. A. Özkan, Z. Şenturk, I. Biryol //International journal of pharmaceutics. – 1997. – V. 157. – Is. 2. – P. 137-144.

140. Bollo, S. Polarographic reduction of megazol and derivatives, and its polarographic, UV spectrophotometric, and HPLC determination [TEKCT] / S. Bollo //Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis. – 2001. – V. 13. – Is. 11. – P. 936-943.

141. Khodari, M.Electroreduction and quantification of furazolidone and furaltadone in different media [текст] / M. Khodari, H. Salah El-Din, G. A. M. Mersal //Microchimica Acta. – 2000. – V. 135. – Is. 1. – Р. 9-17.

142. Khodari, M. Cathodic stripping voltammetric behaviour of nitrofurazone and its determination in pharmaceutical dosage form, urine and serum by linear sweep voltammetry [текст] / M. Khodari, H. Mansour, G. A. M. Mersal //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 1999. – V. 20. – Is. 3. – Р. 579-586.

143. Hammam, E. Determination of nitrofurantoin drug in pharmaceutical formulation and biological fluids by square-wave cathodic adsorptive stripping voltammetry [текст] / E. Hammam //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2002. – V. 30. – Is. 3. – P. 651-659.

144. Guzmán, A. Voltammetric Determination of Antibacterial Nitro-Compounds at Activated Carbon Fibre Microelectrodes [текст] / A. Guzmán //Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis. – 2004. – V. 16. – Is. 21. – Р. 1763-1770.

145. Diab, N. Sequential-injection stripping analysis of nifuroxime using DNA-modified glassy carbon electrodes [текст] / N. Diab, A. AbuZuhri, W. Schuhmann //Bioelectrochemistry. – 2003. – V. 61. – Is. 1-2. – P. 57-63.

146. Radi, A. Determination of nifuroxazide in capsules by differential pulse polarography [текст] / A. Radi, S. El-Laban, I. M. M. Kenawy //Analytical sciences. – 1998. – V. 14. – Is. 3. – Р. 607-608.

147. Radi, A. Determination of nifuroxazide in human serum by adsorptive stripping voltammetry [текст] / A. Radi, M. A. El Ries //Analytical sciences. – 1999. – V. 15. – Is. 4. – P. 385-388.

148. Buchberger, W. Determination of nifuroxazide with polarography and adsorptive stripping voltammetry at mercury and carbon paste electrodes [текст] / W. Buchberger, G. Niessner, R. Bakry //Fresenius' journal of analytical chemistry. – 1998. – V. 362. – Is. 2. – P. 205-208.

149. Şentürk, Z. Electroanalytical study of nifedipine using activated glassy carbon electrode [текст] / Z. Şentürk, S. A. Özkan, Y. Özkan //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 1998. – V. 16. – Is. 5. – P. 801-807.

150. Özaltin, N. Determination of nifedipine in human plasma by square wave adsorptive stripping voltammetry [текст] / N. Özaltin, C. Yardimci, I. Süslü //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2002. – V. 30. – Is. 3. – P. 573-582.

151. Ghoneim, M. M. Cathodic adsorptive stripping square-wave voltammetric determination of nifedipine drug in bulk, pharmaceutical formulation and human serum [текст] / M. M. Ghoneim, A. Tawfik, P. Y Khashaba. //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2003. – V. 375. – Is. 3. – P. 369-375.

152. Madhusudana, R. T. Differential Pulse Adsorptive Stripping Voltammetric Determination of Nifedipine and Nimodipine in Pharmaceutical Formulations, Urine, and Serum Samples by Using a Clay-Modified Carbon-Paste Electrode [TEKCT] / R. T. Madhusudana, R. S. Jayarama //Analytical letters. – 2004. – V. 37. – Is. 10. – P. 2079-2098.

153. Li, X. Study on ethanol gas sensor based on hierarchical structured NiO/Zn2SnO4 nanoflowers [текст] / X. Li //Chinese Journal of Analytical Chemistry. – 2022. – V. 50. – Is. 4. – P. 564-573.

154. Atkosar, Z. Pulse polarographic determination of nicardipine-HCl [текст] / Z. Atkosar, G. Altiokka, M. Tunçel //Pharmazie. – 1997. – V. 52. – Is. 12. – Р. 959-960.

155. Álvarez-Lueje, A. Electrochemical study of nisoldipine: analytical application in pharmaceutical forms and photodegradation [текст] / A. Álvarez-Lueje, L. Naranjo, L. J. Núñez-Vergara //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 1998. – V. 16. – Is. 5. – P. 853-862.

156. Dogrukol-Ak, D. A differential pulse voltammetric determination of nisoldipine using glassy carbon electrode in pharmaceutical preparations [текст] / D. Dogrukol-Ak, N. Gökören, M. Tunçel //Analytical letters. – 1998. – V. 31. – Is. 1. – P. 105-116.

157. A., Álvarez-Lueje Voltammetric behavior of lercanidipine and its differential pulse polarographic determination in tablets [текст] / Álvarez-Lueje A., L. J. Núñez-Vergara //Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis. – 2002. – V. 14. – Is. 15-16. – P. 1098-1104.

158. Álvarez-Lueje, A. Voltammetric study of nimesulide and its differential pulse polarographic determination in pharmaceuticals [текст] / Álvarez-Lueje A., L.
J. Núñez-Vergara //Electroanalysis. – 1997. – V. 9. – Is. 15. – P. 1209-1213.

159. Malagutti, A. R. Determination of ranitidine in drugs using a mercury coated platinum ultramicroelectrode and hanging mercury dropping electrode [текст] / A. R. Malagutti, L. H. Mazo //Journal of the Brazilian Chemical Society. – 2003. – V. 14. – P. 274-280.

160. Squella, J. A. Polarographic determination of loratadine in pharmaceutical preparations [текст] / J. A. Squella //Talanta. – 1996. – V. 43. – Is. 12. – P. 2029-2035.

161. Radi, A. Indirect determination of praziquantel in human serum by cathodic adsorptive stripping voltammetry [текст] / A. Radi, A. M. Hassanein //Chemia Analityczna. – 2001. – V. 46. – Is. 4. – P. 561-567.

162. Adhoum, N. Determination of naproxen in pharmaceuticals by differential pulse voltammetry at a platinum electrode [текст] / N. Adhoum //Analytica chimica acta. – 2003. – V. 495. – Is. 1-2. – Р. 69-75.

163. Abbaspour, A. Electrochemical monitoring of piroxicam in different pharmaceutical forms with multi-walled carbon nanotubes paste electrode [текст]/ A. Abbaspour, R. Mirzajani //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2007. – V. 44. – Is. 1. – P. 41-48.

164. Ghoneim, M. M. Adsorptive stripping voltammetric determination of the anti-inflammatory drug celecoxib in pharmaceutical formulation and human serum [текст] / M. M. Ghoneim, A. M. Beltagi //Talanta. – 2003. – V. 60. – Is. 5. – P. 911-921.

165. Goyal, R. N. Voltammetric biosensors for the determination of paracetamol at carbon nanotube modified pyrolytic graphite electrode [текст] / R. N. Goyal, V. K. Gupta, S. Chatterjee //Sensors and Actuators B: Chemical. – 2010. – V. 149. – Is. 1. – P. 252-258.

166. Türköz, E. Determination of ticlopidine in pharmaceutical products [текст] / E. Türköz, A. Nur Onar //Analytical letters. – 2007. – V. 40. – Is. 11. – P. 2231-2240. 167. Jain, R. Determination of antihelminthic drug pyrantel pamoate in bulk and pharmaceutical formulations using electro-analytical methods [текст] / R. Jain, N. Jadon, K. Radhapyari //Talanta. – 2006. – V. 70. – Is. 2. – P. 383-386.

168. Uslu, B. Simultaneous determination of melatonin and pyridoxine in tablet formulations by differential pulse voltammetry / B. Uslu//Pharmazie. – 2001. – V. 56. – Is. 12. – P. 938-942.

169. El-Hefnawey, G. B. Voltammetric behavior and quantification of the sedative-hypnotic drug chlordiazepoxide in bulk form, pharmaceutical formulation and human serum at a mercury electrode [текст] / G. B. El-Hefnawey, S. El-Hallag, E.M. Ghoneim [et. al.] //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2004. – V. 34. – Is. 1. – P. 75-86.

170. Yardımcı, C. Electrochemical studies and differential pulse polarographic analysis of lansoprazole in pharmaceuticals [текст] / C. Yardımcı, N. Özaltın //Analyst. – 2001. – V. 126. – Is. 3. – Р. 361-366.

171. Uslu, B. Determination of olsalazine sodium in pharmaceuticals by differential pulse voltammetry [текст] / B. Uslu, S. Yilmaz, S. A. Ozkan //Die Pharmazie. – 2001. – V. 56. – Is. 8. – Р. 629-632.

172. El-Enany, N. Voltammetric analysis of trazodone HCl in pharmaceuticals and biological fluids [текст] / N. El-Enany, F. Belal, M. S Rizk //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2002. – V. 30. – Is. 2. – P. 219-226.

173. Nouws, H. P. A. Electrochemical determination of citalopram by adsorptive stripping voltammetry–determination in pharmaceutical products [текст] / H. P. A. Nouws, C. Delerue-Matos, A. A. Barros //Analytical letters. – 2006. – V. 39. – Is. 9. – P. 1907-1915.

174. Demircan, Ş. Electroanalytical characterization of verapamil and its voltammetric determination in pharmaceuticals and human serum [текст] / Ş. Demircan, S. Kır, S. A. Ozkan //Analytical letters. – 2007. – V. 40. – Is. 6. – P. 1177-1195.

175. Uslu B., Electroanalytical characteristics of piribedil and its differential pulse and square wave voltammetric determination in pharmaceuticals and human serum [текст] / B. Uslu, S. A. Özkan //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2003. – V. 31. – Is. 3. – P. 481-489.

176. Siddiqui I., Voltammetric determination of vitamins in a pharmaceutical formulation [текст] / I. Siddiqui, K. S. Pitre //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2001. – V. 26. – Is. 5-6. – P. 1009-1015.

177. Wu, Y. H. Voltammetric Investigation of Vitamin B_6 at a Glassy Carbon Electrode and Its Application in Determination [текст] / Y. H. Wu, F. J. Song //Bulletin of the Korean Chemical Society. – 2008. – V. 29. – Is. 1. – P. 38-42.

178. Hassan, E. M. Development of a differential pulse voltammetric method for the determination of Silymarin [текст] /Vitamin E acetate mixture in pharmaceuticals / E. M. Hassan //Talanta. – 2008. – V. 74. – Is. 4. – P. 773-778.

179. Jain, R. Adsorptive stripping voltammetric behavior and determination of anticholinergic agent oxybutynin chloride on a mercury electrode [текст] / R. Jain, K. Radhapyari, N. Jadon //Journal of colloid and interface science. – 2007. – V. 314. – Is. 2. – P. 572-577.

180. Altiokka, G. Voltammetric determination of doxazosin in tablets using rotating platinum electrode [TEKCT] / G. Altiokka //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. -2001. - V. 25. - Is. 3-4. - P. 387-391.

181. Abasq, M. L. Determination of entacapone by differential pulse polarography in pharmaceutical formulation [текст] / M. L. Abasq, P. Courtel, G. Burgot //Analytical letters. – 2008. – V. 41. – Is. 1. – Р. 56-65.

182. Ghoneim, M. M. Polarographic behaviour of loratadine and its direct determination in pharmaceutical formulation and human plasma by cathodic adsorptive stripping voltammetry [текст] / M. M. Ghoneim, M.M. Mabrouk, A. M. Hassanein [et. al.] //Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2001. – V. 25. – Is. 5-6. – P. 933-939.

183. Bozal, B. A review of electroanalytical techniques for determination of anti-HIV drugs [текст] / B. Bozal, B. Uslu, S. A. Özkan //International Journal of Electrochemistry. – 2011. – V. 2011. – P. 1-17.

184. Jain, R. Electrochemical evaluation and determination of cefdinir in dosage form and biological fluid at mercury electrode [текст] / R. Jain, K. Radhapyari, N. Jadon //Journal of the Electrochemical Society. – 2007. – V. 154. – Is. 11. – P. F199.

185. Jain, R. Adsorptive stripping voltammetric behavior and determination of anticholinergic agent oxybutynin chloride on a mercury electrode [текст] / R. Jain, K. Radhapyari, N. Jadon //Journal of colloid and interface science. – 2007. – V. 314. – Is. 2. – P. 572-577.

186. Мискирджан, С. П. Полярография лекарственных препаратов [текст]
/ С. П. Мискирджан, Л. П. Кравчнюк. – Москва : ИО «Вища школа». – 1976. –
232 с.

187. Гейровский, Я. Основы полярографии [текст] / Я. Гейровский, Я. Кута; под. ред. С. Г. Майрановского. – Москва : издат. Мир. – 1965. – 559 с.

188. Soofiabadi, F. Application of Cu (II) nanocomplex modified graphite screen printed electrode to improve the sensitivity and selectivity for epinephrine detection [текст] / F. Soofiabadi, A. Amiri, S. Jahani//Anal Bioanal Electrochem. – 2017. – V. 9. – Is. 3. – P. 340-350.

189. Rusinov, V. L. Reduction of nitro derivatives of azolo [5, 1-c][1, 2, 4] triazines [текст] / V. L. Rusinov, E. N. Ulomskii, O. N. Chupakhin. [et. al.] //Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 1992. – V. 28. – Is. 5. – Р. 570-573.

190. Pysarevska, S. Voltammetry of local anesthetics: theoretical and practical aspects [текст] / S. Pysarevska, S. Plotycya, L. Dubenska //Critical Reviews in Analytical Chemistry. – 2021. – V. 51. – Is. 4. – Р. 339-352.

191. Mugadza, T. Characterization and electrocatalytic applications of metallophthalocyanine-single walled carbon nanotube conjugates: a dissertation doctor of chemistry [текст] / T. Mugadza – Rhodes university. – 2010. – 367 p.

192. Gooding, J. J. Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing [текст] / J. J. Gooding //Electrochimica Acta. – 2005. – V. 50. – Is. 15. – Р. 3049-3060.

193. Dubenska, L. et al. Voltammetric methods for the determination of pharmaceuticals [текст] / L. Dubenska, M. Blazhejevskyj, S. Plotycya [et. al.] //Methods and objects of chemical analysis. – 2017. – V. 12. – Is. 2. – P. 61-75.

194. Wang, J. Analytical electrochemistry [Текст] / J. Wang – Hoboken, NJ: John Wiley & Sons. – 2006. – 272 р

195. Tylka, M. M. Application of voltammetry for quantitative analysis of actinides in molten salts [текст] / M. M. Tylka, J. L. Willit, J. Prakash [et. al.] //Journal of The Electrochemical Society. – 2015. – V. 162. – Is. 12. – P. H852.

196. Wang, J. Electrochemical activation of screen-printed carbon strips [текст] / J. Wang //Analyst. – 1996. – V. 121. – Is. 3. – Р. 345-350.

197. Štulík, K. Activation of solid electrodes [текст] / K. Štulík //Electroanalysis. – 1992. – V. 4. – Is. 9. – Р. 829-834.

198. Kubendhiran, S. Electrochemically activated screen printed carbon electrode decorated with nickel nano particles for the detection of glucose in human serum and human urine sample [текст] / S. Kubendhiran, S. Sakthinathan, S.M. Chen [et. al.] //Int. J. Electrochem. Sci. – 2016. – V. 11. – P. 7934-7946.

199. Pan, D. Amperometric determination of dopamine using activated screen-printed carbon electrodes [текст] / D. Pan, S. Rong, G. Zhang [et. al.] //Electrochemistry. – 2015. – V. 83. – Is. 9. – Р. 725-729.

200. Shi, K. Determination of uric acid at electrochemically activated glassy carbon electrode [текст] / K. Shi, K. K. Shiu //Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis. – 2001. – V. 13. – Is. 16. – P. 1319-1325.

201. Gusmão, R. Enhanced electrochemical sensing of polyphenols by an oxygen-mediated surface [текст] / R. Gusmão, V. López-Puente, I. Pastoriza-Santos [et. al.] //RSC advances. – 2015. – V. 5. – Is. 7. – Р. 5024-5031.

202. Su, Y. L. A Simple Method to Tune Up Screen-Printed Carbon Electrodes Applicable to the Design of Disposable Electrochemical Sensors [текст] / Y. L. Su, C. Y. Tai, J. M. Zen //Electroanalysis. – 2013. – V. 25. – Is. 11. – P. 2539-2546.

203. Wang, S. C. Enhancement of electrochemical properties of screenprinted carbon electrodes by oxygen plasma treatment [текст] / S. C. Wang, K. S. Chang, C. J. Yuan //Electrochimica Acta. – 2009. – V. 54. – Is. 21. – Р. 4937-4943.

204. Cumb, L. R. Can the mechanical activation (polishing) of screen-printed electrodes enhance their electroanalytical response? [текст] / L. R. Cumb, C. W. Foster, D. A. C. Brownsona [et. al.]//Analyst. – 2016. – V. 141. – Is. 9. – Р. 2791-2799.

205. Pierini, G. D. A facile electrochemical intercalation and microwave assisted exfoliation methodology applied to screen-printed electrochemical-based sensing platforms to impart improved electroanalytical outputs [текст] / G. D. Pierini, S. A. Maccio, S. N. Robledo [et. al.] //Analyst. – 2018. – V. 143. – Is. 14. – P. 3360-3365.

206. Cui, G. Effect of pre-treatment on the surface and electrochemical properties of screen-printed carbon paste electrodes [текст] / G. Cui, J. H. Yoo, J. S. Lee [et. al.] //Analyst. – 2001. – V. 126. – Is. 8. – Р. 1399-1403.

207. Kadara, R. O. Screen printed recessed microelectrode arrays [текст] / R. O. Kadara, N. Jenkinson, C. E. Banks //Sensors and actuators B: chemical. – 2009. – V. 142. – Is. 1. – P. 342-346.

208. Fanjul-Bolado, P. Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes [текст] / P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos //Electrochimica Acta. – 2008. – V. 53. – Is. 10. – P. 3635-3642.

209. Gornall, D. D. Investigations into the use of screen-printed carbon electrodes as templates for electrochemical sensors and sonochemically fabricated microelectrode arrays [текст] / D. D. Gornall, S. D. Collyer, S. P. J. Higson //Sensors and Actuators B: Chemical. – 2009. – V. 141. – Is. 2. – P. 581-591.

210. Jiang, Z. Effect of surface modification of carbon black (CB) on the morphology and crystallization of poly (ethylene terephthalate)/CB masterbatch [текст] / Z. Jiang, J. Jin, C. Xiao [et. al.] //Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2012. – V. 395. – P. 105-115.

211. Sundaresan, P. Electrochemical activation of screen printed carbon electrode for the determination of antibiotic drug metronidazole [текст] / P. Sundaresan, T. W. Chen, S. M. Chen [et. al.] //Int. J. Electrochem. Sci. – 2018. – V. 13. – P. 1441-1451.

212. González-Sánchez, M. I. Electrochemical performance of activated screen printed carbon electrodes for hydrogen peroxide and phenol derivatives sensing [текст] / M. I. González-Sánchez, B. Gómez-Monedero//Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2019. – V. 839. – P. 75-82.

213. Rezaei, R. Electrochemical sensing of uric acid using a ZnO/graphene nanocomposite modified graphite screen printed electrode [текст] / R. Rezaei //Russian Journal of Electrochemistry. – 2018. – V. 54. – Is. 11. – P. 860-866.

214. Будников, Г. К. Основы современного электрохимического анализа
[текст] / Г. К. Будников, В. Н. Майстренко, М. Р. Вяселев – М.: Мир: Бином ЛЗ. – 2003. – 592 с

215. Alkire, R. C. Chemically modified electrodes [текст] / R.C. Alkire, D.M.
Kolb, J. Lipkowski – John Wiley & Sons. – 2009. – 278 р.

216. Будников, Г.К. Модифицированные электроды для вольтамперометрии в химии, биологии и медицине [Текст] / Г.К. Будников, Г.А. Евтюгин, В.Н. Майстренко // Издательство: Бином. Лаборатория знаний. – 2014. Серия: Методы в химии. – 116 с.

217. Стожко, Н. Ю. Модифицированные графитсодержащие электроды в инверсионной вольтамперометрии [текст] / Н. Ю. Стожко //Ур. гос. техн. ун. – 2006. – Т. 2006. – С. 50.

218. Cinti, S. Screen-printed electrodes modified with carbon nanomaterials: a comparison among carbon black, carbon nanotubes and graphene [текст] / S. Cinti //Electroanalysis. – 2015. – V. 27. – Is. 9. – P. 2230-2238. 219. Gupta, V. K. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals—a review [текст] / V. K. Gupta, R Jain, K Radhapyari [et. al.] //Analytical biochemistry. – 2011. – V. 408. – Is. 2. – Р. 179-191.

220. Uslu, B. Electroanalytical application of carbon-based electrodes to the pharmaceuticals [текст] / B. Uslu, S. A Ozkan. //Analytical Letters. – 2007. – V. 40. – Is. 5. – P. 817-853.

221. Bonfilio, R. Recent applications of analytical techniques for quantitative pharmaceutical analysis: a review [текст] / R. Bonfilio, M. De Araujo, H. R. Salgado [et. al.] //WSEAS Trans. Biol. Biomed. – 2010. – V. 7. – Is. 4. – P. 316-338.

222. Ivoilova, A. Study of Different Carbonaceous Materials as Modifiers of Screen-printed Carbon Electrodes for the Triazid as Potential Antiviral Drug [текст] / A. Ivoilova, N. Malakhova, P. Mozharovskaia [et. al.] //Electroanalysis. – 2022.

223. Soofiabadi, F. Application of Cu (II) nanocomplex modified graphite screen printed electrode to improve the sensitivity and selectivity for epinephrine detection [TEKCT] / F. Soofiabadi, A. Amiri, S. Jahani //Anal Bioanal Electrochem. – 2017. – V. 9. – Is. 3. – P. 340-350.

224. Beitollahi, H. Graphene oxide/ZnO nano composite for sensitive and selective electrochemical sensing of levodopa and tyrosine using modified graphite screen printed electrode [TEKCT] / H. Beitollahi, F. Garkani Nejad //Electroanalysis. – 2016. – V. 28. – Is. 9. – P. 2237-2244.

225. Amatatongchai, M. Highly sensitive and selective electrochemical paperbased device using a graphite screen-printed electrode modified with molecularly imprinted polymers coated Fe₃O_{4/} Au/ SiO2 for serotonin determination [TEKCT] / M. Amatatongchai //Analytica chimica acta. -2019. - V. 1077. - P. 255-265.

226. Silva, T. A. Square-wave adsorptive anodic stripping voltammetric determination of ramipril using an electrochemical sensor based on nanostructured carbon black [текст] / T. A. Silva, O. Fatibello-Filho //Analytical Methods. – 2017. – V. 9. – Is. 32. – P. 4680-4687.

227. Long, C. M. Carbon black vs. black carbon and other airborne materials containing elemental carbon: Physical and chemical distinctions [текст] / C. M. Long,

M. A. Nascarella, P. A. Valberg //Environmental pollution. – 2013. – V. 181. – P. 271-286.

228. Deroco, P. B. Effect of Different Carbon Blacks on the Simultaneous Electroanalysis of Drugs as Water Contaminants Based on Screen-printed Sensors [текст] / P. B. Deroco, O Fatibello-Filho, F Arduini [et. al.] //Electroanalysis. – 2019. – V. 31. – Is. 11. – P. 2145-2154.

229. Arduini, F. High performance electrochemical sensor based on modified screen-printed electrodes with cost-effective dispersion of nanostructured carbon black [TeκcT] / F. Arduini //Electrochemistry communications. – 2010. – V. 12. – Is. 3. – P. 346-350.

230. Talarico, D Screen-printed electrode modified with carbon black nanoparticles for phosphate detection by measuring the electroactive phosphomolybdate complex [текст] / D Talarico, F. Arduini, A. Amin [et. al.] //Talanta. – 2015. – V. 141. – P. 267-272.

231. Carmo, M. Characterization of nitric acid functionalized carbon black and its evaluation as electrocatalyst support for direct methanol fuel cell applications [текст] / M. Carmo, M. Linardi, J. G. R. Poco //Applied Catalysis A: General. – 2009. – V. 355. – Is. 1 – 2. – P. 132-138.

232. Ibáñez-Redín, G. Effect of carbon black functionalization on the analytical performance of a tyrosinase biosensor based on glassy carbon electrode modified with dihexadecylphosphate film [TeκcT] / G. Ibáñez-Redín, T. A. Silva, F. C. Vicentini [et. al.] //Enzyme and microbial technology. – 2018. – V. 116. – P. 41-47.

233. Таланов, В. М. Методы синтеза наностркутур и наноструктурированных материалов. [текст] / В. М. Таланов, Г. П. Ерейская. – Новочеркаск : ЮРГТУ (НПИ), 2011. – 284 с.

234. Fanjul-Bolado, P. Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools [текст] / P. Fanjul-Bolado //Talanta. – 2007. – V. 74. – Is. 3. – P. 427-433.

235. Раков, Э. Г. Нанотрубки и фуллерены: учеб. пособие для студ., обуч.
по спец. 210602 «Наноматериалы» [текст] /Э. Г. Раков. М.: Логос. – 2006. – 376
с.

236. Мищенко, С.В. Углеродные наноматериалы. Производство, свойства, применение [текст] /С. В. Мищенко, А. Г. Ткачев. – М.: Машиностроение. – 2008. – 320 с

237. Obradović, M. D. A comparative study of the electrochemical properties of carbon nanotubes and carbon black [текст] / M. D. Obradović, G.D. Vuković, S.I. Stevanović [et. al.] //Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2009. – V. 634. – Is. 1. – P. 22-30.

238. Neese, F. The ORCA program system [текст] / F. Neese //Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science. – 2012. – V. 2. – Is. 1. – P. 73-78.

239. Neese, F. Software update: the ORCA program system, version 4.0 [текст] / F. Neese //Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science. – 2018. – V. 8. – Is. 1. – P. e1327.

240. Adamo, C. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model [TEKCT] / C. Adamo, V. Barone //The Journal of chemical physics. – 1999. – V. 110. – Is. 13. – P. 6158-6170.

241. Adamo, C. Toward reliable density functional methods without adjustable parameters: The PBE0 model [текст] / C. Adamo, V. Barone //The Journal of chemical physics. – 1999. – V. 110. – Is. 13. – Р. 6158-6170.

242. Weigend, F. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: Design and assessment of accuracy [текст] / F. Weigend, R. Ahlrichs //Physical Chemistry Chemical Physics. – 2005. – V. 7. – Is. 18. – P. 3297-3305.

243. Grimme, S. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu [текст] / S. Grimme //The Journal of chemical physics. – 2010. – V. 132. – Is. 15. – P. 154104.

244. Bono, D. The effect of myoglobin on the stability of the hydroxyl-radical adducts of 5, 5 dimethyl-1-pyrolline-N-oxide (DMPO), 3, 3, 5, 5 tetramethyl-1-pyrolline-N-oxide (TMPO) and 1-alpha-phenyl-tert-butyl nitrone (PBN) in the presence of hydrogen peroxide [TEKCT] / D. Bono, W. D. Yang, M. C. R. Symons //Free radical research. – 1994. – V. 20. – Is. 5. – P. 327-332.

245. Migita, C. T. Spin trapping of the nitrogen-centered radicals. Characterization of the DMPO/DEPMPO spin adducts [текст] / C. T. Migita, K. Migita //Chemistry letters. – 2003. – V. 32. – Is. 5. – Р. 466-467.

246. Grimme, S. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu [текст] / S. Grimme //The Journal of chemical physics. – 2010. – V. 132. – Is. 15. – P. 154104.

247. Патент RU 2529487. 5-Метил-6-нитро-7-оксо-1,2,4- триазоло[1,5а]пиримидинида l-аргининия моногидрат / Чупахин О. Н., Чарушин В. Н., Русинов В. Л., Уломский Е. Н., Котовская С. К., Киселев О. И., Деева Э. Г., Саватеев К. В., Борисов С. С.; патентообладатель ИОС УрО РАН. - Заявл. 15.04.13; опубл. 27.09.14.

248. Пат. 2330036. Рос. Федерация, Натриевая соль 5-метил-6-нитро-1,2,4,-триазоло[1,5-а]пиримидин-7-она дигидрат/ Чупахин О. Н., Чарушин В. Н., Русинов В. Л., Уломский Е. Н., Котовская С. К., Киселев О. И.; патентообладатель ИОС УрО РАН. - Заявл. 22.12.06; опубл. 27.07.08.

249. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии [текст] / Ю. Ю. Лурье. М.: Книга по Требова- нию. – 2012. – 440 с.

250. Perrin, D. D. Purification of laboratory chemicals [текст]/ D. D. Perrin, W.L.F Armarego. – Boston.: Butterworth-Heinemann. – 1966. – 544 p.

251. Dikalov, S. Spin trapping of superoxide radicals and peroxynitrite by 1hydroxy-3-carboxy-pyrrolidine and 1-hydroxy-2, 2, 6, 6-tetramethyl-4-oxo-piperidine and the stability of corresponding nitroxyl radicals towards biological reductants [текст] / S. Dikalov, M. Skatchkov, E. Bassenge //Biochemical and biophysical research communications. – 1997. – V. 231. – Is. 3. – P. 701-704. 252. Dikalov, S. I., EPR detection of cellular and mitochondrial superoxide using cyclic hydroxylamines [текст] / S. I. Dikalov, I. A. Kirilyuk, M. Voinov [et. al.] //Free radical research. – 2011. – V. 45. – Is. 4. – Р. 417-430.

253. Bono, D. The effect of myoglobin on the stability of the hydroxyl-radical adducts of 5, 5 dimethyl-1-pyrolline-N-oxide (DMPO), 3, 3, 5, 5 tetramethyl-1-pyrolline-N-oxide (TMPO) and 1-alpha-phenyl-tert-butyl nitrone (PBN) in the presence of hydrogen peroxide [TEKCT] / D. Bono, W. D. Yang, M. C. R. Symons //Free radical research. – 1994. – V. 20. – Is. 5. – P. 327-332.

254. Migita, C. T. Spin trapping of the nitrogen-centered radicals. Characterization of the DMPO/DEPMPO spin adducts [текст] / C. T. Migita, K Migita.//Chemistry letters. – 2003. – V. 32. – Is. 5. – P. 466-467.

255. Tocher, J. H. Reductive activation of nitroheterocyclic compounds [текст] / J. H. Tocher //General pharmacology. – 1997. – V. 28. – Is. 4. – Р. 485-487.

256. Verbitskiy, E. V. Development of new antituberculosis drugs among of 1, 3-and 1, 4-diazines. Highlights and perspectives [текст] / E. V. Verbitskiy, G. L. Rusinov, V. N. Charushin [et. al.] //Russian Chemical Bulletin. – 2019. – V. 68. – Is. 12. – P. 2172 – 2189.

257. Baumane, L. K. Nitroazines. 4. Polarographic behavior of 5nitropyrazolo [3, 4-b] pyridines and the esr spectra of their electrochemically generated free radicals [текст] / L. K. Baumane //Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 1985. – V. 21. – Is. 5. – P. 582-587.

258. Hammerich, O. Organic electrochemistry [текст] / O. Hammerich, B. Speiser eds. – Berlin : Boca Raton, FL CRC press, 2016. – 830 с.

259. Kokkinidis, G. Use of Pt/M (UPD)(M Pb, Tl, Bi) modified electrodes to the catalytic electroreduction of heterocyclic nitro compounds—I. 3-nitro-1H-1,2,4-triazole [текст] / G. Kokkinidis, K. Hasiotis, D. Sazou //Electrochimica acta. – 1990. – V. 35. – Is. 11-12. – P. 1957-1964.

260. Scholz, F. Electroanalytical Methods [текст] / F. Scholz, A.M. Bond, R.G. Compton [et. al.] – Berlin.: – Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 2010. – 359 p. 261. Stradyn, Y. et al. Free radicals in the electrochemical reduction of certain mononitro and dinitro derivatives of pyridine [текст]/ Y. Stradyn, R. Gavars, L. Baumane [et. al.]//Chemistry of Heterocyclic Compounds. – 1993. – V. 29. – Is. 8. – P. 918-925.

262. Lin, C. G. Rab3A delayed catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells [текст] / C. G. Lin, C. Y. Pan, L. S. Kao //Biochemical and biophysical research communications. – 1996. – V. 221. – Is. 3. – P. 675-681.

263. Dikalov, S. I. EPR detection of cellular and mitochondrial superoxide using cyclic hydroxylamines [τεκcτ] / S. I. Dikalov, I. A. Kirilyuk, M. Voinov [et. al.] //Free radical research. – 2011. – V. 45. – Is. 4. – P. 417-430.

264. Reis, A. Detection and characterization of cyclic hydroxylamine adducts by mass spectrometry [текст] / A. Reis, M. R. M. Domingues, F. M. L. Amado [et. al.] //Free radical research. – 2008. – V. 42. – Is. 5. – P. 481-491.

265. Malakhova, N. Development and Validation of Voltammetric Method for Quantitation of New Antiviral Drug Triazavirin using Bare Carbon Screen-Printed Electrodes [TEKCT] / N. Malakhova, A Tsmokalyuk, A. Ivoilova [et. al.] //Analytical and Bioanalytical Electrochemistry. – 2019. – V. 11. – Is. 3. – P. 292-303.

266. Xu, Q. Application of electrochemical methods for pharmaceutical and drug analysis [текст] / Q. Xu //Current Pharmaceutical Analysis. – 2009. – V. 5. – Is. 2. – P. 144-155.

267. Stoll, S. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR [текст] / S. Stoll, A. Schweiger //Journal of magnetic resonance. – 2006. – V. 178. – Is. 1. – P. 42-55.

268. Karakus, C.Polarographic and electrochemical studies of some aromatic and heterocyclic nitro compounds Part 9. Substitutent effects on protonation of the radical ArNO2H[·] and its reactions with hydroxylamino and nitroso compounds in buffered mixtures of water and DMF [TEKCT] / C. Karakus, P. Zuman //Journal of Electroanalytical Chemistry. – 1995. – V. 396. – Is. 1-2. – P. 499-505.

269. Русаков, А.И. Структура и реакционная способность органических анион-радикалов [текст] / А.И. Русаков – Москва : МИР, 2005. – 153 с.

270. Szwarc, M. Ions and ion pairs in organic reactions [текст] / M. Szwarc – New York : John Wiley & Sons, 1972. – 345 p.

271. Cavalcanti, J. C. M. Evidence of self-protonation on the electrodic reduction mechanism of an anti-Helicobacter pylori metronidazole isotere [текст] / J. C. M. Cavalcanti, N. V. Oliveira, M. A. B. F. de Moura [et. al.] //Journal of Electroanalytical Chemistry. – 2004. – V. 571. – Is. 2. – P. 177-182.

272. Jakubke, H. D. Amino Acids, Peptides, Proteins: An Introduction [текст] / H. D. Jakubke, H. Jeschkeit. – New York: John Wiley & Sons, 1977. – р. 336.

273. Lopyrev, V. Dianion radicals of nitro derivatives of pyrazole, imidazole and 1,2,4-triazole [текст] / V. Lopyrev, L. Larina, T. Rakhmatulina [et. al.]// М.Fiz. Khimiya. – 1978. – V. 242. – Р. 142-145.

274. Заичко, А. В. Экспресс-определение As (V) и As (III) в водах методом инверсионной вольтамперометрии [текст] / А. В. Заичко, Е. Е. Иванова, Г. Н. Носкова //Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2005. – Т. 71. – №. 1. – С. 19-23.

275. Savéant, J. M. Single electron transfer and nucleophilic substitution [текст] / J. Savéant //Advances in Physical Organic Chemistry. – Academic Press, 1990. – V. 26. – Р. 1-130.

276. Gooding, J. J. Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing [текст] / J. J. Gooding //Electrochimica Acta. – 2005. – V. 50. – Is. 15. – Р. 3049-3060.

277. Baklykov, A. V. Method of determination of 5-methyl-6-nitro-7-oxo-1, 2, 4-triazolo [1, 5-a] pirimidinide l-argininy-the active component of drug «triazid» by hplc method [текст] / A. V. Baklykov, A. A. Tumashov. //Drug development & registration. – 2018. – Is. 2. – P. 78-83.