

Под редакцией
Г. В. Раменской

РУКОВОДСТВО К ЛАБОРАТОРНЫМ ЗАНЯТИЯМ ПО ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

Рекомендовано Координационным советом по области образования “Здравоохранение и медицинские науки” в качестве учебного пособия для использования в образовательных учреждениях, реализующих программы высшего образования по направлению подготовки 33.05.01 “Фармация” по дисциплине “Фармацевтическая химия”

Регистрационный номер рецензии № 018 ЭКУ от 23 июня 2016 года
Министерства образования и науки РФ Координационного совета по области образования “Здравоохранение и медицинские науки”
ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова



Москва
Лаборатория знаний

Дорогому учителю — Александру Павловичу Арзамасцеву



25.03.1933–23.12.2008

Александр Павлович Арзамасцев — выдающийся ученый, первый академик РАМН в области фармации, заслуженный деятель науки, лауреат премии правительства Российской Федерации в области науки и техники, доктор фармацевтических наук, профессор.

Ведущий специалист в области фармакопейного анализа и фармацевтической химии, руководил фармакопейным комитетом Министерства здравоохранения РФ. Более 20 лет возглавлял фармацевтический факультет и более 30 лет (до последнего дня жизни) заведовал кафедрой фармацевтической химии ММА им. И. М. Сеченова (в настоящее время Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова).

Автор приоритетных исследований по синтезу, стандартизации, контролю качества и фармакокинетики лекарственных средств; пяти монографий, учебников, более 450 научных статей и 26 изобретений.

Под его руководством подготовлено 10 докторов и 75 кандидатов фармацевтических наук. Его ученики работают по всей России и во многих странах.

Двери его кабинета всегда были открыты для каждого.

Предисловие

Фармацевтическая химия — одна из основополагающих наук современного фармацевтического образования. Главные задачи фармацевтической химии: моделирование и синтез новых лекарственных веществ, изучение фармакокинетики и др.; особое место занимают вопросы стандартизации и оценки качества лекарственных средств.

Фармакопейный анализ лекарственных веществ включает оценку качества по множеству показателей. Первоначально для такого анализа применяли исключительно химические методы: реакции подлинности, реакции на содержание примесей, титрование при количественном определении. В современных условиях обеспечение качества лекарственных средств достигается за счет повышения уровня стандартизации и приведения нормативной базы в соответствие с международными требованиями.

В этих условиях возрастает исключительная роль фармакопеи как основного документа, направленного на унификацию и стандартизацию испытаний и норм, обеспечивающих надлежащее качество лекарственных средств. Стандартизации подвергаются общие и частные статьи при обеспечении их научного уровня в соответствии с современными достижениями в химии синтетических и природных лекарственных веществ, путем установления новых характеристик (кристалличность, дифракция рентгеновских лучей и др.), разработки новейших технологий их получения.

Для оценки подлинности, посторонних примесей, тестов растворения, однородности дозирования, количественного определения и других показателей широко применяются спектральные методы (инфракрасная и ультрафиолетовая спектрофотометрия), спектроскопия ЯМР, различные виды хроматографии — тонкослойная, высокоэффективная, газовая.

Руководство составлено в соответствии с программой по дисциплине «Фармацевтическая химия» по специальности «33.05.01, 060301, 060108 — Фармация» и предназначено для студентов фармацевтических вузов и факультетов, аспирантов и провизоров.

Авторский коллектив

Аксенова Элеонора Николаевна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Андреанова Ольга Павловна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Арзамасцев Александр Павлович, доктор фармацевтических наук, академик РАМН, профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Горпинченко Наталия Васильевна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Коваленко Людмила Ивановна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Кузина Вера Николаевна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Ноздрин Константин Владимирович, кандидат фармацевтических наук, ассистент кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Печенников Валерий Михайлович, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Прокофьева Вера Ивановна, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Раменская Галина Владиславовна, доктор фармацевтических наук, заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Рыженкова Александра Петровна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Садчикова Наталья Петровна, доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Чернова Светлана Викторовна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Чугаев Дмитрий Владиславович, кандидат фармацевтических наук, ассистент кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Щепочкина Ольга Юрьевна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова

Общие методы и приемы исследования качества лекарственных средств

ГЛАВА 1

Физические и физико-химические методы исследования лекарственных средств

1.1. Рефрактометрия

Общие положения

Если луч света пересекает границу раздела двух прозрачных однородных сред, то направление луча изменяется — происходит его преломление, или *рефракция*. Согласно закону преломления света, отношение синусов углов падения и преломления — величина постоянная:

$$n = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta}$$

Коэффициент n называется *показателем преломления*. Это безразмерная величина, которая указывает, во сколько раз скорость света в «среде 1» больше скорости света в «среде 2» (рис. 1.1):

$$n = \frac{v_1}{v_2}$$

Если «среда 1» — это вакуум, то v_1 — скорость света в вакууме ($\approx 3 \cdot 10^8$ м/с), а коэффициент n — *абсолютный показатель преломления* (обычно его определяют для газов). Для жидкостей и твердых тел наиболее часто определяют показатель преломления относительно воздуха. В этом случае n — *относительный*

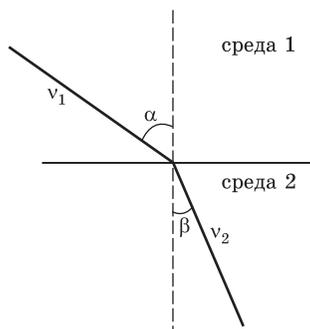


Рис. 1.1. Показатель преломления

показатель преломления вещества. Связь между абсолютным $n_{\text{абс}}$ и относительным $n_{\text{отн}}$ показателями преломления имеет вид:

$$n_{\text{абс}} = n_{\text{возд}} \times n_{\text{отн}}$$

где $n_{\text{возд}}$ — абсолютный показатель преломления воздуха ($\approx 1,00027$). Проводить подобный расчет, однако, обычно нет необходимости, так как в рефрактометрических таблицах для жидких и твердых веществ (и для растворов лекарственных веществ) также приводят значения $n_{\text{отн}}$.

В фармакопейном анализе метод рефрактометрии в основном применяется для установления подлинности и анализа чистоты лекарственных веществ (в последнем случае — как косвенный показатель). В экспресс-анализе (т. е. **нефармакопейном**) данный метод широко используется для количественного анализа растворов лекарственных веществ. С этой целью применяются рефрактометры, позволяющие определять показатель преломления с относительно высокой точностью: $n \pm 0,0001$.

Анализ жидких лекарственных форм, содержащих одно растворенное вещество

В этом разделе мы рассмотрим рефрактометрический анализ двухкомпонентных систем, состоящих из растворителя и растворенного лекарственного вещества.

Наиболее точный количественный рефрактометрический анализ возможен только в определенном диапазоне концентраций. Для большинства лекарственных веществ верхний предел этого диапазона находится в области **20—30%**. При этом важно отметить, что регламентируется и нижний предел концентрации: **в общем случае** он составляет **3%**. Это связано с тем, что при низком содержании вещества в растворе недопустимо возрастает относительная погрешность рефрактометрического анализа. В частности, необходимо отметить, что *изотонический раствор натрия хлорида (т. е. 0,9%) не анализируют методом рефрактометрии*.

Для определения концентрации раствора по показателю преломления существуют два подхода:

Первый подход заключается в использовании рефрактометрических таблиц, в которых приводятся значения показателей преломления и соответствующих им концентраций (или наоборот). В том случае, если в таблице отсутствует найденная экспериментально величина, для нахождения промежуточных значений используют метод интерполяции.

Методика

Раствора магния сульфата 25% — 10 мл.

Измеренный показатель преломления составил 1,3551. Находим в рефрактометрической таблице ближайшие значения — 1,3550 и 1,3560. Им соответствуют концентрации 24,70% и 25,92%. Рассчитываем, на сколько изменяется концентрация при изменении показателя преломления на 0,0001: $(25,92\% - 24,70\%) / 10 = 0,122\%$. Отсюда, показателю преломления 1,3551 соответствует концентрация:

$$24,70\% + 0,122\% \approx 24,82\%$$

Сущность *второго подхода* состоит в нахождении уравнения, описывающего зависимость показателя преломления раствора от концентрации растворенного вещества (и наоборот). Если эта зависимость линейна, то искомое уравнение в общем случае имеет вид:

$$n = n_0 + F_X \cdot C_X$$

где n_0 — показатель преломления растворителя (для воды $n_D^{20} \approx 1,3330$);
 F_X — фактор показателя преломления вещества X, физический смысл которого заключается в том, что он равен величине прироста показателя преломления при увеличении концентрации на 1%;
 C_X — концентрация раствора вещества X, %.

Отсюда, для нахождения концентрации раствора вещества X в процентах по показателю преломления, определенному с помощью рефрактометра, расчет ведут по формуле:

$$C_X = \frac{n - n_0}{F_X} \quad (1)$$

Если содержание определяемого компонента в препарате необходимо получить в граммах (m_X), расчет ведут по формуле:

$$m_X = \frac{n - n_0}{F_X} \times \frac{V_{\text{ПРЕПАРАТА}}}{100} \quad (2)$$

где $V_{\text{ПРЕПАРАТА}}$ — общий объем препарата, мл;
 100 — коэффициент, служащий для перевода концентрации из процентов (г/100 мл) в г/мл.

В рефрактометрических таблицах всегда указывается, какому способу выражения концентрации (массовая доля или массо-объемная концентрация) соответствуют приводимые показатели преломления и факторы показателей преломления.

Значение F находят для каждого конкретного вещества на основании экспериментальных данных. Примером линейной зависимости показателя преломления раствора от массообъемной концентрации растворенного вещества могут служить водные растворы глюкозы. Для этого лекарственного вещества фактор показателя преломления для массообъемной концентрации $F = 0,00142\%^{-1}$, и линейное уравнение имеет вид:

$$n = 1,3330 + 0,00142 \cdot C \quad (3)$$

Для большинства лекарственных веществ во всем диапазоне концентраций зависимость n от C нелинейна, т. е. фактор показателя преломления F меняется вместе с концентрацией. Учитывая это, на основании экспериментальных данных были рассчитаны значения F для конкретных концентраций и составлены соответствующие таблицы зависимости фактора показателя преломления F от концентрации для ряда веществ. В этом случае для расчета C_X в формулу подставляют то значение F , которое соответствует предполагаемой концентрации вещества X.

Рассчитаем концентрацию с использованием фактора F на примере **раствора магния сульфата 25%**. Фактор показателя преломления F для этой концентрации, найденный по рефрактометрической таблице, равен 0,00089. Измеренный с помощью рефрактометра показатель преломления $n = 1,3551$. По формуле рассчитываем концентрацию анализируемого раствора:

$$C = (1,3551 - 1,3330) / 0,00089 = 24,83\%$$

Методика

Раствора глюкозы 10% — 100 мл.

Измерение показателя преломления раствора при 18 °С дало результат 1,3475. Требуется найти концентрацию глюкозы.

Первый подход. По формуле (3) рассчитываем, что при 20 °С показатель преломления должен быть равен 1,3473. По рефрактометрической таблице находим (с привлечением метода интерполяции), что такому значению n соответствует концентрация глюкозы 10,07%. Можно также по рефрактометрической таблице найти, что фактор показателя преломления F для растворов глюкозы равен 0,00142, и рассчитать по формуле (1) концентрацию глюкозы:

$$C = (1,3473 - 1,3330) / 0,00142 = 10,07\%$$

Второй подход. Используя вышеуказанное правило для водных растворов твердых веществ, измеряем при той же температуре показатель преломления воды очищенной — 1,3332. По рефрактометрической таблице находим, что фактор показателя преломления F для растворов глюкозы равен 0,00142. Подставляем найденные значения в формулу (1):

$$C = (1,3475 - 1,3332) / 0,00142 = 10,07\%$$

Часто для расчета содержания глюкозы в водном растворе приводят следующую формулу:

$$C = \frac{n - n_0}{0,00142 \cdot 100}$$

где n и n_0 — показатели преломления соответственно раствора и растворителя, а 0,00142 — фактор показателя преломления водных растворов глюкозы. При этом значение 100 в знаменателе служит для перевода концентрации глюкозы из процентов (г/100 мл) в г/мл, если в нормативной документации концентрация указана в г/мл.

Анализ многокомпонентных лекарственных форм

Рефрактометрический анализ смесей лекарственных веществ основывается на правиле аддитивности (сложения) показателей преломления:

$$n = n_0 + n_1 + n_2 + \dots + n_i = n_0 + C_1F_1 + C_2F_2 + \dots + C_iF_i$$

Показатель преломления раствора равен сумме показателей преломления всех его компонентов — растворителя и растворенных веществ. Из этого уравнения можно вывести формулу для расчета концентрации одного из компонентов смеси:

$$C_1 = \frac{n - (n_0 + C_2F_2 + \dots + C_iF_i)}{F_1} \quad (4)$$

При этом имеется в виду, что все остальные компоненты смеси определяются какими-либо другими методами, например титриметрически, и перед проведением расчета по формуле (4) все концентрации, кроме C_1 , уже известны.

Если содержание определяемого компонента в препарате необходимо получить в граммах (m_1), расчет ведут по формуле:

$$m_1 = \frac{n - (n_0 + C_2 F_2 + \dots + C_i F_i)}{F_1} \times \frac{V_{\text{ПРЕПАРАТА}}}{100} \quad (5)$$

где $V_{\text{ПРЕПАРАТА}}$ — общий объем препарата, мл; 100 — коэффициент, служащий для перевода концентрации из процентов (г/100 мл) в г/мл.

Пример

Натрия бромид — 2,0 мл.

Магния сульфата — 5,0 мл.

Раствора глюкозы 20% — 200,0 мл.

В этом случае натрия бромид определяют методом аргентометрии (титрант — 0,1 М раствор нитрата серебра), магния сульфат — методом комплексонометрии (титрант — 0,05 М раствор трилона Б). Глюкозу в присутствии натрия бромида целесообразно определить рефрактометрическим методом. Расчет содержания глюкозы в процентах ($C_{\text{ГЛК}}$) выполняют по формуле (4):

$$C_{\text{ГЛК}} = \left[n - (n_0 + C_{\text{NaBr}} \times F_{\text{NaBr}} + C_{\text{MgSO}_4} \times F_{\text{MgSO}_4}) \right] / F_{\text{ГЛК}}$$

где n — показатель преломления раствора;
 n_0 — показатель преломления воды очищенной, измеренный при той же температуре;
 C_{NaBr} — концентрация натрия бромида в растворе, определенная методом аргентометрии;
 F_{NaBr} — фактор показателя преломления раствора натрия бромида для найденной концентрации;
 C_{MgSO_4} — концентрация магния сульфата ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) в растворе, определенная методом комплексонометрии;
 F_{MgSO_4} — фактор показателя преломления раствора магния сульфата ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) для найденной концентрации;
 $F_{\text{ГЛК}}$ — фактор показателя преломления раствора глюкозы.

1.2. Поляриметрия

Рассмотрим методику анализа таблеток валидола в качестве примера использования поляриметрии для количественного определения (*подробнее см. Учебник*).

Анализ таблеток валидола

Около 15 г порошка растертых таблеток (точная навеска) помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 15—20 мл петролейного эфира и взбалтывают в течение 5 мин; затем взвеси дают отстояться и осторожно декантируют жидкость с осадка на стеклянный фильтр № 2 в мерную колбу вместимостью 50 мл. К осадку вновь прибавляют 6 мл петролейного эфира и перемешивают содержимое колбы в течение 3 мин. Взвеси дают отстояться и фильтруют через тот же фильтр и в ту же колбу. Извлечение повторяют

еще 3 раза, прибавляя к осадку по 10 мл петролейного эфира. Объем фильтрата в мерной колбе доводят петролейным эфиром до метки. В растворе определяют угол вращения плоскости поляризации. Показания поляриметра наблюдают 5 раз и берут среднюю арифметическую величину. Содержание валидола в одной таблетке в граммах вычисляют по приведенной выше формуле (5).

1.3. Спектрофотометрия в инфракрасной области спектра

Инфракрасная (ИК) область электромагнитного спектра, используемая в фармацевтическом анализе, охватывает интервал $4000\text{—}250\text{ см}^{-1}$.

ИК-спектрофотометрия, впервые введенная в Государственной фармакопее (ГФ X) для идентификации фторотана и натриевых солей полусинтетических пенициллинов — метициллина и оксациллина, в последнее время все чаще применяется в анализе различных классов лекарственных веществ.

Приборы. Спектрофотометры, применяемые в ИК-области, в основном аналогичны приборам для видимой и ультрафиолетовой (УФ) областей и отличаются от последних в отношении источников получения, оптических материалов и детекторов.

Наиболее распространенные приборы отечественного и зарубежного производства работают при длине волны $4000\text{—}670\text{ см}^{-1}$.

Для калибровки шкалы длин волн измеряют спектр пленки полистирола, которая обычно прилагается к прибору.

Факторы, влияющие на воспроизводимость и правильность результатов. Подготовка образца для анализа наиболее важна при определении в ИК-области спектра. Жидкие вещества можно испытывать непосредственно или в подходящем растворе. Ни один растворитель при достаточной толщине слоя полностью не прозрачен во всей области ИК-спектра. Чаще всего используют четыреххлористый углерод, хлороформ и дихлорметан. При интерпретации спектров необходимо учитывать возможное перекрытие полос поглощения вещества за счет поглощения растворителя.

Для подготовки образцов твердых веществ можно использовать один из следующих методов.

Метод 1. Растирают небольшое количество вещества с минимальным количеством подходящего минерального масла или другой подходящей жидкости до получения однородной пасты; 2—5 мг испытуемого вещества обычно достаточно для приготовления требуемой пасты, которая должна быть полупрозрачной на свет. Сжимают часть пасты между двумя пластинками натрия хлорида или другого материала.

Метод 2. Растирают твердое вещество с сухим мелкоизмельченным галогенидом калия (бромид или хлорид калия для ИК-спектроскопии) в соотношении 1 : 200 для призматических приборов или 1 : 300 для приборов с дифракционной решеткой. Часть смеси помещают в специальную матрицу и в условиях вакуума прессуют. Полученный прозрачный диск помещают в прибор и производят измерения. Диск считают непригодным, если при визуальном просмо-

тре обнаруживается отсутствие гомогенности или пропускание примерно при 2000 см⁻¹ в отсутствие специфической полосы поглощения составляет менее 75% без компенсации.

Наибольшее отклонение, возникающее из-за различий в разрешающей силе прибора, может отмечаться при длине волн от 4000 до 2000 см⁻¹.

В тех случаях, когда отсутствует стандартный образец или не опубликован атлас спектров, допускается приводить в нормативной документации (НД) рисунок спектра с указанием условий его снятия. Для установления подлинности должно выполняться требование полного совпадения полученного в эксперименте спектра со спектром, приведенным на рис. 1.2.

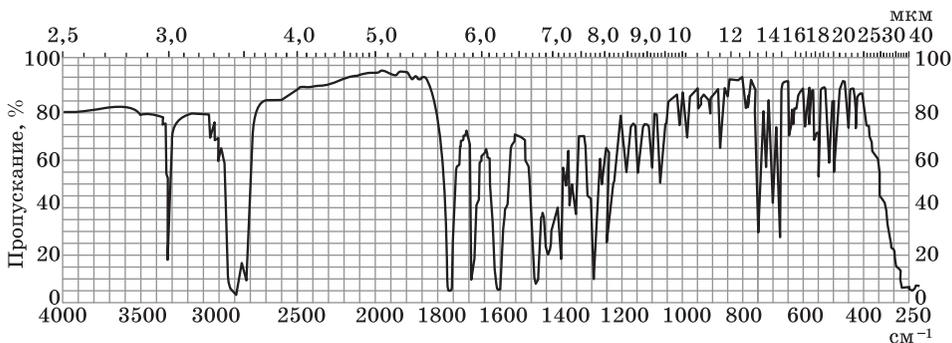


Рис. 1.2. ИК-спектр бензилпенициллина натриевой соли

При проведении практических занятий по идентификации лекарственных веществ методом ИК-спектрофотометрии первое вводное занятие уделяется общим основам ИК-спектрофотометрии и принципам получения и оценки ИК-спектров.

Необходимо подчеркнуть универсальность метода ИК-спектрофотометрии и рассмотреть на нескольких примерах ИК-спектры пленки полистирола, вазелинового масла и одного из растворителей (хлороформа или ацетона).

ИК-спектры могут быть получены на приборе любой конструкции. На ИК-спектрофотометре работают группами (не более 5 человек), после ознакомления с работой и общей схемой прибора и обсуждения материала.

Подтверждение правильности калибровки шкалы длин волн и степени разрешения прибора проводят путем оценки ИК-спектра пленки полистирола. Для этого определяют длины волн в см⁻¹ на спектре полистирола, полученном на приборе, и сопоставляют с теоретическими величинами, приведенными в табл. 1.1.

Таблица 1.1

Проверка шкалы длин волн

Полосы поглощения, см ⁻¹	Степень разрешения прибора как разность в процентах пропускания
Теор. 3027 2850 1944	2870 1589
1802 1601 1583	2851 1483
1154 1028 906	
Найдено	
Разность	

Разность в процентах пропускания между минимумом при 2870 см^{-1} и максимумом при 2851 см^{-1} должна быть более 18, а разность между минимумом при 1589 см^{-1} и максимумом при 1583 см^{-1} должна быть более 12.

Если полоса полистирола при определенной длине волны смещена по сравнению с теоретической величиной, то положение полос образца должно быть исправлено на эту величину смещения.

Для оценки ИК-спектра вазелинового масла, применяемого для приготовления паст лекарственных веществ, получают спектр вазелинового масла в чистом виде и производят отнесение полос поглощения. Вазелиновое масло состоит из насыщенных углеводородов. На спектре отмечают валентные колебания C—H: 2950 , 2920 и 2850 см^{-1} , а также деформационные колебания C—H: 1460 , 1375 см^{-1} , слабая полоса при 722 см^{-1} .

Пасты с вазелиновым маслом из-за простоты их приготовления и удобства применения наиболее часто используются в анализе лекарственных веществ, поэтому рекомендуется запомнить частоты длин волн, характерных для данного разбавителя [см. далее оценку ИК-спектров пенициллинов (β -лактамидов)].

Изучение ИК-спектров β -лактамидов. Получают спектр любого из пенициллинов (предпочтительнее натриевых солей бензилпенициллина и оксациллина), используя в качестве пробы пасту с вазелиновым маслом.

Сравнивают полученные спектры с аналогичными (рис. 1.2 и 1.3), отмечают сходство и различие спектров, указывая соответствующие характеристические полосы.

Для удобства оценки полос поглощения рекомендуется весь спектр разделить условно на три области: от 4000 до 3000 см^{-1} , от 1800 до 1500 см^{-1} и от 1500 до 650 см^{-1} .

Общие характеристические полосы поглощения пенициллинов находятся в области 1800 — 1500 см^{-1} , на которую приходится интенсивная полоса поглощения при 1775 — 1755 см^{-1} , соответствующая β -лактамному кольцу, сопряженному с тиазоловым циклом.

Амидная группа пенициллинов обуславливает первую и вторую амидные полосы вторичного нециклического амида соответственно в областях 1690 —

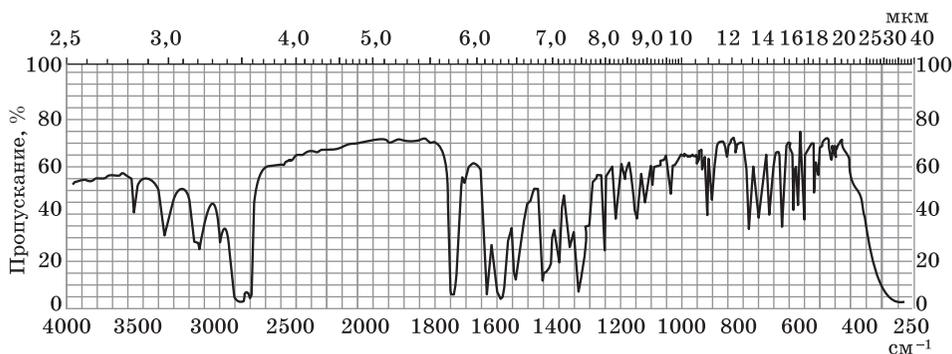


Рис. 1.3. ИК-спектр оксациллина натриевой соли

1645 см^{-1} , вызванные валентными колебаниями $\text{C}=\text{O}$, и 1585—1550 см^{-1} , соответствующие деформационным колебаниям группы NH .

Большинство пенициллинов — соли, поэтому в препаратах этой группы карбоксильные группы ионизированы, что подтверждается наличием полосы при 1615—1600 см^{-1} .

Наличие полос поглощения в области 3500—3200 см^{-1} иногда обусловлено валентными колебаниями свободной гидроксильной группы, на характер которой могут влиять водородные связи, а также колебания вторичных амидов и аминов.

Для ИК-спектров оксациллина натриевой соли кристаллогидрата (см. рис. 1.3) характерны четко выраженные полосы поглощения, соответствующие общим группировкам пенициллинов. Так, интенсивная полоса поглощения при 1760 см^{-1} обусловлена наличием β -лактамной группировки, полоса поглощения при 1645 см^{-1} — наличием амидной группы. Последняя иногда обозначается как полоса амид-1. Полоса интенсивного поглощения при 1600 см^{-1} обусловлена валентными колебаниями ионизированной карбоксильной группы. Для ИК-спектров пенициллинов характерно также при 1600—1500 см^{-1} наличие сильной полосы — около 1550 см^{-1} , соответствующей вторичной амидной группировке (полоса амид-2).

Кроме того, в области 4000—3000 см^{-1} имеется интенсивная полоса при 3410 см^{-1} , соответствующая валентным колебаниям группы NH вторичного амида. Наличие второй амидной группировки в оксациллине проявляется в виде дублета полос при 3210 и 3180 см^{-1} , которое относят к *транс*- и *цис*-изомерам. Полоса валентных колебаний группы NH около 3060 см^{-1} очень слабо выражена. Эту полосу можно рассматривать как соответствующую обертонову полосы амид-2. Полоса валентных колебаний группы OH кристаллогидрата проявляется в виде интенсивного поглощения при 3610 см^{-1} .

ИК-спектр натриевой соли оксациллина для инъекций, получаемой лиофильной сушкой, отличается от спектра кристаллогидрата. Широкая полоса поглощения при 3380—3400 см^{-1} с максимумом 3400 см^{-1} указывает на наличие оксациллина, частично потерявшего при сушке воду. При дальнейшей

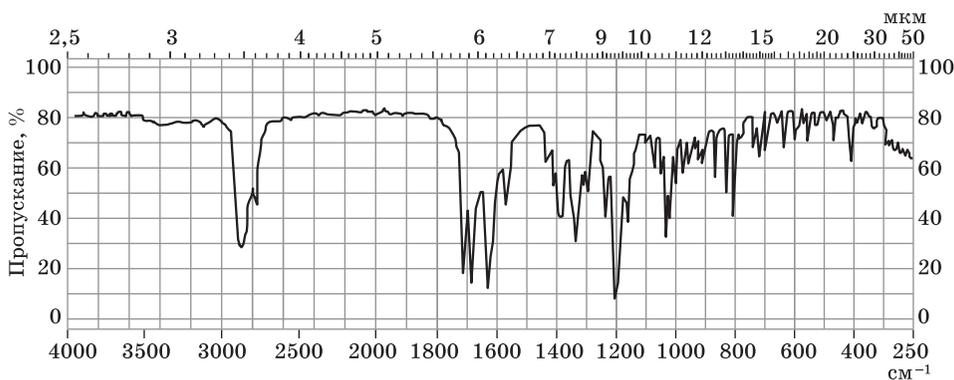


Рис. 1.4. ИК-спектр дезоксикортикостерона ацетата

перекристаллизации вещества получают спектр, присущий кристаллогидрату. Для выяснения более подробных корреляций между ИК-спектром и структурой β -лактамидов рекомендуется сопоставить ИК-спектры других пенициллинов и характерных для них кислот.

В связи с тем, что большинство кортикостероидов применяется в медицине в виде сложных эфиров, чаще всего ацетатов, рассмотрим наиболее типичный для этой группы ИК-спектр дезоксикортикостерона ацетата (ДОКА), для которого пока не описаны полиморфные формы (рис. 1.4).

1.4. Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях спектра

Абсорбционная УФ-спектрофотометрия основывается на измерении количества поглощенного веществом электромагнитного излучения в определенной узкополосной области. Обычно для УФ-измерений используют приближенно монохроматическое излучение в области от 190 до 380 нм.

Спектрофотометрия в видимой области — измерение количества поглощенного немонохроматического излучения в области 380—780 нм.

Терминология, используемая при описании спектрофотометрических испытаний, в настоящее время еще не унифицирована. Поэтому, действуя согласно ГФ XIII, указываем также на некоторые особенности терминологии, принятые в III издании Международной Фармакопеи (МФ IV).

Согласно МФ IV, *поглощение* — десятичный логарифм обратной величины пропускания (T). В ГФ XIII используются термины «*оптическая плотность*» (A), а также «*экстинкция*» (E).

Пропускание (T) — частное от деления интенсивности света, прошедшего через вещество, на интенсивность света, падающего на вещество.

Поглощаемость (a) — частное от деления поглощения (A) на концентрацию вещества (C), выраженную в граммах на литр, и длину слоя поглощения в сантиметрах (b)

$$a = A / b \cdot C$$

В ГФ XIII и других фармакопеях чаще применяется термин «*удельный показатель экстинкции*» $A_{1\text{см}}^{1\%}$, когда концентрацию (C) выражают в граммах на 100 мл; таким образом,

$$A_{1\text{см}}^{1\%} = 10 a$$

Молярная поглощаемость (ϵ) — частное от деления поглощения (A) на концентрацию вещества (C), выраженную в молях на литр, и длину слоя поглощения в сантиметрах (b). Следовательно,

$$\epsilon = a \cdot \text{мол. л.}^{-1} \cdot \text{см.}^{-1}, \quad \text{или} \quad \epsilon = \frac{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot \text{мол. л.}^{-1}}{10}$$

Спектр поглощения — графическое выражение отношения поглощения (или любой функции) к длине волны (или любой функции длины волны).

Приборы. Для обеспечения единства измерений рекомендуется при эксплуатации прибора точно придерживаться установленных рабочих условий. Особенно важно обеспечить метрологическое обслуживание приборов в отношении их калибровки как по шкале длин волн, так и по фотометрической шкале. Это обслуживание, как правило, проводят соответствующие государственные метрологические организации.

Факторы, влияющие на воспроизводимость и правильность результатов. Для получения достоверных данных необходимо строго следовать инструкции по уходу за прибором и его эксплуатации, обращать внимание на такие факторы, как точность толщины кювет и их спектральная пропускаемость. **Кюветы**, применяемые для испытуемого и контрольного растворов, должны быть одинаковыми и иметь одну и ту же спектральную пропускаемость, если они содержат только один растворитель. В ином случае необходимо внести соответствующую поправку.

Особое внимание следует обращать на чистоту кювет. Нельзя касаться пальцами наружных поверхностей кюветы, на них не должна попадать жидкость (растворитель или испытуемый раствор). Следует также учитывать возможные ограничения, связанные с использованием **растворителей** (см. табл. 1.5 Учебника).

Приемы, связанные с **испытаниями на подлинность** лекарственных веществ методом УФ-спектрофотометрии, сводятся к следующему. Сравнение спектров испытуемого раствора стандартного образца: должно наблюдаться совпадение положений максимумов, минимумов, плеч и точек перегиба. Расхождение между наблюдаемыми и указанными длинами волн не должно превышать 2 нм. Указание длин волн при максимумах поглощения является лишь ориентировочной характеристикой, так как не позволяет судить об общем виде спектра.

Спектральные характеристики некоторых лекарственных веществ, используемые для идентификации, представлены в табл. 1.2.

Таблица 1.2

Спектральные характеристики некоторых лекарственных веществ

Лекарственное вещество	Растворитель	Концентрация, %	λ_{max} , нм
Никотиновая кислота	0,1 М раствор	0,001	261 ± 2
	хлороводородной кислоты	0,002	278 ± 2
Цианокобаламин	Вода		361 ± 2 550 ± 2
Изониазид	0,1 М раствор хлороводородной кислоты	0,002	266 ± 2
α -Токоферола ацетат	95% спирт	0,01	285 ± 2
Нитроксолин	95% спирт	0,001	242 ± 2 356 ± 2 455 ± 2
Сульфациридазин	0,1 М раствор натрия гидроксида	0,001	255 ± 2
Цефалексин ¹	Вода	0,002	260 ± 1
Метандростенолон	95% спирт	0,001	245 ± 2

¹ Спектр поглощения цефалексина представлен на рис. 1.5.

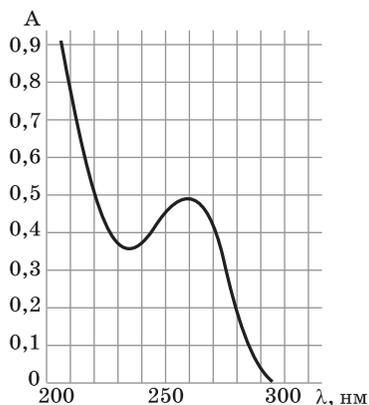


Рис. 1.5. Спектр поглощения 0,002% раствора цефалексина

Чаще приводят максимумы при определенных длинах волн и указывают соответствующие им величины поглощения.

Спектр поглощения раствора пиридоксина гидрохлорида в фосфатном буферном растворе (рН 6,9) с концентрацией 0,5 мг/мл в области от 230 до 350 нм имеет максимумы при 254 и 324 нм; поглощение в кювете с толщиной слоя 1 см при этих максимумах — соответственно 0,18 и 0,35 (МФ III).

Удобным приемом при испытаниях на подлинность является определение отношения величин поглощения при двух максимумах. Такая методика, как указывается в МФ III, «уменьшает влияние переменных характеристик прибора на испытание и исключает необходимость использования стандартного образца».

Например, для натрия *para*-аминосалицилата отношение оптических плотностей 0,001% раствора при длинах волн 265 и 299 нм должно быть в пределах 1,50—1,56 при измерении в кювете с толщиной слоя 1 см.

Некоторые испытания на подлинность с использованием УФ-спектрофотометрии требуют применения стандартных образцов лекарственных веществ. В этом случае проба стандартного образца должна быть изготовлена и одновременно определена в тех же условиях, что и испытуемое вещество.

УФ-спектр 0,0005% раствора этинилэстрадиола в 95% спирте имеет максимумы и минимумы при тех же длинах волн, что и раствор стандартного образца одинаковой концентрации и одновременно измеренный; соответствующие величины поглощения, рассчитанные на сухое вещество, при максимуме поглощения около 281 нм не отличаются более чем на 3%. Этот прием обеспечивает наиболее достоверные результаты, однако связан с обязательным применением стандартного образца.

Иногда величину поглощения при определенной длине волны указывают в виде удельного показателя $A_{1\text{см}}^{1\%}$. Удельный показатель поглощения левомицетина $A_{1\text{см}}^{1\%}$ при длине волны 278 нм составляет 290—305.

В ряде случаев (производные барбитуровой кислоты, сульфаниламиды, фенолы и др.) характер спектра может изменяться в зависимости от значения рН

раствора, поэтому в частной фармакопейной статье указывается значение рН, при котором проводится изменение.

Испытания на чистоту. УФ-характеристики в ряде случаев используются при испытаниях на чистоту и при исследовании стабильности лекарственных веществ, если изменения в характере спектра позволяют судить об изменениях вещества. При этом, как правило, продукты разрушения поглощают в области, отличной от поглощения исследуемого вещества.

Примером может служить определение примесей адреналона и норадреналона соответственно в адреналине и норадреналине. Полоса поглощения «кетон» около 310 нм, для основных веществ — около 278 нм.

Предел содержания поглощающих примесей может быть установлен по величинам отношений поглощения при различных максимумах (ФС «Цианокобаламин», «Ретинола ацетат», «Токоферола ацетат»).

Количественное определение. Спектрофотометрия в УФ-области широко используется для количественного определения лекарственных средств и включена во все современные фармакопеи. Чувствительность метода определяется в основном способностью вещества к поглощению и выражается, как было указано выше, молярным коэффициентом поглощения. Предельные концентрации веществ, анализируемые при помощи спектрофотометрии, как правило, меньше, чем в титриметрических или гравиметрических методах. Этим объясняется использование спектрофотометрии при определении небольших количеств веществ, особенно в различных лекарственных формах.

Основное условие для количественного анализа — соблюдение закона Бугера—Ламберта—Бера в пределах соответствующих концентраций. Для проверки соответствия закону строят график зависимости (поглощения от концентрации) или рассчитывают фактор для каждого стандартного раствора и определяют область концентраций, в пределах которой величина A / C остается постоянной.

Существуют и применяются два принципиально различных способа спектрофотометрических количественных определений. По одному из них содержание вещества в процентах (x) рассчитывают *на основании предварительно вычисленной величины поглощения*, чаще по величине удельного показателя поглощения ($A_{1\text{ см}}^{1\%}$):

$$x = \frac{A \cdot b}{A_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot a} \quad (1)$$

где A — оптическая плотность;
 b — разведение;
 a — масса навески, г.

Примером может служить определение содержания кортизона ацетата в таблетках.

Основным недостатком приведенного определения является общеизвестный факт: различные спектрофотометры (даже различные приборы одной и той же модели и одного производства) дают значительные отклонения по величине поглощения для одного и того же стандартного раствора.