**Лекция № 5. Методы фармацевтического анализа.**

Фармацевтический анализ – это наука о химической характеристике и измерении биологически активных веществ на всех этапах производства: от контроля сырья до оценки качества полученного лекарственного вещества, изучения его стабильности, установления сроков годности и  стандартизации готовой лекарственной формы. Особенностями фармацевтического анализа является его многогранность и многообразие веществ или их смесей, в том числе индивидуальные химические вещества, сложные смеси биологических веществ (белков, углеводов, олигопептидов и т.д.). Способы анализа нуждаются в постоянном совершенствовании и, если в УП фармакопее превалировали химические методы, в том числе качественные реакции, то на современном этапе используются преимущественно физико-химические и физические методы анализа.

**Фармацевтический анализ в зависимости от поставленных задач включает различные аспекты контроля качества лекарств:**
1. Фармакопейный анализ;

2. Постадийный контроль производства лекарственных средств;
3. Анализ лекарственных средств индивидуального изготовления.

Основным и наиболее существенным является фармакопейный анализ, т.е. анализ лекарственных средств на соответствие стандарту – фармакопейной статье или иному НД и, таким образом, подтверждение его пригодности. Отсюда и требования к высокой специфичности, селективности, точности и достоверности анализа.

Заключение о качестве лекарственного средства можно сделать только на основании анализа пробы (статистически достоверной выборки). Порядок отбора пробы указан либо в частной статье, либо в общей статье ГФ Х1 изд. (вып.2) с.15. Для проведения испытания лекарственных средств на соответствие требованиям нормативно-технической документации проводят многоступенчатый отбор проб (выборок). При многоступенчатом отборе пробу (выборку) образуют по ступеням и продукцию в каждой ступени отбирают случайным образом в пропорциональных количествах из единиц, отобранных в предыдущей ступени. Число ступеней определяется видом упаковки.

1 ступень: отбор единиц упаковочной тары (ящиков, коробок и т.д.);

2 ступень: отбор упаковочных единиц, находящихся в упаковочной таре (коробок, флаконов, банок и т.д.);

3 ступень: отбор продукции в первичной упаковке (ампул, флаконов, контурных упаковок и т.д.).

Конкретный порядок формирования выборки подробно описан в ГФ Х1 издания, вып.2. При этом анализ считается достоверным при воспроизводимости как минимум четырех проб.

**Критерии фармацевтического анализа**

Для различных целей анализа имеют значения такие критерии как **избирательность анализа, чувствительность, точность, время выполнения анализа, количество испытуемого вещества.**

Избирательность анализа имеет существенное значение при анализе сложных препаратов, состоящих из нескольких действующих компонентов. В этом случае очень важна избирательность анализа для количественного определения каждого из веществ.

Требования к точности и чувствительности зависят от объекта и цели исследования. При испытании чистоты или примесей используют высокочувствительные методы. Для постадийного контроля производства важен фактор времени, затрачиваемый на анализ.

Важным параметром метода анализа является предел чувствительности метода. Этот предел означает наименьшее содержание, при котором можно достоверно обнаружить данное вещество. Наименее чувствительными являются химические методы анализа и качественные реакции. Самые чувствительные ферментные и биологические методы, позволяющие обнаруживать единичные макромолекулы веществ. Из реально применяемых самыми чувствительными являются радиохимический, каталитический и флуоресцентный методы, позволяющие определять до 10-9%; чувствительность спектрофотометрических методов 10-3-10-6%; потенциометрических 10-2%.

Термин «точность анализа» включает одновременно два понятия: воспроизводимость и правильность полученных результатов.

**Воспроизводимость –**характеризует рассеяние результатов анализа по сравнению со средним значением.

**Правильность –** отражает разность между действительным и найденным содержанием вещества. Точность анализа зависит от качества приборов, опытности аналитика и т.д. Точность анализа не может быть выше, чем точность наименее точного измерения. Это означает, что если при титровании точность составляет ±0,2 мл плюс ошибка от натекания тоже ±0,2 мл, т.е. суммарно ±0,4 мл то при расходовании 20 мл титранта ошибка составляет 0,2%. При уменьшении навески и количества титранта точность уменьшается. Таким образом титриметрический анализ позволяет выполнять определение с относительной погрешностью ± (0,2-0,3)%. Каждый из методов имеет свою точность. При анализе важно иметь представление о следующих понятиях:

**Грубые ошибки-**являются просчетом наблюдателя или нарушения методики анализа. Такие результаты отбрасываются как недостоверные.

**Систематические ошибки –** отражают правильность результатов анализа. Они искажают результаты измерений, как правило, в одну сторону на некоторое постоянное значение. Систематические ошибки можно частично устранить введением поправок, калибровкой прибора и т.д.

**Случайные ошибки –** отражают воспроизводимость результатов анализа. Они вызываются неконтролируемыми переменными. Среднее арифметические случайных ошибок стремится к нулю. Поэтому для расчетов необходимо использовать не результаты единичных измерений, а среднее из нескольких параллельных определений.

**Абсолютная ошибка** – представляет собой разность между полученным результатом и истинным значением. Эта ошибка выражается в тех же единицах, что и определяемая величина.

**Относительная ошибка**определения равна отношению абсолютной ошибки к истинному значению определяемой величины. Выражают ее обычно в процентах или долях.

Значения относительных ошибок находятся в зависимости от того каким методом выполняют анализ и что из себя представляет анализируемое вещество – индивидуальное вещество и смесь многих компонентов.

Относительная ошибка при исследованиях индивидуальных веществ спектрофотометрическим методом составляет 2-3 %, ИК-спектрофотометрией – 5-12%; жидкостной хроматографией 3-4%; потенциометрией 0,3-1%. Сочетанные методы как правило снижают точность анализа. Наименее точными являются биологические методы – их относительная ошибка достигает 50%.

**Методы идентификации лекарственных веществ.**

Важнейшим показателем при испытании лекарственных веществ является их идентификация или как это принято в фармакопейных статьях подлинность. Для определения подлинности лекарственных веществ используют многочисленные методы. Все основные и общие описаны в ГФ Х1 издания, вып.1. Исторически основной упор делался на химические, в т.ч. качественные цветные реакции, характеризующие наличие определенных ионов или функциональных групп у органических соединений, одновременно с этим широко использовались и физические методы. В современных фармакопеях упор делается на физико-химические методы.

Остановимся на основных **физических методах**.

Достаточно стабильной константой, характеризующей вещество, его чистоту и подлинность является температура плавления. Этот показатель широко используется для стандартизации субстанций лекарственных веществ. Подробно методы определения температуры плавления описаны в ГФ Х1, самостоятельно вы смогли опробовать его на лабораторных занятиях. Чистое вещество имеет постоянную температуру плавления, однако при добавлении  в него примесей температура плавления как правило снижается весьма существенно. Такой эффект называют пробой смешения и именно проба смешения позволяет устанавливать подлинность препарата при наличии стандартного образца или заведомой пробы. Бывают, правда и исключения, так рацемическая сульфокамфорная кислота плавится при более высокой температуре, а различные кристаллические формы индометацина отличаются температурой плавления. Т.е. данный метод является одним из показателей, позволяющих характеризовать как чистоту продукта, так и его подлинность.

Для некоторых препаратов используют такой показатель как температура затвердевания. Другим показателем, характеризую-щим вещество является температура кипения или температурные пределы перегонки. Этим показателем характеризуют жидкие вещества, например, спирт этиловый. Температура кипения менее характеристичный показатель, он сильно зависит от давления атмосферы, возможности образования смесей или азеотропов и применяется достаточно редко.

Среди других физических методов следует отметить определение **плотности, вязкости.**Стандартные методики анализа описаны в ГФ Х1. Методом, характеризующим подлинность препарата является также определение растворимости его в различных растворителях. По ГФ Х1 изд. Этот метод характеризуется как свойство, которое может служить ориентировочной характеристикой испытуемого препарата. Наряду с температурой плавления растворимость вещества является одним из параметров, по которому устанавливают подлинность и чистоту практически всех лекарственных веществ. В фармакопее установлена ориентировочная градация веществ по растворимости от очень легко растворим до практически не растворим. При этом растворившимся считается вещество, в растворе которого в проходящем свете не наблюдается частиц вещества.

**Физико-химические методы определения подлинности**.

Наиболее информативными с точки зрения определения подлинности веществ являются физико-химические методы, основанные на свойствах молекул веществ взаимодействовать с какими-либо физическими факторами. К физико-химическим методам следует отнести:

**1.Спектральные методы**

УФ-спектроскопия

Спектроскопия в видимом свете

ИК-спектроскопия

Флуоресцентная спектроскопия

Атомно-абсорбционная спектроскопия

Рентгеновские методы анализа

Ядерный магнитный резонанс

Рентгеноструктурный анализ

**2.Сорбционные методы анализа**

Тонкослойная хроматография

Газожидкостная хроматография

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Элетрофорез

Ионофорез

Гель-хроматография

**3.Массовые методы анализа**

Масс-спектрометрия

Хроматомассспектрометрия

**4.Электрохимические методы анализа**

Полярография

Электронный парамагнитный резонанс

**5.Использование стандартных образцов**

Рассмотрим вкратце применимые в фармации из методов анализа. Подробно все эти методы анализа вам будут прочитаны в конце декабря профессором Мягких В.И. Для определения подлинности лекарственных веществ используют некоторые спектральные методы. Наиболее достоверным является использование низкочастотной области ИК спектроскопии, где полосы поглощения наиболее достоверно отображают данное вещество. Еще эту область называю область отпечатков пальцев. Как правило, для подтверждения подлинности используют сравнение ИК-спектров, снятых в стандартных условиях стандартного образца и испытуемого образца. Совпадение всех полос поглощения подтверждает подлинность препарата. Использование УФ и видимой спектроскопии менее достоверно, т.к. характер спектра не является индивидуальным и отражает только определенный хромофор в структуре органического соединения. Атомно-абсорбционная спектроскопия и рентгеновская спектроскопия используются для анализа неорганических соединений, для идентификации химических элементов. Ядерный магнитный резонанс позволяет устанавливать структуру органических соединений и является достоверным методом подтверждения подлинности, однако в силу сложности приборов и дороговизны используется очень редко и, как правило, только в исследовательских целях. Флуоресцентная спектроскопия применима только для определенного класса веществ, флуоресцирующих под действием УФ излучения. При этом спектр флуоресценции и спектр возбуждения флуоресценции достаточно индивидуальны, но сильно зависят от среды, в которой растворено данное вещество. Этот метод чаще используют для количественного определения, особенно малых количеств, поскольку он является одним из наиболее чувствительных.

Рентгеноструктурный анализ является наиболее достоверным методом подтверждения структуры вещества, он позволяет установить точную химическую структуру вещества, однако для поточного анализа подлинности просто не пригоден и используется исключительно в научных целях.

**Сорбционные методы анализа**нашли очень широкое применение в фармацевтическом анализе. Они используются для определения подлинности, наличия примесей и количественного определения. Подробно об этих методах и  используемой аппаратуре вам будет прочитана лекция профессором В.И.Мягких – региональным представителем фирмы Шимадзу – одного из главных производителей хроматографического оборудования. Эти методы основаны на принципе сорбции-десорбции веществ на определенных носителях в потоке носителя. В зависимости от носителя и сорбента подразделяют на тонкослойную хроматографию, жидкостную колоночную (аналитическую и препаративную, в том числе ВЭЖХ), газожидкостную хроматографию, гель фильтрацию, ионофорез. Два последних метода применяются для анализа сложных белковых объектов. Существенным недостатком методов является их относительность, т.е. хроматография может характеризовать вещество и его количество только при сравнении со стандартным веществом. Однако следует отметить как существенное достоинство – высокая достоверность метода и точность, т.к. в хроматографии любая смесь должна разделиться на индивидуальные вещества и результатом анализа является именно индивидуальное вещество.

Масс-спектрометрические и электрохимические методы используют для подтверждения подлинности редко.

Особое место занимают методы определения подлинности в сравнении со стандартным образцом. Этот метод используют достаточно широко в зарубежных фармакопеях для определения подлинности сложных макромолекул, сложных антибиотиков, некоторых витамином, и других веществ, содержащих особенно хиральные атомы углерода, поскольку определить подлинность оптически активного вещества другими методами сложно или вовсе невозможно. Стандартный образец должен разрабатывать и выпускаться на основании разработанной и утвержденной фармакопейной статьи. В России существуют и применяются всего несколько стандартных образцов и для анализа используют чаще всего так называемые РСО – рабочие стандартные образцы, приготавливаемые непосредственно перед опытом из заведомых субстанций или соответствующих веществ.