**Фармацевтическая химия 2**

**1 занятие.**

**Методы количественного определения лекарственных веществ.**

**Количественный анализ лекарственных средств.**

Заключительный этап фармацевтического анализа лекарственного вещества – количественное определение. Оно выполняется после того, как лекарственное  вещество идентифицировано и установлено наличие допустимого количества примесей. Выбор оптимального метода количественного определения обуславливается прежде всего его возможностью оценивать лекарственное вещество по физиологически активной части молекулы. Практически сделать это сложно. Обычно количественное содержание препарата устанавливают по какому-либо его химическому свойству, связанному с наличием той или иной функциональной группы.

**Для количественного анализа лекарственных веществ применяют четыре группы методов: химические, физические, физико-химические и биологические.**

Общие требования к методам количественного определения:

1. Высокая чувствительность и специфичность основной реакции.
2. Простота и доступность методики.
3. Доступность в практике применяемых реактивов.
4. Быстрота выполнения.
5. Взаимодействие анализируемого вещества с титрантом должно протекать стехиометрически, до конца.
6. Возможность фиксации точки эквивалентности.
7. Минимальный расход реактивов и образца.
8. Точность метода.
9. Отсутствие влияния примесей, наполнителей, растворителей при анализе.

Количественное определение основывается на физико-химических и биологических свойствах лекарственных средств.

**Методы анализа:**

— физические
— химические
— физико- химические
— биологические

Выбор оптимального метода химического определения обуславливается прежде всего его возможностью оценивать лекарственное вещество по физиологически активной части молекулы. Практически во всех готовых формах сейчас присутствует высокоэффективная жидкостная хроматография. С одной стороны это несомненный прогресс, поскольку метод достоверно позволяет идентифицировать индивидуальное вещество, с другой метод относительный, дорогой и непригоден для поточного анализа. Достаточно достоверный поточный анализ возможен при использовании одного хроматографа для одного вида анализа, да и то при соблюдении целого ряда требований.

**Способ подразделения на физические и физико-химические методы анализа достаточно условный. К чисто физическим методам следует отнести методы, основанные на свойствах, связанных с агрегатным состоянием вещества:**

1.**Температура плавления вещества**. Температура плавления, как мы уже говорили, определяет характер кристаллической решетки и иные свойства вещества. Для количественного определения метод малопригоден, хотя возможно в некоторых случаях оценить по температуре плавления количественное содержание вещества. Чаще его используют для полимерных веществ с целью определения пределом полимеризации.

2.**Температура кипения**. Использование такого показателя для определения количественного содержания вещества малопригодно, чаще его используют для качественного анализа и испытания на подлинность.

3.**Плотность вещества**. Плотность вещества, в принципе может быть использована для количественного определения, однако точность такого метода низка ив настоящее время он не применяется в фармакопее для количественного определения лекарственных веществ.

Среди физических методов определенную нишу занимают оптические методы неразрушающего контроля. К этой группе относятся методы, основанные на определении показателя преломления луча света в растворе испытуемого вещества (рефрактометрия), измерение интерференции света (интерферометрия), способности раствора вещества вращать плоскость поляризованного луча (поляриметрия).

**Рефрактометрия.**Метод используется преимущественно для определения подлинности жидких лекарственных веществ (диэтиламид никотиновой кислоты, токоферола ацетат, метилсалицилат), во внутриаптечном контроле лекарственных форм. В том числе анализе двойных и тройных смесей. Весьма редко используют его для количественного определения: объемно-рефрактометрический анализ и рефрактометрический анализ методом полной и неполной экстракции. К примеру, его используют тогда, когда другими методами не удается получить устойчивый результат.

**Интерферометрия метод** экзотический и применяется крайне редко.

**Поляриметрия.** Применяют для испытания подлинности лекарственных веществ, в молекулах которых имеется ассиметрический атом углерода. В фармацевтической химии имеется небольшое количество примеров использования поляриметрии в количественном анализе и то, только когда регламентируется соотношение оптических изомеров.

**Рентгеноспектральные методы анализа.** Могут достаточно успешно использоваться при наличии в молекуле тяжелых элементов (кобальт, золото, платина и др.). На практике в фармацевтическом анализе такие методы не встречаются, правда, пока. Вероятно в перспективе возможно создание компактных и дешевых приборов, пригодных для фармацевтического анализа.

**Физико-химические методы анализа.**

1.Методы, основанные на поглощении излучения (абсорбционные методы).

Абсорбционные методы основаны на свойствах молекул или атомов, поглощать излучения определенной частоты.

**Атомно-абсорбционная спектрофотометрия**основана на использовании ультрафиолетового или видимого излучения резонансной частоты. Поглощение связано с переходом электронов внешней оболочки на возбужденный уровень, что характеризуется для каждого конкретного атома или молекулы определенной частотой. Объектами, поглощающими излучение являются атомы в газообразном состоянии (реже молекулы). Сущность метода заключается в пропускании света через облако, содержащее атомы или ионы испытуемого вещества. Это облако создается или путем введения раствора вещества в пламя горелки с высокотемпера-турным пламенем (ацетилен с кислородом, закись азота с водородом и т.д.), либо через специальное устройство, переводящее раствор в парообразное состояние.

**Ультрафиолетовая и видимая спектрофотометрия.**Наиболее простой и широко применяемый в фармации метод анализа. Его используют на всех этапах фармацевтического анализа (испытания чистоты, подлинности, количественного определения), однако наиболее достоверные данные получаются при использовании метода для количественного определения лекарственных веществ. Процесс поглощения обусловлен электронными переходами электронов, участвующих в валентных связях молекул и отражает в конечном итоге свойства всей молекулы в целом. Хорошими объектами для спектрофотометрии являются ароматические и гетероароматические соединения.

**Дифференциальные методы**позволяют расширить область применения спектрофотометрии в фармацевтическом анализе. Они позволяют повысить ее объективность и точность, а также анализировать высокие концентрации веществ. Кроме того этими методами можно анализировать многокомпонентные системы без их предварительного разделения.

Новые возможности в области идентификации и количественного определения открывает использование производной УФ-спектрофотометрии. Метод основан на выделении математическими методами индивидуальных полос из УФ-спектра, представляющего собой сумму налагающихся полос поглощения или полос, не имеющих четко выраженного максимума. Точность такого метода, правда, существенно ниже, но он позволяет без больших затрат и сложных экстракций производить анализ смесей.

Разновидностью спектрофотометрии является **фотоколориметрия**– метод количественного определения веществ в видимой области. Метод основан на исследовании или окрашенных соединений или анализе производных, например, комплексов в которые переводится испытуемое соединение. Метод до сих пор используют для количественного определения (фурацилин, фурадонин), используют его и для определения веществ в лекарственных формах.

**Инфракрасная (ИК) спектроскопия.** Сущность метода заключается в поглощении излучения в ИК области (от 200 до 4000 см-1) молекулой вещества. ИК спектры возникают в результате переходов между колебательными уровнями основного электронного состояния изучаемой системы. В зависимости от этого имеются деформационные, валентные колебания. Область деформационных колебаний называют область отпечатков пальцев именно по ней идентифицируются вещества. ИК спектроскопию используют почти исключительно для качественного анализа и идентификации подлинности веществ. Связано это с тем, что как правило, спектры ИК снимают для веществ находящихся в кристаллическом состоянии или в виде взвеси  в перфторвазелиновом масле или в таблетке с КВr. ИК спектроскопия в растворе ограничена несколькими растворителями и используется крайне редко. На современном этапе начала достаточно успешно применяться ИК спектроскопия с Фурье преобразованием, позволяющая практически без пробоподготовки определять ряд параметров, в том числе концентрацию воды, содержание основного вещества, а при наличии стандартного образца и определять концентрации примесей. Этот метод является одним из наиболее перспективных методов неразрушающего контроля.

**Методы, основанные на испускании излучения.**

К этой группе методов относят фотометрию пламени, флуоресценцию и радиохимические методы. Флуоресцентные методы основаны на способности некоторых веществ флуоресцировать под воздействием УФ излучения. Эта способность обусловлена структурой либо самих органических соединений, либо продуктов их диссоциации, сольволиза и других превращений, вызванных воздействием различных реактивов. Интенсивность флуоресценции зависит от многих факторов, но в том числе и от концентрации вещества, правда только при достаточно низких концентрациях.

**Флуориметрия** может быть использована как для количест-венного, так и для качественного анализа. Количественный анализ выполняют на спектрофлуориметрах.

Разновидностью флуоресценции является **хемилюминесценция**– метод, заключающийся в использовании энергии, возникающей в процессе химической реакции. Эта энергия служит источником возбуждения. Ее излучают при окислении некоторые барбитураты (особенно фенобарбитал), гидразиды ароматических кислот и некоторые другие соединения. Метод мало используется в фармацевтической химии, однако он позволяет определять очень низкие концентрации веществ в биологическом материале.

**Электрохимические методы.**

**Потенциометрия –**метод, основанный на измерении равно-весных потенциалов, возникающих на границе между испытуемым раствором и погруженным в него электродом. Используют метод **потенциометрического титрования**заключающийся в установлении эквивалентного объема титранта путем измерения ЭДС индикаторного электрода и электрода сравнения, погруженных в анализируемый раствор.

Разновидностью такого титрования является **амперометрическое титрование**с двумя индикаторными электродами, которые находятся под небольшим напряжением. Метод часто используют для нитрито- и иодометрического титрования.

Среди электрохимических методов особняком находятся **полярографические методы –**метод измеряет силу тока. Возникающей на микроэлектроде при электровосстановлении или электроокислении анализируемого вещества в растворе. Для количественно определения полярографию использовали  в анализе сердечных гликозидов, некоторых витаминов.

**Методы разделения.**

Из этой группы методов в фармацевтическом анализе используют хроматографию, электрофорез и экстракцию.

**Хроматографические методы**разделения веществ основаны на их распределении между двумя фазами: подвижной и неподвижной. По механизму процесса разделения хроматографиические методы классифицируют на ионообменную, адсорбционную, осадочную, распределительную, окислительно-восстановительную хроматографию.

Адсорбционная хроматография основана на избирательной адсорбции отдельных компонентов из раствора смеси веществ. Стационарной фазой служат окись алюминия, силикагель, микрокристаллическая целлюлоза и т.д.

Ионообменная хроматография использует ионообменные процессы происходящие между адсорбентом и ионами электролита. Стационарной фазой служат ионообменные смолы.

Для количественного определения в фармацевтическом анализе используют адсорбционную – ТСХ или бумажную хроматографию.

**Электрофорез.**Этот метод включен в качестве метода качественного и количественного анализа. Используют его чаще всего для анализа сложных белковым молекул. На практике используют комбинированные методы иммуноэлектрофорез и метод пептидных карт.

**Газожидкостная хроматография.** Не останавливаясь особенно на этом методе, будет отдельная лекция, следует отметить, что это доступный метод анализа летучих веществ или их дериватов. Достоинством метода является совмещение идентификации лекарственного вещества, оценки его чистоты и примесей и количественное определение.

**ВЭЖХ.** Метод высокоэффективной жидкостной хромато-графии типичный пример распределительной хроматографии. Это один из наиболее применимых сейчас методов количественного определения как в субстанциях, так и в готовых формах. Его используют также для идентификации вещества и определения и идентификации примесей. В качестве детекторов используют УФ, флуориметрический, электрохимический, масс-спектрометрический детекторы.

**Термические методы анализа**, которые включают термогравиметрию, дериватографию, дифференицальную сканирующую калориметрию используют чаще всего для анализа содержания влаги, изучения равновесного состояния жидкость-кристаллы, особенно когда важен показатель кристаллографии вещества. Для количественного анализа методы малопригодны и практические не используются.

**Биологические методы анализа.** Методы количественного определения действующего вещества биологическими методами основаны либо на их физиологическом воздействии на организм животных, либо воздействия на тест-микроорганизмы. Применяют биологические методы, когда с помощью физико-химических или химических методов не удается сделать заключение о чистоте или количестве действующего вещества или суммы действующих веществ. Примером могут служить некоторые антибиотики, эритромицин, канамицин, суммарные экстракты сердечных гликозидов, ядовитые вещества типа яда змей или пчел. Так токсичность яда пчел проводят на голубях и обозначают в голубиных единицах. Биологическую оценку эффективности препаратов наперстянки, горицвета, строфанта проводят на лягушках, кошках или голубях и выражают соответственно (ЛЕД) лягушачьи единицы действия, (КЕД) кошачьи единицы действия или голубиные единицы действия (ГЕД). Антибиотики, которые не удается охарактеризовать физико-химическими методами, или антибиотики, содержащие несколько действующих веществ (тобрамицин, канамицин) анализируют по зоне ингибирования роста тест-микроорганизмов на плотной питательной среде. Биологические методы используют также для оценки пирогенности раствором лекарственных средств.

**Химические методы количественного определения.**

**Гравиметрический (весовой) метод.** Метод используют главным образом для неорганических соединений, редко для количественного определения некоторых алкалоидов в форме пикратов или кремневольфраматов и витаминов (например, тиамина бромида и рутина).

**Титриметрические методы.**

Титриметрические (объемные) методы анализа основаны на точном измерении количества реактива (титранта), израсходован-ного на реакцию с определенным веществом. При титровании тит-рант добавляют небольшими порциями к раствору, содержащему точно известную массу (навеску) определяемого вещества. После добавления каждой новой порции титранта в системе, описываемой уравнением химической реакции, устанавливается равновесие:

**Реакции, используемые в титриметрии, должны удовлетворять следующим основным требованиям:**

—реакция должна протекать количественно, то есть константа равновесия реакции должна быть достаточно высока;

—реакция должна протекать с большой скоростью;

—реакция не должна осложняться протеканием побочных процессов;

—должен существовать способ определения точки конца титрования.

Если реакция не удовлетворяет хотя бы одному из этих требований, она не может быть использована в титриметрическом анализе.

В титриметрии различают три приема титрования: **прямое, обратное и косвенное**(заместительное).

При прямом титровании определяемое вещество А непосредственно реагирует с титрантом В:

В **Обратном** титровании к анализируемому веществу добавляют избыток титранта В, непрореагировавший остаток которого оттитровывают титрантом D:

А + В = С

Избыток

В + D = Е

При **КОСВЕННОМ**(заместительном) титровании с титрантом В реагирует продукт промежуточной реакции G определяемого вещества А со вспомогательным реактивом F:

А + F = G

G + В = К

Для титрования в титриметрических методах используются растворы с точно известной концентрацией, называемые ТИТРАНТАМИ или ТИТРОВАННЫМИ РАСТВОРАМИ. Концентрация титрованного раствора обозначается терминами **МОЛЯРНЫЙ, НОРМАЛЬНЫЙ, ТИТР или ТИТР ПО ОПРЕДЕЛЯЕМОМУ ВЕЩЕСТВУ.**

**Используемые в фармацевтической химии методы титрования принято делить:**

1.Кислотно-основное титрование ( в водных и неводных средах);

Алкалиметрия, ацидиметрия в водной и неводной средах

2.Методы окисления-восстановления (редоксметрия);

Перманганатометрия, бихроматометрия, цериметрия, йодометрия, йодхлорометрия.

3.Методы осадительного титрования;

Аргентометрия, меркуриметрия, меркурометрия, тиоционатометрия.

4.Комплексонометрическое титрование;

5.Нитритометрия.

6.Метод титрования в неводной среде.

7.Комплексометрия.