

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Оренбургский государственный медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации  
ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России**

**КАФЕДРА ХИМИИ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

**«Основы фармацевтической химии (часть I)»**

**для студентов фармацевтического факультета**



**ОРЕНБУРГ- 2016 г.**

УДК 615.011.5(076)(075.8)

ББК 52.81я73

М69

Авторы: И.В. Михайлова, Д.С. Карманова, Н.А. Кузьмичева

Под общей редакцией заведующего кафедрой химии и фармацевтической химии, профессора, д.м.н., С.И. Красикова

Учебное пособие «Основы фармацевтической химии (часть I) для студентов фармацевтического факультета». – 256 с.

Учебное пособие подготовлено коллективом авторов кафедры химии и фармацевтической химии ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава России.

Рецензенты:

1. Зав. кафедры фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет», д.ф.н., профессор Ф.А.Халиуллин.

2. Доцент кафедры управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии ГБОУ ВПО ОрГМУ Минздрава России, к.ф.н. А.А. Шмыгарева.

Учебное пособие «Основы фармацевтической химии (часть I) для студентов фармацевтической химии» рассмотрено и рекомендовано к печати РИС ОрГМУ.

© Кафедра химии и фармацевтической химии, 2016

[К содержанию](#)

## Список основных сокращений

БАВ	Биологически-активные вещества
ГФ	Государственная Фармакопея
ЛВ	Лекарственное вещество
ЛС	Лекарственное средство
ЛП	Лекарственный препарат
ЛФ	Лекарственная форма
ГЛП	Готовые лекарственные препараты
ЛРС	Лекарственное растительное сырье

# Содержание

<b>1. Предмет и задачи фармацевтической химии</b> .....	<b>7</b>
Связь фармацевтической химии с другими науками .....	11
Объекты фармацевтической химии .....	13
Современные проблемы фармацевтической химии .....	16
Основные принципы фармацевтического и фармакопейного анализа .....	16
Фармацевтический анализ .....	16
Критерии фармацевтического анализа .....	21
Ошибки, возможные при проведении фармацевтического анализа .....	22
Общие принципы испытаний подлинности лекарственных веществ .....	23
Источники и причины недоброкачества лекарственных веществ .....	23
Общие требования к испытаниям на чистоту .....	24
Методы фармацевтического анализа и их классификация .....	25
<b>2. Качественный анализ лекарственных веществ</b> .....	<b>26</b>
2.1 Методы физического и физико-химического анализа .....	26
Температура плавления .....	27
Температура затвердевания .....	29
Вязкость (внутреннее трение) .....	30
Растворимость .....	32
Окраска жидкостей .....	33
Прозрачность и степень мутности жидкостей .....	34
Определение воды .....	35
Общая зола .....	37
Сульфатная зола .....	37
2.2 Методы химического анализа .....	39
Общие реакции доказательства подлинности неорганических лекарственных веществ в соответствии с требованиями ГФ .....	39
Определение примесей в лекарственных веществах .....	52
<i>Безэталонный метод</i> .....	54
<i>Эталонный метод</i> .....	54
<i>Определение примеси ионов железа</i> .....	55
<i>Определение примеси ионов аммония</i> .....	55
<i>Определение примеси ионов кальция</i> .....	55
<i>Определение примеси ионов цинка</i> .....	56
<i>Определение примеси сульфат-ионов</i> .....	56
<i>Определение примеси фосфат-ионов</i> .....	57
Вопросы для самоконтроля .....	58

2.3 Инструментальные методы анализа.....	60
Оптические методы .....	60
Поляриметрия .....	60
Рефрактометрия .....	61
Спектроскопические методы.....	62
Спектрофотометрия в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях .....	63
Спектрофотометрия в инфракрасной (ИК) области .....	65
Атомно-эмиссионная пламенная спектрометрия (АЭС) .....	67
Атомно-абсорбционная спектрометрия (ААС) .....	68
Флуориметрия.....	70
Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР).....	71
Методы разделения .....	74
Хроматография в тонком слое сорбента .....	76
Газожидкостная (газовая) хроматография (ГЖХ).....	78
Эксклюзионная хроматография .....	83
<i>Вопросы для самоконтроля</i> .....	85
2.4 Биологические методы контроля .....	89
Аномальная токсичность .....	89
Пирогенность .....	89
Стерильность.....	90
Бактериальные эндотоксины .....	93
Микробиологическая чистота .....	93
Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар ...	94
<i>Вопросы для самоконтроля</i> .....	96

## Введение

Среди задач фармацевтической химии — таких, как моделирование новых лекарственных средств и их синтез, изучение фармакокинетики и др. особое место занимает анализ качества лекарств. Сборником обязательных общегосударственных стандартов и положений, нормирующих качество лекарственных средств, является Государственная фармакопея.

Фармакопейный анализ лекарственных средств включает в себя оценку качества по множеству показателей. В частности, устанавливается подлинность лекарственного средства, анализируется его чистота, проводится количественное определение. Первоначально для такого анализа применяли исключительно химические методы: реакции подлинности, реакции на содержание примесей и титрование при количественном определении.

Со временем не только повысился уровень технического развития фармацевтической отрасли, но и изменились требования к качеству лекарственных средств. В последние годы наметилась тенденция к переходу на расширенное использование физических и физико-химических методов анализа. В частности, широко применяются спектральные методы: инфракрасная и ультрафиолетовая спектрофотометрия, спектроскопия ядерно-магнитного резонанса и др. Активно используются методы хроматографии (высокоэффективная жидкостная, газожидкостная, тонкослойная), электрофорез и др.

Изучение всех этих методов и их усовершенствование — одна из самых важных задач фармацевтической химии на сегодняшний день.

# Блок I

## Предмет и задачи фармацевтической химии

**Фармацевтическая химия** — наука, которая, базируясь на общих законах химических наук, исследует способы получения, строение, физические и химические свойства лекарственных веществ, взаимосвязь между их химической структурой и действием на организм, методы контроля качества и изменения, происходящие при хранении.

Основными методами исследования лекарственных веществ в фармацевтической химии являются анализ и синтез — диалектически тесно связанные между собой процессы, взаимно дополняющие друг друга. Анализ и синтез — мощные средства познания сущности явлений, происходящих в природе.

Задачи, стоящие перед фармацевтической химией, решаются с помощью классических физических, химических и физико-химических методов, которые используются как для синтеза, так и для анализа лекарственных веществ.

### Краткий исторический очерк о развитии фармацевтической химии

Фармация зародилась в глубокой древности и оказала огромное влияние на формирование медицины, химии и других наук. В те времена, естественно, господствовал чисто эмпирический, основанный на многовековых наблюдениях подход к ЛС. В качестве источника ЛП использовали готовое растительное или животное сырье для нанесения на раны, приема внутрь. Нередко лечение сопровождалось молитвами, ритуальными действиями, танцами. На протяжении тысячелетий были испытаны многие растения, минералы, ткани животных для изготовления порошков, отваров, мазей, настоев и т. д. Древнеримский врач Клавдий Гален (II в.) считал, что в растениях, кроме основной массы-балласта, содержится еще «действующее начало» (по современному определению, БАВ - биологически активное вещество), которое имеет повышенное сродство к влаге. Поэтому он рекомендовал перед приготовлением ЛС лекарственные растения сначала высушить, а затем поместить их в воду. В отличие от основной массы растения (клетчатки, белка), эти высокоактивные химические соединения за редким исключением хорошо растворимы в воде и более эффективно извлекаются из высушенного растительного сырья. Приготовление настоев и отваров - это, собственно, и есть изобретение Галена. Он описал более 300 ЛС в виде *отваров, настоев*, полученных из естественных соединений растительного и животного происхождения. Многие из *галеновых препаратов* не потеряли своего значения и в настоящее время, хотя теперь их готовят несколько иначе, и такие изменения научно обоснованы.

Идея применения *химических средств* для лечения болезней получила свое развитие лишь в средние века. Инициаторами этой идеи были алхимики, использовавшие производные *ртути, мышьяка, сурьмы, меди, цинка, железа* и т. д. Однако препараты такого рода часто оказывались токсичными и при приеме в больших дозах могли нанести больному больше вреда, чем сама болезнь. В период алхимии (IУ-ХУI вв.) очень много внимания уделялось поискам «философского камня» как вечного эликсира молодости и панацеи от всех болезней, а также средства превращения неблагородных металлов в золото и серебро. Несмотря на утопические идеи, алхимики накопили огромный экспериментальный материал для становления химии и ФХ. Были разработаны методы получения и очистки веществ (перегонка, возгонка, осаждение, фильтрование, кристаллизация и др.); получены важные химические вещества (неорганические и органические кислоты, спирт, различные соли). Нельзя не упомянуть имя выдающегося таджикского ученого-энциклопедиста X-XI вв. Авиценны, которого по праву считают основателем фармации. В пяти томах «Канона врачебной науки» он обобщил достижения греческой, индийской и арабской медицины, описал около 1000 ЛС растительного, животного и минерального происхождения, многие из которых используются и в современной медицине.

В эпоху Возрождения (XV-XVI вв.) на смену алхимии пришла *иатрохимия* (лечебная химия), стремившаяся поставить химию на службу медицине. Ее основатель, швейцарский врач и химик Филипп Ауреол Теофраст Бомбаст фон Гогенгейм, известный под псевдонимом Парацельс, целью химии считал защиту здоровья с помощью ЛС. Он впервые высказал мысль, что все процессы в организме являются сложными химическими превращениями; исследовал действие на организм многих веществ минерального и растительного происхождения, усовершенствовал ряд приборов для анализа. Парацельс считал себя оппонентом Галена в области теории медицины, а также и в практической сфере получения новых ЛФ. В отличие от Галена, он полагал, что для извлечения действующих начал лекарственных растений необходима более интенсивная и многократная обработка сырья различными растворителями. В результате этой обработки получается извлечение - *эссенция*, но только пятое извлечение - «*квинтэссенция*» (от лат. quinta - пятая) содержит искомое ЛВ. *Экстракты и настойки*, способ приготовления которых изобрел Парацельс, до сих пор получают путем повторного извлечения действующих начал в специальных приборах. (В настоящее время к галеновым ЛП относят не только настои и отвары, но и настойки, сухие и жидкие экстракты, сиропы, припарки, примочки, мази, линименты и другие, изготавливаемые путем водного или неводного извлечения действующих начал без отделения или с частичным отделением сопутствующих балластных веществ.) Парацельс

по праву считается основоположником ФХ и фармацевтического анализа. За 100 лет иатрохимии наука обогатилась большим количеством фактов и открытий, чем алхимия за 1000 лет.

Дальнейшее развитие ФХ получила в XVII-XVIII вв. В это время М. В. Ломоносов определил место химии в медицине следующим образом: «.. .Медик без довольного познания химии совершенен быть не может; от одной почти химии уповать должно на дополнения и исправления врачебной науки.» Были выделены в чистом виде и всесторонне изучены многие БАВ природного происхождения: алкалоиды, гликозиды, витамины. В течение XVIII в. создано всего 10 новых ЛС, а за последнее десятилетие XIX в. - 15.

В XIX в. существенно усовершенствованы методы химического анализа, что дало начало поиску в известных растениях активных ингредиентов, ответственных за лечебные свойства (были выделены *хинин*, *морфин* и др.). Во второй половине XIX в. благодаря созданию структурной теории, а также исследованиям многих химиков-органиков началось бурное развитие органической химии, что существенным образом отразилось на области синтеза ЛВ: появились чисто синтетические ЛС, например: *хлораль*, применяемый с 1869 г. в качестве седативного и успокаивающего средства; салициловая кислота, используемая как обезболивающее средство. К концу XIX в. синтез ЛС приобрел уже промышленные масштабы. В 1888 г. фирма Байера выпустила эффективное жаропонижающее средство фенацетин, а в 1899 г. - известное противовоспалительное ЛС аспирин.

В конце XIX в. получены неогаленовы ЛП, в которых в отличие от галеновых были сохранены действующие начала, но полностью удалены балластные вещества.

Важно подчеркнуть, что к этому времени уже была осуществлена структурная идентификация таких соединений, как жиры, белки и углеводы, т. е. соединений, молекулы которых являются основными мишенями действия ЛС.

Русский врач Д. Л. Романовский в 1891 г. изложил основной принцип химиотерапии: идеальное лекарство - вещество, которое наносит больному наименьший вред, но в то же время максимально разрушает причину заболевания.

Дальнейшее развитие ФХ связано с именами П. Эрлиха, А. Байера, А. Флеминга (пенициллин, 1928 г.), Г. Домагга (сульфаниламиды, 1935 г.) и многих других.

В 1910 г. немецкий ученый П. Эрлих синтезировал сальварсан (первое эффективное средство против сифилиса). Это обусловило возникновение концепции химиотерапии: не просто возможность использовать химические вещества для лечения патологий (болезней), но необходимость модификаций структур предполагаемых лекарственных соединений с тем, чтобы максимально эффективно воздействовать на пораженный орган. П. Эрлих разработал также теорию рецепторов и структурных изменений БАВ, происходящих при

взаимодействии с рецептором: «*Corpora non actunt, nisi fixata*», т. е. чтобы действовать на организм, молекула вещества должна быть связана с каким-то его рецептором. Эта теория, а также концепция химиотерапии стали отправными точками в направленном поиске ЛС в ФХ, а позднее - в современной медицинской химии.

В попытках воспроизвести и улучшить природные вещества химики создали многие тысячи их аналогов за период с конца XIX в. до начала 70-х годов XX в.: были синтезированы барбитураты в качестве гипнотических средств, ртутьорганические соединения, обладающие свойствами диуретиков, сульфамиды - первые эффективные антибактериальные ЛС.

В конце 1930-х годов Х. У. Флори и Э. Чейн возобновили работы по пенициллину, найденному А. Флемингом в 1928 г., а в 1944 г. З. А. Ваксман выделил стрептомицин. Так была открыта эра антибиотиков. В дореволюционной России систематические исследования в области ФХ почти не проводились, потребности в ЛП обеспечивались поставками из Германии. После 1917 г. в течение трех довоенных пятилеток создаются крупная химико-фармацевтическая промышленность и отечественные школы химиков, оказавшие огромное влияние на развитие фармации. Достаточно назвать имена А. Е. Фаворского, Н. Д. Зелинского, С. С. Наметкина, И. Л. Кнунянца, В. М. Родионова, А. П. Орехова, М. М. Шемякина, А. Б. Арбузова, М. И. Кабачника, Н. К. Кочеткова и других.

Во время второй мировой войны возникла потребность в противомаларийных средствах, заменяющих хинин, поскольку прекратилась доставка его из Индонезии. Это обстоятельство стало мощным стимулом для синтеза новых ЛС. Было исследовано 16 тыс. соединений и лишь на 7618-м эксперименте был получен *хлорохин*, а затем *примахин*.

В 50-60-е годы XX в. были созданы многие психотропные препараты: сильные транквилизаторы (*хлорпромазин*, *мепробамат*), *хлордиазепоксид* (первый представитель класса бензодиазепинов), а также антидепрессанты (например, *имипрамин*), в результате чего появилась возможность лечения депрессий, шизофрении и других нервных расстройств. В те же годы синтезированы соединения, оказывающие гипотензивное действие и применяемые для лечения сердечно-сосудистых заболеваний: *резерпин* и *метилдофа*.

Подчеркнем, что в работах по созданию этих ЛС не проводилось целенаправленное конструирование, а использовался метод «проб и ошибок», когда химики-органики достаточно произвольно заменяли одни химические группы другими. Однако постепенно на основании полученных результатов возникало понимание того, каким образом следует вести исследование, чтобы создать ЛВ. Прогресс органической, биоорганической и

бионеорганической химии явился стимулом развития ФХ и других смежных дисциплин, открыв возможности разработки принципиально новых эффективных ЛС.

Применение компьютерных методов в органической и фармацевтической химии привело к развитию методов расчета структуры молекул: геометрии и конформаций, зарядов и карт электронной плотности, энергии молекулярных орбиталей и т. д. Таким образом, появилась возможность количественного описания структурных особенностей даже очень сложных биомолекул. Так, еще в 70-х годах была создана методологическая основа для возникновения и использования рациональных подходов к синтезу физиологически активных веществ (drug design - структурные концепции конструирования ЛС).

### ***Связь фармацевтической химии с другими науками***

Фармацевтическая химия является важным разделом химической науки и тесно связана с ее отдельными дисциплинами (рис.1). Используя достижения базовых химических дисциплин, фармацевтическая химия решает задачу целенаправленного поиска новых лекарственных средств. Например, современные компьютерные методы позволяют прогнозировать фармакологическое действие (терапевтический эффект) лекарственного средства. В химии сформировалось отдельное направление, связанное с поиском взаимно однозначных соответствий между структурой химического соединения, его свойствами и активностью.

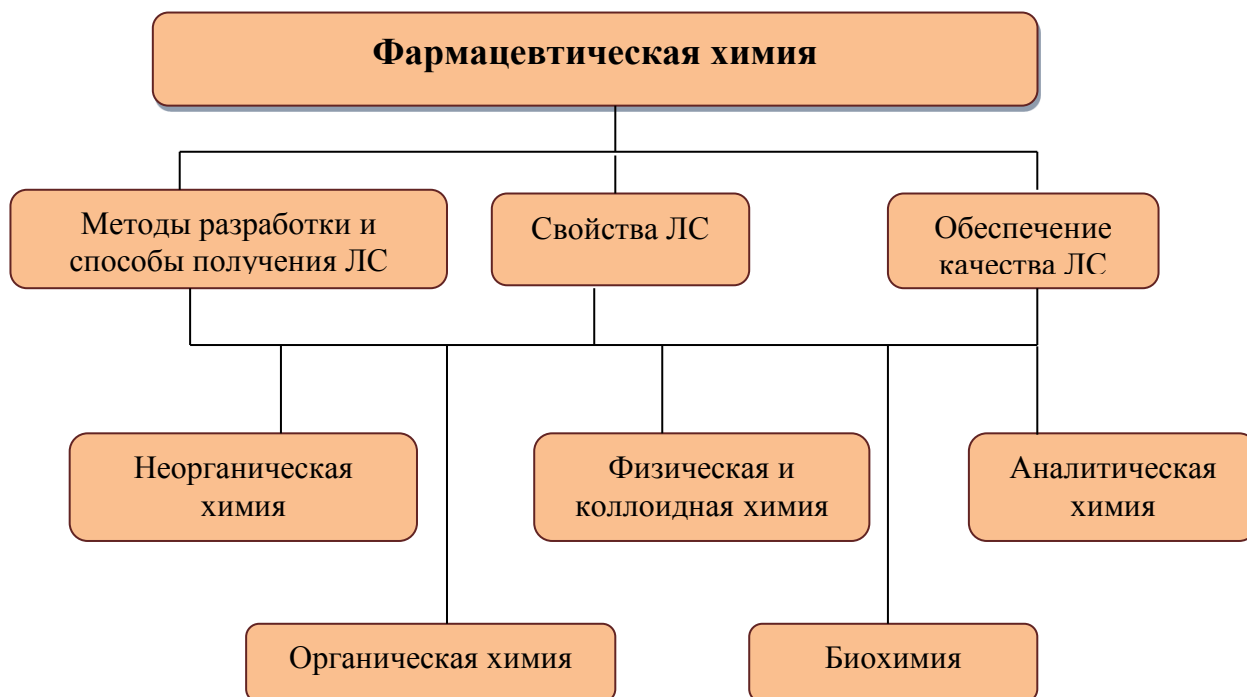


Рис.1. Взаимосвязь фармацевтической химии с другими дисциплинами.

Взаимосвязь «структура — свойство» можно обнаружить, например, сравнивая величины топологического индекса (показателя, отражающего структуру лекарственного вещества) и терапевтического индекса (отношение летальной дозы к эффективной дозе LD50/ED50).

Фармацевтическая химия связана и с другими, нехимическими, дисциплинами (рис.2).



Рис.2. Фармацевтическая химия и специальные дисциплины.

Так, знание математики позволяет, в частности, применять метрологическую оценку результатов анализа ЛС, информатика обеспечивает своевременное получение информационных данных о ЛС, физика — использование фундаментальных законов природы и применение современной аппаратуры при анализе и исследовании.

Очевидна взаимосвязь между фармацевтической химией и специальными дисциплинами. Развитие фармакогнозии невозможно без выделения и анализа биологически активных веществ растительного происхождения. Фармацевтический анализ сопутствует отдельным стадиям технологических процессов получения ЛС. Фармакоэкономика и управление фармацией соприкасаются с фармацевтической химией

при организации системы стандартизации и контроля качества лекарственных средств. Определение содержания ЛС и их метаболитов в биологических средах в равновесии (фармакодинамика и токсикодинамика) и во времени (фармакокинетика и токсикокинетика) демонстрирует возможности применения фармацевтической химии для решения задач фармакологии и токсикологической химии. Ряд дисциплин медико-биологического профиля (биология и микробиология, физиология и патофизиология) представляют собой теоретическую основу для изучения фармацевтической химии. Тесная взаимосвязь со всеми перечисленными дисциплинами обеспечивает решение современных проблем фармацевтической химии.

В конечном итоге эти проблемы сводятся к созданию новых, более эффективных и безопасных лекарственных средств и разработке способов фармацевтического анализа.

### ***Объекты фармацевтической химии***

Объекты фармацевтической химии чрезвычайно разнообразны по химической структуре, фармакологическому действию, по массе, числу компонентов в смесях, наличию примесей и сопутствующих веществ. К числу таких объектов следует отнести: Федеральный закон от 12.04.2010 N 61-ФЗ (ред. от 08.03.2015) "Об обращении лекарственных средств" (12 апреля 2010 г.).

**1) лекарственные средства** - вещества или их комбинации, вступающие в контакт с организмом человека или животного, проникающие в органы, ткани организма человека или животного, применяемые для профилактики, диагностики (за исключением веществ или их комбинаций, не контактирующих с организмом человека или животного), лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания



беременности и полученные из крови, плазмы крови, из органов, тканей организма человека или животного, растений, минералов методами синтеза или с применением биологических технологий. К лекарственным средствам относятся фармацевтические субстанции и лекарственные препараты;

Рис.3. Лекарственные средства.



Рис.4. Фармацевтические субстанции.

**2) фармацевтические субстанции** - лекарственные средства в виде действующих веществ биологического, биотехнологического, минерального или химического происхождения, обладающие фармакологической активностью, предназначенные для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяющие их эффективность;



Рис.5. Тальк.

**3) вспомогательные вещества** - вещества неорганического или органического происхождения, используемые в процессе производства, изготовления лекарственных препаратов для придания им необходимых физико-химических свойств;



Рис. 6. Лекарственные препараты.

**4) лекарственные препараты** - лекарственные средства в виде лекарственных форм, применяемые для профилактики, диагностики, лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности;



Рис.7. Лекарственные формы.

**5) лекарственная форма** - состояние лекарственного препарата, соответствующее способам его введения и применения и обеспечивающее достижение необходимого лечебного эффекта.

Все указанные ЛВ, ЛС, ЛФ и ЛП могут быть как отечественного, так и зарубежного производства, разрешенные для применения в Российской Федерации. Приведенные термины и их аббревиатуры являются официальными. Они внесены в ОСТы и предназначены для использования в фармацевтической практике.

К числу объектов фармацевтической химии относятся также исходные продукты, используемые для получения ЛВ, промежуточные и побочные продукты синтеза, остаточные растворители, вспомогательные и другие вещества. Кроме патентованных ЛС объектами фармацевтического анализа являются дженерики (генерические препараты). На разработанный оригинальный ЛП фармацевтическая компания-производитель получает патент, который подтверждает, что он является собственностью компании на определенный срок (обычно 20 лет). Патент обеспечивает эксклюзивное право на его реализацию без конкуренции со стороны других производителей. После истечения срока действия патента свободное производство и реализация данного ЛП разрешается всем другим компаниям. Он становится генерическим препаратом, или дженериком, но должен быть абсолютно идентичен оригинальному. Разница состоит только в отличии наименования, которое дает компания-производитель. Сравнительная оценка дженерика и оригинального препарата производится по фармацевтической эквивалентности (равное содержание активного ингредиента), биоэквивалентности (равные концентрации накопления при приеме в крови и тканях), терапевтической эквивалентности (одинаковая эффективность и безопасность при введении в равных условиях и дозах). Преимущества дженериков состоят в значительном снижении затрат по сравнению с созданием оригинального ЛП. Однако оценка их качества производится так же, как и соответствующих оригинальных ЛВ.

Объектами фармацевтической химии являются также различные готовые лекарственные средства (ГЛС) заводского и лекарственные формы аптечного изготовления (ЛФ), лекарственное растительное сырье (ЛРС). К их числу относятся таблетки, гранулы,

капсулы, порошки, суппозитории, настойки, экстракты, аэрозоли, мази, пластыри, капли глазные, различные инъекционные ЛФ, глазные лекарственные пленки (ГЛП). Содержание указанных и других терминов и понятий приведено в терминологическом словаре данного учебного пособия.

### ***Современные проблемы фармацевтической химии***

Основными проблемами фармацевтической химии являются:

- создание и исследование новых лекарственных средств;
- разработка способов фармацевтического и биофармацевтического анализа.

Создание и исследование новых ЛС. Несмотря на огромный арсенал имеющихся ЛС, проблема изыскания новых высокоэффективных ЛВ остается актуальной.

Роль ЛС непрерывно растет в современной медицине. Это вызвано целым рядом причин, главными из которых являются:

- ряд тяжелых заболеваний еще не излечивается ЛС;
- длительное применение ряда ЛС формирует толерантные патологии, для борьбы с которыми необходимы новые ЛС с иным механизмом действия;
- процессы эволюции микроорганизмов приводят к возникновению новых заболеваний, для лечения которых нужны эффективные ЛС;
- некоторые из применяемых ЛВ вызывают побочные эффекты, в связи с чем необходимо создавать более безопасные ЛС.

### ***Основные принципы фармацевтического и фармакопейного анализа***

***Фармацевтический анализ*** - это наука о химической характеристике и изменении биологически активных веществ на всех этапах производства: от оценки сырья до оценки качества полученного лекарственного вещества, изучения его стабильности, установления сроков годности и стандартизации готовой лекарственной формы. К фармацевтическому анализу предъявляются высокие требования: специфичность, чувствительность, точность по отношению к нормативам, обусловленным ГФ XI, ФС и др. НД, выполнение в короткие сроки с использованием минимальных количеств лекарственных препаратов и реактивов.

**Фармацевтический анализ включает различные формы контроля качества лекарств:**

- Фармакопейный анализ
- Постадийный контроль производства лекарственных средств
- Анализ лекарственных форм индивидуального изготовления
- Экспресс - анализ в условиях аптеки
- Биофармацевтический анализ.

Фармакопейный анализ является составной частью фармацевтического анализа и представляет собой совокупность способов исследования лекарственных препаратов и форм, изложенные в ГФ, ФС, ФСП. Выполнение фармакопейного анализа позволяет установить подлинность лекарственного средства, его чистоту (содержание примесей), количественное содержание фармацевтического средства, возможность или невозможность использования его врачами и пациентами.

### **ОСНОВНЫЕ НОРМАТИВНЫЕ ДОКУМЕНТЫ**

**Государственная фармакопея (ГФ) является сборником основных стандартов, применяемых в фармакопейном анализе и производстве лекарственных средств. Государственная фармакопея имеет законодательный характер.**

Основу Государственной фармакопеи составляют общие фармакопейные статьи (ОФС) и фармакопейные статьи (ФС).

**Общая фармакопейная статья — это Государственный стандарт качества ЛС, содержащий основные требования к лекарственной форме и/или описание стандартных методов контроля качества лекарственных средств.**

ОФС включает перечень нормируемых показателей или методов испытания для конкретной лекарственной формы, описание физических, физико-химических, химических, биохимических, биологических, микробиологических методов анализа ЛС, требование к используемым реактивам, титрованным растворам, индикаторам.

Например, отдельные ОФС посвящены определению температуры плавления, плотности, мутности и цветности растворов ЛС, растворимости субстанций, описанию химических и физических методов и т.д. Ряд ОФС посвящены описанию нормативных требований к таким лекарственным формам, как мази, таблетки, порошки, суппозитории, экстракты и др.

**Фармакопейная статья — это Государственный стандарт качества ЛС под международным непатентованным названием (МНН), для однокомпонентных ЛС, содержащий обязательный перечень показателей и методов контроля качества.**



Рис.8. Государственная Фармакопея РФ XII.

Общие фармакопейные статьи и фармакопейные статьи должны пересматриваться Научным центром экспертизы и государственного контроля ЛС Минздрава России не реже, чем через пять лет.

Таким образом, ОФС описывает принятые в фармакопейном анализе общие положения, методы анализа или включает в себя перечень нормируемых показателей и методов испытаний определенной лекарственной формы. ФС определяет уровень требований к конкретным лекарственным средствам.

**Кроме того, предприятие, выпускающее ЛС, может создавать так называемую фармакопейную статью предприятия (ФСП) – стандарт качества на ЛС под торговым названием, содержащий перечень показателей и методов контроля качества ЛС, произведенного конкретным предприятием, учитывающий конкретную технологию данного предприятия и прошедший экспертизу и регистрацию в установленном порядке.**

Требование к качеству лекарственных средств, содержащиеся в ФСП, должны быть не ниже требований, изложенных в Государственной фармакопее, с учетом требований настоящего стандарта. Срок действия ФСП устанавливается с учетом уровня технологического процесса конкретного производства лекарственного средства, но не более 5 лет.

ВФС утверждаются на ЛС и лекарственное растительное сырье и на первые промышленные серии новых ЛС, рекомендованных к медицинскому применению фармакопейным комитетом и намеченных к серийному производству. Утверждаются на ограниченный срок (не более 3 лет).



Рис.11. Регистр ЛС России.

**Фармакологический справочник «Регистр лекарственных средств России® РЛС®»** включает информацию о составе и форме выпуска лекарственных препаратов, показаниях к применению, противопоказаниях, побочных действиях, применении при беременности и кормлении грудью, способе применения лекарственных средств. Вся информация получена из официальных источников, выверена и одобрена производителями.

Информация обновляется ежемесячно. Справочник лекарственных препаратов и товаров аптечного ассортимента «Регистр лекарственных средств России® РЛС®» предоставлен ООО «РЛС-Патент».

### **Государственный реестр лекарственных средств (Госреестр лекарственных средств) —**



перечень отечественных и зарубежных лекарств, медико-профилактических и диагностических средств, зарегистрированных Минздравом России.

Госреестр лекарственных средств ведется и издается в соответствии с Законом о лекарственных средствах и является официальным изданием Министерства

Рис.12. Госреестр ЛС.

здравоохранения Российской Федерации. При составлении

Реестра используются следующие официальные документы Минздрава России: приказы о разрешении медицинского применения, регистрационные удостоверения, фармакопейные и временные фармакопейные статьи, нормативные документы на зарубежные лекарственные средства, удостоверение регистрации уникального номера.

Информация о торговых и международных непатентованных названиях, лекарственных формах, упаковках, дозировках, фармакологических группах, приведенная в Реестре, должна служить основой для формирования различных перечней и списков (перечня ЖНВЛП — жизненно важных лекарственных препаратов, списков А и В, списков лекарств безрецептурного и льготного отпуска, списков ПККН), а также быть стандартом описания лекарственных средств при сборе заявок от регионов на их поставку, при анализе процессов производства, импорта и потребления, при составлении государственного баланса спроса и предложения на лекарственные средства. Государственный Реестр лекарственных средств является изданием, необходимым не только работникам здравоохранения, но и всем органам государственной власти, участвующим в регулировании лекарственного обращения и контроле за ним. В этой связи часть тиража направляется в адреса центральных и региональных органов управления здравоохранением, а часть — заинтересованным министерствам и ведомствам, прежде всего — в Министерство по налогам и сборам, в Министерство экономики, в Государственный таможенный комитет и другие.

### **Государственный стандарт (ГОСТ)**

**ГОСТ - государственный стандарт – разрабатывается на продукцию, имеющую межотраслевое значение.**

В отличие от ТУ требования ГОСТ разрабатываются не предприятием-изготовителем, а государственными отраслевыми структурами, утверждаются на высшем уровне Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации. Каждый ГОСТ проходит серьезные испытания и проверки в сертифицированных лабораториях, оценивается научными сотрудниками отрасли, проходит межведомственные согласования и только после этого допускается к публикации.



Рис.13.1 ГОСТ.

### Технические условия

**ТУ - технические условия - разрабатывает предприятие–производитель и утверждает отраслевое министерство с минимальными формальностями.** Поэтому ТУ могут быть более мягкими по сравнению с ГОСТом, а могут быть и более жесткими, когда стандарт устарел и не отвечает требованиям конкретного производства, например, по точности изготовления, по количеству примесей и т.д. Предприятия, чтобы избежать лишних затрат, часто разрабатывают свои ТУ, чтобы сертифицировать свою продукцию.



Рис.13.2 Технические условия

### Отраслевой стандарт

**ОСТ – отраслевой стандарт – разрабатывается на продукцию отраслевого значения.**

**Отраслевой стандарт (ОСТ)** — устанавливается на те виды продукции, нормы, правила, требования, понятия и обозначения, регламентация которых необходима для обеспечения качества продукции данной отрасли.

Объектами отраслевой стандартизации в частности могут быть отдельные виды продукции ограниченного применения, технологическая оснастка и инструмент, предназначенные для применения в данной области, сырье, материалы, полуфабрикаты внутриотраслевого применения, отдельные виды товаров народного потребления. Также объектами могут быть технические нормы и типовые технологические процессы, специфичные для данной отрасли, нормы, требования и методов в области организации проектирования; производства и эксплуатации промышленной продукции и товаров народного потребления.

Отраслевые стандарты утверждаются министерством (ведомством), являющимся головным (ведущим) в производстве данного вида продукции.

### ***Критерии фармацевтического анализа***

На различных этапах фармацевтического анализа в зависимости от поставленных задач имеют значение такие критерии, как **избирательность**, **чувствительность**, **точность**, **время**, затраченное на выполнение анализа, израсходованное **количество анализируемого препарата** (лекарственной формы).

**Избирательность** метода очень важна при проведении анализа смесей веществ, поскольку дает возможность получать истинные значения каждого из компонентов. Только избирательные методики анализа позволяют определять содержание основного компонента в присутствии продуктов разложения и других примесей.

Требования к **точности** и **чувствительности** фармацевтического анализа зависят от объекта и цели исследования. При испытании степени чистоты препарата используют методики, отличающиеся высокой чувствительностью, позволяющие устанавливать минимальное содержание примесей.

При выполнении постадийного контроля производства, а также при проведении экспресс-анализа в условиях аптеки важную роль имеет **фактор времени**, которое затрачивается на выполнение анализа. Для этого выбирают методы, позволяющие провести анализ в наиболее короткие промежутки времени и вместе с тем с достаточной точностью.

При количественном определении лекарственного вещества используют метод, отличающийся избирательностью и высокой точностью. Чувствительностью метода пренебрегают, учитывая возможность выполнения анализа с большой навеской препарата.

**Мерой чувствительности реакции** является **предел обнаружения**. Он означает наименьшее содержание, при котором по данной методике можно обнаружить присутствие определяемого компонента с заданной доверительной вероятностью. 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.

### ***Ошибки, возможные при проведении фармацевтического анализа***

При выполнении количественного определения любым химическим или физико-химическим методом могут быть допущены три группы ошибок: **грубые (промахи)**, **систематические (определенные)** и **случайные (неопределенные)**.

**Грубые ошибки** являются результатом просчета наблюдателя при выполнении какой-либо из операций определения или неправильно выполненных расчетов. Результаты с грубыми ошибками отбрасываются как недоброкачественные.

**Систематические ошибки** отражают правильность результатов анализа. Они искажают результаты измерений обычно в одну сторону (положительную или отрицательную) на некоторое постоянное значение. Причиной систематических ошибок в анализе могут быть, например, гигроскопичность препарата при отвешивании его навески; несовершенство измерительных и физико-химических приборов; опытность аналитика и т.д. Систематические ошибки можно частично устранить внесением поправок, калибровкой прибора и т.д. Однако всегда необходимо добиваться того, чтобы систематическая ошибка была соизмерима с ошибкой прибора и не превышала случайной ошибки.

**Случайные ошибки** отражают воспроизводимость результатов анализа. Они вызываются неконтролируемыми переменными. Среднее арифметическое случайных ошибок стремится к нулю при постановке большого числа опытов в одних и тех же условиях. Поэтому для расчетов необходимо использовать не результаты единичных измерений, а среднее из нескольких параллельных определений.

**Правильность** результатов определений выражают **абсолютной ошибкой** и **относительной ошибкой**.

**Абсолютная ошибка** представляет собой разность между полученным результатом и истинным значением. Эта ошибка выражается в тех же единицах, что и определяемая величина (граммах, миллилитрах, процентах).

**Относительная ошибка** определения равна отношению абсолютной ошибки к истинному значению определяемой величины. Выражают относительную ошибку обычно в процентах (умножая полученную величину на 100). Относительные ошибки определений физико-химическими методами включают как точность выполнения подготовительных операций (взвешивание, отмеривание, растворение), так и точность выполнения измерений на приборе (инструментальная ошибка).

## ***Общие принципы испытаний подлинности лекарственных веществ***

**Испытание на подлинность** — это подтверждение идентичности анализируемого лекарственного вещества (лекарственной формы), осуществляемое на основе требований Фармакопеи или другой нормативно-технической документации (НТД). Испытания выполняют физическими, химическими и физико-химическими методами. Непременным условием объективного испытания подлинности лекарственного вещества является идентификация тех ионов и функциональных групп, входящих в структуру молекул, которые обуславливают фармакологическую активность. С помощью физических и химических констант (удельного вращения, рН среды, показателя преломления, УФ- и ИК-спектры) подтверждают и другие свойства молекул, оказывающие влияние на фармакологический эффект.

Применяемые в фармацевтическом анализе химические реакции сопровождаются образованием окрашенных соединений, выделением газообразных или нерастворимых в воде соединений. Последние можно идентифицировать по температуре плавления.

## ***Источники и причины недоброкачества лекарственных веществ***

Основные источники **технологических** и **специфических примесей** — аппаратура, исходное сырье, растворители и другие вещества, которые используют при получении лекарственных средств. Материал, из которого изготовлена аппаратура (металл, стекло), может служить источником примесей тяжелых металлов и мышьяка. При плохой очистке в препаратах могут содержаться примеси растворителей, волокна тканей или фильтровальной бумаги, песок, асбест и т.д., а также остатки кислот или щелочей.

На качество синтезируемых лекарственных веществ могут оказывать влияние различные факторы.

**Технологические факторы** — первая группа факторов, оказывающих влияние в процессе синтеза лекарственного вещества. Степень чистоты исходных веществ, температурный режим, давление, рН среды, растворители, применяемые в процессе синтеза и для очистки, режим и температура сушки, колеблющаяся даже в небольших пределах, — все эти факторы могут привести к появлению примесей, которые накапливаются от одной к другой стадии. Вторая группа факторов — образование различных кристаллических модификаций, или полиморфизм. Около 65% лекарственных веществ, относящихся к числу барбитуратов, стероидов, антибиотиков, алкалоидов и др., образуют по 1—5 и более различных модификаций. Остальные дают при кристаллизации стабильные полиморфные и псевдополиморфные модификации. Они различаются не только по физико-химическим свойствам (температуре плавления, плотности, растворимости) и фармакологическому действию, но имеют различную величину свободной поверхностной энергии, а следовательно, неодинаковую устойчивость к действию кислорода воздуха, света, влаги.

В лекарственных веществах, получаемых из растительного и животного сырья, основными примесями являются **сопутствующие природные соединения (алкалоиды, ферменты, белки, гормоны и др.)**. Многие из них очень сходны по химическому строению и физико-химическим свойствам с основным продуктом экстракции. Поэтому очистка его представляет большую сложность.

Содержание тех и других примесей должно строго контролироваться, чтобы исключить присутствие токсичных соединений или наличие индифферентных веществ в лекарственных средствах в таких количествах, которые мешают их использованию для конкретных целей. Иными словами, лекарственное вещество должно иметь достаточную степень чистоты, следовательно, отвечать требованиям определенной спецификации.

Лекарственное вещество является чистым, если дальнейшая очистка не меняет его фармакологической активности, химической стабильности, физических свойств и биологической доступности.

### ***Общие требования к испытаниям на чистоту***

**Оценка степени чистоты лекарственного препарата** — один из важных этапов фармацевтического анализа. Все лекарственные препараты независимо от способа получения испытывают на чистоту. При этом устанавливают содержание примесей. Их можно разделить на две группы: примеси, оказывающие влияние на фармакологическое действие лекарственного препарата, и примеси, указывающие на степень очистки вещества. Последние не влияют на фармакологический эффект, но присутствие их в больших

количества снижает концентрацию и соответственно уменьшает активность препарата. Поэтому фармакопеи устанавливают определенные пределы этих примесей в лекарственных препаратах.

Таким образом, основной критерий доброкачественности лекарственного препарата — наличие допустимых пределов физиологически неактивных примесей и отсутствие токсичных примесей. Понятие отсутствие условно и связано с чувствительностью способа испытания.

**Общие требования, которые предъявляются к испытаниям на чистоту:** — чувствительность, специфичность и воспроизводимость используемой реакции, а также пригодность ее применения для установления допустимых пределов содержания примесей.

### ***Методы фармацевтического анализа и их классификация***

В фармацевтическом анализе используются разнообразные методы исследования: **физические, физико-химические, химические, биологические**. Применение физических и физико-химических методов требует соответствующих приборов и инструментов, поэтому данные методы называют также приборными, или инструментальными.

Использование **физических методов** основано на измерении физических констант, например, прозрачности или степени мутности, цветности, влажности, температуры плавления, затвердевания и кипения и др.

С помощью **физико-химических методов** измеряют физические константы анализируемой системы, которые изменяются в результате химических реакций. К этой группе методов относятся оптические, электрохимические, хроматографические.

**Химические методы анализа** основаны на выполнении химических реакций.

**Биологический контроль** лекарственных веществ осуществляют на животных, отдельных изолированных органах, группах клеток, на определенных штаммах микроорганизмов. Устанавливают силу фармакологического эффекта или токсичность.

Методики, используемые в фармацевтическом анализе, должны быть чувствительными, специфическими, избирательными, быстрыми и пригодными для экспресс-анализа в условиях аптеки.

## Блок II

### Качественный анализ лекарственных веществ

#### Методы физического и физико-химического анализа

Подлинность лекарственного вещества подтверждают: агрегатное состояние (твердое вещество, жидкость, газ); окраска, запах; форма кристаллов или вид аморфного вещества; гигроскопичность или степень выветриваемости на воздухе; устойчивость к воздействию света, кислорода воздуха; летучесть, подвижность, воспламеняемость (жидкостей).

**Описание.** Указывают характеристики физического состояния и цвет лекарственного средства; если необходимо, приводят информацию о запахе и гигроскопичности.

Твердые субстанции могут быть крупнокристаллическими, кристаллическими, мелкокристаллическими или аморфными.

*Крупнокристаллический порошок.* Не более 40 % частиц порошка должно быть размером менее 0,4 мм.

*Кристаллический порошок.* Не менее 95 % частиц порошка должно быть размером менее 0,4 мм и не более 40 % – размером менее 0,2 мм.

*Мелкокристаллический порошок.* Не менее 95 % частиц порошка должно быть размером менее 0,2 мм.

Аморфный порошок – это порошок, не имеющий признаков кристаллического строения.

Характеристики кристалличности и гигроскопичности в описании приводятся для информации и испытанию не подлежат. При необходимости нормирования величины частиц в нормативной документации приводят специальный раздел.

Субстанции жидкой консистенции могут быть охарактеризованы такими терминами, как вязкие, подвижные, легколетучие и т.д.

Газообразные субстанции характеризуют по цвету и запаху.

**Цвет** лекарственного средства следует характеризовать названиями: белый, синий, зеленый, желтый, оранжевый, красный и т.п. При оттеночных цветах на первом месте указывают тот цвет, который содержится в меньшей доле, а затем через дефис – преобладающий цвет (например, красно-коричневый).

Слабоокрашенные образцы имеют оттенок цвета, название которого характеризуют суффиксом «-оват» (например, «желтоватый») или добавляют приставку «светло-» (например, «светло-желтый»).

Цвет твердых веществ следует определять на матово-белом фоне (белая плотная или фильтровальная бумага) при рассеянном дневном свете в условиях минимального проявления тени. Небольшое количество вещества (0,5 – 2,0 г) помещают на белую бумагу и без нажима равномерно распределяют по поверхности бумаги (осторожно разравнивают шпателем или другим приспособлением) так, чтобы поверхность оставалась плоской.

**Запах.** Запах следует характеризовать терминами: «без запаха», «с характерным запахом», «со слабым характерным запахом». Если запах не охарактеризован, то подразумевается его отсутствие у анализируемого лекарственного средства.

Испытание проводят сразу после вскрытия упаковки. 0,5 – 2,0 г лекарственного средства равномерно распределяют на часовом стекле диаметром 6 – 8 см; через 15 мин определяют запах на расстоянии 4 – 6 см или делают вывод о его отсутствии. В случае легко летучих жидких лекарственных средств наносят 0,5 мл испытуемого образца на фильтровальную бумагу и запах определяют сразу же после нанесения, если нет других указаний.

### *Температура плавления*

Используется в фармацевтическом анализе для установления подлинности и чистоты большинства твердых лекарственных веществ. Известно, что это температура, при которой твердое тело находится в равновесии с жидкой фазой при насыщенной фазе пара. **Температурой плавления** называют температуру, при которой происходит переход вещества из твердого состояния в жидкое.

Для определения температуры плавления в зависимости от физических свойств вещества применяют **капиллярный метод, открытый капиллярный метод, метод мгновенного плавления и метод каплепадения.** Для твердых веществ, легко превращаемых в порошок, применяют методы 1 и 3. Для аморфных веществ, не растирающихся в порошок и плавящихся ниже температуры кипения воды (таких как жиры, воск, парафин, вазелин, смолы) - методы 2 и 4.

Для веществ, неустойчивых при нагревании, определяют температуру разложения. Температурой разложения называют температуру, при которой происходит резкое изменение физического состояния вещества (вспенивание) при нагревании.

Для определения температуры плавления используют описанные ниже приборы. Для калибровки приборов используют подходящие для этих целей стандартные вещества,

имеющие температуру плавления, близкую к температуре плавления испытуемого вещества.

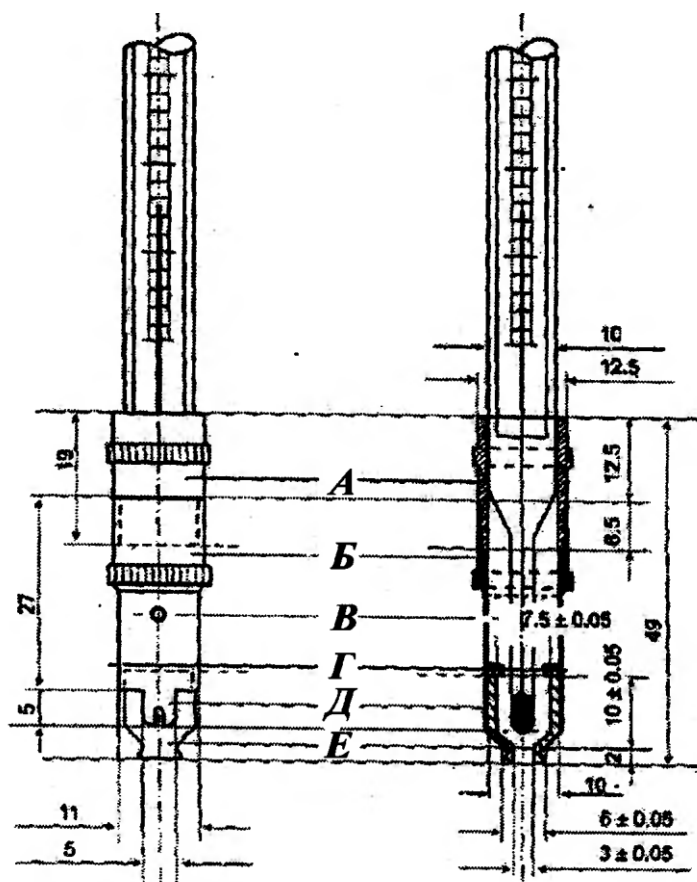


Рис.15. Прибор для определения температуры каплепадения.

Размеры приведены в миллиметрах.

Температура плавления, определенная капиллярным методом, представляет собой температуру, при которой последняя твердая частичка уплотненного столбика вещества в капиллярной трубке переходит в жидкую фазу.

В методе каплепадения определяют температуру, при которой в условиях, приведенных ниже, первая капля расплавленного испытуемого вещества падает из чашечки.

Прибор (рис.15) состоит из двух металлических гильз (А и Б), соединенных посредством резьбы. Гильза (А) прикреплена к ртутному термометру. В нижней части гильзы (Б) с помощью двух уплотнителей (Г) свободно закреплена металлическая чашечка (Д). Точное положение чашечки определяется фиксаторами (Е) длиной 2 мм, которые используются также для центровки термометра. Отверстие (В) в стенке гильзы (Б) предназначено для выравнивания давления. Отводящая поверхность чашечки должна быть плоской, а края выходного отверстия - под прямым углом к поверхности. Нижняя часть ртутного термометра имеет форму и размер, как показано на рис.15. (не приводится); термометр градуирован от 0 до 110 град. С и расстояние на шкале в 1 мм соответствует

разности температур в 1 град. С. Ртутный шарик термометра имеет диаметр (3,5 +/- 0,2) мм и высоту (6,0 +/- 0,3) мм.

За температуру плавления (открытый капиллярный метод) принимают температуру, при которой вещество начинает подниматься по капиллярной трубке. В тех случаях, когда столбик вещества не поднимается в капилляре, за температуру плавления принимают температуру, при которой столбик вещества в капилляре становится прозрачным.

### *Температура затвердевания*

Согласно ОФС.1.2.1.0012.15 температурой затвердевания называют температуру, при которой вещество переходит из жидкого состояния в твердое при охлаждении.

В ГФ XIII описаны устройство прибора и методика определения температуры затвердевания.

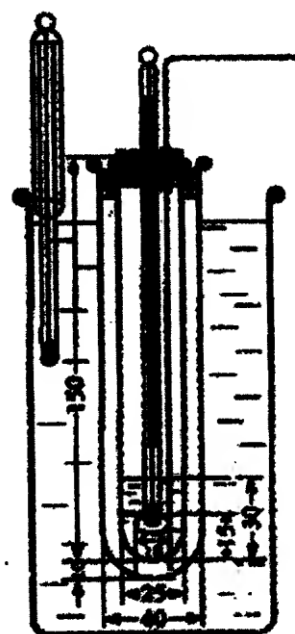


Рис.16. Прибор для определения температуры затвердевания.

Размеры приведены в миллиметрах

Прибор (рис.16) состоит из внутренней толстостенной пробирки с внутренним диаметром около 25 мм и длиной около 150 мм, помещенной внутри другой пробирки диаметром около 40 мм и длиной около 160 мм. Внутренняя пробирка закрыта пробкой, снабженной термометром длиной около 175 мм с ценой деления 0,2 град. С, который закреплен таким образом, чтобы ртутный шарик находился на расстоянии около 15 мм от дна пробирки. В пробирке имеется отверстие, через которое проходит вал мешалки, изготовленный из стеклянного стержня или другого подходящего материала, согнутый на конце под прямым углом в виде петли, внешний диаметр которой около 18 мм. Внутреннюю пробирку вместе с внешней пробиркой располагают в центре стакана

емкостью 1 л, содержащего подходящую охлаждающую жидкость, уровень которой находится на расстоянии около 20 мм от верхнего края стакана. Охлаждающая баня также должна быть снабжена термометром.

Под *температурными пределами перегонки* подразумевают интервал между начальной и конечной температурой кипения при нормальном давлении 101,3 кПа (760 мм рт. ст.).

**Начальной температурой кипения** считают температуру, при которой в приемник перегнались первые 5 капель жидкости. Конечной температурой кипения считают температуру, при которой в приемник перешло 95% жидкости.

**Точка кипения** - скорректированная температура, при которой давление пара жидкости достигает 101,3 кПа.

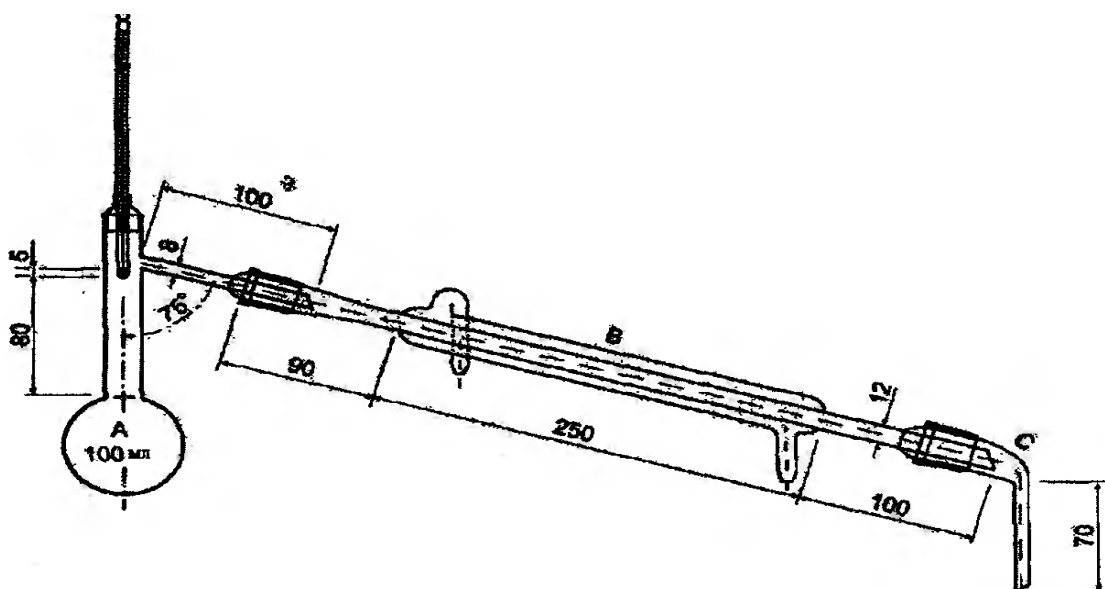


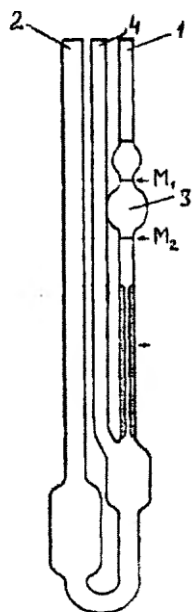
Рис.17. Прибор для определения температурных пределов перегонки

Размеры приведены в миллиметрах.

Прибор (рис.17) состоит из перегонной колбы (А), прямого холодильника (В) и аллонжа (С); допускается использовать холодильник с изогнутым нижним концом. Колбу снабжают термометром, конец ртутного шарика которого должен находиться на 5 мм ниже от нижнего края отводной трубки перегонной колбы. Применяют укороченный термометр с диапазоном шкалы около 50 град. С и ценой деления 0,2 град. С.

*Вязкость (внутреннее трение)*— физическая константа, подтверждающая подлинность жидких лекарственных веществ. Различают динамическую (абсолютную),

кинематическую, относительную, удельную, приведенную и характеристическую вязкость. Каждая из них имеет свои единицы измерения.



Для оценки качества жидких препаратов, имеющих вязкую консистенцию, например глицерина, вазелина, масел, обычно определяют относительную вязкость. Она представляет собой отношение вязкости исследуемой жидкости к вязкости воды, принятой за единицу. Для измерения кинематической вязкости используют различные модификации вискозиметров типа Оствальда и Уббелюде. Кинематическую вязкость обычно выражают в  $\text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ . Зная плотность исследуемой жидкости, можно затем вычислить динамическую вязкость, которую выражают в  $\text{Па} \cdot \text{с}$ .

Рис.18. Вискозиметр стеклянный капиллярный ВПЖ-1.

Динамическую вязкость можно также установить с помощью ротационных вискозиметров различных модификаций типа "Полимер РПЭ-1И или микрореометров серии ВИР. На измерении скорости падения шарика в жидкости основано устройство вискозиметров типа Гепплера. Они позволяют установить динамическую вязкость. Все приборы должны термостатироваться, так как вязкость в значительной степени зависит от температуры испытуемой жидкости.

**Потенциометрическое определение рН** (ОФС.1.2.1.19.0002.15 Взамен ст. ГФ XI, вып.1) - Водородным показателем рН, характеризующим концентрацию ионов водорода в водных растворах, называется отрицательный десятичный логарифм активности ионов водорода  $\text{рН} = -\lg a^+ \text{H}$

Потенциометрическое определение рН заключается в измерении ЭДС электродной системы, где в качестве ионоселективного электрода используют чувствительный к ионам водорода электрод (обычно стеклянный), в качестве электрода сравнения - стандартный электрод с известной величиной потенциала (насыщенный каломельный или хлорсеребряный электроды). На практике для измерения рН применяют метод градуировочного графика.

## Растворимость

Растворимость - свойство, которое может служить ориентировочной характеристикой испытуемого препарата. Наряду с температурой плавления растворимость вещества при постоянной температуре и давлении является одним из параметров, по которому устанавливают подлинность и чистоту практически всех лекарственных веществ.



Рис.19 (1;2). Определение растворимости лекарственных веществ.

**Методика определения растворимости** по ГФ XIII основана на том, что навеска предварительно растертого (в необходимых случаях) препарата вносится в отмеренный объем растворителя и непрерывно перемешивается в течение 10 мин при  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ . Растворившимся считают препарат, в растворе которого в проходящем свете не наблюдается частиц вещества. Если для растворения препарата требуется более 10 мин, то его относят к числу медленно растворимых. Их смесь с растворителем нагревают на водяной бане до  $30^\circ\text{C}$  и наблюдают полноту растворения после охлаждения до  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$  и энергичного встряхивания в течение 1—2 мин.

## *Окраска жидкостей*

Окраску жидкостей определяют визуально одним из методов, приведенных ниже, путем сравнения с соответствующими эталонами. В статью включены методы контроля качества лекарственных средств по показателям "цветность" и "цветность раствора". Цветность является условно принятой количественной характеристикой для жидкостей, имеющих незначительную окраску.



Рис.20. Эталонные растворы калия перманганата.



Рис.21. Эталонные растворы цветности.

### **Метод 1**

Испытания проводят в одинаковых пробирках из бесцветного, прозрачного, нейтрального стекла с внутренним диаметром около 12 мм, используя равные объемы - 2,0 мл испытуемой жидкости и воды, или растворителя, или эталона сравнения, описанного в статье. Сравнивают окраску в дневном отраженном свете, горизонтально (перпендикулярно оси пробирок) на матово-белом фоне (эталонные 1-3).

### **Метод 2**

Испытания проводят в одинаковых пробирках из бесцветного, прозрачного, нейтрального стекла с внутренним диаметром от 15 до 25 мм, используя равные слои высотой 40 мм испытуемой жидкости и воды, или растворителя, или эталона сравнения, описанного в статье. Сравнивают окраску в дневном отраженном свете сверху вдоль вертикальной оси пробирок на матово-белом фоне (эталон 4-9).

### *Прозрачность и степень мутности жидкостей*

Определяется путем сравнения испытуемой жидкости с растворителем или эталонами визуально или инструментальным методом.

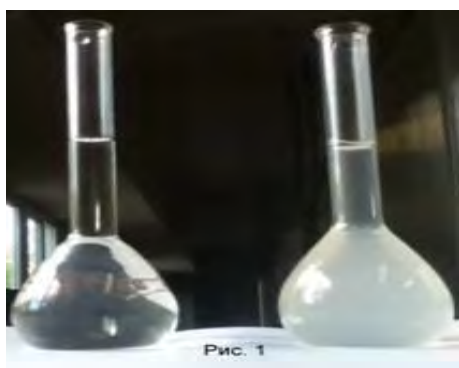


Рис.23. Прозрачный и мутный растворы



Рис.24. Прозрачные растворы.

Испытание проводят в пробирках с притертой пробкой из прозрачного бесцветного стекла с внутренним диаметром около 15 мм. Для сравнения берут равные объемы эталона и испытуемой жидкости (5 или 10 мл). Испытание проводят при освещении электрической лампой матового стекла мощностью 40 Вт, расположенной над образцом, просматривая растворы перпендикулярно вертикальной оси пробирок на черном фоне через 5 мин. после приготовления эталона.

Испытуемую жидкость считают прозрачной, если она по прозрачности не отличается от воды или растворителя, используемого при приготовлении испытуемой жидкости, или выдерживает сравнение с эталоном I, т.е. ее опалесценция (мутность) не превышает опалесценцию (мутность) эталона I при просмотре в описанных выше условиях.

#### **Эталонами служат взвеси из гидразина сульфата и гексаметилентетрамина.**

Для установления чистоты лекарственных препаратов широко используют **определение золы** Прокаливанием навески препарата в фарфоровом (платиновом) тигле устанавливают общую золу. Кроме того, определяют также **сульфатную золу**, получаемую после нагревания и прокаливания навески препарата, обработанной концентрированной серной кислотой.

Один из показателей чистоты органических лекарственных препаратов — содержание остатка после прокаливании.

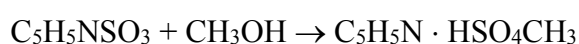
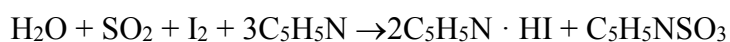
При установлении чистоты некоторых лекарственных препаратов проверяют также наличие восстанавливающих веществ (по обесцвечиванию раствора перманганата калия), красящих веществ (бесцветность водного извлечения). Обнаруживают также водорастворимые соли (в нерастворимых препаратах), вещества, нерастворимые в этаноле, и примеси, нерастворимые в воде (по эталону мутности).

### *Определение воды*

#### **1. Метод К. Фишера (полумикрометод)**

Метод основан на химическом взаимодействии воды с компонентами реактива К. Фишера (йодсернистый реактив).

Реактив К.Фишера представляет собой раствор серы диоксида, йода и пиридина в метаноле. Взаимодействие реактива с водой протекает в две стадии стехиометрически по уравнениям:

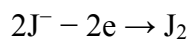


Используемые растворы и реактивы должны быть безводными. Их хранят и применяют в условиях, исключающих возможность воздействия на них атмосферной влаги. С помощью реактива К. Фишера может быть определена как гигроскопическая, так и кристаллизационная вода. При этом воду можно определять в органических и неорганических соединениях, в различных растворителях и летучих веществах.

Рис.25. Результат реакции воды с реактивом К. Фишера.

#### **2. Микроопределение воды (кулонометрический метод)**

При кулонометрическом титровании необходимый для реакции К. Фишера йод образуется при анодном окислении йодид-иона:



Образующийся йод реагирует с присутствующей водой и диоксидом серы в присутствии основания. Йод потребляется до тех пор, пока в среде присутствует вода.

Избыток йода указывает на достижение конечной точки титрования. Количество оттитрованной воды пропорционально количеству электричества, пропущенному через ячейку.

1 моль йода соответствует 1 молю воды, а количество электричества 10,71 Кл соответствует 1 мг воды.

Вследствие малого тока титрования кулонометрическое определение применяется для количественного определения микроколичеств воды: от 10 мкг до 10 мг.

Правильность и точность метода должны быть обеспечены устранением атмосферной влаги из системы.

### **3. Определение воды методом дистилляции**

**Прибор.** Определение проводят в приборе (рис. 26), состоящем из стеклянной круглодонной колбы (1) вместимостью от 250 до 500 мл, приемника (2), представляющего собой градуированную пробирку или бюретку вместимостью 6–10 мл с ценой деления 0,1 мл, и холодильника (3).

**Методика.** В колбу (1) отвешивают с точностью до 1 % указанное в частной фармакопейной статье количество испытуемого вещества (от 10 до 20 г, содержащее от 2 до 3 мл воды), прибавляют 100 мл толуола или ксилола и несколько кусочков пористого материала. Колбу нагревают на электроплитке или песчаной бане до кипения. Кипячение ведут так, чтобы конденсирующийся растворитель не скапливался в холодильнике, а спокойно стекал навстречу поднимающимся парам жидкости со скоростью от 2 до 4 капель в секунду. Кипячение прекращают, когда объем воды в приемнике перестанет увеличиваться и верхний слой растворителя в приемнике станет прозрачным. Внутреннюю трубку холодильника промывают толуолом и продолжают нагревание еще 5 мин, после чего приемник охлаждают до комнатной температуры и стряхивают со стенок приемника все капли воды.

Вся отогнанная вода должна собираться в нижней части приемника. После полного разделения слоев отмечают объем отогнанной воды.

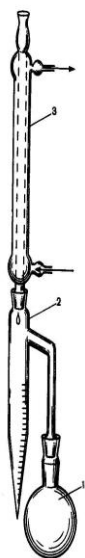


Рис.26. Прибор для определения воды методом дистилляции  
1 – колба, 2 – приемник, 3 – холодильник

### *Общая зола*

Около 1 г испытуемого вещества или 3-5 г измельченного лекарственного растительного сырья (точная навеска) помещают в предварительно прокаленный и точно взвешенный фарфоровый, кварцевый или платиновый тигель, равномерно распределяя вещество по дну тигля. Затем тигель осторожно нагревают, давая сначала веществу сгореть или улетучиться при возможно более низкой температуре. Сжигание оставшихся частиц угля проводят также при возможно более низкой температуре; после того как уголь сгорит почти полностью, увеличивают пламя. При неполном сгорании частиц угля остаток охлаждают, смачивают водой или насыщенным раствором аммония нитрата, выпаривают на водяной бане и остаток прокаливают. В случае необходимости такую операцию повторяют несколько раз.

Прокаливание проводят в муфельной печи при температуре около 600 град. С до постоянной массы, избегая появления пламени, сплавления золы и спекания ее со стенками тигля. По окончании прокаливания тигель охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

### *Сульфатная зола*

Точную навеску испытуемого вещества (около 1 г, если нет других указаний в частной фармакопейной статье) помещают в предварительно прокаленный и точно взвешенный фарфоровый, кварцевый или платиновый тигель, смачивают 1 мл серной кислоты концентрированной и осторожно (избегая сильного вспенивания вещества) нагревают на пламени или песчаной бане до удаления паров серной кислоты. Продолжают нагревание при более высокой температуре до исчезновения темных частиц. Затем тигель

помещают в муфельную печь и прокаливают при температуре около 600 град. С до постоянной массы, избегая появления пламени, сплавления золы и спекания ее со стенками тигля. По окончании прокаливания тигель охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

В случае трудного сгорания, прибавление серной кислоты концентрированной и прокаливание повторяют.

## ***Методы химического анализа***

Эти методы используются для установления подлинности лекарственных веществ, испытаний их на чистоту и количественного определения.

Для целей идентификации используют реакции, которые сопровождаются внешним эффектом, например изменением окраски раствора, выделением газообразных продуктов, выпадением или растворением осадков. Установление подлинности неорганических лекарственных веществ заключается в обнаружении с помощью химических реакций катионов и анионов, входящих в состав молекул. Химические реакции, применяемые для идентификации органических лекарственных веществ, основаны на использовании функционального анализа.

Чистота лекарственных веществ устанавливается помощью чувствительных и специфичных реакций, пригодных для определения допустимых пределов содержания примесей.

Химические методы оказались самыми надежными и эффективными, они дают возможность выполнить анализ быстро и с высокой достоверностью. В случае сомнения в результатах анализа последнее слово остается за химическими методами.

Количественные методы химического анализа подразделяют на гравиметрический, титриметрический, газометрический анализ и количественный элементный анализ.

### ***Общие реакции доказательства подлинности неорганических лекарственных веществ в соответствии с требованиями ГФ***

#### **Ион натрия.**

А. Отмеривают 1 мл 10 %-ного раствора натрия хлорида, подкисляют разведенной уксусной кислотой, если необходимо, фильтруют, затем прибавляют 0,5 мл раствора цинк-уранил-ацетата; образуется желтый кристаллический осадок:

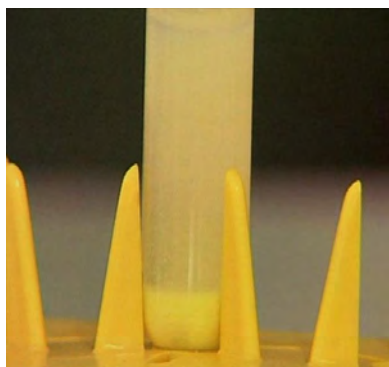
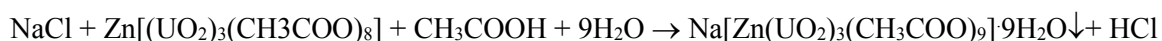


Рис.27. Качественная реакция на ион-натрия с раствором цинк-уранил-ацетата.

**Б.** Соль натрия, смоченная кислотой хлороводородной, внесенная в бесцветное пламя, окрашивает его в желтый цвет.

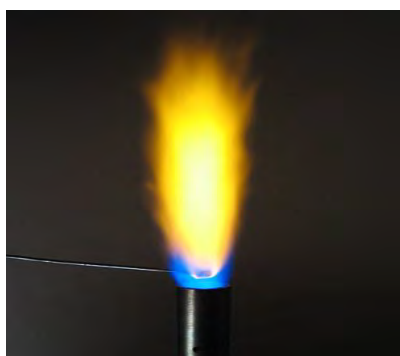
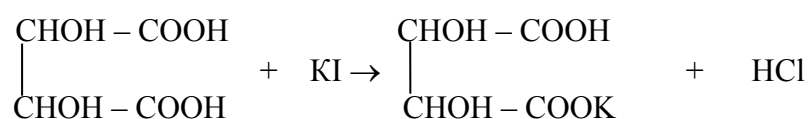


Рис.28. Качественная реакция на ион-натрия (окрашивание пламени горелки).

### **Ион калия.**

**А.** К 1 мл 10%-ного раствора калия йодида прибавляют 1 мл раствора винной кислоты, 1 мл раствора ацетата натрия, 0,5 мл этанола и встряхивают. Постепенно выпадает белый кристаллический осадок:

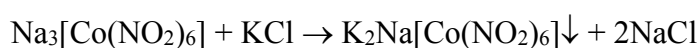


Осадок растворяется в разведенных минеральных кислотах и растворах едких щелочей.



Рис.29. Качественная реакция на ион-калия с раствором винной кислоты.

**Б.** К 1 мл 10% -ного раствора калия йодида прибавляют 0,5 мл разведенной уксусной кислоты, 0,5 мл раствора кобальтинитрита натрия, образуется желтый кристаллический осадок:



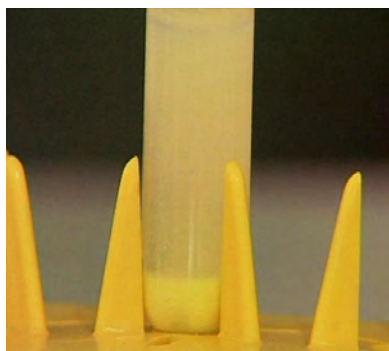


Рис.30. Качественная реакция на ион-калия с раствором кобальтинитрита натрия.

**В.** Соль калия, внесенная в бесцветное пламя, окрашивает его в фиолетовый цвет или при рассмотрении через синее стекло в пурпурно – красный.



Рис.31. Качественная реакция на ион-калия (окрашивание пламени горелки).

### Ион серебра.

**А.** К 1 мл 2%-ного раствора серебра нитрата прибавляют 2-3 капли разведенной соляной кислоты или раствора натрия хлорида; образуется белый творожистый осадок, нерастворимый в азотной кислоте, растворимый в растворе аммиака:

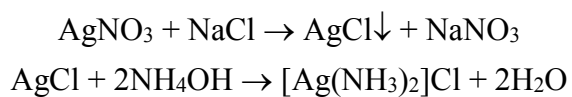


Рис.32. Качественная реакция на ион-серебра с раствором хлорида натрия.

**Б.** К 1 мл 2%-ного раствора серебра нитрата прибавляют раствор аммиака до растворения образующегося вначале осадка, затем прибавляют 2-3 капли раствора формальдегида и нагревают. На стенках пробирки образуется блестящий налет металлического серебра:

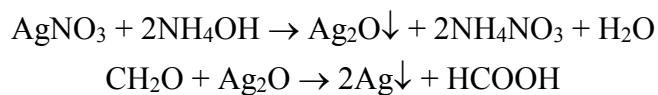
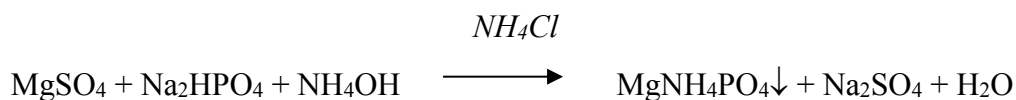


Рис.33. Качественная реакция на ион-серебра с раствором формальдегидом.

**Ион магния.** К 1 мл 5%-ного раствора магния сульфата прибавляют 1 мл раствора хлорида аммония, 0,5 мл раствора сульфата натрия и 1 мл раствора аммиака. Образуется белый кристаллический осадок:



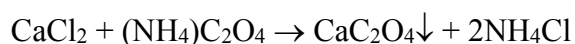
Осадок растворим в уксусной кислоте.



Рис.34. Качественная реакция на ион-магния.

**Ион кальция.**

**А.** К 1 мл 5%-ного раствора кальция хлорида добавляют 1 мл раствора оксалата аммония. Образуется белый осадок:



Осадок нерастворим в разведенной уксусной кислоте и растворе аммиака, но растворим в разведенных минеральных кислотах.



Рис.35. Качественная реакция на ион-кальция с раствором оксалата аммония.

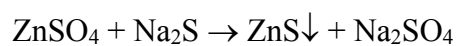
**Б.** Соль кальция, смоченная соляной кислотой и внесенная в бесцветное пламя, окрашивает его в кирпично – красный цвет.



Рис.36. Качественная реакция на ион-кальция (окрашивание пламени горелки).

### **Ион цинка.**

**А.** К 2 мл нейтрального 5%-ного раствора цинка сульфата прибавляют 0,5 мл раствора сульфида натрия. Образуется белый осадок:

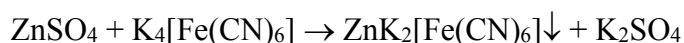


Осадок нерастворим в разведенной уксусной кислоте и легко растворим в разведенной соляной кислоте.



Рис.37. Качественная реакция на ион-цинка с раствором сульфида натрия.

**Б.** К 2 мл 5%-ного раствора цинка сульфата прибавляют 0,5 мл раствора гексацианоферрата (II) калия (ферроцианида калия); образуется белый студенистый осадок:



Осадок нерастворим в разведенной соляной кислоте.

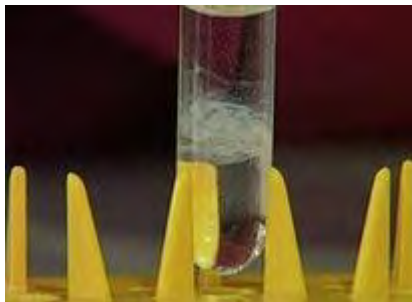


Рис.38. Качественная реакция на ион-цинка с раствором гексацианоферрата (II) калия (ферроцианида калия).

### **Ион аммония.**

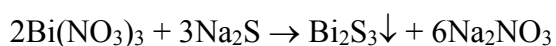
**А.** Отмеривают 1 мл 1%-ного раствора аммония хлорида и нагревают с 0,5 мл раствора гидроксида натрия. Выделяется аммиак, обнаруживаемый по запаху и по внесению влажной красной лакмусовой бумаги:



Рис.39. Качественная реакция на ион-аммония по изменению окраски лакмусовой бумаги.

### **Ион висмута.**

**А.** Массу висмута нитрата основного (около 0,1 г) взбалтывают с 3 мл разведенной соляной кислоты и фильтруют. К фильтрату прибавляют 1 мл раствора сульфида натрия. Появляется коричнево – черный осадок:



Осадок растворим в равном объеме концентрированной азотной кислоты.

**Б.** Массу висмута нитрата основного (около 0,1 г) взбалтывают с 5 мл разведенной серной кислоты и фильтруют. К фильтрату прибавляют 2 капли раствора йодида калия, выпадает черный осадок, растворимый в избытке реактива с образованием раствора желтовато – оранжевого цвета:

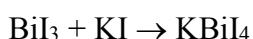
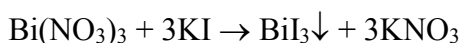


Рис.40. Качественные реакции на ион-висмута.

### **Ион железа (II).**

**А.** К 2 мл свежеприготовленного 5%-ного раствора железа (II) сульфата прибавляют 0,5 мл разведенной соляной кислоты и 1 мл раствора гексацианоферрата (III) калия (ферроцианида калия). Образуется синий осадок:

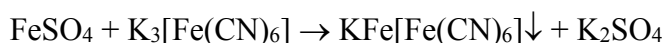
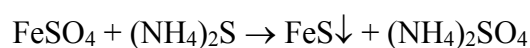


Рис.41. Качественная реакция на ион-железа (II) с раствором гексацианоферрата (III) калия (ферроцианида калия).

**Б.** К 2 мл свежеприготовленного 5%-ного раствора железа (II) сульфата прибавляют раствор сульфида аммония. Образуется черный осадок:



Осадок растворим в разведенных минеральных кислотах.



Рис.42. Качественная реакция на ион-железа (II) с раствором сульфида аммония.

### Ион железа (III).

А. К 1 мл 3%-ного раствора железа (III) хлорида прибавляют 5 мл воды, 0,5 мл разведенной соляной кислоты и 1-2 капли раствора тиоционата аммония. Появляется красное окрашивание:

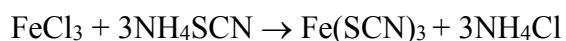


Рис.43. Качественная реакция на ион-железа (III) с раствором тиоционата аммония.

Б. К 1 мл 3%-ного раствора железа (III) хлорида прибавляют 5 мл воды, 0,5 мл разведенной соляной кислоты и 1-2 капли раствора гексацианоферрата (II) калия. Образуется синий осадок:

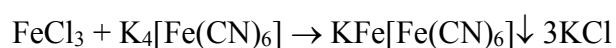
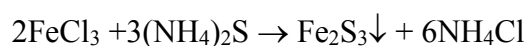




Рис.44. Качественная реакция на ион-железа (III) с раствором гексацианоферрата (II) калия.

**В.** К 1 мл 3%-ного раствора железа (III) хлорида прибавляют 5 мл воды и раствор сульфида аммония. Образуется черный осадок:



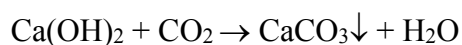
Осадок растворим в разведенных минеральных кислотах.



Рис.45. Качественная реакция на ион-железа (III) с раствором сульфида аммония.

**Карбонат (гидрокарбонат) – ион.**

**А.** К 0,2 г натрия карбоната (гидрокарбоната) или к 2 мл 10%-ного раствора карбоната (гидрокарбоната) прибавляют 0,5 мл разведенной кислоты. Выделяются пузырьки диоксида углерода. При пропускании их через известковую воду образуется белый осадок:



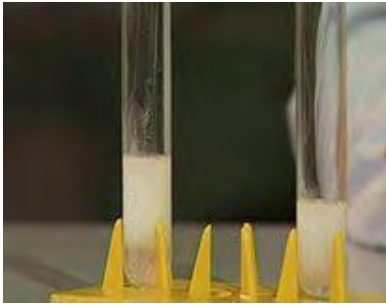


Рис.46. Качественная реакция на карбонат (гидрокарбонат) – ион с раствором разведенной соляной кислоты.

**Б)** К 2 мл 10%-ного раствора карбоната (гидрокарбоната) прибавляют 5 капель насыщенного раствора сульфата магния, образуется белый осадок (гидрокарбонат образует осадок только при кипячении смеси):

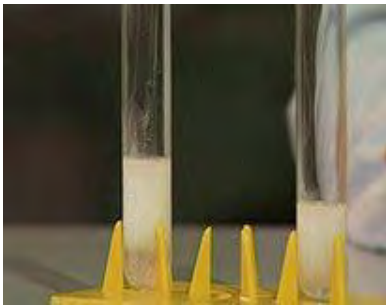
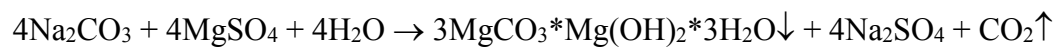


Рис.47. Качественная реакция на карбонат (гидрокарбонат) – ион с раствором сульфата магния.

**В)** Раствор натрия карбоната 10%-ный при прибавлении 1 капли раствора фенолфталеина окрашивается в красный цвет (отличие от гидрокарбоната).



Рис.48. Качественная реакция на карбонат – ион с раствором фенолфталеина.

**Нитрат – ион.**

А) Натрия нитрат (около 0,005 г) не обесцвечивает раствор перманганата калия, подкисленной серной кислотой (отличие от нитритов).



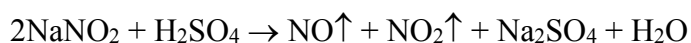
Рис.49. Качественная реакция на нитрат – ион с раствором перманганата калия.

Б) К 0,005 г натрия нитрата прибавляют 2-3 капли воды и концентрированной серной кислоты, кусочек металлической меди и нагревают. Выделяются бурые пары диоксида азота:

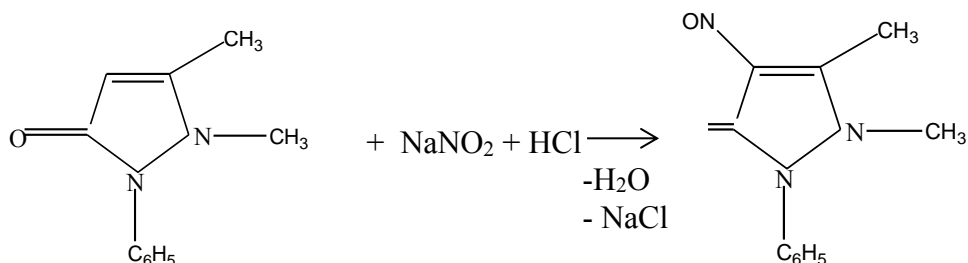


### Нитрит – ион.

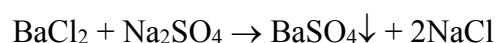
А) К 1 мл 10%-ного раствора натрия нитрита прибавляют 1 мл разведенной серной кислоты. Выделяются желто – бурые пары:



Б) Несколько кристаллов антипирина растворяют в фарфоровой чашке в 2 каплях разведенной соляной кислоты, прибавляют 1 каплю 10%-ного раствора натрия нитрита. Появляется зеленое окрашивание:



**Сульфат – ион.** К 2 мл 5%-ного раствора натрия сульфата прибавляют 0,5 мл разведенной соляной кислоты и 0,5 мл раствора хлорида бария. Образуется белый осадок:



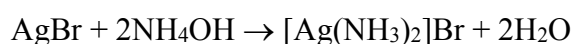
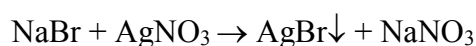
Осадок нерастворим в разведенных кислотах.



Рис.51. Качественная реакция на сульфат-ион с раствором хлорида бария.

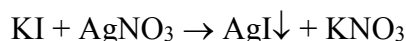
**Хлорид – ион.** К 2 мл 0,5%-ного раствора натрия хлорида прибавляют 0,5 мл раствора нитрата серебра. Образуется белый творожистый осадок, растворимый в растворе аммиака. При испытании подлинности гипохлоридов органических оснований растворимость образовавшегося осадка хлорида серебра устанавливают после фильтрования и промывания его водой.

**Бромид – ион.** К 1 мл 1%-ного раствора калия бромида. Подкисленного азотной кислотой, прибавляют несколько капель раствора нитрата серебра. Образуется желтоватый творожистый осадок, трудно растворимый в растворе аммиака:



**Йодид – ион.**

А) К 2 мл раствора калия йодида прибавляют 0,5 мл азотной кислоты и 0,5 мл раствора нитрата серебра. Образуется желтый творожистый осадок:



Осадок нерастворим в растворе аммиака.



Рис.52. Качественная реакция на йодид-ион с раствором нитрата серебра.

**Б)** При нагревании 0,1 г калия йодида с 1 мл концентрированной серной кислотой выделяются фиолетовые пары йода:

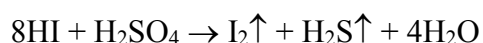
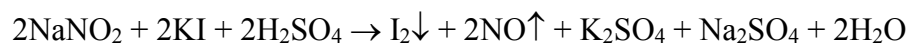


Рис.53. Качественная реакция на йодид-ион с раствором концентрированной серной кислоты при нагревании.

**В)** К 2 мл 1%-ного раствора калия йодида прибавляют 0,2 мл разведенной серной кислоты, 0,2 мл раствора нитрита натрия или раствора хлорида железа (III) и 2 мл хлороформа. При взбалтывании хлороформный слой окрашивается в фиолетовый цвет:



## ***Определение примесей в лекарственных веществах***

Анализ чистоты ЛС является неотъемлемой и важной частью контроля их качества, поскольку наличие примесных соединений может не только снизить фармакологический эффект (например, появление 4-эпитетрациклинов в тетрациклине) или оказать противоположное действие (примесь иона-антагониста по фармакологическому действию), но и сделать препарат более токсичным (наличие примеси броматов в калия бромиде) или опасным для здоровья (примесь минеральных кислот в кислоте борной, примесь растворимых солей бария в бария сульфате для рентгеноскопии).

Основным принципом в требованиях к чистоте ЛС является отсутствие или ограниченное содержание тех примесей, которые могут отрицательно влиять на их физические, химические и фармакологические свойства.

Примеси в ЛС в зависимости от характера и свойств могут влиять на фармакологическое действие или не оказывают специфического действия, а их присутствие указывает на степень очистки вещества (например, примеси хлоридов, сульфатов). Однако для такого рода примесей необходимо устанавливать предельное их содержание.

Нормирование содержания примесей предусмотрено в статьях ГФ в разделе «Испытания на чистоту». Уровень требований к качеству ЛС зависит не только от технологического процесса их получения, но и от способа применения лекарственной формы. Например, к лекарственным веществам, используемым в инъекционных растворах, предъявляются дополнительные требования в отношении качества.

Источники примесей в лекарственных веществах - это технологический процесс получения (качество исходного сырья, растворители, аппаратура, полупродукты синтеза), окружающая среда, упаковка. Примеси появляются в ЛС и при их хранении (под действием  $O_2$ ,  $CO_2$ , влаги, света и других факторов).

В частной статье на каждое ЛС приведен перечень показателей, по которым устанавливается его чистота. Несоответствие лекарственного вещества хотя бы одному из предусмотренных НД показателей указывает на изменение его качества, наличие или появление примесей в процессе хранения.

В медицине применяется только лекарственное средство, отвечающее всем требованиям ГФ.

В ГФ имеется общая статья «Испытания на чистоту и допустимые пределы примесей», в которой приведены унифицированные методики для определения примесей хлорид-ионов, сульфат-ионов, ионов аммония, кальция, железа, цинка,

тяжелых металлов, мышьяка. Приготовление эталонных растворов на примесные соединения проводится по методикам частных ФС (например, определение количества примеси салициловой кислоты в кислоте ацетилсалициловой).

Определение примесей в лекарственных средствах и оценку их содержания проводят с помощью:

- визуального сравнения с эталонными растворами, устанавливающими предел содержания данной примеси, после проведения реакции с испытуемым и эталонным растворами. Окраска или опалесценция/помутнение испытуемого раствора должна быть не интенсивнее окраски или опалесценции/помутнения эталонного раствора;
- физико-химических методов (спектроскопические, хроматографические и другие методы).

***При испытании на чистоту должны соблюдаться требования ГФ, изложенные в общих замечаниях:***

1. Вода и реактивы должны быть свободны от ионов, на которые проводится испытание.

2. Пробирки, в которых проводятся наблюдения, должны быть бесцветными и одинакового диаметра, чтобы столб жидкости был одинаковым в обеих пробирках.

3. Добавление реактивов к испытуемому и эталонному растворам должно проводиться одновременно и в одинаковых количествах.

4. В случаях, когда в соответствующей статье ГФ указано, что в данной концентрации раствора не должно обнаруживаться той или иной примеси, поступают следующим образом: к испытуемому раствору прибавляют применяемые для каждой реакции, приведенные в статье реактивы, кроме основного, открывающего данную примесь. Раствор делят на 2 равные части и к одной из них прибавляют основной реактив. Оба раствора сравнивают. Между ними не должно быть различий (безэталонный метод).

5. Окраску сравнивают при дневном отраженном свете на матово-белом фоне. Степень мутности определяют, сравнивая пробирки в проходящем свете на темном фоне. Для проведения испытания на определение нормированного предела содержания примеси готовят раствор препарата (концентрация указана в соответствующей частной статье). Затем готовят эталонный раствор примесного иона или вещества той концентрации, которая соответствует требованию ГФ к содержанию данной примеси в препарате. Для установления содержания примеси проводят цветную реакцию или реакцию осаждения на испытуемую примесь, как в анализируемом препарате, так и

в эталонном растворе. Сравнивают интенсивность окраски или степень мутности в обеих пробирках.

ГФ использует 2 метода определения предела содержания примесей: безэталонный и эталонный.

### ***Безэталонный метод***

В случаях, когда в частной ФС на лекарственное вещество указано, что примесного вещества или иона «не должно быть», проводится испытание на это примесное вещество или ион; положительным результатом будет их отсутствие в лекарственном веществе. Так, в лекарственном веществе натрия хлорид должны отсутствовать ионы калия (антагонисты по фармакологическому действию); реакция с виннокаменной кислотой должна быть отрицательной.

Причем отрицательная реакция на определяемый примесный ион или вещество может означать, что чувствительность реакции недостаточна для определения данной примеси, т.е. говорить о полном отсутствии данной примеси нельзя. То же можно сказать и о других методах анализа, используемых для определения примесей.

### ***Эталонный метод***

Если предел содержания примесей дан в числовом выражении (например, в процентах), то используется эталонный метод. Так, содержание примеси хлоридов в препарате «Меди сульфат» по требованию частной ФС должно быть не более 0,005%.

Для определения допустимого предела содержания примесей в ЛС проводят их количественную оценку с помощью соответствующих эталонных растворов - на цветность, мутность, примесные вещества и ионы.

Эталонные растворы содержат определенное количество примесного иона или примесного вещества. Сравнение проводят колориметрическим (определение окраски) или нефелометрическим (определение мутности) методом.

Эталонные растворы готовят из соответствующих веществ взятием навески с точностью до 0,001 г. Готовят растворы А (для длительного хранения) и из них рабочие растворы Б и В путем разведения до нужной концентрации. Относительная ошибка эталонного метода определения предела содержания примеси составляет  $\pm 10\%$ . Эталонный метод более точен, чем безэталонный, поэтому часто используется для нормирования содержания токсичных примесей (например, примеси мышьяка, тяжелых металлов и др.).

### ***Определение примеси ионов железа***

Химические методы определения примеси железа в лекарственных средствах основаны на образовании окрашенных растворов при взаимодействии ионов железа с различными реагентами.

С сульфосалициловой кислотой соли двух- и трехвалентного железа в зависимости от концентрации образуют в аммиачной среде желтые или коричнево-красные растворы сульфосалицилатных комплексов (метод 1); в зависимости от природы испытуемого образца используются различные модификации этого метода.

С тиогликолевой кислотой в аммиачной среде (метод 2) или с аммония тиоцианатом в кислой среде (метод 3) соли трехвалентного железа в зависимости от концентрации образуют розовые или красные растворы соответствующих соединений. При использовании этих методов двухвалентное железо переходит в трехвалентное под действием тиогликолевой кислоты или аммония персульфата.

После добавления соответствующих реактивов (с учетом используемого метода) сравнивают интенсивность окраски испытуемого раствора с окраской эталонного раствора. Окраска, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать окраску эталонного раствора.

Предельно допустимое содержание солей железа, метод испытания, условия подготовки испытуемого образца и концентрация стандартного раствора железа должны быть указаны в фармакопейной статье.

### ***Определение примеси ионов аммония***

Определение основано на образовании в зависимости от их концентрации желто-бурого осадка или желтого окрашивания со щелочным раствором калия тетраiodомеркурата (2) (реактивом Несслера). Предельная чувствительность реакции 0,3 мкг/мл аммоний-иона. При концентрации аммоний-иона 2 мкг/мл наблюдается выраженное желтое окрашивание.

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 0,15 мл реактива Несслера и перемешивают. Через 5 мин сравнивают окраску растворов.

Окраска, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать окраску эталонного раствора.

### ***Определение примеси ионов кальция***

Растворы солей кальция в зависимости от их концентрации дают с раствором аммония оксалата помутнение раствора или белый мелкокристаллический осадок, не исчезающие при прибавления уксусной кислоты, но легко растворимые при прибавлении

хлористоводородной или азотной кислоты. Предельная чувствительность реакции 3,5 мкг/мл кальций-иона. При концентрации кальций-иона 30 мкг/мл наблюдается помутнение раствора.

#### **Метод 1**

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 1 мл 10 % раствора аммония хлорида, 1 мл 10 % раствора аммиака и 1 мл 4 % раствора аммония оксалата, перемешивают.

Через 10 мин сравнивают мутность растворов. Мутность, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать мутность эталонного раствора.

#### **Метод 2**

При приготовлении всех растворов, применяемых в данном испытании, должна использоваться вода очищенная, полученная методом дистилляции.

В каждую из двух пробирок помещают по 0,2 мл стандартного раствора кальций-иона спиртового (100 мкг/мл) и 1 мл 4 % раствора аммония оксалата.

Через 15 мин сравнивают мутность растворов. Мутность, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать мутность эталонного раствора.

### ***Определение примеси ионов цинка***

Определение примесей солей цинка в лекарственных средствах основано на образовании с раствором калия ферроцианида, в зависимости от концентрации ионов цинка, белого помутнения раствора или белого осадка, не растворимых в разведенных кислотах. Предельная чувствительность реакции 1 мкг/мл цинк-иона. При концентрации цинк-иона 5 мкг/мл наблюдают помутнение раствора.

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 2 мл хлористоводородной кислоты 25 % и по 0,2 мл калия ферроцианида раствора 5 %. Через 10 мин сравнивают мутность растворов. Мутность, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать мутность эталонного раствора.

Примечание. В случае появления в испытуемом растворе синего окрашивания, следует предварительно отделить ионы железа. Для этого к испытуемому раствору, нагретому до кипения, прибавляют аммиака раствор 10 % до отчетливого запаха, смесь фильтруют и проводят определение цинк-ионов в фильтрате.

### ***Определение примеси сульфат-ионов***

Определение содержания сульфат-ионов основано на их способности образовывать с растворами солей бария помутнение раствора или белый осадок, нерастворимые в кислотах. Предельная чувствительность реакции 3 мкг/мл сульфат-иона. При концентрации 10 мкг/мл сульфат-иона через 10 мин наблюдают помутнение раствора.

## **Метод 1**

*Испытуемый раствор.* 10 мл раствора, приготовленного, как указано в фармакопейной статье.

*Эталонный раствор* 10 мл стандартного раствора сульфат-иона (10 мкг/мл).

К испытуемому и эталонному растворам прибавляют по 0,5 мл хлористоводородной кислоты разведенной 8,3 % и 1 мл бария хлорида раствора 5 %, перемешивают.

Через 10 мин сравнивают мутность испытуемого и эталонного растворов. Мутность, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать мутность эталонного раствора.

## **Метод 2**

К 4,5 мл стандартного раствора сульфат-иона спиртового (10 мкг/мл) прибавляют 3 мл бария хлорида раствора 25 %, встряхивают и выдерживают в течение 1 мин.

*Испытуемый раствор.* К 2,5 мл описанного выше раствора прибавляют 15 мл раствора испытуемого образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье, и 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30 %.

*Эталонный раствор* готовят с теми же количествами реактивов и в тех же условиях, используя вместо раствора испытуемого образца 15 мл стандартного раствора сульфат-иона (10 мкг/мл).

Через 5 мин сравнивают мутность испытуемого и эталонного растворов. Мутность, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать мутность эталонного раствора.

## ***Определение примеси фосфат-ионов***

Определение фосфатов основано на их способности образовывать с молибдат-ионами в присутствии восстановителя соединения синего цвета – молибденовую синь.

*Испытуемый раствор.* 100 мл испытуемого раствора, имеющего нейтральную реакцию, приготовленного, как указано в фармакопейной статье.

*Эталонный раствор.* К 2 мл стандартного раствора фосфат-иона (5 мкг/мл) прибавляют 98 мл воды.

К 20 мл испытуемого и 20 мл эталонного растворов прибавляют по 4 мл сульфомолибденового реактива 2,5 %, встряхивают, прибавляют по 0,1 мл раствора олова(II) хлорида, перемешивают и через 10 мин сравнивают окраски.

Синяя окраска, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать окраску эталонного раствора.

## ***Вопросы для самоконтроля***

1. Государственная фармакопея (введение, общие и частные статьи).  
Структура статей на ЛС.  
Унификация требований к анализу ЛС (общие ФС).
2. Определение чистоты ЛС:
  - а) характеристика внешнего вида лекарственных веществ. Возможные изменения при неправильном хранении;
  - б) причины присутствия примесных соединений и ионов в ЛС;
  - в) характеристика примесей, которые должны отсутствовать в лекарственных веществах, а также примесей, количество которых ГФ регламентирует в лекарственных веществах. Эталонный и безэталонный методы определения примесных соединений и ионов. Эталоны цветности, мутности, эталоны на примесные ионы и примесные вещества;
  - г) определение прозрачности и цветности растворов лекарственных веществ;
  - д) определение кислотности, щелочности, рН;
3. Какие общие физические и физико-химические методы установления доброкачественности лекарственных препаратов включены в ГФ?
4. Что подразумевается под термином «растворимость» в ГФ?
5. Какие условные термины приняты ГФ X, ГФ XI, ГФ XII, ГФ XIII для обозначения растворимости и для каких соотношений препарата и растворителя?
6. Какие жидкости по ГФ считаются прозрачными и какие бесцветными?
7. Сколько эталонов существует для определения степени мутности жидкостей по ГФ? Какова методика приготовления и продолжительность пригодности этих эталонов?
8. Как готовят по ГФ исходные и основные растворы для определения степени мутности?
9. Сколько эталонов окраски приведено в ГФ XIII? Как они готовятся?
10. Какие методы определения воды и летучих веществ включены в ГФ?
11. При каких условиях постоянную массу препарата считают достигнутой?
12. Какие химические соединения входят в состав реактива Фишера?
13. Какие химические реакции лежат в основе определения воды методом Фишера?
14. Какие химические соединения не могут быть определены титрованием реактивом Фишера и почему?
15. Почему при определении общей золы сжигание ведут при возможно более низкой температуре?

16. Что означает термин «постоянная масса»?
17. Как поступают при прокаливании, если не удастся полностью сжечь частицы угля?
18. Какова методика определения золы, нерастворимой в соляной кислоте?
19. Как определяется сульфатная зола в лекарственных препаратах?
20. Что такое температура плавления и для какой цели ее определяют по ГФ?
21. Какие химические процессы происходят при разложении органического лекарственного препарата в процессе определения температуры плавления?
22. Какие методы определения температуры плавления и для каких веществ включены в ГФ?

## ***Инструментальные методы анализа***

Физико-химические методы приобретают все большее значение для целей объективной идентификации и количественного определения лекарственных веществ. Получивший распространение в различных отраслях неdestructивный анализ (без разрушения анализируемого объекта) играет важную роль и в фармацевтическом анализе. Для его выполнения пригодны многие физико-химические методы, в частности оптические, ЯМР-, ПМР-, УФ- и ИК- спектроскопия, ГЖХ, ВЭЖХ и др.

В фармацевтическом анализе наиболее широко используют физико-химические методы, которые могут быть классифицированы на следующие группы: оптические методы; методы, основанные на поглощении излучения; методы, основанные на испускании излучения; методы, основанные на использовании магнитного поля; электрохимические методы; методы разделения; термические методы.

Большинство перечисленных методов (за исключением оптических, электрохимических и термических) широко применяют для установления химической структуры органических соединений.

### **Оптические методы**

#### ***Поляриметрия***

**Оптическое вращение** - свойство вещества вращать плоскость поляризации при прохождении через него поляризованного света.

В зависимости от природы оптически активного вещества вращение плоскости поляризации может иметь различное направление и величину. Если от наблюдателя, к которому направлен свет, проходящий через оптически активное вещество, плоскость поляризации вращается по часовой стрелке, то вещество называют правовращающим и перед его названием ставят знак (+); если же плоскость поляризации вращается против часовой стрелки, то вещество называют левовращающим и перед его названием ставят знак (-). Величину отклонения плоскости поляризации от начального положения, выраженную в угловых градусах, называют углом вращения и обозначают греческой буквой  $\alpha$ . Величина угла вращения зависит от природы оптически активного вещества, длины пути поляризованного света в оптически активной среде (чистом веществе или растворе) и длины волны света. Для растворов величина угла вращения зависит от природы растворителя и концентрации оптически активного вещества. Величина угла вращения прямо пропорциональна длине пути света, т.е. толщине слоя оптически активного вещества или его раствора. Влияние температуры в большинстве случаев незначительно. Измерение

угла вращения проводят на поляриметре, позволяющем определить величину угла вращения с точностью +/- 0,02 град. С, при температуре (20 +/- 0,5) град. С. Величину удельного вращения  $[\alpha]$  рассчитывают по одной из следующих формул.

Для веществ, находящихся в растворе:

$$[\alpha] = \alpha * 100 / l * c$$

где  $\alpha$  - измеренный угол вращения, в градусах;

l - толщина слоя, в дециметрах;

c - концентрация раствора, в граммах вещества на 100 мл раствора.



Рис.54. Поляриметр МСР-100.

### ***Рефрактометрия***

**Показателем преломления (индексом рефракции)** называют отношение скорости света в вакууме к скорости света в испытуемом веществе (абсолютный показатель преломления). На практике определяют так называемый относительный показатель преломления (n), который является отношением скорости света в воздухе к скорости света в испытуемом веществе.

Показатель преломления зависит от температуры и длины волны света, при которой проводят определение. В растворах показатель преломления зависит также от концентрации вещества и природы растворителя.

**Рефрактометрию** применяют для установления подлинности и чистоты вещества. Метод применяют также для определения концентрации вещества в растворе, которую находят по графику зависимости показателя преломления раствора от концентрации. На графике выбирают интервал концентраций, в котором наблюдается линейная зависимость

между показателем преломления и концентрацией. В этом интервале концентрацию вычисляют по формуле:

$$X = (n - n_0)/F,$$

где X - концентрация, в процентах;

n - показатель преломления раствора;

n<sub>0</sub> - показатель преломления растворителя при той же температуре;

F - фактор, равный величине прироста показателя преломления при увеличении концентрации на 1% (устанавливается экспериментально).



Рис.55. Рефрактометр ИРФ 454.

## Спектроскопические методы

**Спектроскопические методы анализа** основаны на избирательном поглощении электромагнитного излучения анализируемым веществом и служат для исследования строения, идентификации и количественного определения светопоглощающих соединений.

В зависимости от используемой аппаратуры в фармацевтическом анализе различают следующие методы анализа, основанные на поглощении электромагнитного излучения и испускании света:

- спектрофотометрия в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях;
- спектрофотометрия в инфракрасной (ИК) области;
- атомно-эмиссионная и атомно-абсорбционная спектроскопия (АЭС и ААС);
- флуориметрия;

- спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

### *Спектрофотометрия в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях*

**Ультрафиолетовая спектрофотометрия** — наиболее простой и широко применяемый в фармации абсорбционный метод анализа. Его используют на всех этапах фармацевтического анализа лекарственных препаратов (испытания подлинности, чистоты, количественное определение). Разработано большое число способов качественного и количественного анализа лекарственных форм методом ультрафиолетовой спектрофотометрии. Для идентификации могут быть использованы атласы спектров лекарственных веществ, систематизирующие сведения о характере спектральных кривых и значениях удельных показателей поглощения.

Известны различные варианты использования метода УФ-спектрофотометрии для идентификации. При испытаниях на подлинность идентифицируют лекарственные вещества по *положению* максимума светопоглощения. Чаще в фармакопейных статьях приведены положения максимума (или минимума) и соответствующие им значения оптических плотностей. Иногда используют метод, основанный на вычислении отношения оптических плотностей при двух длинах волн (они обычно соответствуют двум максимумам или максимуму и минимуму светопоглощения). Идентифицируют целый ряд лекарственных веществ также по удельному показателю поглощения раствора.

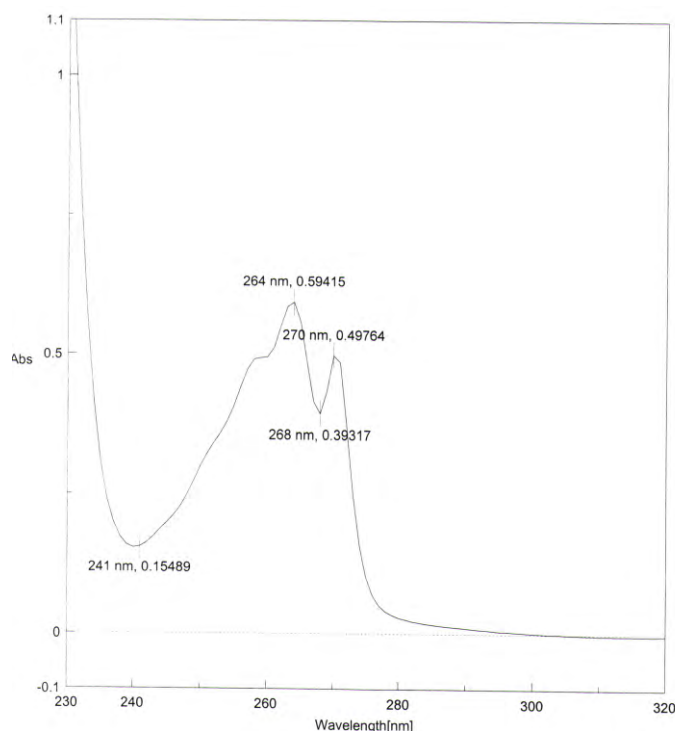


Рис.56. УФ-спектр кислотного раствора стрептоцида.

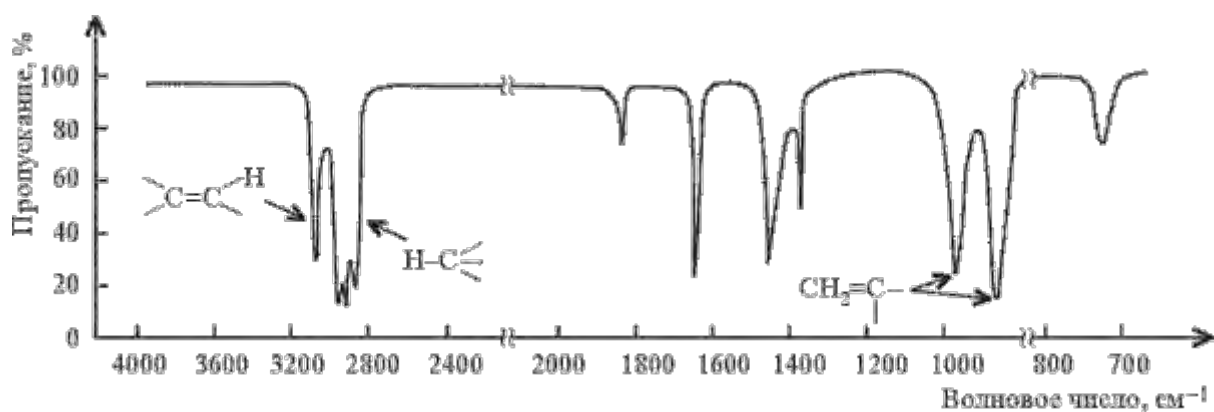


Рис.57. ИК-спектр гексена-1  $\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ .

Весьма перспективно для идентификации лекарственных веществ использование таких оптических характеристик, как положение полосы поглощения в шкале длин волн, частота в максимуме поглощения, значение пиковой и интегральной интенсивности, полуширина и асимметрия полос, сила осциллятора. Эти параметры делают более надежной идентификацию веществ, чем установление длины волны максимума светопоглощения и удельного показателя поглощения. Эти константы, позволяющие охарактеризовать наличие связи между УФ-спектром и структурой молекулы, были установлены и использованы для оценки качества лекарственных веществ, содержащих гетероатом кислорода в молекуле (В.П.Буряк).

Объективный выбор оптимальных условий количественного спектрофотометрического анализа можно осуществить только предварительным исследованием констант ионизации, влияния природы растворителей, pH среды и других факторов на характер спектра поглощения.

В НТД приведены различные способы использования УФ-спектрофотометрии для количественного определения лекарственных веществ, являющихся витаминами (ретинола ацетат, рутин, цианокобаламин), стероидными гормонами (кортизона ацетат, преднизон, прегнин, тестостерона пропионат), антибиотиками (натриевые соли оксациллина и метициллина, феноксиметилпенициллин, левомецетина стеарат, гризеофульвин). В качестве растворителей для спектрофотометрических измерений обычно используют воду или этанол. Расчет концентрации проводят различными способами: по стандарту, удельному показателю поглощения или калибровочному графику.

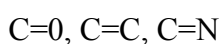
Количественный спектрофотометрический анализ целесообразно комбинировать с установлением подлинности по УФ-спектру. В этом случае раствор, приготовленный из одной навески, можно использовать для обоих этих испытаний. Чаще всего при спектрофотометрических определениях применяют способ, основанный на сравнении оптических плотностей анализируемого и стандартного растворов. Определенных условий

анализа требуют лекарственные вещества, способные образовывать кислотно-основные формы в зависимости от pH среды. В таких случаях необходимо предварительно подбирать условия, в которых вещество в растворе полностью будет находиться в одной из таких форм.

### *Спектрофотометрия в инфракрасной (ИК) области*

**Инфракрасная (ИК) спектроскопия** характеризуется широкой информативностью, что создает возможность объективной оценки подлинности и количественного определения лекарственных веществ. ИК-спектр однозначно характеризует всю структуру молекулы. Различия в химическом строении меняют характер ИК-спектра. **Важные преимущества ИК-спектрофотометрии** — специфичность, быстрота выполнения анализа, высокая чувствительность, объективность получаемых результатов, возможность анализа вещества в кристаллическом состоянии.

ИК-спектры измеряют, используя обычно взвеси лекарственных веществ в вазелиновом масле, собственное поглощение которого не мешает идентификации анализируемого соединения. Для установления подлинности используют, как правило, расположенную в интервале частот от 650 до 1800 см<sup>-1</sup> так называемую область "отпечатков пальцев" (650—1500 см<sup>-1</sup>), а также валентные колебания химических связей



В ГФ XII рекомендованы два способа установления подлинности лекарственных веществ по ИК-спектрам. Один из них основан на сравнении ИК-спектров испытуемого вещества и его стандартного образца. Спектры должны быть сняты в идентичных условиях, т.е. образцы должны быть в одинаковом агрегатном состоянии, в одной и той же концентрации, единой должна быть скорость регистрации и т.д. Второй способ заключается в сравнении ИК-спектра испытуемого вещества с его стандартным спектром. В этом случае необходимо строго соблюдать условия, предусмотренные для снятия стандартного спектра, приведенные в соответствующей НТД (ГФ, ВФС, ФС). Полное совпадение полос поглощения свидетельствует об идентичности веществ. Однако полиморфные модификации могут давать различные ИК-спектры. В таком случае для подтверждения идентичности необходимо перекристаллизовать испытуемые вещества из одного и того же растворителя и вновь снять спектры.

Подтверждением подлинности лекарственного вещества может служить также интенсивность поглощения. Для этой цели используют такие константы как показатель

поглощения или величина интегральной интенсивности поглощения, равная площади, которую огибает кривая на спектре поглощения.

Установлена возможность использования ИК-спектроскопии для идентификации большой группы лекарственных веществ, содержащих в молекуле карбонильные группы. Подлинность устанавливают по характеристическим полосам поглощения в следующих областях: 1720-1760, 1424-1418, 950-900  $\text{см}^{-1}$  для карбоновых кислот; 1596-1582, 1430-1400, 1630-1612, 1528-1518  $\text{см}^{-1}$  для аминокислот; 1690—1670, 1615—1580  $\text{см}^{-1}$  для амидов; 1770—1670  $\text{см}^{-1}$  для производных барбитуровой кислоты; 1384—1370, 1742—1740, 1050  $\text{см}^{-1}$  для терпеноидов; 1680—1540, 1380—1278  $\text{см}^{-1}$  для антибиотиков тетрациклинового ряда; 3580-3100, 3050-2870, 1742-1630, 903-390  $\text{см}^{-1}$  для стероидов (А.Ф.Мынка).

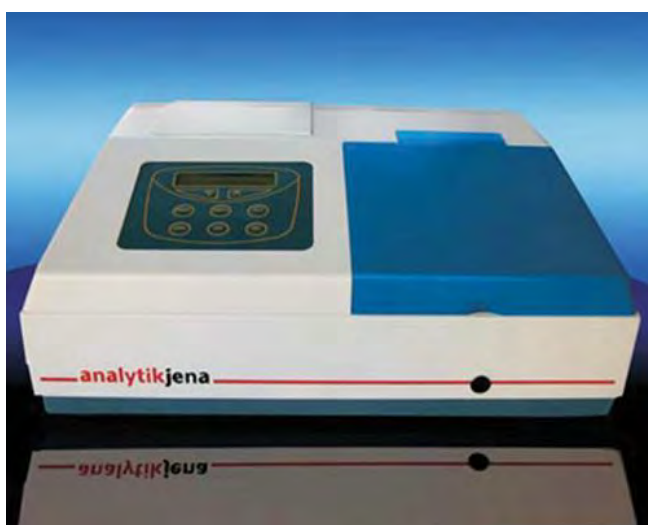


Рис.58. Спектрофотометр SPEKOL 1300.

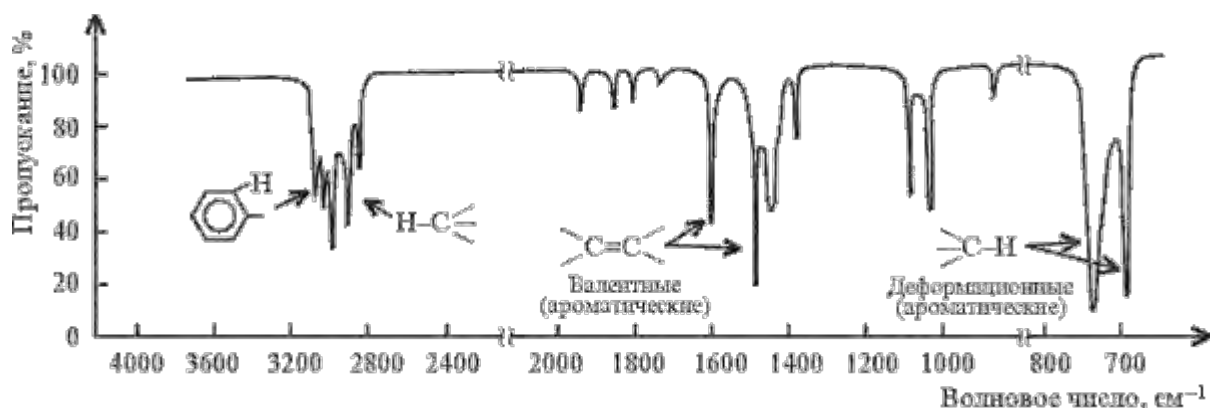


Рис.59. ИК-спектр толуола  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ .

## *Атомно-эмиссионная пламенная спектрометрия (АЭС)*

**Принцип метода.** Анализируемый раствор распыляется в виде аэрозоля в пламя горелки, работающей на горючем газе. Под действием температуры пламени происходит ряд сложных физико-химических процессов: испарение растворителя из капель аэрозоля, испарение твердых частиц, диссоциация молекул, возбуждение атомов и возникновение характеристического излучения атомов. Излучение определяемого элемента отделяется от постороннего с помощью светофильтра или монохроматора, попадает на фотоэлемент и вызывает фототок, который измеряется. Количественное определение элемента методом эмиссионной спектрометрии основано на функциональной зависимости интенсивности спектральной линии ( $I$ ) от концентрации элемента в растворе ( $c$ ). Прямопропорциональная зависимость между  $I$  и  $c$  имеет место лишь в определенной для данного элемента области концентраций. Линейную зависимость  $I$  от  $c$  может нарушать самопоглощение, ионизация, образование газообразных или трудно диссоциирующих в пламени соединений.

**Прибор.** Главными составными частями атомно-эмиссионного спектрометра являются: генератор атомного пара определяемого элемента (пламя, плазма, дуга и др.), монохроматор и детектор.

Если генератором является пламя, в качестве растворителя для приготовления испытуемого и стандартного растворов рекомендуется использовать воду. Могут использоваться и органические растворители, если они не влияют на стабильность пламени.

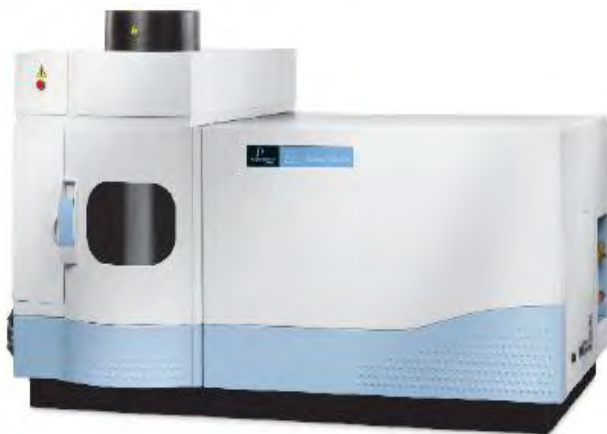


Рис.60. Атомно-эмиссионный спектрометр.

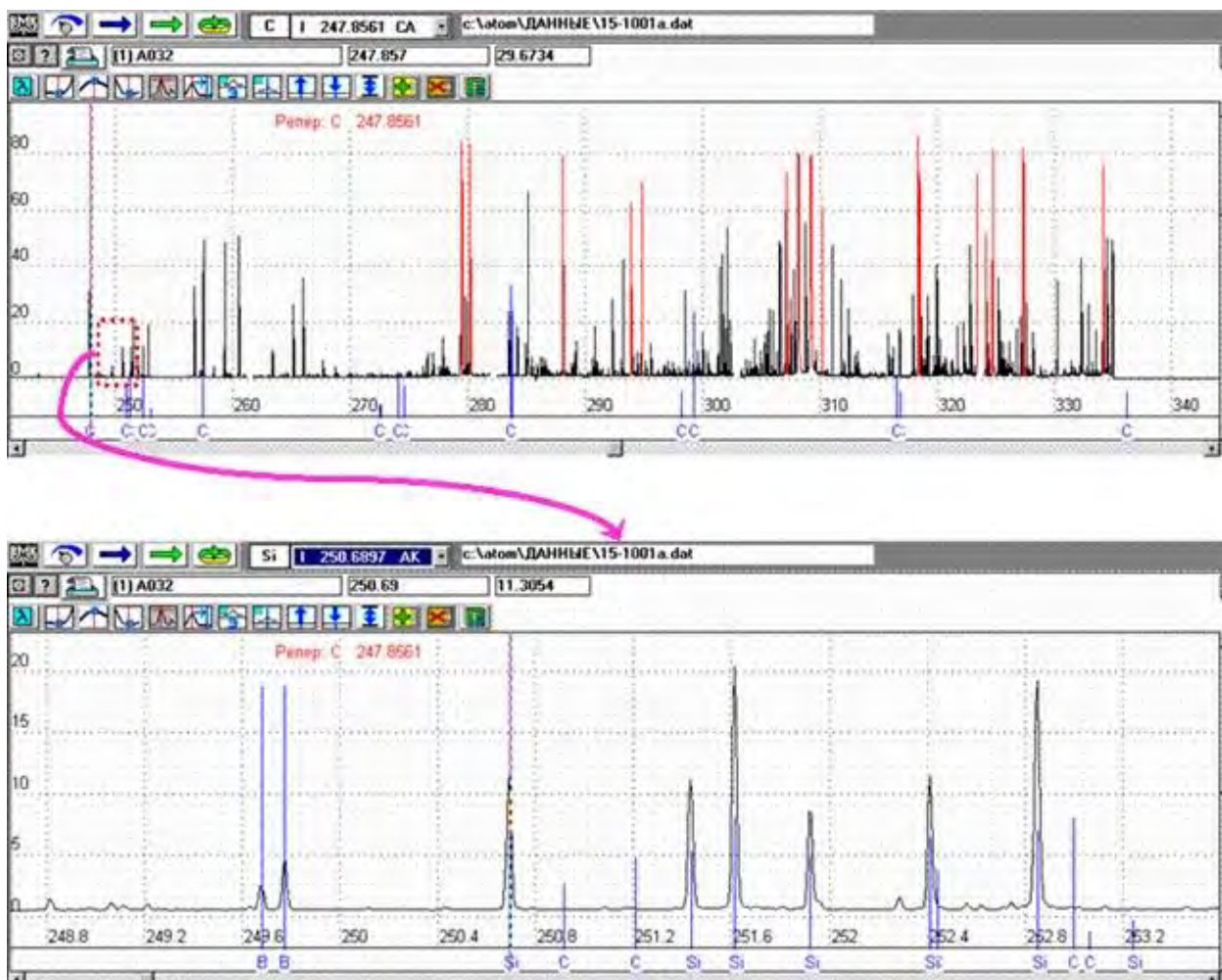


Рис.61. Атомно-эмиссионный спектр кремний-углеродсодержащего материала.

### *Атомно-абсорбционная спектрометрия (ААС)*

**Принцип метода.** Резонансное излучение от лампы с полым катодом проходит через пламя, в которое распыляется анализируемый раствор пробы. Излучение попадает на входную щель монохроматора, установленного таким образом, что из спектра выделяется только резонансная линия определяемого элемента, интенсивность которой измеряется фотоэлектрическим способом. Измеряют уменьшение интенсивности резонансной линии вследствие поглощения ее атомами определяемого элемента, принимая интенсивность неослабленной линии за 100%. Величина поглощения резонансного излучения пропорциональна числу атомов, находящихся в поглощающем слое.

**Прибор.** Главными составными частями прибора являются: источник излучения, атомный генератор определяемого элемента (пламя, печь и др.), монохроматор и детектор - для считывания сигнала из нагревательной камеры.

Для каждого определяемого элемента должен быть выбран специфический источник, излучающий спектральную линию, которая должна быть поглощена. Таким источником излучения обычно является полая катодная лампа, катод которой испускает излучение при возбуждении. Поскольку излучение, поглощаемое испытуемым элементом, обычно той же длины волны, что и его линия эмиссии, в полой катодной лампе используется тот элемент, который определяется.

Прибор снабжен аспиратором для введения испытуемого образца в пламя, создаваемое газовыми смесями.



Рис.62. Спектрометр атомно-абсорбционный.

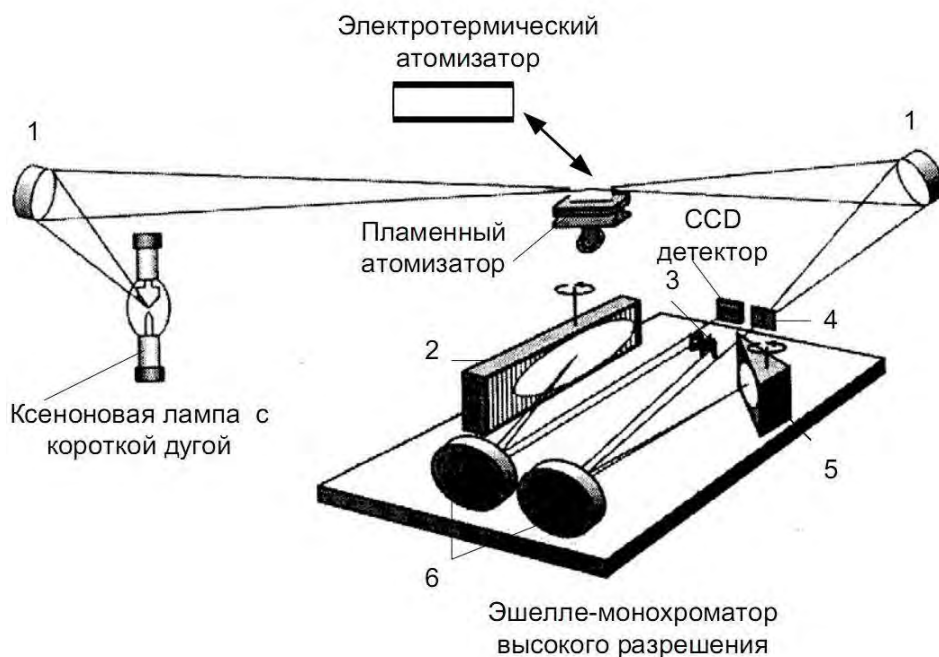


Рис.63. Оптическая схема атомно-абсорбционного спектрометра высокого разрешения с источником непрерывного спектра.

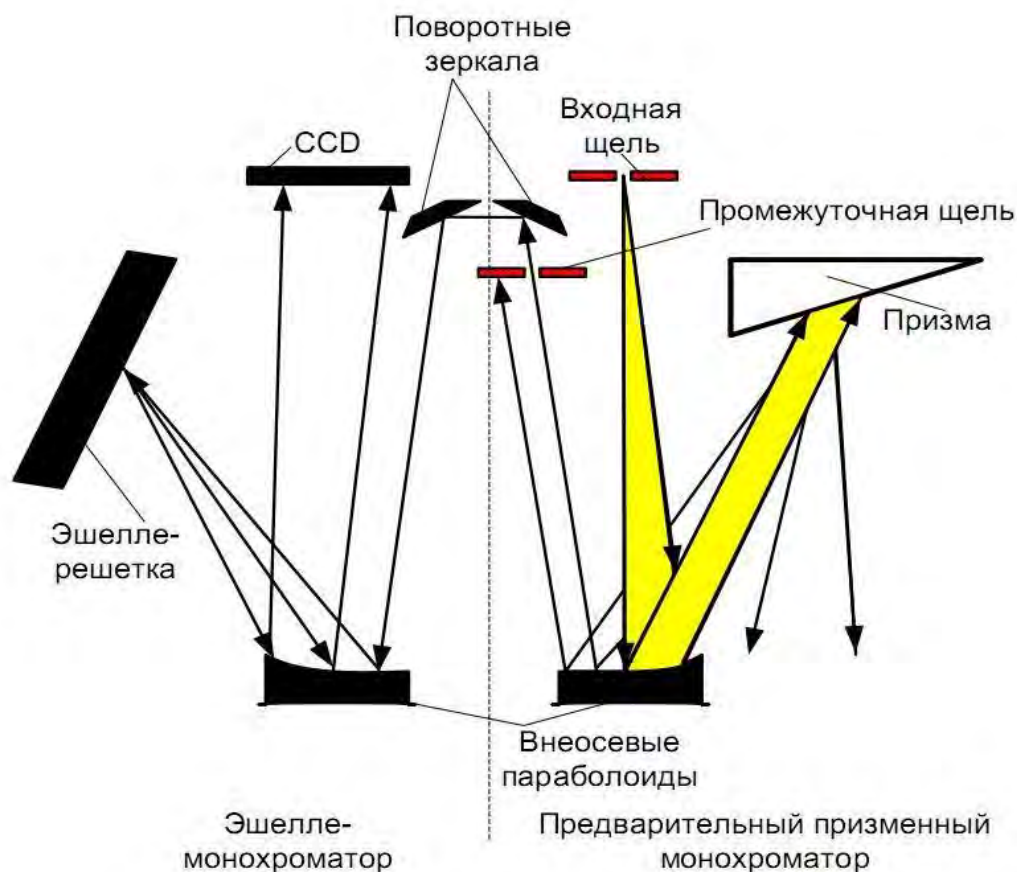


Рис.64.Ход оптических лучей в спектрометре высокого разрешения с непрерывным источником спектра.

## *Флуориметрия*

**Флуориметрия (или флуоресцентная спектрофотометрия)** основана на измерении флуоресценции - интенсивности флуоресцентного света, излучаемого испытуемым образцом в возбужденном состоянии, которое было достигнуто поглощением лучевой энергии в результате воздействия ультрафиолетового, видимого или других видов электромагнитного излучения. Флуоресценция органических соединений охватывает спектральную область от 250 до 800 нм, т.е. области: УФ (частично), видимую и начало ближнего ИК.

Энергия молекул, поглотивших лучевую энергию и находящихся в возбужденном состоянии, может высвобождаться в виде тепла или излучения при той же или большей длине волны по сравнению с поглощаемым излучением. Поэтому свет, излучаемый флуоресцентным раствором, имеет максимум интенсивности, смещенный в более длинноволновую область по сравнению с возбуждающим излучением, обычно на 20-30 нм.

**Флуориметрия** является более чувствительным методом анализа, чем абсорбционная

спектрофотометрия, и позволяет определять флуоресцирующие вещества в растворах с концентрацией, которая составляет примерно от 1/10 до 1/100 от концентрации, используемой в абсорбционной спектрофотометрии.

**Приборы.** Для проведения флуориметрического анализа используют приборы двух типов: фильтрационный флуориметр и спектрофлуориметр.



Рис.65. Флуориметр.

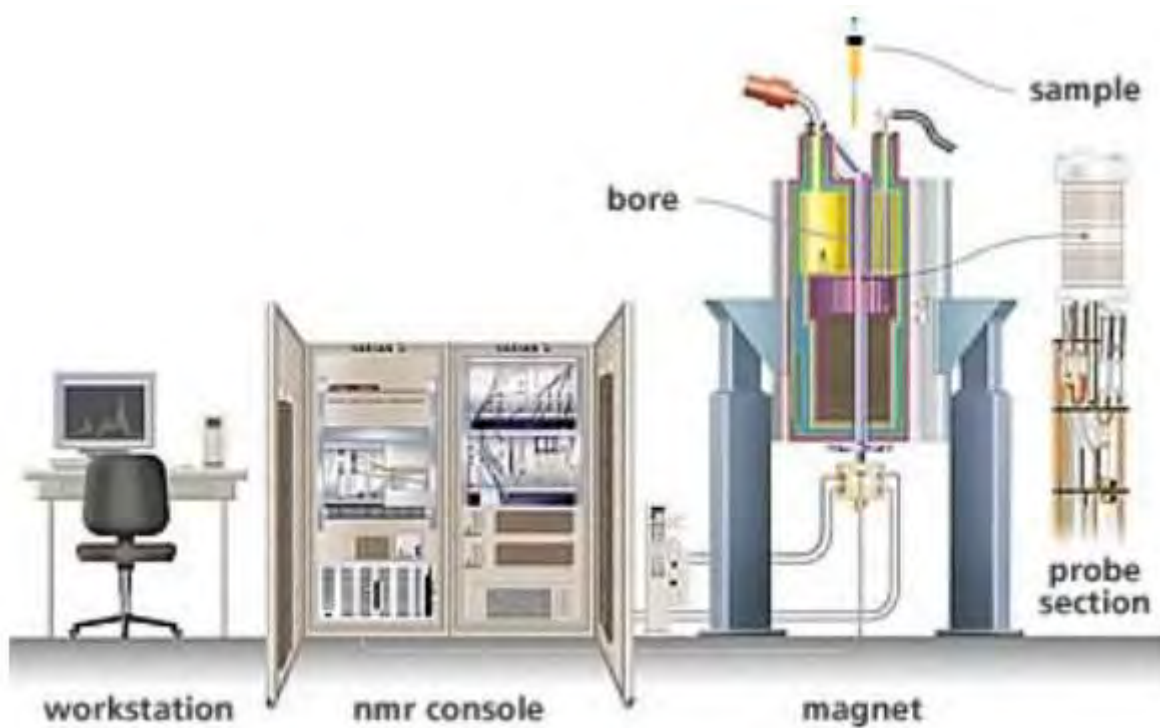
### ***Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР)***

Вещества, ядра атомов которых имеют магнитные моменты, в постоянном магнитном поле поглощают энергию электромагнитных волн (радиочастотный диапазон) при определенном соотношении между величинами постоянного магнитного поля и частотой переменного поля (ядерный магнитный резонанс, ЯМР). Магнитные моменты имеют изотопы ядер элементов с нечетным атомным весом ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{19}\text{F}$ ). Не имеют магнитных моментов ядра атомов с четным зарядом и четным атомным весом ( $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$ ).

Спектр ЯМР может быть получен двумя способами: или при непрерывном облучении образца слабым электромагнитным полем с изменяющейся частотой, в результате чего получается непосредственно спектр ЯМР (спектроскопия с непрерывным облучением), или при воздействии на образец короткого радиочастотного импульса с последующим Фурье-преобразованием отклика, представляющего собой сигнал свободной индукции, в спектр (импульсная спектроскопия).



Рис.66. Современный спектрометр ЯМР на электромагните.



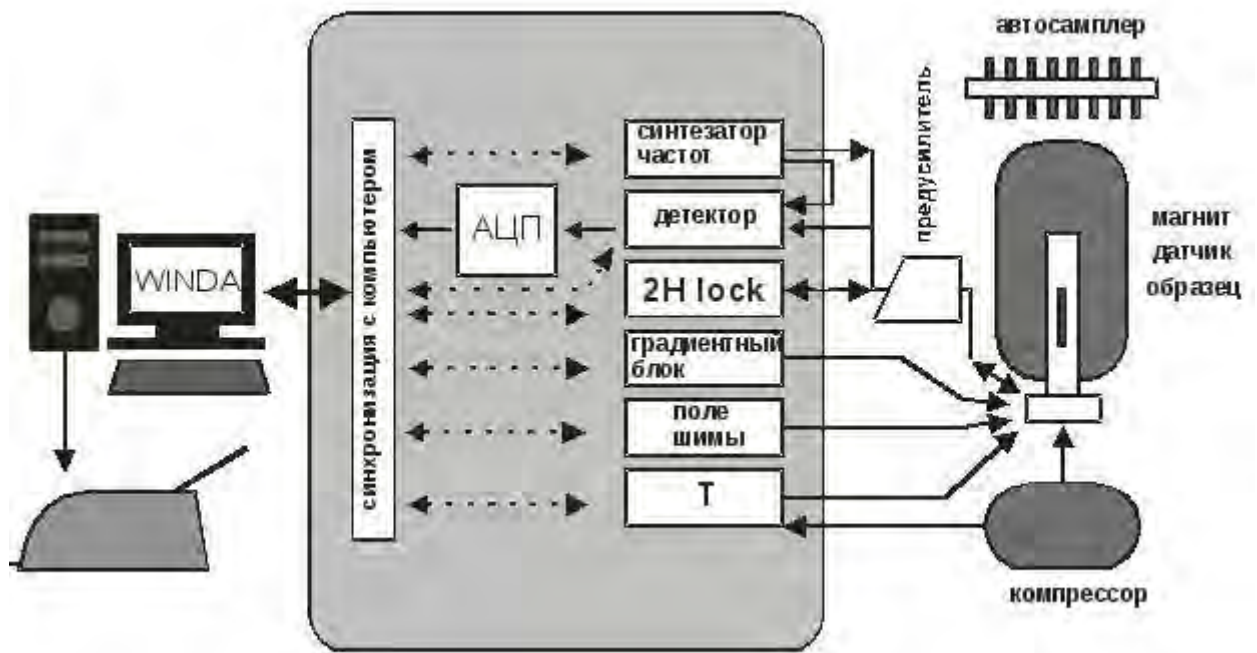


Рис.67. Устройство спектрометра.

## Методы разделения

**Хроматографические методы разделения** веществ основаны на их распределении между двумя фазами: подвижной и неподвижной. Подвижной фазой может быть жидкость или газ, неподвижной — твердое вещество или жидкость, адсорбированная на твердом носителе. Относительная скорость перемещения частиц вдоль пути разделения зависит от взаимодействия их с неподвижной фазой. Это приводит к тому, что каждое из веществ проходит определенную длину пути на носителе. Отношение скорости перемещения вещества к скорости перемещения растворителя обозначают. Эта величина является константой вещества для данных условий разделения и используется для идентификации.

Хроматография дает возможность наиболее эффективно осуществлять избирательное распределение компонентов анализируемого образца. Это имеет существенное значение для фармацевтического анализа, объектами исследования в котором обычно являются смеси нескольких веществ.

По механизму процесса разделения хроматографические методы классифицируют на ионообменную, адсорбционную, осадочную, распределительную, окислительно-восстановительную хроматографию. По форме проведения процесса можно выделить колоночную, капиллярную и плоскостную хроматографию. Последняя может быть выполнена на бумаге и в тонком (закрепленном или незакрепленном) слое сорбента. Хроматографические методы классифицируют также по агрегатному состоянию анализируемого вещества. К ним относятся различные методы газовой и жидкостной хроматографии.

**Адсорбционная хроматография** основана на избирательной адсорбции отдельных компонентов из раствора смеси веществ. Стационарной фазой служат такие адсорбенты, как оксид алюминия, активированный уголь и др.

**Ионообменная хроматография** использует ионообменные процессы, происходящие между адсорбентом и ионами электролита в анализируемом растворе. Стационарной фазой служат катион обменные или ани-онообменные смолы, содержащиеся в них ионы способны обмениваться на одноименно заряженные противоионы.

**Осадочная хроматография** основана на различии в растворимости веществ, образующихся при взаимодействии компонентов разделяемой смеси с осадителем.

**Распределительная хроматография** заключается в распределении компонентов смеси между двумя несмешивающимися жидкими фазами (подвижной и неподвижной). Стационарной фазой служит пропитанный растворителем носитель, а подвижной фазой — органический растворитель, практически не смешивающийся с первым растворителем. При

выполнении процесса в колонке происходит разделение смеси на зоны, содержащие по одному компоненту. Распределительная хроматография может выполняться также в тонком слое сорбента (тонкослойная хроматография) и на хроматографической бумаге (бумажная хроматография).

В **бумажной хроматографии** стационарной фазой служит поверхность специальной хроматографической бумаги. Распределение веществ происходит между водой, находящейся на поверхности бумаги, и подвижной фазой. Последняя представляет собой систему, включающую несколько растворителей.



Рис. 68. Прибор для бумажной хроматографии.

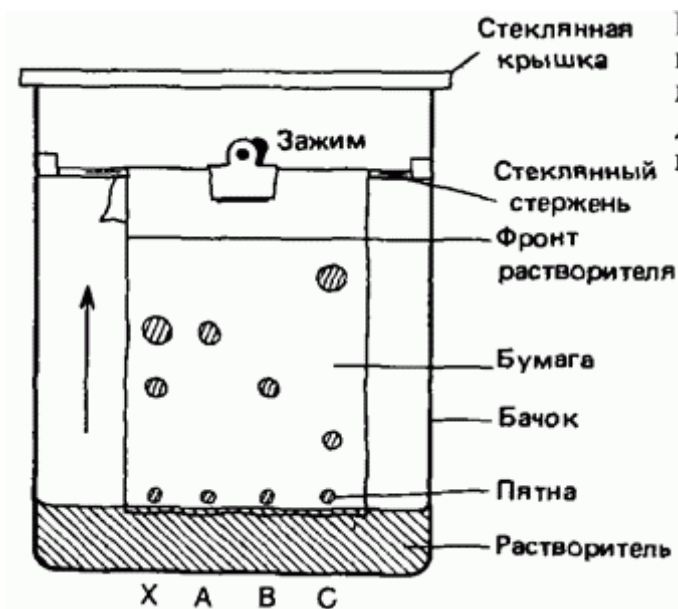


Рис. 69. Общая схема бумажной хроматографии.

В фармацевтическом анализе при выполнении испытаний методом бумажной хроматографии руководствуются указаниями ГФ XI, вып. 1 (с. 98) и частных фармакопейных статей на соответствующие лекарственные вещества (лекарственные формы). При испытаниях подлинности хроматографируют на одном листе

хроматографической бумаги одновременно испытуемое вещество и соответствующий стандартный образец. Если оба вещества идентичны, то соответствующие им пятна имеют на хроматограммах одинаковый вид и равные значения  $R_f$ . Если хроматографировать смесь испытуемого вещества и стандартного образца, то при их идентичности на хроматограмме должно появляться только одно пятно. Чтобы исключить влияние условий хроматографирования на получаемые значения  $R_f$ , можно пользоваться более объективной величиной  $R_s$ , которая представляет собой отношение величин  $R_f$  испытуемого и стандартного образцов.

При испытании на чистоту о наличии примесей судят по величине и интенсивности окраски пятен на хроматограмме. Примесь и основное вещество должны иметь разные значения  $R_f$ . Для полуколичественного определения содержания примеси на одном листе бумаги одновременно в одинаковых условиях получают хроматограмму испытуемого вещества, взятого в определенном количестве, и несколько хроматограмм стандартного образца, взятых в точно отмеренных количествах. Затем сравнивают между собой хроматограммы испытуемого и стандартного образцов. Заключение о количестве примеси делают по величине пятен и их интенсивности.

Количественное содержание вещества методом хроматографии на бумаге можно установить непосредственно на хроматограмме, используя, например, планиметрический, денситометрический, люминесцентный или другие методы. Для количественной оценки используют также способы, основанные на элюировании испытуемого вещества из вырезанного и измельченного участка хроматограммы. В элюате или в сухом остатке (после отгонки экстрагента) содержание испытуемого вещества определяют фотометрическим или электрохимическим методом.

### *Хроматография в тонком слое сорбента*

Данный метод отличается от хроматографии на бумаге тем, что процесс, протекающий при перемещении подвижной фазы, происходит на носителе (сорбенте), нанесенном тонким слоем на инертную поверхность. Твердый сорбент (неподвижная фаза) может быть закрепленным или не закрепленным на стеклянной пластинке. В качестве сорбента используют силикагель или оксид алюминия (квалификации "для хроматографии"). Для закрепления слоя добавляют небольшие количества сульфата кальция или крахмала. Для ТСХ используют также готовые стандартные пластинки с закрепленным слоем, выпускаемые промышленностью, типа "Силуфол УФ-254" размером 15 X 15, 20 X 20 см и др.

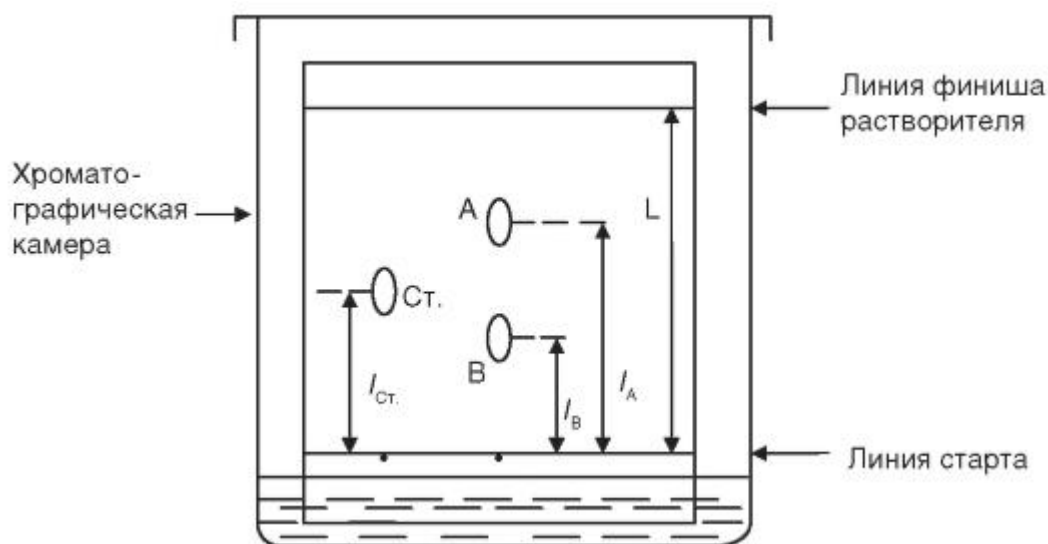


Рис.70. Схема разделения компонентов методом тонкослойной хроматографии.



Рис.71. Оборудование для тонкослойной хроматографии.

Преимуществами ТСХ являются простота приемов и оборудования, высокая чувствительность, широкий набор стандартизованных сорбентов, их устойчивость к температурным и химическим воздействиям, большие потенциальные возможности процессов разделения и детектирования, малая стоимость анализов, возможности проведения испытаний с лекарственными веществами, относящимися к любым классам соединений.

Метод ТСХ широко используется в теоретической и практической фармации для идентификации, обнаружения примесей, количественного определения не только конечных, но и промежуточных продуктов производства лекарств, а также оценки чистоты стандартных образцов лекарственных веществ.

## ***Газожидкостная (газовая) хроматография (ГЖХ)***

Метод основан на на распределении вещества между газовой и жидкой или твердой фазами.

Преимущество ГЖХ перед другими хроматографическими методами заключается в универсальности (можно разделять смеси газов, жидкостей и твердых веществ); способности разделять сложные смеси, содержащие до нескольких десятков компонентов; короткой продолжительности анализа (5—20 мин); достаточно высокой чувствительности (до  $10^{-13}$  г); малой величине анализируемой пробы (до  $10^{-4}$  г); сравнительно небольшой относительной ошибке (1—1,5%), которая может быть уменьшена (до 0,01—0,02%) при использовании интеграторов; простоте конструкции и надежности эксплуатации газовых хроматографов, Эти достоинства способствовали активному внедрению ГЖХ в практику анализа лекарственных веществ с различными физическими свойствами.

**Прибор для ГЖХ** — газовый хроматограф — включает систему измерения и регулирования скорости потока газа-носителя, систему ввода пробы испытуемого образца, газохроматографическую колонку, систему термостатирования и контроля температуры в различных узлах прибора и систему детектирования, регистрации и обработки полученной на приборе информации.



Рис.72. Газожидкостный хроматограф.

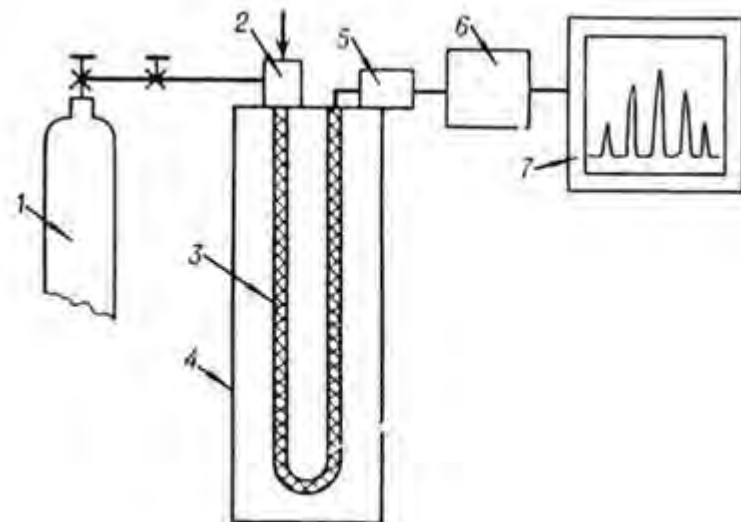


Рис.73. Принципиальная схема газового хроматографа:

- 1-баллон с инертным газом;
- 2-устройство для ввода пробы в хроматографическую колонку;
- 3-хроматографическая колонка;
- 4-термостат;
- 5-детектор;
- 6-преобразователь сигналов;
- 7-регистратор.

Газ-носитель поступает в хроматограф из баллона через редуктор. Система ввода анализируемой пробы включает испаритель и мембрану из термостойкой резины, расположенной на вводе. Объем пробы жидкости составляет 0,1—1 мкл, а газа — от 0,5 до 5 мл. Колонка для ГЖХ представляет собой трубку (прямую или спиральную), изготовленную из нержавеющей стали или стекла, с внутренним диаметром 0,6—5 мм и длиной от 1 до 3 м. Твердый носитель служит для удерживания тонкой пленки неподвижной жидкой фазы. Готовят твердые Носители из материалов на основе кремнезема — диатомита или ки- зельгура, фтор углеродных полимеров, полистирола и др. В качестве неподвижной жидкой фазы используют высококипящую жидкость — это углеводороды или их смеси, простые и сложные эфиры, полифенолы, амины, жирные кислоты и др. Испытуемое вещество (смесь) вводят в поток газа-носителя, где оно испаряется, и в виде пара проходит через колонку с сорбентом, распределяясь между газовой и жидкой или газовой и твердой фазами. Разделенные вещества элюируются из колонки газом-носителем, регистрируются детектором и фиксируются на хроматограмме в виде пиков. Наиболее часто используют детектор по теплопроводности и пламенно-ионизационный, а также термоионный и электрозахватный. Действие детектора основано на измерении

теплопроводности газа-носителя в присутствии других веществ, а пламенно-ионизационного — на измерении тока насыщения ионизированной газовой смеси в зависимости от ее состава. Термоионный и электрозахватный детекторы более селективны и чувствительны.

**Метод ГЖХ** может быть использован для **испытаний подлинности** лекарственных веществ. С этой целью применяют либо способ, основанный на использовании веществ-свидетелей, либо метод относительных удерживаний. В первом случае после анализа исследуемого образца в идентичных условиях хроматографируют вещества-свидетели, которые могут содержаться в испытуемом объекте. Если времена удерживания свидетеля и какого-либо компонента в испытуемом образце совпадают, то это может служить доказательством идентичности данных веществ. При испытании подлинности методом относительных удерживаний к пробе прибавляют определенное количество вещества-свидетеля. Затем анализируют по рекомендуемой методике и рассчитывают по формуле величину относительного удерживания, которая является постоянной для вещества в конкретных условиях выполнения анализа.

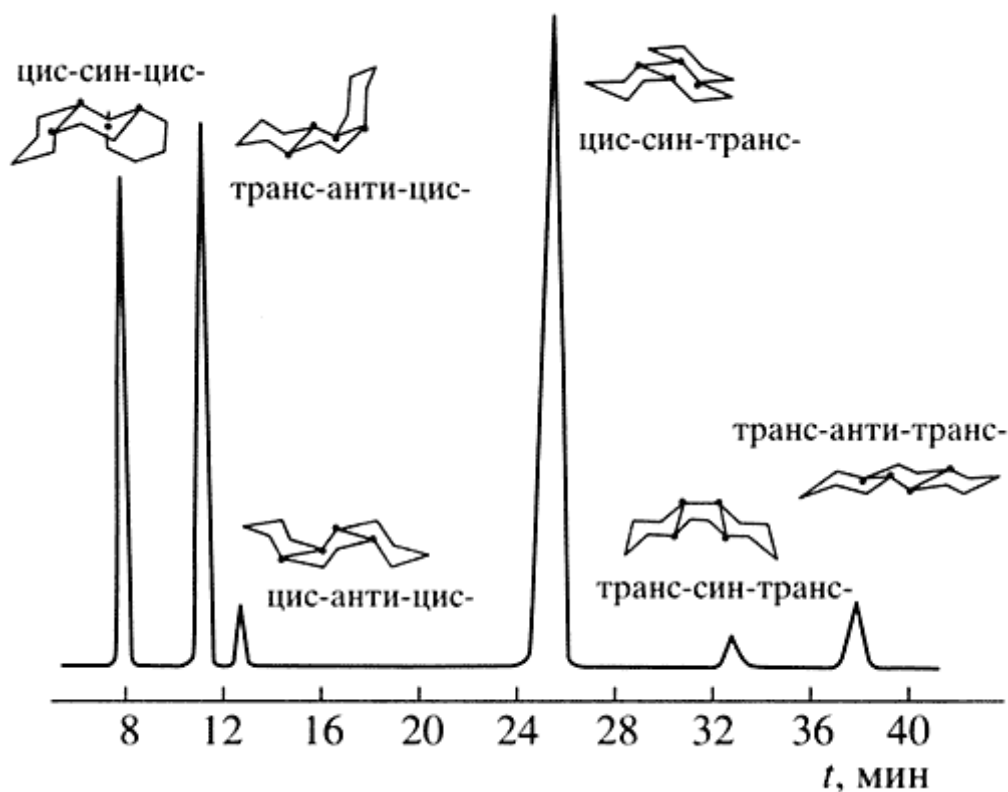


Рис.74.Хроматограмма разделения пространственных изомеров пергидрофенантрена на капиллярной набивной колонке.

Количественный ГЖХ анализ лекарственных веществ выполняют в тех же условиях, что и качественный. Для расчетов количественного содержания используют такие

параметры, как площадь или высота пиков веществ. Площадь пика на хроматограмме можно установить с помощью планиметра, интегратора или умножением высоты пика на его полуширину (ширину, измеренную на половине высоты).

**Для количественного ГЖХ анализа используют такие методы, как метод абсолютной градуировки, метод внутренней нормализации и метод внутреннего стандарта.** Сущность **метода абсолютной градуировки** заключается в установлении зависимости между количеством введенного в хроматограф вещества и высотой (или площадью) пика. При использовании **метода внутренней нормализации** сумму площадей пиков приводят к 100%, а затем вычисляют содержание каждого из них. Применение **метода внутреннего стандарта** основано на сравнении высоты или площади пика анализируемого и стандартного вещества, введенного в пробу в определенном количестве.

В приборах для ВЭЖХ используют спектрофотометрический, рефрактометрический, флуориметрический, пламенно-ионизационный, масс-спектрометрический, электрохимический и другие детекторы. Чаще всего детектором является спектрофотометр с переменной (190—900 нм) длиной волны.

Адсорбентом обычно служит силикагель либо с гидроксильной поверхностью, либо с привитыми к поверхности различными функциональными группами. В качестве элюента используют различные углеводороды, добавляя к ним небольшие количества этанола или других растворителей. В обращенно-фазной ВЭЖХ колонки заполняют силикагелем с привитыми гидрофобными группами, а в качестве элюента берут водные растворы низших спиртов или ацетонитрил. В тех же условиях применяют ионпарную ВЭЖХ для разделения органических кислот, оснований и их солей, но в этом случае к элюенту добавляют ионные соединения, анион или катион которых содержит гидрофобную группу. Ионообменную ВЭЖХ применяют для разделения органических катионов и анионов, используя в качестве адсорбентов соединения, содержащие сульфогруппы, карбоксильные или аминоксильные группы разной основности. Элюентами служат водные буферные растворы с различным рН.

**Метод ВЭЖХ** успешно применен для качественной и количественной оценки ряда наркотических, ядовитых и сильнодействующих лекарственных веществ. С этой целью перспективно использование таких параметров, как время удерживания, коэффициент емкости, интегральные спектральные отношения (А.Х.Лайпанов). В нашей стране метод ВЭЖХ рекомендован во всех ФС, разработанных на стандартные образцы антибиотиков. В Фармакопее США (XII издание) метод ВЭЖХ применен для анализа большинства антибиотиков противоопухолевого действия и цефалоспоринового ряда.



Рис.75. ВЭЖХ-хроматограф.

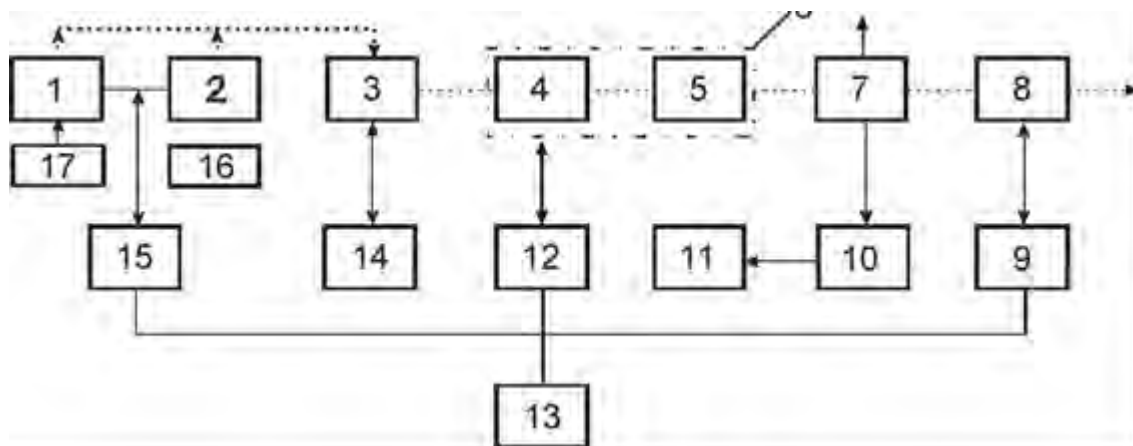


Рис.76. Схема высокоэффективного жидкостного хроматографа:

1, 2 - насосы, 3 - дозатор, 4 - предколонка, 5 - колонка, 6 - термостат колонки, 7 - детектор, 8 - коллектор фракций, 9 - блок управления коллектором, 10 - интегратор, 11 - регистратор, 12 - блок регулирования температуры, 13 - микропроцессор, 14 - блок автоматики ввода пробы, 15 - блок управления градиентного элюирования, 16, 17 - резервуары с растворителем. Сплошная линия - электрический кабель, пунктир - поток растворителя.

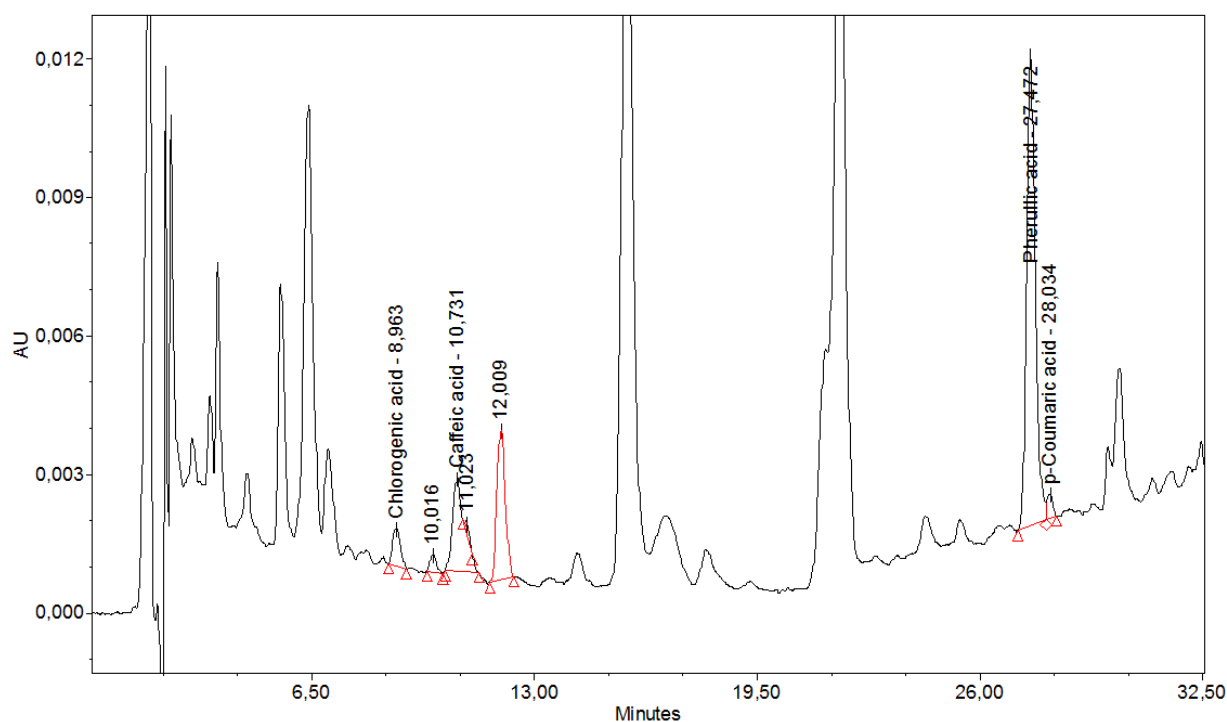


Рис.77. Хроматограмма (ВЭЖХ) экстракционного препарата из свежей травы эхинацеи пурпурной.

Ряд преимуществ по сравнению с ГЖХ и ВЭЖХ имеет занимающая промежуточное положение между этими методами сверхкритическая **флюидная хроматография**. Преимущества метода заключаются в возможности разделения неустойчивых и нелетучих веществ, универсальном детектировании и высокой экспрессности. Так, например, сочетание сверхкритической флюидной хроматографии с УФ-детектором позволяет детектировать 40 алкалоидов в одном растении.

### **Эксклюзионная хроматография**

**Гель-фильтрация, молекулярно-ситовая фильтрация, гельпроникающая хроматография)** — вид жидкостной распределительной хроматографии, в процессе которой разделение происходит по размерам молекул. В гель-фильтрации элюентом служит вода, а в гельпроникающей хроматографии — органический растворитель. Неподвижной фазой являются пористые материалы с определенным узким распределением пор по диаметру. Исследуемое вещество, диаметр которого превышает диаметр пор, не может диффундировать внутрь таких сорбентов. Поэтому оно проходит через колонку быстрее, чем молекулы с меньшим размером, которые проникают в поры. Таким образом обеспечивается разделение молекул в зависимости от их размера. Поры внутри геля заполнены жидкостью, которая занимает большую часть его объема. Применяют гели на основе декстрана, агарозы, полиакриламида. Метод может быть использован для

определения молекулярной массы, а также для исследования, очистки и разделения веществ с молекулярной массой  $10^2$ — $10^8$ . Осуществляют эксклюзионную хроматографию в жидкостных хроматографах.

Колонки заполняют различными сорбентами: мягкими (сефадексы), полужесткими (полиакриламидные гели), жесткими (пористые стекла). Детектором служит проточный рефрактометр или спектрофотометр. В отличие от других видов хроматографии на выполнение испытания требуются небольшие затраты времени.

Количественное содержание каждого компонента смеси можно установить используя метод внутреннего стандарта или абсолютной калибровки, т.е. так же, как в ГЖХ. Время выхода каждого компонента из колонки в идентичных условиях разделения является постоянной величиной и может служить для идентификации вещества. Площадь пика пропорциональна количеству компонента и поэтому используется для определения его содержания в смеси.

**Экстракционно - фотометрический метод** основан на образовании цветных продуктов, способных экстрагироваться каким-либо органическим растворителем. Этот метод используют для анализа многих препаратов и лекарственных форм. Метод включен в ГФ XI, зарубежные фармакопеи.

Для экстракционно-фотометрического определения алифатических, ароматических, гетероциклических азотсодержащих лекарственных веществ используют различные группы кислотных красителей: азокрасители (метиловый оранжевый, магнезон ИРЕА, кислотный хром темно-синий, тропеолин 00), сульфоталеиновые красители (бромфеноловый синий, бромтимоловый синий, бромкрезоловый зеленый, бромкрезоловый пурпуровый, тимоловый синий, пирокатехиновый фиолетовый, ксиленоловый оранжевый), оксиксантеновые красители (эозин, эритрозин, флоксин, бенгальский розовый А и Б). Указанные красители образуют с азотсодержащими соединениями и их солями окрашенные комплексы или ионные ассоциаты, растворы которых отличаются высокими значениями молярных коэффициентов поглощения, что позволяет определять малые количества веществ. Окрашенные вещества экстрагируют в органическую фазу (обычно в хлороформ) и измеряют оптическую плотность с помощью спектрофотометра или фотоколориметра.

Чаще всего измеряют оптическую плотность раствора ионного ассоциата в органическом растворителе. Но в ряде случаев полученный ассоциат разрушают введением кислоты в органическую фазу или путем рекстракции красителя водными растворами кислот или оснований, а затем измеряют абсорбцию свободного красителя. Анализ выполняют при оптимальном значении рН водной среды, которую устанавливают

экспериментально для каждого испытуемого препарата. Наряду со стехиометрическим вариантом экстракционно-фотометрического метода применяют также субстехиометрический, сущность которого состоит в однократном экстрагировании ионного ассоциата, что в значительной степени упрощает методику выполнения анализа и сокращает время его выполнения.

### *Вопросы для самоконтроля*

1. Чем обусловлена необходимость объединения в одной общей статье ГФ XI (ГФ X) методик испытания подлинности анионов и катионов?
2. Какие реактивы являются групповыми при определении катионов и анионов в неорганических препаратах?
3. С помощью каких химических реакций можно отличить галогенид-ионы друг от друга?
4. Какова окраска образующихся при испытании подлинности осадков сульфидов висмута, ртути (II), железа (II), цинка?
5. Растворы нитратов и нитритов дают одинаковую окраску с раствором дифениламина. С помощью какого реактива можно различить эти анионы?
6. Фосфаты, иодиды, бромиды образуют желтые осадки при взаимодействии с раствором нитрата серебра. Какими химическими реакциями можно различить указанные анионы?
7. С помощью каких химических реакций можно отличить растворы карбонатов от гидрокарбонатов?
8. Какими химическими реакциями можно отличить арсенаты от арсенитов?
9. Какие химические реакции происходят при выполнении реакции образования «серебряного зеркала»?
10. Какие анионы и катионы можно обнаружить с помощью окислительно-восстановительных реакций? Какие реактивы при этом используются?
11. Какие катионы и анионы идентифицируют с помощью реакций. Какие катионы и анионы идентифицируют с помощью реакций осаждения? Какие реактивы используются для этой цели?
12. Какие катионы можно открыть по окрашиванию бесцветного пламени? Какова методика этого испытания?
13. Какие катионы из числа объектов исследования и с какими реактивами образуют белые осадки?
14. При добавлении нитрата серебра к двум растворам неорганических препаратов неизвестного состава в обоих случаях выпали белые осадки. Один осадок растворился при

добавлении азотной кислоты, а другой — при добавлении раствора аммиака. Какие анионы могли быть в этих растворах?

15. К растворам препаратов железа (II) сульфату, висмута нитрату основному, магния сульфату, ртути дихлориду, серебра нитрату, цинка сульфату добавлен раствор гидроксида натрия. Какое окрашивание имели выпавшие осадки?

16. К трем растворам различных препаратов добавлен один реактив - сульфид натрия. В первом растворе выпал черный осадок, во втором — коричнево-черный, в третьем — белый. Наличие каких катионов могло вызвать появление этих осадков? Какие лекарственные препараты содержат эти катионы?

17. При добавлении к водному раствору неизвестного препарата нитрата серебра наблюдалось выпадение осадка желтого цвета. Было высказано предположение о наличии в растворе фосфатов, арсенитов, йодидов или бромидов. Каким путем можно уточнить анион, имеющийся в растворе? Какими дополнительными реакциями это можно подтвердить?

### **Тестовые вопросы по хроматографическим методам анализа:**

- 1) Метод ВЭЖХ основан на
  - a) различной адсорбции компонентов смеси на твёрдом сорбенте;
  - b) различном распределении компонентов между двумя жидкими фазами при прохождении одной из них через колонку под давлением;
  - c) различном распределении компонентов смеси между потоком газа-носителя и твёрдым сорбентом, находящимся в колонке.
- 2) Выберите блок-схему хроматографа в методе ВЭЖХ
  - a) сосуд для подвижной фазы, насос, фильтр, термостат, инжектор, колонка, детектор, самописец;
  - b) баллон с газом-носителем, испаритель, термостат, инжектор, колонка, детектор, самописец;
  - c) сосуд для неподвижной фазы, термостат, устройство для ввода пробы, колонка, детектор, самописец;
  - d) баллон с газом-носителем, инжектор, испаритель, насос, колонка, детектор, самописец.
- 3) Закончите формулировку: дозировку пробы осуществляют
  - a) шприцем;
  - b) автоматическим дозатором;

- c) микропипеткой;
- 4) Укажите сорбент, применяемый в ВЭЖХ
- a) активированный уголь;
  - b) силасорб;
  - c) полисорб;
  - d) сепарон.
- 5) Укажите материал, из которого изготавливают колонки для ВЭЖХ
- a) стекло;
  - b) нержавеющая сталь;
  - c) алюминий;
  - d) тефлон.
- 6) Укажите принцип, на котором основана работа рефрактометрического детектора
- a) излучение света;
  - b) люминесценция определяемых веществ;
  - c) поглощение света;
  - d) преломление света.
- 7) Закончите формулировку: работа спектрофотометрического детектора основана на
- a) излучении света;
  - b) люминесценции определяемых веществ;
  - c) поглощении света;
  - d) преломлении света.
- 8) Какой блок жидкостного хроматографа оказывает наибольшее влияние на эффективность разделения компонентов?
- a) дозатор;
  - b) насос;
  - c) детектор;
  - d) колонка.
- 9) Как проводят идентификацию веществ?
- a) по температуре кипения и диэлектрической проницаемости;
  - b) по площади хроматографического пика;
  - c) по времени удерживания, исследованию зон в колонке методами спектрального или химического анализа;
  - d) подключением спектрального анализатора к колонке.

- 10) Закончите формулировку: количественный анализ включает
- a) ввод пробы, расчет времени удерживания;
  - b) разделение, расчет состава смеси;
  - c) градуировку прибора, разделение, измерение площади пиков;
  - d) ввод пробы, разделение, расчет индекса удерживания.

## **Биологические методы контроля**

### **Аномальная токсичность**

#### **Основной тест**

Испытание проводят на 5 здоровых белых мышах обоего пола массой 19-21 г, которые ранее не использовались в экспериментах. Условия содержания и кормления должны обеспечивать нормальную жизнедеятельность животных.

Испытуемое лекарственное средство растворяют или разводят, в случае необходимости, раствором натрия хлорида 0,9% для инъекций. Тест-доза должна содержаться в объеме 0,5 мл испытуемого раствора, подогретого до 37 град. С, который вводят в хвостовую вену животного со скоростью 0,1 мл в секунду. Тест-дозу указывают в частной фармакопейной статье. Период наблюдения за животными составляет 48 ч.

Если в частной фармакопейной статье даны иные указания, то следуют им.

Лекарственное средство выдерживает испытание, если в течение предусмотренного срока наблюдения не погибнет ни одна из подопытных мышей.

Лекарственное средство не выдерживает испытание, если в течение предусмотренного срока наблюдения погибнет более чем одно животное.

В случае гибели одного животного, эксперимент повторяют на 5 мышах массой 20,0 +/- 0,5 г. Если при повторном испытании не погибнет ни одна мышь, лекарственное средство выдерживает испытание.

### **Пирогенность**

Испытание на пирогенность инъекционных растворов и субстанций, из которых они изготавливаются, основано на измерении температуры тела у кроликов до и после инъекции.



Рис.79. Испытания на пирогенность.

## **Проведение испытания**

Испытание лекарственного средства проводят на группе из трех кроликов с исходной температурой 38,5-39,5 град. С.

Перед опытом, с интервалом не менее 30 мин., у каждого кролика дважды измеряют температуру тела. Различия в показаниях температуры у одного и того же животного не должны превышать 0,2 град. С. В противном случае кролика исключают из испытания. За исходную температуру принимают величину последнего результата измерения.

Раствор испытуемого лекарственного средства вводят животным сразу после второго измерения температуры.

Измерения температуры после внутривенного введения испытуемого лекарственного средства проводят с интервалом не более 30 мин. на протяжении трех часов. При других путях парентерального введения - на протяжении пяти часов.

## **Стерильность**

Лекарственные средства для инъекций и инфузий, глазные капли, мази, пленки и другие препараты и субстанции, в отношении которых имеются соответствующие указания в документации, должны быть стерильными, то есть не содержать микроорганизмов.

Методы контроля стерильности применяют для испытания всех лекарственных средств независимо от их природы и лекарственной формы.

### **1. Условия проведения испытания**

Испытание на стерильность проводят в асептических условиях, чтобы избежать микробной контаминации во время посева, используя, например, ламинар-бокс класса А, расположенный в зоне класса В, или изолятор. Можно применять и другие меры, предотвращающие контаминацию, при условии, что они не оказывают пагубное влияние на микроорганизмы, которые могут содержаться в исследуемых образцах. Условия проведения испытания регулярно контролируют в соответствии с правилами GMP.



Рис.80. Условия проведения испытания.

### **2. Определение антимикробного действия**

До проведения испытания на стерильность следует определить, обладает ли исследуемый образец антимикробным действием, которое может существенно повлиять на результаты испытания.

Для этого готовят взвеси культур тест-микроорганизмов (табл. 31.4) с конечной концентрацией не более 100 колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1 мл. Испытание проводят дважды с каждым микроорганизмом в отдельности.

В пробирки с 10 мл питательной среды, рекомендованной для испытания, вносят по 1 мл приготовленной взвеси тест-микроорганизма.

Сравнивают рост тест-микроорганизмов в контрольных и опытных посевах при визуальном просмотре. Если результаты неодинаковые, то есть, в контроле наблюдают рост тест-микроорганизма, а в опыте рост отсутствует, считают, что исследуемый образец обладает бактериостатическим или фунгистатическим действием.

### **Метод мембранной фильтрации**

При определении стерильности лекарственных средств, обладающих выраженным антимикробным действием, и лекарственных средств в сосудах вместимостью более 100 мл, используют метод мембранной фильтрации. Исключение составляют лекарственные средства с антимикробным действием, нерастворимые в воде или изопропилмиристате.

Испытание проводят с использованием фильтрационной установки, которая должна быть смонтирована таким образом, чтобы исследуемый раствор (жидкость) можно было ввести и профильтровать в условиях асептики. После окончания фильтрации мембрану асептически переносят в 100 мл питательной среды. Испытания проводят под вакуумом 93,3 кПа (70 см рт. ст.) при скорости вытекания воды 55-75 мл в 1 мин.

### **Метод прямого посева**

Посевы инкубируют не менее 14 сут. при температуре (32,5 +/- 2,5) град. С на жидкой тиогликолевой среде и при температуре (22,5 +/- 2,5) град. С на жидкой соево-казеиновой среде или жидкой среде Сабуро (независимо от метода посева), периодически просматривая питательные среды.

Наличие роста микроорганизмов определяют визуально. Если исследуемый образец вызывает помутнение питательной среды и визуально нельзя определить наличие или отсутствие роста микроорганизмов, через 14 сут. после начала испытания переносят не менее 1 мл помутневшей среды в пробирки с той же стерильной средой. Инкубируют исходные и повторные посевы. Общее время инкубации должно составлять не менее чем 14 + 4 сут. от начала испытания.



Рис.81.Метод прямого посева.

### **Интерпретация результатов испытания**

При отсутствии роста микроорганизмов считают, что исследуемый образец соответствует требованиям испытания.

При наличии роста микроорганизмов, наблюдаемом визуально и подтверждаемом микроскопическим исследованием, считают, что исследуемый образец не соответствует требованиям испытания на стерильность, если не доказана недостоверность испытания, вызванная причинами, не связанными с исследуемым образцом. **Результаты испытания могут быть признаны недостоверными в случае, если выполняется одно или несколько условий:**

- 1)** получены неудовлетворительные результаты микробиологического контроля окружающей среды в ходе проведения испытания;
- 2)** выявлены ошибки, допущенные в ходе испытания;
- 3)** обнаружен рост микроорганизмов в отрицательном контроле;
- 4)** после идентификации микроорганизмов, выделенных из исследуемого образца, однозначно признано, что причиной возникновения роста этого вида или видов являются материалы и/или технические приемы, использованные при испытании;
- 5)** если питательная среда нестерильна и/или ее ростовые свойства неудовлетворительны.

Если результаты испытания признаны недостоверными, его повторяют на том же количестве образцов, что и первоначально.

Если в результате повторного испытания не обнаруживают роста микроорганизмов, считают, что препарат выдерживает испытание на стерильность.

Если в результате повторного испытания обнаруживают рост микроорганизмов, считают, что препарат не выдерживает испытание на стерильность.

## **Бактериальные эндотоксины**

Определение содержания бактериальных эндотоксинов проводят с помощью реактива, представляющего собой лизат клеток крови (амебоцитов) мечехвоста *Limulus polyphemus* (ЛАЛ-реактив) или *Tachypleus tridentatus* (ТАЛ-реактив). В результате реакции с эндотоксином происходит помутнение реакционной смеси и увеличение ее вязкости вплоть до формирования плотного геля, образование которого служит индикатором наличия в пробе бактериальных эндотоксинов. Проводимый таким образом анализ называется гель-тромб тест. Этот метод может быть использован для определения соответствия содержания бактериальных эндотоксинов предельному содержанию бактериальных эндотоксинов, указанному в частной фармакопейной статье («Метод А. Качественный анализ»), и для определения содержания бактериальных эндотоксинов в испытуемом лекарственном средстве («Метод В. Количественный анализ»).

Качественный анализ является основным методом проведения анализа на соответствие показателю «Бактериальные эндотоксины». Этот же метод является арбитражным.

## **Микробиологическая чистота**

Нестерильные лекарственные средства (субстанции, различные формы препаратов - таблетки, капсулы, гранулы, растворы, суспензии, сиропы, мази, суппозитории и др., а также вспомогательные вещества) могут быть контаминированы микроорганизмами. В них допускается наличие лимитированного количества микроорганизмов, при отсутствии определенных видов бактерий, представляющих опасность для здоровья человека.

Приведенные в приложении методы определения микробиологической чистоты распространяются на нестерильные лекарственные средства (субстанции и препараты), вспомогательные вещества и полупродукты, а также используются при определении эффективности антимикробных консервантов и мониторинге производственных помещений фармацевтических предприятий и лабораторий контрольных служб.



Рис.84. Микробиологические испытания.

## **Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар**

Определение антимикробной активности антибиотиков основано на их способности угнетать рост микроорганизмов. Определение проводят методом диффузии в агар на плотной питательной среде путем сравнения размеров зон угнетения роста тест-микробов, образующихся при испытании растворов определенных концентраций Государственного стандартного образца <\*> и испытуемого препарата.

Антимикробная активность антибиотиков выражается в единицах действия - ЕД или "мкг". Для большинства антибиотиков 1 ЕД или "мкг" соответствуют 1 мкг активного вещества (кислоты или основания); для антибиотиков, имеющих иное количественное выражение единицы, соответствующие указания даются в частных фармакопейных статьях.

При определении антимикробной активности антибиотиков используют стандартные образцы, активность которых, как правило, устанавливают в соответствии с Международными биологическими стандартами. При отсутствии последних для указанных целей могут быть использованы международные химические стандарты, антимикробную активность которых рассчитывают на основании показателей качества, установленных физико-химическими методами. Антимикробную активность стандартных образцов антибиотиков, не имеющих аналогов в международной коллекции стандартов, рассчитывают также на основании показателей качества, установленных физико-химическими методами.

Стандартные образцы антибиотиков хранятся и используются в соответствии с рекомендациями, указанными на этикетке стандартного образца.

Метод определения. Тест-микробы, растворители, буферные растворы, питательные среды и прочие условия проведения испытания указаны в табл..

В чашки Петри (стеклянные или пластмассовые), установленные на столиках со строго горизонтальной поверхностью, разливают расплавленные питательные среды определенного состава в один или два слоя. Для нижнего слоя используют незасеянные среды, для верхнего или одного слоя - агаровую среду, предварительно засеянную соответствующим тест-микробом. Если культура представляет собой суспензию вегетативных клеток, то температура расплавленной среды, в которую вносят тест-микроб, должна быть (49 +/-1) град. С, при использовании суспензии спор - 65-70 град. С. К среде следует добавить такое количество суспензии вегетативных клеток или спор, которое обеспечивает оптимальный рост тест-микроба и четкость зон угнетения его роста.



Рис. 85.Метод диффузии в агар.

## Вопросы для самоконтроля

1. ИСПЫТАНИЯ НА ПРИМЕСИ, КОТОРЫЕ В ДАННОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ РАСТВОРА ЛЕКАРСТВЕННОГО ВЕЩЕСТВА «НЕ ДОЛЖНЫ ОБНАРУЖИВАТЬСЯ» ПРОВОДЯТ СРАВНЕНИЕМ С
  - 1.растворителем;
  - 2.эталонным раствором на определяемую примесь;
  3. раствором препарата без основного реактива;
  4. водой очищенной;
  5. буферным раствором;
2. ОТСУТСТВИЕ ПРИМЕСИ ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В ВОДЕ ОЧИЩЕННОЙ УСТАНОВЛИВАЮТ ПО
  - 1.появлению синей окраски от прибавления раствора дифениламина;
  - 2.сохранению окраски раствора калия перманганата в среде кислоты серной;
  - 3.сохранению окраски раствора калия перманганата в среде кислоты хлороводородной;
  - 4.обесцвечиванию раствора калия перманганата в среде кислоты серной;
  - 5.обесцвечиванию раствора калия перманганата в среде кислоты хлороводородной.
3. ГФ XI РЕГЛАМЕНТИРУЕТ С ПОМОЩЬЮ СООТВЕТСТВУЮЩЕГО ЭТАЛОННОГО РАСТВОРА СОДЕРЖАНИЕ В ВОДЕ ОЧИЩЕННОЙ ИОНОВ
  - 1.хлорида;
  - 2.сульфата;
  - 3.кальция;
  - 4.аммония;
  - 5.тяжелых металлов.
4. ГФ РЕКОМЕНДУЕТ ОТКРЫВАТЬ ПРИМЕСЬ НИТРАТОВ И НИТРИТОВ В ВОДЕ ОЧИЩЕННОЙ ПО
  - 1.обесцвечиванию раствора калия перманганата;
  - 2.реакции с концентрированной кислотой серной;
  - 3.обесцвечиванию раствора калия перманганата в сернокислой среде;
  - 4.реакции с раствором дифениламина;
  - 5.реакции с раствором дифениламина в среде концентрированной кислоты серной.
5. ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ИСПЫТАНИЙ НА ХЛОРИД-ИОНЫ В ВОДЕ ОЧИЩЕННОЙ ОДНОВРЕМЕННО МОЖЕТ БЫТЬ ОБНАРУЖЕН
  - 1.бромид-ион;
  - 2.фосфат-ион;

3. сульфид-ион;
4. карбонат-ион;
5. гидрокарбонат-ион.

6. ХЛОРИД-ИОНЫ ОБНАРУЖИВАЮТ

1. раствором серебра нитрата водным;
2. раствором серебра нитрата в присутствии аммиака;
3. раствором серебра нитрата в присутствии кислоты азотной;
4. раствором серебра нитрата в присутствии кислоты серной;
5. нет верного ответа.

7. ОДИН ИЗ ПЕРЕЧИСЛЕННЫХ ИОНОВ ДАЕТ БЕЛЫЙ ОСАДОК С РАСТВОРОМ БАРИЯ ХЛОРИДА В ПРИСУТСТВИИ КИСЛОТЫ ХЛОРОВОДОРОДНОЙ

1. нитрат-ион;
2. сульфат-ион;
3. фосфат-ион;
4. сульфид-ион;
5. нет верного ответа.

8. СИНЕЕ ОКРАШИВАНИЕ РАСТВОРА В ПРИСУТСТВИИ АММИАКА ДАЕТ

1. ион серебра;
2. ион цинка;
3. ион железа;
4. ион меди;
5. нет верного ответа.

9. РОЗОВАЯ ОКРАСКА КАЛИЯ ПЕРМАНГАНАТА ИСЧЕЗАЕТ

1. в присутствии кислоты азотной;
2. в присутствии кислоты серной;
3. в присутствии натрия сульфата и кислоты серной;
4. в присутствии натрия нитрита и кислоты серной;
5. нет верного ответа.

10. ПЕРЕЧИСЛИТЕ ОСНОВНЫЕ ЗАДАЧИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ХИМИИ

- а) организация управления фармацевтической службы;
- б) поиск и создание лекарственных средств;
- в) изучение флоры лекарственных растений;
- г) изготовление лекарств аптечного и заводского производства;
- д) осуществление контроля качества лекарственных средств.

1. правильные ответы а, б;
2. правильные ответы б, в;
3. правильные ответы в, г;
4. правильные ответы б, д;
5. правильные ответы а, б, д.

#### 11. ЭФФЕКТИВНОСТЬ - ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

1. комплекс норм и методов анализ;
2. фармакологическое свойство, которое обеспечивает применение лекарственного средства;
3. отсутствие вредного воздействия на организм;
4. все ответы верны;
5. нет правильного ответа.

#### 12. БЕЗОПАСНОСТЬ - ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

1. комплекс норм и методов анализ;
2. фармакологическое свойство, которое обеспечивает применение лекарственного средства;
3. отсутствие вредного воздействия на организм;
4. все ответы верны;
5. нет правильного ответа.

#### 13. СООТВЕТСТВИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НОРМАМ НТД

1. комплекс норм и методов анализа;
2. фармакологическое свойство, которое обеспечивает применение лекарственного средства;
3. отсутствие вредного воздействия на организм;
4. все ответы верны;
5. нет верного ответа.

#### 14. ПЕРЕЧИСЛИТЕ ФАКТОРЫ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА КАЧЕСТВО ЛЕКАРСТВЕННОГО ВЕЩЕСТВА

- а) температура;
- б) свет;
- в) влажность воздуха;
- г) кислород воздуха;
- д) углекислый газ воздуха.

1. правильные ответы а, б, в;

2. правильные ответы б, в, г;
3. правильные ответы а, в, г, д;
4. правильные ответы б, в, г, д;
5. все ответы верны.

15. ПЕРЕЧИСЛИТЕ ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВ

- а) разработка методик анализа новых лекарственных средств;
- б) совершенствование известных методик с учетом предъявляемых к ним требований;
- в) разработка методик анализа лекарственных веществ в новых лекарственных формах;
- г) изучение стабильности лекарств;
- д) совершенствование организации труда провизора-аналитика, его квалификация.

1. правильные ответы б, г, д;
2. правильные ответы а, б, в, д;
3. правильные ответы а, в, г, д;
4. правильные ответы б, в, д;
5. все ответы верны.

16. ПЕРЕЧИСЛИТЕ ТРЕБОВАНИЯ, ПРЕДЪЯВЛЯЕМЫЕ К МЕТОДИКАМ АНАЛИЗА

- а) воспроизводимость и правильность;
- б) чувствительность;
- в) избирательность (специфичность);
- г) унификация;
- д) определение фармакологически активного лекарственного вещества.

1. правильные ответы а, б, в, г;
2. правильные ответы а, б, г, д;
3. правильные ответы а, б, в, г, д;
4. правильные ответы а, в, г, д;
5. правильные ответы б, в, д.

17. ПЕРЕЧИСЛИТЕ ИСТОЧНИКИ ПРИМЕСЕЙ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

- а) аппаратура;
- б) сырье;
- в) растворители;

- г) продукты синтеза;
- д) продукты разложения.

1. правильные ответы б, г, д;
2. правильные ответы б, в, г, д;
3. правильные ответы а, б, в;
4. правильные ответы а, б, в, г;
5. правильные ответы а, б, в, г, д.

#### 18. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ - НАУКА, КОТОРАЯ БАЗИРУЯСЬ НА ОБЩИХ ЗАКОНАХ ХИМИЧЕСКИХ НАУК

1. разрабатывает способы получения лекарственных веществ, изучает их физические и химические свойства;
2. исследует взаимосвязь между химической структурой лекарственных веществ и их действием на организм;
3. разрабатывает методы контроля качества лекарств, исследует изменения, происходящие при их хранении;
4. изучает химический состав лекарственного растительного сырья;
5. нет верного ответа.

#### 19. ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ ИМЕЕТ ТЕСНУЮ СВЯЗЬ С ДРУГИМИ СПЕЦИАЛЬНЫМИ ДИСЦИПЛИНАМИ

1. фармакогнозией;
2. технологией лекарств;
3. фармакологией;
4. организацией и экономикой фармации;
5. все ответы верны.

#### 20. ИОН АММОНИЯ МОЖНО ОБНАРУЖИТЬ

1. раствором бария хлорида;
2. реактивом Несслера;
3. раствором калия йодида;
4. раствором калия перманганата;
5. нет верного ответа.

#### 21. ОДНО ИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ ХРАНЕНИИ РОЗОВЕЕТ ВСЛЕДСТВИЕ ОКИСЛЕНИЯ

1. резорцин;
2. натрия хлорид;

3. серебра нитрат;
4. бария сульфат для рентгеноскопии;
5. нет верного ответа.

22. ВНЕШНИЙ ВИД «РЕЗОРЦИНА» ИЗМЕНИЛСЯ ПРИ ХРАНЕНИИ ВСЛЕДСТВИЕ ОКИСЛЕНИЯ. МЕТОД ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОПУСТИМОГО ПРЕДЕЛА ИЗМЕНЕНИЯ ДАННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ВЕЩЕСТВА

1. определение pH;
2. определение степени мутности;
3. определение окраски;
4. определение золы;
5. нет верного ответа.

23. ОДНО ИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ НЕ МОЖЕТ БЫТЬ ИСПОЛЬЗОВАНО В КАЧЕСТВЕ И ЛС, И РЕАКТИВА, И ТИТРОВАННОГО РАСТВОРА

1. кислота хлороводородная;
2. калия перманганат;
3. раствор аммиака;
4. натрия нитрит;
5. нет верного ответа.

1. НАТРИЯ ТИОСУЛЬФАТ, НАТРИЯ НИТРИТ И НАТРИЯ ГИДРОКАРБОНАТ МОЖНО ДИФФЕРЕНЦИРОВАТЬ ОДНИМ РЕАГЕНТОМ

1. раствором йода;
2. раствором аммиака;
3. калия перманганатом;
4. нитратом серебра;
5. кислотой хлористоводородной.

2. ПРИМЕСЬ ЙОДИДОВ В ПРЕПАРАТАХ КАЛИЯ БРОМИД И НАТРИЯ БРОМИД ОПРЕДЕЛЯЮТ РЕАКЦИЕЙ С

1. нитратом серебра;
2. хлорамином;
3. концентрированной серной кислотой;
4. хлоридом железа (III) и крахмалом;
5. перманганатом калия.

3. НЕОБХОДИМЫМ УСЛОВИЕМ ТИТРОВАНИЯ ХЛОРИДОВ И БРОМИДОВ МЕТОДОМ МОРА ЯВЛЯЕТСЯ

1. кислая реакция среды;

2. щелочная реакция среды;
3. присутствие азотной кислоты;
4. реакция среды должна быть близка к нейтральной;
5. присутствие натрия карбоната.

4. ОКРАСКА РАСТВОРА В ТОЧКЕ ЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ПРИ КОМПЛЕКСНОМЕТРИЧЕСКОМ МЕТОДЕ (СПОСОБ ПРЯМОГО ТИТРОВАНИЯ) ОБУСЛОВЛЕНА ОБРАЗОВАНИЕМ

1. комплекса металла с эдта;
2. комплекса металла с индикатором;
3. свободного индикатора;
4. комплекса металла с буферным раствором;
5. комплекса индикатора с эдта.

5. ИЗМЕНЯЕТ ВНЕШНИЙ ВИД ПРИ ПРОКАЛИВАНИИ

1. натрия хлорид;
2. бария сульфат;
3. магния оксид;
4. висмута нитрат основной;
5. натрия гидрокарбонат.

6. В ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ ПРОЯВЛЯЕТ СВОЙСТВА КАК ОКИСЛИТЕЛЯ, ТАК И ВОССТАНОВИТЕЛЯ

1. калия иодид;
2. серебра нитрат;
3. водорода пероксид;
4. натрия бромид;
5. натрия тиосульфат.

7. ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С РАСТВОРОМ КАЛИЯ ИОДИДА ОБРАЗУЕТ ХАРАКТЕРНЫЙ ОСАДОК, РАСТВОРИМЫЙ В ИЗБЫТКЕ РЕАКТИВА

1. серебра нитрат;
2. меди сульфат;
3. свинца ацетат;
4. натрия нитрит;
5. висмута нитрат основной.

8. ОБЩИМ МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ РАСТВОРА ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА, НАТРИЯ НИТРИТА, ЖЕЛЕЗА (II) СУЛЬФАТА, ЖЕЛЕЗА ВОССТАНОВЛЕННОГО ЯВЛЯЕТСЯ

1. ацидиметрия;
2. алкалиметрия;
3. рефрактометрия;
4. комплексонометрия;
5. перманганатометрия.

9. ПРИМЕСЬ ТРЕХ ИОНОВ (БАРИЯ, КАЛЬЦИЯ, БРОМАТА) В ЛЕКАРСТВЕННОМ СРЕДСТВЕ “НАТРИЯ БРОМИД” МОЖНО ОБНАРУЖИТЬ РЕАКТИВОМ

1. кислотой серной;
2. раствором аммиака;
3. аммония оксалатом;
4. раствором натрия гидроксида;
5. кислотой хлороводородной.

10. ГФ XI В КАЧЕСТВЕ СТАБИЛИЗАТОРА РАСТВОРА ВОДОРОДА ПЕРОКСИДА ИСПОЛЬЗУЕТ

1. натрия бензоат;
2. кислоту бензойную;
3. натрия гидрокарбонат;
4. раствор натрия гидроксида;
5. кислоту хлороводородную.

11. ОТЛИЧИТЬ РАСТВОР НАТРИЯ ГИДРОКАРБОНАТА ОТ РАСТВОРА НАТРИЯ КАРБОНАТА МОЖНО ПО

1. индикатору лакмусу;
2. индикатору фенолфталеину;
3. индикатору метиловому красному;
4. реакции с кислотой уксусной;
5. реакции с минеральной кислотой.

12. ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ПРИМЕСИ ХЛОРИД-ИОНОВ В НАТРИЯ ТИОСУЛЬФАТЕ НЕОБХОДИМО ПРЕДВАРИТЕЛЬНО ПРОВЕСТИ РЕАКЦИЮ С

1. аммиаком;
2. натрием гидроксидом;
3. кислотой азотной;
4. кислотой уксусной;
5. кислотой хлороводородной.

13. ЛЕКАРСТВЕННОЕ ВЕЩЕСТВО, РАСТВОРИМОЕ И В КИСЛОТАХ, И В ЩЕЛОЧАХ

1. цинка оксид;

2. магния оксид;
3. лития карбонат;
4. висмута нитрат основной;
5. бария сульфат.

14. РАСТВОР НАТРИЯ ТИОСУЛЬФАТА ДЛЯ ИНЪЕКЦИЙ СТАБИЛИЗИРУЮТ С ПОМОЩЬЮ

1. натрия метабисульфита;
2. кислоты хлороводородной;
3. натрия гидроксида;
4. натрия гидрокарбоната;
5. натрия хлорида.

15. РЕАКЦИЯ СРЕДЫ, НЕОБХОДИМАЯ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ГАЛОГЕНИДОВ ПО МЕТОДУ МОРА

1. щелочная;
2. кислая;
3. сильно щелочная;
4. сильно кислая;
5. нейтральная.

16. КАЛЬЦИЯ ХЛОРИД ПО СВОИМ СВОЙСТВАМ – ЭТО

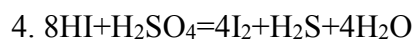
1. белый мелкий легкий порошок без запаха;
2. бесцветные призматические выветривающиеся кристаллы;
3. бесцветные кристаллы без запаха, горько-соленого вкуса, очень гигроскопичные, расплываются на воздухе;
4. белый или белый с желтоватым оттенком аморфный порошок;
5. блестящие игольчатые кристаллы.

17. НЕРАСТВОРИМЫ В ВОДЕ ПРЕПАРАТЫ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

1. натрия хлорида;
2. натрия тетрабората;
3. цинка оксида;
4. натрия йодида;
5. натрия тиосульфата.

18. ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ КАЛИЯ ЙОДИДА МОЖНО ИСПОЛЬЗОВАТЬ РЕАКЦИИ

1.  $KI + AgNO_3 = KNO_3 + AgI$
2.  $2NaNO_2 + 2KI + 2H_2SO_4 = I_2 + 2NO + 2Na_2SO_4 + 2H_2O$
3.  $2KI + Na_3[Co(NO_2)_6] = K_2Na[Co(NO_2)_6] + 2NaI$



5. все вышеперечисленные

19. УКАЖИТЕ МЕТОД АНАЛИЗА, КОТОРЫЙ ИСПОЛЬЗУЕТСЯ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАТРИЯ ТЕТРАБОРАТА ПО ГФ X

1. косвенная нейтрализация;
2. ацидиметрия в водной среде;
3. алкалиметрия;
4. ацидиметрия в водно-глицериновой среде;
5. аргентометрия.

20. ФАКТОР ЭКВИВАЛЕНТНОСТИ НАТРИЯ ТЕТРАБОРАТА ПРИ ТИТРОВАНИИ КИСЛОТОЙ ХЛОРОВОДОРОДНОЙ РАВЕН

1. 1;
2. 1/2;
3. 1/4;
4. 2;
5. 4.

21. ФАКТОР ЭКВИВАЛЕНТНОСТИ КАЛИЯ ПЕРМАНГАНАТА КАК ОКИСЛИТЕЛЯ В КИСЛОЙ СРЕДЕ РАВЕН

1. 1;
2. 1/2;
3. 1/4;
3. 1/5;
4. 1/6.

22. В АРГЕНТОМЕТРИИ (МЕТОД МОРА) В КАЧЕСТВЕ ИНДИКАТОРА ИСПОЛЬЗУЮТ

1. эриохром – черный т;
2. фенолфталеин;
3. флюоресцеин;
4. калия хромат;
5. калия дихромат

23. ХЛОРИД-ИОНЫ ОБНАРУЖИВАЮТ

1. раствором серебра нитрата водным;
2. раствором серебра нитрата в присутствии аммиака;
3. раствором серебра нитрата в присутствии кислоты азотной;
4. раствором серебра нитрата в присутствии кислоты серной;
5. нет верного ответа.

24. ОДИН ИЗ ПЕРЕЧИСЛЕННЫХ ИОНОВ ДАЕТ БЕЛЫЙ ОСАДОК С РАСТВОРОМ БАРИЯ ХЛОРИДА В ПРИСУТСТВИИ КИСЛОТЫ ХЛОРОВОДОРОДНОЙ

1. нитрат-ион;
2. сульфат-ион;
3. фосфат-ион;
4. сульфид-ион;
5. нет верного ответа.

25. СИНЕЕ ОКРАШИВАНИЕ РАСТВОРА В ПРИСУТСТВИИ АММИАКА ДАЕТ

1. ион серебра;
2. ион цинка;
3. ион железа;
4. ион меди;
5. нет верного ответа.

26. РОЗОВАЯ ОКРАСКА КАЛИЯ ПЕРМАНГАНАТА ИСЧЕЗАЕТ

1. в присутствии кислоты азотной;
2. в присутствии кислоты серной;
3. в присутствии натрия сульфата и кислоты серной;
4. в присутствии натрия нитрита и кислоты серной;
5. нет верного ответа.

27. ИЗ ПЕРЕЧИСЛЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ПРОЯВЛЯЮТ КАК ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ, ТАК И ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА

1. калия перманганат;
2. водорода пероксид;
3. натрия нитрит;
4. калия йодид;
5. нет верного ответа.

31. ОДНО ИЗ ПЕРЕЧИСЛЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ ХРАНЕНИИ ИЗМЕНЯЕТ ВНЕШНИЙ ВИД ВСЛЕДСТВИЕ ПОТЕРИ КРИСТАЛЛИЗАЦИОННОЙ ВОДЫ

1. кальция хлорид;
2. меди сульфат;
3. натрия йодид;
4. калия хлорид;
5. нет верного ответа.

32. ОДНИМ ИЗ ПЕРЕЧИСЛЕННЫХ РЕАКТИВОВ МОЖНО ОТКРЫТЬ ПРИМЕСЬ БРОМАТОВ В ЛС КАЛИЯ БРОМИД

1. серебра нитрат;
2. кислота серная;
3. бария хлорид;

4. аммония оксалат;
  5. нет верного ответа.
33. ГФ ТРЕБУЕТ ОПРЕДЕЛЯТЬ ЦВЕТНОСТЬ ЛС КАЛИЯ БРОМИД, ТАК КАК ДАННОЕ ВЕЩЕСТВО МОЖЕТ
1. восстанавливаться;
  2. окисляться;
  3. подвергаться гидролизу;
  4. взаимодействовать с углекислотой воздуха с образованием окрашенных продуктов;
  5. нет верного ответа.
34. ОДНИМ ИЗ ПЕРЕЧИСЛЕННЫХ РЕАКТИВОВ МОЖНО ОТКРЫТЬ ПРИМЕСЬ ЙОДАТОВ В ЛС КАЛИЯ ЙОДИД
1. аммония оксалат;
  2. натрия гидроксид;
  3. раствор аммиака;
  4. кислота хлороводородная;
  5. нет верного ответа.
35. ОКРАШЕННЫМ ЛЕКАРСТВЕННЫМ ВЕЩЕСТВОМ ЯВЛЯЕТСЯ
1. йод;
  2. калия хлорид;
  3. натрия хлорид;
  4. натрия йодид;
  5. нет верного ответа.
36. ПРИ ДОБАВЛЕНИИ К РАСТВОРУ ЛЕКАРСТВЕННОГО ВЕЩЕСТВА КИСЛОТЫ АЗОТНОЙ РАЗВЕДЕННОЙ И РАСТВОРА СЕРЕБРА НИТРАТА ОБРАЗУЕТСЯ БЕЛЫЙ ТВОРОЖИСТЫЙ ОСАДОК, РАСТВОРИМЫЙ В РАСТВОРЕ АММИАКА
1. натрия йодид;
  2. калия йодид;
  3. натрия хлорид;
  4. раствор йода спиртовый 5%;
  5. нет верного ответа.
37. ПРИ ДОБАВЛЕНИИ К РАСТВОРУ ЛЕКАРСТВЕННОГО ВЕЩЕСТВА РАСТВОРА ХЛОРАМИНА В ПРИСУТСТВИИ КИСЛОТЫ ХЛОРОВОДОРОДНОЙ И ХЛОРОФОРМА (ПРИ ВЗБАЛТЫВАНИИ) ХЛОРОФОРМНЫЙ СЛОЙ ОКРАШИВАЕТСЯ В ЖЕЛТО-БУРЫЙ ЦВЕТ
1. калия йодид;
  2. натрия хлорид;
  3. натрия фторид;
  4. натрия бромид;
  5. нет верного ответа.

38. ПРИ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ КИСЛОТЫ ХЛОРИСТОВОДОРОДНОЙ РАЗВЕДЕННОЙ С МАРГАНЦА (IV) ОКСИДОМ ВЫДЕЛЯЕТСЯ

1. кислород;
2. хлор;
3. хлора (I) оксид;
4. хлора (VII) оксид;
5. нет верного ответа.

39. ПРИМЕСЬ ЙОДИДОВ В ПРЕПАРАТАХ КАЛИЯ БРОМИД И НАТРИЯ БРОМИД ОПРЕДЕЛЯЮТ РЕАКЦИЕЙ С

1. серебра нитратом;
2. хлорамином;
3. кислотой серной концентрированной;
4. железа (III) хлоридом;
5. нет верного ответа.

40. В ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ ПРОЯВЛЯЮТ СВОЙСТВА КАК ОКИСЛИТЕЛЯ, ТАК И ВОССТАНОВИТЕЛЯ

1. калия йодид;
2. натрия нитрит;
3. раствор водорода пероксида;
4. натрия хлорид;
5. верно 2 и 3.

41. ПРИ ДОБАВЛЕНИИ РАСТВОРОВ КИСЛОТЫ ВИННОКАМЕННОЙ И НАТРИЯ АЦЕТАТА К РАСТВОРУ КАКОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО ВЕЩЕСТВА ПОСТЕПЕННО ВЫПАДАЕТ БЕЛЫЙ КРИСТАЛЛИЧЕСКИЙ ОСАДОК, РАСТВОРИМЫЙ В РАЗВЕДЕННЫХ МИНЕРАЛЬНЫХ КИСЛОТАХ И ЩЕЛОЧАХ

1. калия хлорида;
2. натрия фторида;
3. кислоты хлористоводородной разведенной;
4. натрия бромид;
5. нет верного ответа.

42. ОТ ПРИБАВЛЕНИЯ К ПОДКИСЛЕННОМУ РАСТВОРУ КАЛИЯ БРОМИДА НЕСКОЛЬКИХ КАПЕЛЬ РАСТВОРА ЖЕЛЕЗА (III) ХЛОРИДА И РАСТВОРА КРАХМАЛА ПОЯВЛЯЕТСЯ СИНЕЕ ОКРАШИВАНИЕ. ЭТО СВИДЕТЕЛЬСТВУЕТ О НАЛИЧИИ В ЛЕКАРСТВЕННОМ СРЕДСТВЕ ПРИМЕСИ

1. сульфатов;
2. йодидов;
3. броматов;
4. хлоридов;
5. нет верного ответа.

43. ОТ ПРИБАВЛЕНИЯ К РАСТВОРУ НАТРИЯ БРОМИДА КИСЛОТЫ СЕРНОЙ КОНЦЕНТРИРОВАННОЙ РАСТВОР ОКРАШИВАЕТСЯ В ЖЕЛТЫЙ ЦВЕТ. ЭТО СВИДЕТЕЛЬСТВУЕТ О НАЛИЧИИ ПРИМЕСИ

1. броматов;
  2. йодидов;
  3. сульфатов;
  4. хлоридов;
  5. нет верного ответа.
44. ОТ ПРИБАВЛЕНИЯ К РАСТВОРУ КАЛИЯ ХЛОРИДА КИСЛОТЫ СЕРНОЙ РАЗВЕДЕННОЙ НАБЛЮДАЕТСЯ ПОМУТНЕНИЕ. ЭТО СВИДЕТЕЛЬСТВУЕТ О НАЛИЧИИ В ЛС СЛЕДУЮЩЕЙ ПРИМЕСИ
1. солей бария;
  2. солей железа;
  3. солей аммония;
  4. хлоридов;
  5. нет верного ответа.
45. К РАСТВОРУ ЛС ПРИБАВЛЯЮТ РАСТВОР ЙОДИДА КАЛИЯ И ТИТРУЮТ РАСТВОРОМ НАТРИЯ ТИОСУЛЬФАТА ДО ОБЕСЦВЕЧИВАНИЯ БЕЗ ИНДИКАТОРА. ЭТО МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
1. раствора йода спиртового 10%;
  2. кислоты хлористоводородной разведенной;
  3. натрия хлорида;
  4. натрия бромиды;
  5. нет верного ответа.
46. К РАСТВОРУ ЛЕКАРСТВЕННОГО ВЕЩЕСТВА ДОБАВЛЯЮТ УКСУСНЫЙ АНГИДРИД, КИПЯТЯТ, ОХЛАЖДАЮТ И ТИТРУЮТ КИСЛОТОЙ ХЛОРНОЙ. ЭТО МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
1. натрия хлорида;
  2. натрия фторида;
  3. натрия бромиды;
  4. натрия йодида;
  5. нет верного ответа.
47. ЩЕЛОЧНУЮ РЕАКЦИЮ СРЕДЫ ВОДНОГО РАСТВОРА ИМЕЮТ
1. натрия хлорид;
  2. магния сульфат;
  3. натрия тетраборат;
  4. натрия гидрокарбонат;
  5. нет верного ответа.
48. ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ МЕДИ СУЛЬФАТА, МАГНИЯ СУЛЬФАТА, НАТРИЯ ТЕТРАБОРАТА, ЦИНКА СУЛЬФАТА ЗАВЫШЕННЫЙ РЕЗУЛЬТАТ МОЖЕТ БЫТЬ ПОЛУЧЕН ВСЛЕДСТВИЕ
1. поглощения влаги;
  2. потери кристаллизационной воды;
  3. гидролиза;

4. поглощения диоксида углерода;
5. нет верного ответа.

49. ВЫДЕЛЕНИЕ ПУЗЫРЬКОВ ГАЗА НАБЛЮДАЮТ ПРИ ДОБАВЛЕНИИ КИСЛОТЫ ХЛОРОВОДОРОДНОЙ К

1. лития карбонату;
2. магния сульфату;
3. натрия тетраборату;
4. раствору водорода пероксида;
5. нет верного ответа.

50. ПРИМЕСЬ МИНЕРАЛЬНЫХ КИСЛОТ В КИСЛОТЕ БОРНОЙ МОЖНО ОПРЕДЕЛИТЬ ПО

1. фенолфталеину;
2. лакмусу красному;
3. метиловому оранжевому;
4. лакмусу синему;
5. верно 3 и 4.

51. КОЛИЧЕСТВО ПРИМЕСИ КАРБОНАТОВ ВНАТРИЯ ГИДРОКАРБОНАТЕ УСТАНАВЛИВАЮТ

1. титрованием кислотой;
2. по реакции с насыщенным раствором магния сульфата;
3. по окраске фенолфталеина;
4. прокаливанием;
5. нет верного ответа.

52. БАРИЯ СУЛЬФАТ ДЛЯ РЕНТГЕНОСКОПИИ

1. растворим в кислоте хлороводородной;
2. растворим в щелочах;
3. растворим в аммиаке;
4. нерастворим в воде, кислотах и щелочах;
5. нет верного ответа.

53. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ НАТРИЯ ГИДРОКАРБОНАТА ПРОВОДЯТ МЕТОДОМ

1. алкалиметрии;
2. ацидиметрии (прямое титрование);
3. ацидиметрии (обратное титрование);
4. комплексонометрии;
5. нет верного ответа.

54. ПРИ РАСТВОРЕНИИ В ВОДЕ ПОДВЕРГАЮТСЯ ГИДРОЛИЗУ

1. натрия нитрит;
2. кальция хлорид;

3. натрия гидрокарбонат;
  4. натрия тетраборат;
  5. верно 1 и 4.
55. КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЦИДИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ (ОБРАТНОЕ ТИТРОВАНИЕ) ПРОВОДЯТ ДЛЯ
1. натрия тетрабората;
  2. натрия гидрокарбоната;
  3. лития карбоната;
  4. натрия нитрита;
  5. нет верного ответа.
56. В ПРЕПАРАТАХ КАЛЬЦИЯ КАТИОН  $Ca^{2+}$  МОЖНО ДОКАЗАТЬ ПО
1. окрашиванию пламени;
  2. реакции с аммиаком;
  3. реакции с аммония оксалатом;
  4. реакции с кислотой хлороводородной;
  5. верно 1 и 3.
57. ОБЩИМИ РЕАКЦИЯМИ НА ПРЕПАРАТЫ БОРА ЯВЛЯЮТСЯ
1. образование сложного эфира с этанолом;
  2. реакция с кислотой хлороводородной;
  3. реакция с куркумином;
  4. реакция с аммония оксалатом;
  5. верно 1 и 3.
58. ПРИ НЕПРАВИЛЬНОМ ХРАНЕНИИ ИЗМЕНЯЮТ СВОЙ ВНЕШНИЙ ВИД
1. натрия тетраборат;
  2. калия йодид;
  3. кальция хлорид;
  4. магния сульфат;
  5. все ответы верны.
59. В ВИДЕ ИНЪЕКЦИОННЫХ РАСТВОРОВ ПРИМЕНЯЮТСЯ
1. магния сульфат;
  2. кальция хлорид;
  3. натрия хлорид;
  4. натрия тетраборат;
  5. верно 1,2,3.
60. С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА КОМПЛЕКСОМЕТРИИ КОЛИЧЕСТВЕННО ОПРЕДЕЛЯЮТ
1. магния сульфат;
  2. кальция хлорид;
  3. лития карбонат;

4. натрия тетраборат.
  5. верно 1,2
61. ЗАВЫШЕННЫЙ РЕЗУЛЬТАТ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВСЛЕДСТВИЕ НЕПРАВИЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ МОЖЕТ БЫТЬ У
1. кальция хлорида;
  2. натрия тетрабората;
  3. магния сульфата;
  4. кислоты борной;
  5. нет верного ответа.
62. ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ КИСЛОТЫ БОРНОЙ ДЛЯ УСИЛЕНИЯ КИСЛОТНЫХ СВОЙСТВ ДОБАВЛЯЮТ
1. глицерин;
  2. спирт этиловый;
  3. раствор аммиака;
  4. хлороформ;
  5. нет верного ответа.
63. НЕ ПРОПУСКАЕТ РЕНТГЕНОВСКИЕ ЛУЧИ И ПРИМЕНЯЕТСЯ ПРИ РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ
1. лития карбонат;
  2. натрия тетраборат;
  3. бария сульфат;
  4. кислота борная;
  5. нет верного ответа.
64. ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ИОНА ЛИТИЯ ПРОВОДЯТ РЕАКЦИЕЙ С
1. сульфат-ионом;
  2. фосфат-ионом в кислой среде;
  3. фосфат-ионом в щелочной среде;
  4. фосфат-ионом в нейтральной среде;
  5. нет верного ответа.
65. ОБЩЕЙ РЕАКЦИЕЙ НА НАТРИЯ ГИДРОКАРБОНАТ И ЛИТИЯ КАРБОНАТ ЯВЛЯЕТСЯ РЕАКЦИЯ С
1. кислотой хлороводородной;
  2. раствором натрия гидроксида;
  3. раствором аммиака;
  4. реакция окрашивания пламени в желтый цвет;
  5. нет верного ответа.
66. В ОТЛИЧИЕ ОТ НАТРИЯ ГИДРОКАРБОНАТА, ИСПОЛЬЗУЕМОГО ДЛЯ ПРИЕМА ВНУТРЬ, НАТРИЯ ГИДРОКАРБОНАТ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ В ИНЪЕКЦИОННЫХ РАСТВОРАХ, ДОЛЖЕН
1. не содержать примеси хлоридов;

2. быть бесцветным;
  3. быть прозрачным;
  4. иметь нейтральную реакцию среды;
  5. верно 2 и 3.
67. ДЛЯ ДОКАЗАТЕЛЬСТВА БАРИЯ СУЛЬФАТА ДЛЯ РЕНТГЕНОСКОПИИ ПРЕПАРАТ ПРЕДВАРИТЕЛЬНО
1. растворяют в кислоте;
  2. растворяют в щелочи;
  3. кипятят с кислотой;
  4. кипятят с натрия карбонатом;
  5. нет верного ответа.
68. ХАРАКТЕРНУЮ ОКРАСКУ ПЛАМЕНИ ДАЮТ
1. кальция хлорид;
  2. натрия гидрокарбонат;
  3. лития карбонат;
  4. магния сульфат;
  5. верно 1,2,3.
69. ОСАДКИ ГИДРОКСИДОВ С АММИАКОМ ДАЮТ
1. магния сульфат;
  2. кальция хлорид;
  3. лития карбонат;
  4. бария сульфат;
  5. нет верного ответа.
70. С КИСЛОТОЙ ХЛОРОВОДОРОДНОЙ РЕАГИРУЮТ
1. натрия тиосульфат;
  2. натрия гидрокарбонат;
  3. бария сульфат;
  4. лития карбонат;
  5. верно 1,2,4.
71. ПРИМЕСЬ ФОСФАТОВ В БАРИЯ СУЛЬФАТЕ ДЛЯ РЕНТГЕНОСКОПИИ ОПРЕДЕЛЯЮТ С
1. молибдатом аммония;
  2. молибдатом аммония в щелочной среде;
  3. молибдатом аммония в азотнокислой среде;
  4. сульфатом магния;
  5. нет верного ответа.
  5. нет верного ответа.
73. КИСЛУЮ РЕАКЦИЮ СРЕДЫ ВОДНОГО РАСТВОРА ИМЕЮТ ПРЕПАРАТЫ
1. цинка сульфат;

2. серебра нитрат;
  3. натрия гидрокарбонат;
  4. кальция хлорид;
  5. верно 1 и 2.
74. В ХИМИЧЕСКОМ ОТНОШЕНИИ ПРОДУКТОМ ГИДРОЛИЗА ЯВЛЯЕТСЯ
1. натрия тиосульфат;
  2. висмута нитрат основной;
  3. бария сульфат;
  4. натрия тетраборат;
  5. нет верного ответа.
75. ПЕРЕЧИСЛЕННЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ВЕЩЕСТВА, КРОМЕ ОДНОГО, МОГУТ ПРОЯВЛЯТЬ В ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ СВОЙСТВА ВОССТАНОВИТЕЛЯ
1. водорода пероксид;
  2. железа (II) сульфат;
  3. калия йодид;
  4. серебра нитрат;
  5. нет верного ответа.
76. С РАСТВОРОМ АММИАКА КОМПЛЕКС СИНЕГО ЦВЕТА ОБРАЗУЕТ ЛЕКАРСТВЕННОЕ ВЕЩЕСТВО
1. серебра нитрат;
  2. цинка сульфат;
  3. висмута нитрат основной;
  4. меди сульфат;
  5. нет верного ответа.
77. С КАЛИЯ ЙОДИДОМ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ ОБРАЗУЕТ ОСАДОК, РАСТВОРЯЮЩИЙСЯ В ИЗБЫТКЕ РЕАКТИВА
1. висмута нитрат основной;
  2. серебра нитрат;
  3. меди сульфат;
  4. железа сульфат;
  5. нет верного ответа.
78. ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ИСПЫТАНИЯ ПОДЛИННОСТИ И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕПАРАТА ТРЕБУЕТСЯ ПРЕДВАРИТЕЛЬНАЯ МИНЕРАЛИЗАЦИЯ
1. висмута нитрата основного;
  2. протаргола;
  3. цинка оксида;
  4. бария сульфата;
  5. нет верного ответа.

79. ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЖЕЛЕЗА СУЛЬФАТА, ЦИНКА СУЛЬФАТА, НАТРИЯ ТЕТРАБОРАТА, МЕДИ СУЛЬФАТА, НАТРИЯ ТИОСУЛЬФАТА ЗАВЫШЕННЫЙ РЕЗУЛЬТАТ МОЖЕТ БЫТЬ ПОЛУЧЕН ИЗ-ЗА

1. поглощения влаги;
2. потери кристаллизационной воды;
3. гидролиза;
4. поглощения оксида углерода (IV);
5. нет верного ответа.

80. МЕТОДОМ КОМПЛЕКСОНОМЕТРИИ В КИСЛОЙ СРЕДЕ КОЛИЧЕСТВЕННО ОПРЕДЕЛЯЮТ

1. цинка оксид;
2. магния оксид;
3. магния сульфат;
4. висмута нитрат основной;
5. нет верного ответа.

81. МЕТОДОМ КОМПЛЕКСОНОМЕТРИИ В ПРИСУТСТВИИ ГЕКСАМЕТИЛЕНТЕТРАМИНА КОЛИЧЕСТВЕННО ОПРЕДЕЛЯЮТ

1. магния сульфат;
2. цинка оксид;
3. кальция хлорид;
4. висмута нитрат основной;
5. нет верного ответа.

82. ПО СПИСКУ А ХРАНЯТ

1. бария сульфат;
2. цинка сульфат;
3. серебра нитрат;
4. натрия тетраборат;
5. нет верного ответа.

83. СЕРЕБРА НИТРАТ ПО НД КОЛИЧЕСТВЕННО ОПРЕДЕЛЯЮТ МЕТОДОМ

1. меркуриметрии;
2. аргентометрии;
3. йодометрии,
4. тиоцианатометрии;
5. нет верного ответа.

84. МЕТОДОМ ПЕРМАНГНАТОМЕТРИИ МОЖНО КОЛИЧЕСТВЕННО ОПРЕДЕЛИТЬ ВСЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ВЕЩЕСТВА, КРОМЕ

1. железа сульфата;
2. натрия нитрита;
3. серебра нитрата;
4. раствора пероксида водорода;

5. нет верного ответа.

85. ЗАНИЖЕННЫЙ РЕЗУЛЬТАТ ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЖЕЛЕЗА (II) СУЛЬФАТА БЫЛ ПОЛУЧЕН В РЕЗУЛЬТАТЕ

1. восстановления препарата;
2. окисления препарата;
3. гигроскопичности препарата;
4. выветривания препарата;
5. нет верного ответа.

86. ДЛЯ ЦИНКА ОКСИДА, МАГНИЯ СУЛЬФАТА, ВИСМУТА НИТРАТА ОСНОВНОГО, КАЛЬЦИЯ ХЛОРИДА ОБЩИМ МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЯВЛЯЕТСЯ

1. гравиметрия;
2. перманганатометрия;
3. йодометрия;
4. комплексонометрия;
5. нет верного ответа.

87. ОПИСАНИЕ СВОЙСТВ: «БЕЛЫЙ АМОРФНЫЙ ИЛИ КРИСТАЛЛИЧЕСКИЙ ПОРОШОК; ПРАКТИЧЕСКИ НЕРАСТВОРИМЫЙ В ВОДЕ; СМОЧЕННЫЙ ВОДОЙ ОКРАШИВАЕТ СИНЮЮ ЛАКМУСОВУЮ БУМАГУ В КРАСНЫЙ ЦВЕТ» СООТВЕТСТВУЕТ ЛЕКАРСТВЕННОМУ ВЕЩЕСТВУ

1. магния сульфату;
2. колларголу;
3. висмута нитрату основному;
4. цинка оксиду;
5. нет верного ответа.

88. В ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЯХ ПРОЯВЛЯЮТ СВОЙСТВА КАК ОКИСЛИТЕЛЯ, ТАК И ВОССТАНОВИТЕЛЯ ЛС

1. калия йодид;
2. натрия нитрит;
3. раствор водорода пероксида;
4. серебра нитрат;
5. верно 2 и 3.

Эталоны ответов:

1. 1
2. 3
3. 4
4. 2
5. 5
6. 2
7. 1
8. 3
9. 4
10. 1
11. 2
12. 3
13. 4
14. 5
15. 1
16. 3
17. 5
18. 1
19. 2
20. 3
21. 2
22. 2
23. 1
24. 1
25. 3
26. 4
27. 1
28. 5
29. 1
30. 1
31. 3
32. 2
33. 1
34. 2
35. 3
36. 4
37. 5
38. 5
39. 5
40. 1
41. 2
42. 3
43. 2
44. 2
45. 1
46. 5
47. 1
48. 2
49. 1
50. 1
51. 5

52. 5  
53. 2  
54. 3  
55. 1  
56. 2  
57. 3  
58. 3  
59. 1  
60. 2  
61. 3  
62. 1  
63. 4  
64. 3  
65. 1  
66. 4  
67. 5  
68. 1  
69. 2  
70. 3  
71. 4  
72. 2  
73. 1  
74. 5  
75. 1  
76. 1  
77. 2  
78. 1  
79. 1  
80. 2  
81. 5  
82. 5  
83. 3  
84. 2  
85. 1  
86. 3  
87. 1  
88. 1

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ****Температура плавления****ОФС.1.2.1.0011.15****Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0034-07**

Температурой плавления называют температуру, при которой происходит переход вещества из твердого состояния в жидкое.

Для определения температуры плавления в зависимости от физических свойств вещества применяют капиллярный метод (метод 1), открытый капиллярный метод (метод 2), метод мгновенного плавления (метод 3) и метод каплепадения (метод 4). Для твердых веществ, легко превращаемых в порошок, применяют методы 1 и 3, для аморфных веществ, не растирающихся в порошок и плавящихся ниже температуры кипения воды (таких как жиры, воск, парафин, вазелин, смолы), – методы 2 и 4.

Для веществ, не устойчивых при нагревании, определяют температуру разложения. Температурой разложения называют температуру, при которой происходит резкое изменение физического состояния или окраски вещества (вспенивание, побурение).

Для определения температуры плавления используют описанные ниже приборы и методы. Для калибровки приборов используют подходящие для этих целей стандартные вещества, имеющие температуру плавления, близкую к температуре плавления испытуемого вещества.

**1. Капиллярный метод**

Температура плавления, определенная капиллярным методом, представляет собой температуру, при которой последняя твердая частичка уплотненного столбика вещества в капилляре переходит в жидкую фазу.

**Прибор 1.** Составными частями прибора являются:

– стеклянный сосуд, содержащий жидкость (например, воду, вазелиновое или силиконовое масло), используемый в качестве бани и оснащенный подходящим устройством для нагрева. Жидкость в бане следует выбирать в зависимости от требуемой температуры;

– устройство для перемешивания, обеспечивающее однородность температуры внутри бани;

– подходящий термометр с ценой деления не более 0,5 °С. Разность между верхним и нижним делениями термометра в области измеряемой температуры – не более 100 °С;

– запаянные с одного конца капилляры из нейтрального прочного стекла диаметром от 0,9 до 1,1 мм, толщиной стенок от 0,10 до 0,15 мм и длиной 10 см.

**Прибор 2.** Составными частями прибора являются:

– круглодонная колба из термостойкого стекла вместимостью от 100 до 150 мл; длина горла колбы 20 см; диаметр горла – от 3 до 4 см;

– пробирка из термостойкого стекла, вставленная в колбу и отстоящая от дна колбы на расстоянии 1,0 см; диаметр пробирки от 2,0 до 2,5 см;

– термометр ртутный стеклянный укороченный с ценой деления 0,5 °С, вставленный во внутреннюю пробирку так, чтобы конец его отстоял от дна пробирки на 1,0 см;

– источник нагрева (газовая горелка, электрический обогрев);

– запаянные с одного конца капилляры из нейтрального прочного стекла диаметром от 0,9 до 1,1 мм, толщиной стенок от 0,10 до 0,15 мм и длиной от 6 до 8 см.

Колбу наполняют на  $\frac{3}{4}$  объема соответствующей жидкостью:

– вазелиновое масло или жидкие силиконы; серная кислота концентрированная – для веществ с температурой плавления от 80 до 260 °С;

- раствор калия сульфата в серной кислоте концентрированной (3:7 по массе) – для веществ с температурой плавления выше 260 °С;
- вода очищенная – для веществ с температурой плавления ниже 80 °С.

#### Примечания.

1. Стеклообразные трубки, из которых вытягивают капилляры, должны быть вымыты и высушены.

2. При приготовлении раствора калия сульфата в серной кислоте концентрированной смесь кипятят в течение 5 мин при энергичном перемешивании. При недостаточном перемешивании могут образоваться 2 слоя, в результате чего может произойти закипание смеси, приводящее к взрыву.

**Прибор 3.** Прибор для определения температуры плавления с диапазоном измерений в пределах от 20 до 360 °С с электрическим обогревом типа ПТП или типа ПТП-М (рис. 1) с диапазоном измерений в пределах от 20 до 340 °С.

Составными частями прибора являются:

- основание со щитком управления и номограммой;
- стеклянный блок-нагреватель, обогрев которого осуществляется константановой проволокой, навитой бифилярно;
- оптическое приспособление;
- приспособление для установки термометра;
- приспособление для установки капилляров;
- термометр укороченный с ценой деления 0,5 °С;
- источник нагрева (электрический обогрев);
- капилляры длиной 20 см для прибора типа ПТП; капилляры длиной 8 см для прибора типа ПТП-М.

Принцип действия прибора основан на температурном воздействии на исследуемые вещества в вертикально установленных капиллярах, запаянных с нижнего конца.

Допускается применение других приборов, использующих капиллярный метод, если точность и правильность измерений будут не хуже, чем в случае применения приборов, описанных выше.

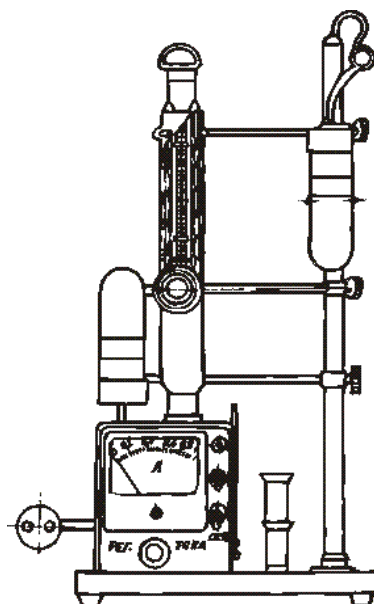


Рисунок 1– Прибор ПТП-М для определения температуры плавления

**Методика.** Если нет других указаний в фармакопейной статье, тонкоизмельченное в порошок вещество сушат или при температуре от 100 до 105 °С в течение 2 ч или в эксикаторе над серной кислотой в течение 24 ч, или в вакууме над безводным силикагелем в течение 24 ч.

Достаточное количество вещества помещают в капилляр до получения уплотненного столбика высотой около 5 мм. Необходимое уплотнение вещества при заполнении капилляра можно получить, если его несколько раз бросить запаянным концом вниз в стеклянную трубку длиной 0,5 – 1,0 м, поставленную вертикально на стекло. Капилляр с веществом сохраняют до начала определения в эксикаторе.

Повышают температуру в бане (приборе). При температуре приблизительно на 10 °С ниже предполагаемой температуры плавления регулируют нагрев прибора так, чтобы скорость подъема температуры на протяжении всего испытания составляла около 1 °С в мин. Когда температура достигнет значения на 5 – 10 °С ниже предполагаемой температуры плавления, капилляр с веществом прикрепляют к термометру так, чтобы его запаянный конец находился на уровне центра шарика термометра, и помещают в прибор.

Продолжают нагревание со скоростью:

– для устойчивых при нагревании веществ при определении температуры плавления ниже 100 °С – со скоростью от 0,5 до 1,0 °С в 1 мин;

– при определении температуры плавления от 100 до 150 °С – от 1,0 до 1,5 °С в 1 мин;

– при определении температуры плавления выше 150 °С – от 1,5 до 2,0 °С в 1 мин;

– для неустойчивых при нагревании веществ от 2,5 до 3,5 °С в 1 мин.

Отмечают температуру, при которой последняя твердая частичка перейдет в жидкую фазу.

Проводят не менее двух определений. За температуру плавления принимают среднее арифметическое значение нескольких определений, проведенных в одинаковых условиях и отличающихся друг от друга не более чем на 1 °С.

Примечание. Во время определения температуры плавления колба и пробирка должны быть открыты.

## **2. Открытый капиллярный метод**

Используют стеклянный капилляр, открытый с обоих концов, длиной около 80 мм, наружным диаметром от 1,4 до 1,5 мм и внутренним диаметром от 1,0 до 1,2 мм.

Вещество, предварительно подготовленное, как указано в фармакопейной статье, помещают в каждый из 5 капилляров в количестве, достаточном для формирования в каждом капилляре столбика высотой около 10 мм. Капилляры оставляют на определенное время при температуре, указанной в фармакопейной статье.

Прикрепляют один из капилляров к термометру с ценой деления 0,2 °С таким образом, чтобы вещество находилось около шарика термометра.

Термометр с прикрепленным капилляром помещают в стакан таким образом, чтобы расстояние между дном стакана и нижней частью шарика термометра составляло 1 см. Стакан наполняют водой до высоты слоя 5 см.

Повышают температуру воды со скоростью 1 °С в мин.

За температуру плавления принимают температуру, при которой вещество начинает подниматься по капилляру. В тех случаях, когда столбик вещества не поднимается в капилляре, за температуру плавления принимают температуру, при которой столбик вещества в капилляре становится прозрачным.

Повторяют эту операцию с 4 другими капиллярами и рассчитывают результат как среднее арифметическое из 5 значений. Расхождение между всеми значениями не должно превышать 1 °С.

### **3. Метод мгновенного плавления**

**Прибор.** Прибор состоит из металлического блока, изготовленного из материала, обладающего высокой теплопроводностью и не взаимодействующего с испытуемым веществом, например, из латуни. Верхняя поверхность блока должна быть плоской и тщательно отполированной. Блок равномерно нагревают по всей массе газовой горелкой с микрорегулировкой или электрическим нагревателем с тонкой регулировкой. Блок имеет достаточно широкую цилиндрическую полость для размещения термометра, столбик ртути которого должен находиться в одном и том же положении, как при калибровке, так и при определении температуры плавления испытуемого вещества. Цилиндрическая полость размещена параллельно отполированной верхней поверхности блока на расстоянии около 3 мм от нее.

**Методика.** Блок быстро нагревают до температуры, которая на 10 °С ниже предполагаемой температуры плавления, и затем устанавливают скорость нагрева около 1 °С в минуту. Несколько частичек тонкоизмельченного в порошок вещества, высушенного в вакууме над безводным силикагелем в течение 24 ч, бросают через равные промежутки времени на поверхность блока в непосредственной близости от шарика термометра, очищая поверхность после каждого испытания. Записывают температуру  $t_1$ , при которой вещество плавится мгновенно при соприкосновении с металлом. Останавливают нагрев. Во время охлаждения через равные промежутки времени бросают несколько частичек вещества на

поверхность блока, очищая ее после каждого испытания. Записывают температуру  $t_2$ , при которой вещество прекращает мгновенно плавиться при соприкосновении с металлом.

Температуру плавления ( $T_{пл.}$ ) рассчитывают по формуле:

$$T_{пл.} = \frac{t_1 + t_2}{2},$$

где  $t_1$  – первое значение температуры;

$t_2$  – второе значение температуры.

#### 4. Метод каплепадения

В данном методе определяют температуру, при которой в условиях, приведенных ниже, первая капля расплавленного испытуемого вещества падает из чашечки.

**Прибор.** Прибор состоит из двух металлических гильз ( $A$  и  $B$ ), соединенных посредством резьбы. Гильза ( $A$ ) прикрепена к ртутному термометру. В нижней части гильзы ( $B$ ) с помощью двух уплотнителей ( $Г$ ) свободно закреплена металлическая чашечка ( $Д$ ). Точное положение чашечки определяется фиксаторами ( $Е$ ) длиной 2 мм, которые используются также для центровки термометра. Отверстие ( $В$ ) в стенке гильзы ( $Б$ ) предназначено для выравнивания давления. Отводящая поверхность чашечки должна быть плоской, а края выходного отверстия расположены под прямым углом к поверхности. Нижняя часть ртутного термометра имеет форму и размер, как показано на рис.2. Термометр градуирован от 0 до 110 °С и расстояние на шкале в 1 мм соответствует разности температур в 1 °С. Ртутный шарик термометра имеет диаметр  $(3,5 \pm 0,2)$  мм и высоту  $(6,0 \pm 0,3)$  мм.

Прибор устанавливают по оси пробирки длиной около 200 мм и наружным диаметром около 40 мм.

Прибор прикрепляют к пробирке с помощью пробки, в которую вставлен термометр и которая имеет боковую прорезь. Отверстие чашечки должно находиться на расстоянии около 15 мм от дна пробирки. Все

устройство погружают в стакан вместимостью около 1 л, заполненный водой. Дно пробирки должно находиться на расстоянии около 25 мм от дна стакана. Уровень воды должен достигать верхней части гильзы (А). Для равномерного распределения температуры в стакане используют мешалку.

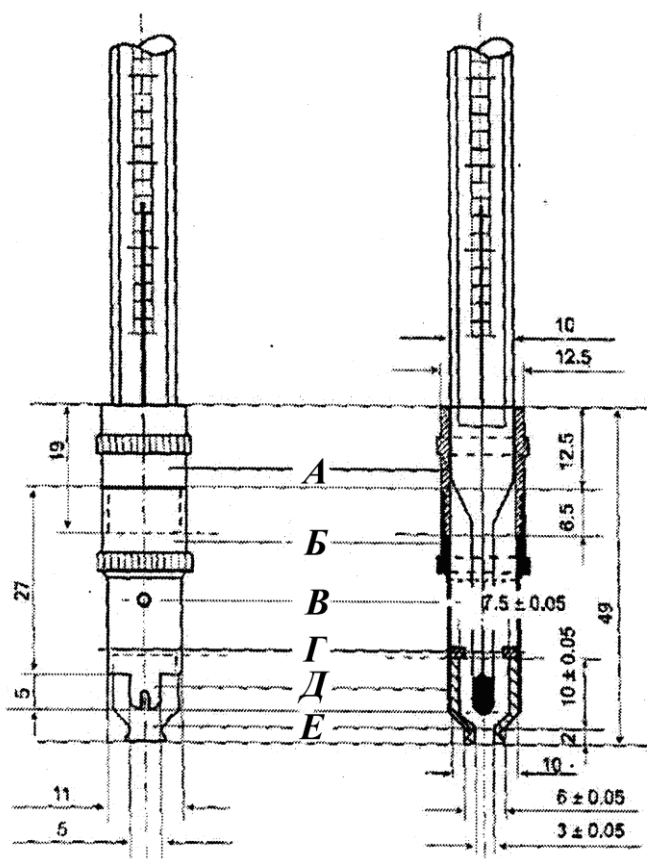


Рисунок 2 – Прибор для определения температуры каплепадения.

*Размеры приведены в мм*

**Методика.** Заполняют чашечку до краев нерасплавленным испытуемым веществом, если нет других указаний в фармакопейной статье. Избыток вещества удаляют с обеих сторон шпателем. После соединения гильз (А) и (Б) проталкивают чашечку внутрь на ее место в гильзе (Б) до упора. Удаляют шпателем вещество, выдавленное термометром. Прибор помещают на водяную баню, как описано выше. Водяную баню нагревают до температуры примерно на 10 °С ниже предполагаемой температуры плавления и устанавливают скорость нагрева около 1 °С в минуту. Отмечают температуру

падения первой капли. Проводят не менее трех определений, каждый раз с новым образцом вещества. Разность между показаниями не должна превышать 3 °С. Рассчитывают среднее арифметическое из полученных значений.

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

Температура затвердевания

ОФС.1.2.1.0012.15

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0035-07

---

Температурой затвердевания называют температуру, при которой вещество переходит из жидкого состояния в твердое при охлаждении. Для определения температуры затвердевания используют две методики.

**Методика 1.** В сухую внутреннюю пробирку прибора 1 (рис.1) помещают достаточное количество (около 10 г) испытуемого вещества, находящегося в жидком состоянии (твердое вещество предварительно расплавляют при температуре не выше 20 °С ожидаемой температуры затвердевания) и укрепляют таким образом, чтобы ртутный шарик находился посередине слоя испытуемого вещества. Затем внутреннюю пробирку с испытуемым веществом помещают во внешнюю пробирку и, при быстром охлаждении, определяют приблизительную температуру затвердевания. После этого внешнюю пробирку вместе с внутренней помещают на водяную баню с температурой на 5 °С выше приблизительно определенной температуры затвердевания до полного расплавления испытуемого вещества. Затем заполняют стакан водой или насыщенным раствором натрия хлорида с температурой на 5 °С ниже ожидаемой температуры затвердевания. Внешнюю пробирку вместе с внутренней помещают в стакан. При постоянном перемешивании испытуемого вещества отмечают температуру каждые 30 с. Вначале происходит постепенное понижение температуры, затем при появлении твердой фазы, она остается некоторое время постоянной или повышается перед тем, как стать постоянной (в этот момент прекращают перемешивание), а затем снова падает. Отмечают наиболее высокую температуру, остающуюся короткое время постоянной при переходе вещества из жидкого состояния в твердое. Эту температуру и принимают за температуру затвердевания.

Если вещество остается жидким при ожидаемой температуре затвердевания, его охлаждают на 1 – 2 °С ниже ожидаемой температуры затвердевания и вызывают затвердевание введением малых количеств (нескольких кристаллов) испытуемого вещества или потиранием стенок внутренней пробирки термометром.

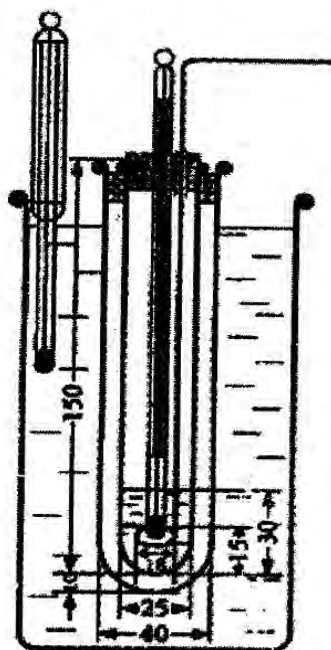


Рисунок 1. Прибор для определения температуры затвердевания

*Размеры указаны в мм*

**Прибор 1.** Прибор (рис.1) состоит из толстостенной пробирки с внутренним диаметром около 25 мм и длиной около 150 мм, помещенной внутри другой пробирки диаметром около 40 мм и длиной около 160 мм. Внутренняя пробирка закрыта пробкой, снабженной термометром длиной около 175 мм с ценой деления 0,2 °С, который закреплен таким образом, чтобы ртутный шарик находился на расстоянии около 15 мм от дна пробирки. Во внутренней пробирке имеется отверстие, через которое проходит вал мешалки, изготовленный из стеклянного стержня или другого подходящего материала, согнутый на конце под прямым углом в виде петли, внешний диаметр которой около 18 мм. Внутреннюю пробирку вместе с внешней пробиркой размещают в центре стакана вместимостью 1 л, содержащего

подходящую охлаждающую жидкость, уровень которой находится на расстоянии около 20 мм. Охлаждающая баня также должна быть снабжена термометром.

**Методика 2.** Для твердых веществ, имеющих высокую температуру затвердевания с диапазоном от +30 до +100 °С (парафины и высокоплавкие кристаллические вещества).

Испытуемое вещество, расплавленное на водяной бане или в термостате при температуре на 15 – 20 °С выше ожидаемой температуры затвердевания, тщательно перемешивают и заливают в подогретый прибор 2 (рис.2) на  $\frac{3}{4}$  его высоты. Температура испытуемого вещества после помещения в прибор должна превышать ожидаемую температуру затвердевания не менее чем на 8 °С. В отверстие прибора вставляют термометр на пробке по оси прибора так, чтобы ртутный шарик термометра находился приблизительно на половине высоты слоя расплавленного вещества. Оставляют прибор до достижения температуры на 3 – 4 °С выше температуры затвердевания. По достижении этой температуры записывают температуру через каждую минуту. Сначала температура понижается быстро. Затем понижение замедляется, и температура в течение нескольких минут сохраняется постоянной или снижается очень медленно. После этого температура снова быстро понижается. За температуру затвердевания вещества принимают то показание термометра, при котором температура оставалась постоянной или снижалась наиболее медленно.

Рассчитывают среднее арифметическое трех определений. Расхождение между определениями не должно превышать 0,2 °С.

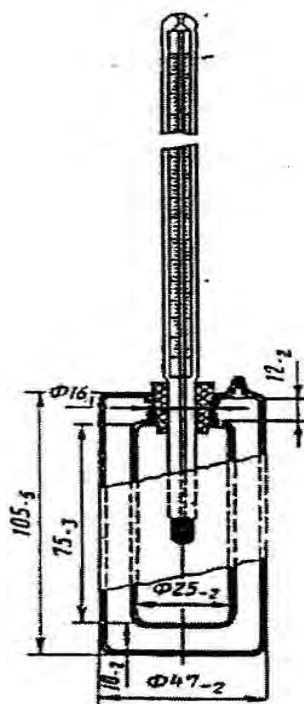


Рисунок 2. Прибор Жукова.

*Размеры указаны в мм*

**Прибор 2** (прибор Жукова) – дьюаровский сосуд из прозрачного стекла (рис. 2). Снабжен пробкой, в которой укреплен термометр с диапазоном температур от +30 до +100 °С и ценой деления 0.

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

**Температурные пределы перегонки  
и точка кипения**

**ОФС  
Взамен ГФ XII, ч.1,  
ОФС 42-0036-07**

---

Под температурными пределами перегонки подразумевают интервал между начальной и конечной температурой кипения при нормальном давлении 101,3 кПа (760 мм рт. ст.).

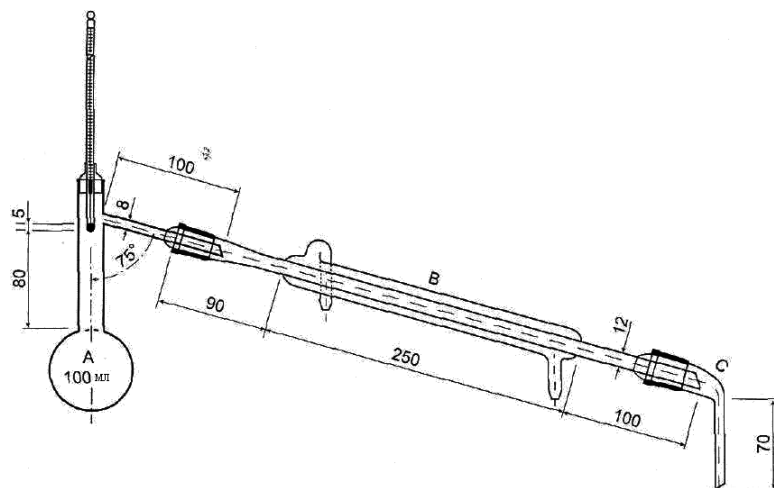
Начальной температурой кипения считают температуру, при которой в приемник перегнались первые 5 капель жидкости. Конечной температурой кипения считают температуру, при которой в приемник перешло 95% жидкости.

Точка кипения – скорректированная температура, при которой давление пара жидкости достигает 101,3 кПа.

### **Определение температурных пределов перегонки**

**Прибор.** Прибор (рис. 1) состоит из перегонной колбы (А), прямого холодильника (В) и аллонжа (С); допускается использовать холодильник с изогнутым нижним концом. Колбу снабжают термометром, конец ртутного шарика которого должен находиться на 5 мм ниже от нижнего края отводной трубки перегонной колбы. Применяют укороченный термометр с верхним значением шкалы около 50 °С и ценой деления 0,2 °С.

Во время испытания колбу защищают от охлаждения соответствующим экраном.



**Рис. 1. Прибор для определения температурных пределов перегонки.**

*Размеры указаны в миллиметрах.*

Для жидкостей, кипящих при температуре ниже 150 °С, применяют водяное охлаждение; для жидкостей, кипящих при температуре выше 150 °С, достаточно воздушного охлаждения.

**Методика.** В колбу помещают 50 мл исследуемой жидкости и несколько тонких запаянных с одного конца капилляров или кусочков пористого материала.

Начинают нагревание колбы, отмечают начальную температуру кипения и продолжают нагревание таким образом, чтобы в минуту перегонялось 2-3 мл жидкости. Перегоняют требуемый объем жидкости, отмечая конечную температуру кипения. Отгон собирают в приемник (цилиндр вместимостью 50 мл с ценой деления 1 мл). Приемник устанавливают так, чтобы аллонж входил в него на 2,5 см.

Наблюдаемую температуру перегонки ( $t_1$ ) приводят к нормальному давлению 101,3 кПа (760 мм рт. ст.) по формуле:

$$t_2 = t_1 + K \times (P - P_1), \quad (1)$$

где:  $t_2$  – исправленная температура, в градусах Цельсия;

$t_1$  – наблюдаемая температура, в градусах Цельсия;

$P$  – нормальное барометрическое давление, в кПа или мм рт. ст.;

$P_1$  – барометрическое давление во время опыта, наблюдаемое по ртутному барометру или anerоиду, в кПа или мм рт. ст., с учетом поправок, указанных в поверочном свидетельстве и в инструкции по

эксплуатации;

$K$  – поправочный коэффициент. Значения  $K$  зависят от температуры кипения перегоняемой жидкости и приведены в табл. 1.

**Таблица 1**

**Поправочный коэффициент для приведения к нормальному значению**

Наблюдаемая температура кипения, °С	Поправочный коэффициент $K$ при давлении, выраженном	
	в мм рт. ст.	в кПа
до 100	0,040	0,30
100-140	0,045	0,34
141-190	0,050	0,38
191-240	0,055	0,41
выше 240	0,060	0,45

**Примечания**

1. Если во время опыта давление измеряют ртутным барометром, то после внесения поправок, указанных в поверочном свидетельстве и в инструкции по эксплуатации, оно должно быть приведено к показаниям при температуре 0 °С, для чего вычитают из показаний барометра:

0,27 кПа (2 мм рт. ст.) при температуре окружающей среды 13-20 °С;

0,4 кПа (3 мм рт. ст.) при температуре окружающей среды 21-28 °С;

0,53 кПа (4 мм рт. ст.) при температуре окружающей среды 29-35 °С.

2. Перегонку эфира следует проводить на предварительно нагретой водяной бане при температуре от 54 до 58 °С.

Допустимое расхождение между результатами двух параллельных определений температуры кипения не должно превышать 1 °С.

**Определение точки кипения**

Испытание проводят в приборе для определения температурных пределов перегонки, за исключением того, что термометр вводят в горло колбы так, чтобы нижний конец ртутного шарика находился на уровне нижнего конца горла колбы.

В колбу помещают 20 мл испытуемой жидкости и несколько кусочков пористого материала и быстро нагревают до кипения. Отмечают температуру,

при которой жидкость начинает поступать по отводной трубке колбы в холодильник.

Отмеченную температуру кипения приводят к нормальному давлению по формуле (1).

*Микрометод определения температуры кипения* обычно используется для идентификации веществ.

В тонкостенную стеклянную запаянную с одного конца трубочку диаметром 3 мм и длиной около 8 см помещают несколько капель исследуемой жидкости, чтобы образовался слой от 1 до 1,5 см высоты. В трубочку вставляют открытым концом вниз запаянный с одного конца капилляр длиной около 10 см и диаметром около 1 мм. Трубочку прикрепляют с помощью резинового колечка или тонкой проволоки к укороченному термометру так, чтобы нижний конец трубочки находился на уровне середины ртутного шарика, и термометр помещают в прибор для определения температуры плавления. Нагревание ведут таким образом, чтобы температура поднималась на 2 – 3 °С в минуту до того момента, когда из капилляра вместо отдельных воздушных пузырьков начнет выделяться непрерывная цепочка пузырьков пара, после чего прекращают или уменьшают нагрев. Момент, когда прекратится выделение пузырьков и жидкость начнет подниматься в капилляр, принимают за температуру кипения.

Наблюдаемую температуру кипения приводят к показаниям при нормальном давлении, как указано выше.

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Вязкость

ОФС.1.2.1.0015.15

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0038-07

Вязкость (внутреннее трение) – свойство текучих тел оказывать сопротивление перемещению одной их части относительно другой.

Основными кинематическими переменными для жидкостей служат деформация и ее скорость. Поэтому для изучения реологических характеристик жидких сред устанавливают связь между приложенными внешними нагрузками и кинематическими параметрами.

Жидкости, вязкость которых не зависит от напряжения сдвига и при определенной концентрации и температуре является постоянной величиной в соответствии с законом Ньютона, называются ньютоновскими. Жидкости, вязкость которых не подчиняется закону Ньютона и зависит от напряжения сдвига, называются неньютоновскими.

Различают *динамическую, кинематическую, относительную, удельную, приведенную и характеристическую* вязкости. Для неньютоновских жидкостей, главным образом, характерна *структурная вязкость*. *Структурная (эффективная или кажущаяся) вязкость* – вязкость при данном напряжении сдвига.

*Динамическая вязкость или коэффициент вязкости* ( $\eta$ ) – это приходящаяся на единицу поверхности тангенциальная сила, называемая также *напряжением сдвига* ( $\tau$ ), выраженная в паскалях (Па), которую необходимо приложить для того, чтобы переместить слой жидкости площадью  $1 \text{ м}^2$  со скоростью ( $v$ ) 1 метр в секунду ( $\text{м}\cdot\text{с}^{-1}$ ), находящийся на расстоянии ( $x$ ) 1 м относительно другого слоя, параллельно плоскости скольжения.

Величина  $dv/dx$  представляет собой градиент скорости и определяет скорость сдвига  $D$ , выраженную в обратных секундах ( $\text{с}^{-1}$ ).

Таким образом, вязкость ( $\eta$ ) определяется отношением напряжения

сдвига ( $\tau$ ) к скорости сдвига  $D$  и определяется по формуле:

$$\eta = \tau / D. \quad (1)$$

*Динамическая вязкость* ( $\eta$ ) в системе СИ выражается в Паскаль-секундах ( $\text{Па} \cdot \text{с}$ ) или миллипаскаль-секундах ( $\text{мПа} \cdot \text{с}$ ); в системе СГС – в пуазах ( $\text{П}$ ) или сантипуазах ( $\text{сП}$ ). Также динамическая вязкость может измеряться в  $\text{дин} \cdot \text{с}/\text{см}^2$  и  $\text{кгс} \cdot \text{с}/\text{м}^2$  и производных от них единицах.

При измерении вязкости ньютоновских жидкостей в капиллярных вискозиметрах определяют кинематическую вязкость.

*Кинематическую вязкость* ( $\nu$ ), выраженную в метрах квадратных на секунду ( $\text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ ), получают делением величины динамической вязкости  $\eta$  на плотность жидкости  $\rho$ , выраженную в килограммах на метр кубический ( $\text{кг} \cdot \text{м}^{-3}$ ), измеренную пикнометром или плотномером при той же температуре:

$$\nu = \eta / \rho. \quad (2)$$

Кинематическая вязкость в системе СИ выражается в метрах квадратных на секунду ( $\text{м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ ) или миллиметрах квадратных на секунду ( $\text{мм}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ ); в системе СГС – в стоксах ( $\text{Ст}$ ) или сантистоксах ( $\text{сСт}$ ).

При работе с растворами используются такие реологические характеристики, как относительная, удельная, приведенная и характеристическая вязкости.

*Относительная вязкость* ( $\eta_{\text{отн.}}$ ) – отношение вязкости раствора к вязкости растворителя:

$$\eta_{\text{отн}} = \eta / \eta_0.$$

Часто вязкость выражают как удельную вязкость ( $\eta_{\text{уд}}$ ), которая показывает, какая часть вязкости раствора обусловлена присутствием в нем растворенного вещества:

$$\eta_{\text{уд}} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{\eta}{\eta_0} - 1 = \eta_{\text{отн}} - 1, \quad (3)$$

где  $\eta$  – вязкость раствора;

$\eta_0$  – вязкость растворителя.

Удельная вязкость, отнесенная к единице концентрации раствора, называется *приведенной вязкостью* ( $\eta_{\text{прив}}$ ):

$$\eta_{\text{прив}} = \frac{\eta_{\text{уд}}}{c} \quad (4)$$

где  $c$  – концентрация раствора.

Для растворов полимеров вязкость является функцией молекулярных масс, формы, размеров и гибкости макромолекул. Чтобы определить структурные характеристики полимеров, приведенную вязкость экстраполируют к нулевой концентрации. В этом случае вводится понятие *характеристической вязкости*  $[\eta]$ :

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{\text{прив}} = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{\text{уд}}}{c} \quad (5)$$

Характеристическая вязкость выражается в единицах, обратных единицам концентрации.

Для определения вязкости применяются *капиллярные, ротационные вискозиметры и вискозиметры с падающим шариком*.

*Капиллярные вискозиметры* обычно используются для определения вязкости при одном значении скорости сдвига, поэтому применяются в основном для исследования ньютоновских жидкостей. Они просты и удобны в обращении.

*Ротационные вискозиметры* позволяют определять реологические свойства жидкостей в широком диапазоне скоростей сдвига, что особенно важно для неньютоновских жидкостей.

*Вискозиметр с падающим шариком* (вискозиметр Гепплера) предназначен для измерения вязкости прозрачных ньютоновских жидкостей.

Допускается использование других вискозиметров при условии, что точность и правильность измерений будет не хуже, чем в случае использования вискозиметров, описанных ниже.

## **Измерение вязкости на капиллярных вискозиметрах**

Для измерения кинематической вязкости применяются капиллярные вискозиметры типа Оствальда и Уббелодде различной модификации.

Стеклянные капиллярные вискозиметры предназначены для определения вязкости:

- 1) прозрачных жидкостей – серии ВПЖ и ВПЖТ;
- 2) малых объемов прозрачных жидкостей – серии ВПЖМ и ВПЖТМ;
- 3) непрозрачных жидкостей – серии ВНЖ и ВНЖТ.

На рис. 1 и 2 представлен общий вид вискозиметров серии ВПЖ.

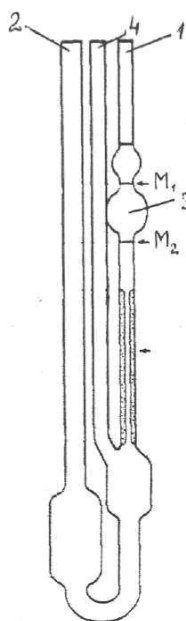


Рисунок 1 – Вискозиметр стеклянный капиллярный ВПЖ - 1  
1, 2, 4 – трубки; 3 – измерительный резервуар;  
M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> – отметки измерительного резервуара.

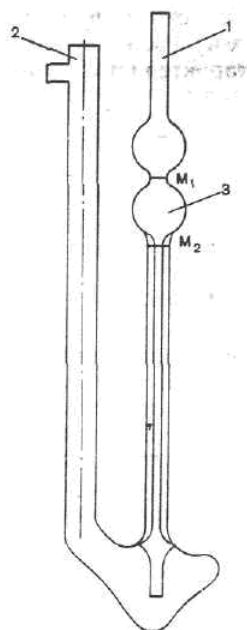


Рисунок 2 – Вискозиметр стеклянный капиллярный ВПЖ-2

1, 2 – трубки; 3 – измерительный резервуар;  
 $M_1, M_2$  – отметки измерительного резервуара.

Вискозиметр состоит из капилляра с радиусом  $R$  и длиной  $L$ , через который под действием силы тяжести протекает жидкость объема  $V$ .

Если  $H$  – средняя высота жидкости,  $g$  – ускорение силы тяжести, то кинематическая вязкость ( $\nu$ ) в миллиметрах квадратных на секунду ( $\text{мм}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ ) равна:

$$\nu = \frac{\eta}{\rho} = \frac{\pi \cdot R^4 \cdot g \cdot H}{8 \cdot L \cdot V} \cdot t = K \cdot t, \quad (6)$$

где  $K = \frac{\pi \cdot R^4 \cdot g \cdot H}{8 \cdot L \cdot V}$  – постоянная прибора, обычно выражаемая в миллиметрах квадратных на секунду квадратную ( $\text{мм}^2 \cdot \text{с}^{-2}$ ).

Если известна плотность испытуемой жидкости  $\rho$ , то, зная  $\nu$ , можно вычислить динамическую вязкость  $\eta$  ( $\text{мПа} \cdot \text{с}$ ):

$$\eta = \rho \cdot \nu = \rho \cdot K \cdot t, \quad (7)$$

где  $\rho$  – плотность испытуемой жидкости ( $\text{мг}\cdot\text{мм}^{-3}$ ), полученная умножением относительной плотности ( $d_{20}^{20}$ ) на 0,9982.

Для определения вязкости в каждом конкретном случае капиллярные вискозиметры выбирают в соответствии с табл. 1 и 2 по известным значениям  $K$  и  $V$  в зависимости от характера испытуемой жидкости, ее объема и значения вязкости.

**Методика.** Перед проведением измерений вискозиметр следует тщательно промыть и высушить.

В колено трубки 2 вискозиметра наливают измеренный объем жидкости и вискозиметр помещают в вертикальном положении в водяной термостат с температурой ( $20 \pm 0,1$ ) °С, если в фармакопейной статье не указана другая температура, удерживая его в этом положении не менее 30 мин для установления температурного равновесия. Производят повышение уровня жидкости в вискозиметре через отверстие 1 (в случае вискозиметра ВПЖ-1 закрывают трубку 4) до тех пор, пока жидкость не поднимется выше отметки  $M_1$ . Тогда повышение уровня прекращают, и жидкость опускается. Время  $t$ , которое требуется, чтобы мениск прошел расстояние между отметками  $M_1$  и  $M_2$ , измеряют секундомером с точностью до 0,2 с.

Время истечения испытуемой жидкости определяют как среднее не менее чем трех измерений. Полученные данные являются приемлемыми при условии, что результаты двух последовательных измерений отличаются не более чем на 1 %.

Для определения относительной вязкости жидкости  $\eta_{отн}$  измеряют время истечения между верхней и нижней меткой мениска той жидкости, относительно которой проводят измерения  $t_{оср}$ . Затем в том же чистом и сухом вискозиметре при тех же условиях определяют время истечения испытуемой жидкости  $t_{сп}$ .

Одновременно при той же температуре, при которой определяют вязкость, измеряют плотности испытуемых жидкостей  $\rho_0$  и  $\rho$  пикнометрическим методом и рассчитывают относительную вязкость по

формуле:

$$\eta_{\text{отн}} = \frac{t_{\text{ср}} \cdot \rho}{t_{\text{оср}} \cdot \rho_0} \quad (8)$$

Для определения характеристической вязкости готовят не менее 5 испытуемых растворов различной концентрации. При этом должно выполняться условие возможности линейной экстраполяции приведенной вязкости к нулевой концентрации, т.е. концентрации раствора следует выбирать минимальными в пределах чувствительности и точности метода измерения. Для каждой концентрации раствора определяют  $t_{\text{ср}}$  и рассчитывают приведенную вязкость. Затем строят зависимость  $\eta_{\text{прив.}}$  от концентрации  $c$  и графически или линейным методом наименьших квадратов экстраполируют приведенную вязкость к нулевой концентрации, т.е. находят характеристическую вязкость.

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Растворимость

ОФС.1.2.1.0005.15

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0049-07

В фармакопейном анализе понятие растворимости приводится в качестве характеристики приблизительной растворимости фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ (далее – веществ) при фиксированной температуре. Испытание, если нет других указаний в фармакопейной статье, следует проводить при температуре  $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ .

Если растворимость является показателем чистоты вещества, то в фармакопейной статье должны быть представлены конкретные количественные соотношения вещества и растворителей.

Рекомендуется использовать растворители разной полярности (обычно три); не рекомендуется использование легкокипящих и легковоспламеняющихся (например, диэтиловый эфир) или очень токсичных (например, бензол, метиленхлорид) растворителей.

Растворимость вещества (в пересчете на 1 г вещества) выражают в следующих терминах, приведенных в таблице.

Таблица – Обозначения растворимости фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ

Термин	Примерное количество растворителя (мл), необходимое для растворения 1 г вещества
Очень легко растворим	до 1 включительно
Легко растворим	от 1 до 10 включительно
Растворим	от 10 до 30 включительно
Умеренно растворим	от 30 до 100 включительно
Мало растворим	от 100 до 1000 включительно

Очень мало растворим	от 1000 до 10 000 включительно
Практически нерастворим	более 10 000

Вещество считают растворившимся, если в растворе при наблюдении в проходящем свете не обнаруживаются частицы вещества. В растворе могут присутствовать следовые количества физических примесей, например, таких как волокна фильтровальной бумаги. Для веществ, образующих при растворении опалесцирующие растворы, соответствующее указание должно быть приведено в фармакопейной статье.

Термин «смешивается с...» используется для характеристики жидкостей, смешивающихся с указанным растворителем во всех соотношениях.

Если указано, что вещество растворимо в жирных маслах, то имеется в виду, что оно растворимо в любом масле, относящемся к классу жирных масел.

**Методика определения растворимости.** К навеске растертого в тонкий порошок вещества прибавляют отмеренное количество растворителя и непрерывно встряхивают в течение 10 мин при  $(20 \pm 2)$  °С.

Для медленно растворимых веществ, требующих для своего растворения более 10 мин, допускается нагревание на водяной бане до 30 °С. Наблюдение производят после охлаждения раствора до комнатной температуры и энергичного встряхивания в течение 1 – 2 мин.

Условия растворения медленно растворимых веществ указывают в фармакопейных статьях.

*Для веществ с неизвестной растворимостью испытание проводят по следующей методике.*

К 1,0 г растертого вещества прибавляют 1,0 мл растворителя и проводят растворение, как описано выше. Если вещество полностью растворилось, оно очень легко растворимо.

Если вещество растворилось не полностью, то к 100 мг растертого вещества прибавляют 1,0 мл растворителя и проводят растворение, как

описано выше. Если вещество полностью растворилось, оно легко растворимо.

Если вещество растворилось не полностью, то добавляют 2,0 мл растворителя и продолжают растворение. Если вещество полностью растворилось, оно растворимо.

Если вещество растворилось не полностью, то добавляют 7,0 мл растворителя и продолжают растворение. Если вещество полностью растворилось, оно умеренно растворимо.

Если вещество растворилось не полностью, то к 10 мг растертого вещества прибавляют 10,0 мл растворителя и проводят растворение, как описано выше. Если вещество полностью растворилось, оно мало растворимо.

Если вещество растворилось не полностью, то к 10 мг растертого вещества прибавляют 100 мл растворителя и проводят растворение, как описано выше. Если вещество полностью растворилось, оно очень мало растворимо.

Если вещество не растворилось, оно практически нерастворимо в данном растворителе.

*Для веществ с известной растворимостью* испытание проводят по описанной выше методике, но только для крайних значений, относящихся к указанному термину. Например, если вещество растворимо, то 100 мг растертого вещества не должны растворяться в 1,0 мл растворителя, но должны раствориться полностью в 3,0 мл раствори

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

Степень окраски жидкостей

ОФС.1.2.1.0006.15

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0050-07

---

Окраску жидкостей определяют визуально одним из методов, приведенных ниже, путем сравнения с соответствующими эталонами. В статью включены методы контроля качества лекарственных средств по показателям «цветность» и «цветность раствора». Цветность является условно принятой количественной характеристикой для жидкостей, имеющих незначительную окраску.

Цвет – это восприятие или субъективная реакция наблюдателя на объективный раздражитель в виде энергии, излучаемой в видимой области спектра и охватывающей диапазон длин волн от 400 до 700 нм. Окраска двух растворов совпадает (при определенном источнике света), если их спектры поглощения и отражения идентичны и наблюдатель не замечает разницы между ними.

Ахроматизм или отсутствие окраски означает отсутствие у испытуемого раствора абсорбции в видимой области спектра.

Для визуальной оценки окраски жидкостей в зависимости от интенсивности в области коричневых, желтых и красных цветов используют один из двух методов, описанных в статье.

Бесцветной считается жидкость, если ее окраска не отличается от воды (в случае растворов – от соответствующего растворителя) или она окрашена не более интенсивно, чем эталон В<sub>9</sub>.

Сравнение степени окраски жидкости с эталонами (В, ВУ, У, GY, R)<sub>1-3</sub> обычно проводят по методу 1; в случае использования эталонов В<sub>4-9</sub>, (ВУ, У, GY, R)<sub>4-7</sub> применяют метод 2.

### Метод 1

Испытания проводят в одинаковых пробирках из бесцветного, прозрачного, нейтрального стекла с внутренним диаметром около 12 мм, используя равные объемы (2,0 мл) испытуемой жидкости и воды, или растворителя, или эталона сравнения, описанного в статье. Сравнивают окраску при рассеянном дневном свете, горизонтально (перпендикулярно оси пробирок) на матово-белом фоне.

### **Метод 2**

Испытания проводят в одинаковых пробирках из бесцветного, прозрачного, нейтрального стекла с внутренним диаметром от 15 до 25 мм, используя равные слои высотой 40 мм испытуемой жидкости и воды, или растворителя, или эталона сравнения, описанного в статье. Сравнивают окраску при рассеянном дневном свете сверху вдоль вертикальной оси пробирок на матово-белом фоне.

### **Приготовление исходных растворов**

*Желтый раствор.* 46,0 г (точная навеска) железа(III) хлорида ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ; М. м. 270,30) помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 900 мл смеси, приготовленной из 25 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и 975 мл воды, доводят объем раствора этой же смесью до метки и перемешивают. Определяют количественное содержание железа(III) хлорида в 1 мл раствора. Объем раствора железа(III) хлорида разбавляют этой же смесью таким образом, чтобы содержание железа(III) хлорида в 1 мл составляло 45,0 мг.

Раствор хранят в защищенном от света месте.

*Количественное определение:* 10,0 мл раствора железа(III) хлорида помещают в коническую колбу с притертой пробкой вместимостью 250 мл, прибавляют 15 мл воды, 5 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и 4 г калия йодида, перемешивают, закрывают пробкой и оставляют на 15 мин в темном месте, затем прибавляют 100 мл воды. Титруют выделившийся йод натрия тиосульфата раствором 0,1 М, прибавляя 0,5 мл раствора крахмала 1 % в конце титрования в качестве индикатора.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,1 М раствора натрия тиосульфата соответствует 27,03 мг железа(III) хлорида ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ).

**Красный раствор.** 60,0 г (точная навеска) растертого кобальта хлорида ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ; М. м. 237,93) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 900 мл смеси, приготовленной из 25 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и 975 мл воды, доводят объем раствора этой же смесью до метки и перемешивают. Определяют количественное содержание кобальта хлорида в 1 мл раствора. Объем раствора кобальта хлорида разбавляют этой же смесью таким образом, чтобы содержание кобальта хлорида в 1 мл раствора составляло 59,5 мг.

**Количественное определение.** 5,0 мл раствора кобальта хлорида помещают в коническую колбу с притертой стеклянной пробкой вместимостью 250 мл, прибавляют 5 мл перекиси водорода раствора 3 % и 30 мл натрия гидроксида раствора 10 %. Смесь кипятят с обратным холодильником в течение 10 мин, затем охлаждают до комнатной температуры и прибавляют 60 мл серной кислоты раствора 1 М и 2 г калия йодида. Закрывают колбу и растворяют осадок, осторожно помешивая. Выделившийся йод титруют натрия тиосульфата раствором 0,1 М до бледно-розового окрашивания, используя в качестве индикатора 0,5 мл раствора крахмала 1 % в конце титрования.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл натрия тиосульфата раствора 0,1 М соответствует 23,79 мг кобальта хлорида ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ).

**Голубой раствор.** 63,0 г (точная навеска) меди(II) сульфата ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ; М.м. 249,68) помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, растворяют в 900 мл смеси, приготовленной из 25 мл концентрированной хлористоводородной кислоты и 975 мл воды, доводят объем раствора этой же смесью до метки и перемешивают. Определяют количественное содержание меди(II) сульфата в 1 мл раствора. Объем раствора меди(II) сульфата разбавляют этой же смесью таким образом, чтобы

содержание меди(II) сульфата в 1 мл раствора составляло 62,4 мг.

*Количественное определение.* 10,0 мл раствора меди(II) сульфата помещают в коническую колбу с притертой стеклянной пробкой вместимостью 250 мл, прибавляют 50 мл воды, 12 мл уксусной кислоты раствора 2 М, 3 г калия йодида и перемешивают. Выделившийся йод титруют натрием тиосульфата раствором 0,1 М до бледно-коричневого окрашивания, используя 0,5 мл крахмала раствора 1 % в качестве индикатора в конце титрования.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл натрия тиосульфата раствора 0,1 М соответствует 24,97 мг меди(II) сульфата ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ).

### Приготовление стандартных растворов

Стандартные растворы получают смешением исходных растворов железа(III) хлорида, кобальта хлорида, меди(II) сульфата с хлористоводородной кислоты раствором 1 %, отмеривая их с помощью калиброванной пипетки или бюретки с точностью до 0,02 мл (табл. 1).

Таблица 1 – Стандартные растворы

Стандартные растворы	Желтый исходный раствор, мл	Красный исходный раствор, мл	Голубой исходный раствор, мл	Хлористоводородной кислоты раствор 1 %, мл
В (коричневый)	30,0	30,0	24,0	16,0
ВУ (коричневато-желтый)	24,0	10,0	4,0	62,0
У (желтый)	24,0	6,0	0	70,0
ГУ (зеленовато-желтый)	96,0	2,0	2,0	0
Р (красный)	10,0	20,0	0	70,0

Приготовленные исходные и стандартные растворы помещают в сухие колбы с притертыми пробками и хранят при температуре  $(20 \pm 3)^\circ\text{C}$  в защищенном от попадания прямых солнечных лучей месте.

Срок годности исходных и стандартных растворов – 1 год.

При хранении исходных и стандартных растворов следует перед употреблением убедиться в отсутствие в них помутнения, осадка и хлопьев. При наличии таковых растворы заменяют свежеприготовленными.

## Приготовление эталонов

Эталонные стандартные растворы готовят из 5 стандартных растворов путем разбавления их хлористоводородной кислотой раствором 1 %.

Отмеривание исходных и стандартных растворов для приготовления шкал производят при помощи калиброванной пипетки или бюретки с точностью до 0,02 мл.

Эталонные стандартные растворы для определения степени окраски жидкостей по методу I хранят в ампулах из бесцветного прозрачного нейтрального стекла с наружным диаметром 12 мм, в защищенном от света месте в течение 1 года.

Эталонные стандартные растворы, используемые для определения степени окраски жидкостей по методу II, готовят из соответствующих стандартных растворов непосредственно перед использованием.

Количества компонентов для приготовления эталонов цветности приведены в табл. 2 – 6.

Таблица 2 – Эталонные стандартные растворы (шкала В)

Эталонные стандартные растворы	Стандартный раствор В, мл	Хлористоводородной кислоты раствор 1 %, мл
В <sub>1</sub>	75,0	25,0
В <sub>2</sub>	50,0	50,0
В <sub>3</sub>	37,5	62,5
В <sub>4</sub>	25,0	75,0
В <sub>5</sub>	12,5	87,5
В <sub>6</sub>	5,0	95,0
В <sub>7</sub>	2,5	97,5
В <sub>8</sub>	1,5	98,5
В <sub>9</sub>	1,0	99,0

Таблица 3 – Эталонные стандартные растворы (шкала ВУ)

Эталонные стандартные растворы	Стандартный раствор ВУ, мл	Хлористоводородной кислоты раствор 1 %, мл
ВУ <sub>1</sub>	100,0	0,0
ВУ <sub>2</sub>	75,0	25,0
ВУ <sub>3</sub>	50,0	50,0
ВУ <sub>4</sub>	25,0	75,0

BY <sub>5</sub>	12,5	87,5
BY <sub>6</sub>	5,0	95,0
BY <sub>7</sub>	2,5	97,5

Таблица 4 – Эталонные желтые оттенки (шкала Y)

Эталонные шкалы Y	Стандартный раствор Y, мл	Хлористоводородной кислоты раствор 1 %, мл
Y <sub>1</sub>	100,0	0,0
Y <sub>2</sub>	75,0	25,0
Y <sub>3</sub>	50,0	50,0
Y <sub>4</sub>	25,0	75,0
Y <sub>5</sub>	12,5	87,5
Y <sub>6</sub>	5,0	95,0
Y <sub>7</sub>	2,5	97,5

Таблица 5 – Эталонные зеленовато-желтые оттенки (шкала GY)

Эталонные шкалы GY	Стандартный раствор GY, мл	Хлористоводородной кислоты раствор 1 %, мл
GY <sub>1</sub>	25,0	75,0
GY <sub>2</sub>	15,0	85,0
GY <sub>3</sub>	8,5	91,5
GY <sub>4</sub>	5,0	95,0
GY <sub>5</sub>	3,0	97,0
GY <sub>6</sub>	1,5	98,5
GY <sub>7</sub>	0,75	99,25

Таблица 6 – Эталонные красные оттенки (шкала R)

Эталонные шкалы R	Стандартный раствор R, мл	Хлористоводородной кислоты раствор 1 %, мл
R <sub>1</sub>	100,0	0,0
R <sub>2</sub>	75,0	25,0
R <sub>3</sub>	50,0	50,0
R <sub>4</sub>	37,5	62,5
R <sub>5</sub>	25,0	75,0
R <sub>6</sub>	12,5	87,5
R <sub>7</sub>	5,0	95,0

Степень окраски испытуемого раствора не должна превышать степень окраски соответствующего эталона. Цвет испытуемого образца должен быть максимально приближен к цвету соответствующего эталона.

При сравнении окраски испытуемого раствора с эталонами указывают номера эталона и букву шкалы. Например, окраска раствора не должна превышать эталон B<sub>7</sub>.

При необходимости могут быть использованы другие эталоны, приготовленные путем смешения стандартных растворов разных цветовых шкал с точным указанием их объемов для достижения нужной окраски, приближенной к окраске испытуемого раствора, если это предусмотрено фармакопейной статьей.

Для оценки окраски жидкостей возможно использование спектрофотометрического метода, если это предусмотрено фармакопейной статьей, при этом должны быть указаны: длина волны, при которой наблюдается максимум поглощения в видимой области спектра, толщина кюветы и значение оптической плотности с допустимыми отклонениями.

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

Прозрачность и степень

ОФС.1.2.1.0007.15

мутности жидкостей

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0051-07

---

Прозрачность и степень мутности жидкостей определяют путем сравнения испытуемой жидкости с растворителем или эталонами визуально или инструментальным методом.

Визуальное испытание проводят в одинаковых пробирках с притертой пробкой из прозрачного бесцветного и нейтрального стекла с внутренним диаметром около 15 мм. Для сравнения берут равные объемы эталона и испытуемой жидкости (5 или 10 мл). Испытание проводят при освещении электрической лампой матового стекла мощностью 40 Вт, расположенной над образцом, просматривая растворы перпендикулярно вертикальной оси пробирок на черном фоне через 5 мин после приготовления эталона.

Испытуемую жидкость считают прозрачной, если она по прозрачности не отличается от воды или растворителя, используемого при приготовлении испытуемой жидкости, или ее опалесценция (мутность) не превышает опалесценцию (мутность) эталона I при просмотре в описанных выше условиях.

Эталонами служат взвеси из гидразина сульфата и гексаметилентетрамина.

**Приготовление раствора гидразина сульфата.** 0,50 г гидразина сульфата помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 40 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Раствор выдерживают в течение 4 – 6 ч.

**Приготовление раствора гексаметилентетрамина.** 3,0 г гексаметилентетрамина растворяют в 30,0 мл воды.

**Приготовление исходного эталона.** К 25,0 мл раствора гидразина сульфата прибавляют 25,0 мл раствора гексаметилентетрамина, перемешивают и оставляют на 24 ч.

Исходный эталон стабилен в течение 2 мес при хранении в стеклянной посуде, не имеющей дефектов поверхности (взвесь не должна прилипать к стеклу), с притертой пробкой.

**Приготовление основного эталона.** 15,0 мл исходного эталона помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, доводят объем жидкости водой до метки и перемешивают.

Срок годности основного эталона 24 ч.

**Приготовление эталонов сравнения.** Отмеренное количество основного эталона, указанное в приведенной ниже таблице, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем жидкости водой до метки и перемешивают.

Таблица – Состав эталонов сравнения

Состав эталона сравнения	Эталон сравнения			
	I	II	III	IV
Основной эталон, мл	5,0	10,0	30,0	50,0
Вода, мл	95,0	90,0	70,0	50,0

Примечание. Перед применением исходный, основной и эталоны сравнения перемешивают и встряхивают в течение 3 мин.

Эталон сравнения I, II, III и IV должны быть свежеприготовленными.

Для оценки прозрачности и степени мутности жидкостей допускается использование спектрофотометров или специальных приборов типа турбидиметров, нефелометров или эквивалентных, если это предусмотрено фармакопейной статьей. В таком случае в фармакопейной статье должны быть указаны необходимые условия проведения испытания.

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Зола общая

ОФС.1.2.2.2.0013.15

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0055-07

Требования данной общей фармакопейной статьи распространяются на метод определения золы общей в лекарственных средствах, лекарственном растительном сырье (свежем и высушенном) и лекарственных растительных препаратах.

Определение общей золы проводят с измельченным испытуемым образцом. При необходимости лекарственное средство растирают в ступке перед взятием навески.

Высушенное и свежее лекарственное растительное сырье измельчают с помощью соответствующего оборудования и приспособлений (ножницы, мельницы различных типов, ступки и др.). Высушенное лекарственное растительное сырье измельчают до размера частиц не более 2 мм.

Платиновый, фарфоровый или кварцевый тигель нагревают до красного каления (550 – 650 °С) в течение 30 мин, затем охлаждают в эксикаторе и точно взвешивают. Прокаливание тигля проводят до постоянной массы. Около 1 г (точная навеска) лекарственного средства или 3 – 5 г (точная навеска) высушенного лекарственного растительного сырья, или 5 – 25 г (точная навеска) свежего лекарственного растительного сырья, или 2 – 3 г (точная навеска) лекарственного растительного препарата помещают в подготовленный тигель, равномерно распределяя анализируемую навеску по дну тигля. Испытуемый образец в тигле осторожно нагревают при 100 – 105 °С в течение 1 ч и далее проводят сжигание с последующим прокаливанием остатка образца при температуре 550 – 650 °С. Испытуемый образец свежего лекарственного растительного сырья осторожно нагревают в тигле, не допуская разбрызгивания пробы. Тигель охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Прокаливание повторяют до постоянной массы, избегая

сплавления золы и спекания её со стенками тигля. В ходе сжигания не должно появляться пламя. Если после длительного прокаливания зола все ещё содержит черные частицы, её обрабатывают горячей водой, фильтруют через беззольный бумажный фильтр, осадок и фильтр сжигают, объединяют фильтрат с золой, осторожно упаривают досуха и сжигают, после чего тигель с золой охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Процедура сжигания повторяется до достижения постоянной массы зольного остатка.

Содержание общей золы ( $X$ ) в процентах в лекарственном средстве, свежем и высушенном лекарственном растительном сырье, лекарственном растительном препарате вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m_1 \cdot 100}{m_2},$$

где  $m_1$  – масса золы, г;

$m_2$  – масса лекарственного средства или лекарственного растительного сырья/препарата, г.

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

Сульфатная зола

ОФС.1.2.2.2.0014.15

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0056-07

---

Фарфоровый, кварцевый или платиновый тигель прокаливают при температуре 550 – 650 °С в течение 30 мин, охлаждают в эксикаторе над силикагелем или другим подходящим осушителем и точно взвешивают по окончании каждого прокаливания.

Точную навеску испытуемого вещества (обычно 1 – 2 г) помещают в предварительно прокаленный тигель, смачивают 1 мл серной кислоты концентрированной и осторожно (избегая сильного вспенивания вещества) нагревают на пламени, песчаной бане или электрической плитке с закрытым нагревательным элементом и терморегулятором до обугливания. После охлаждения смачивают остаток 1 мл серной кислоты концентрированной и осторожно нагревают до удаления паров серной кислоты. Затем тигель помещают в муфельную печь и прокаливают при температуре 550 – 650 °С до тех пор, пока остаток полностью не превратится в пепел. При этом следует избегать появления пламени, сплавления золы и спекания ее со стенками тигля. По окончании прокаливания тигель охлаждают в эксикаторе, взвешивают и рассчитывают процентное содержание остатка.

В случае получения результата, превышающего допустимый предел, указанный в фармакопейной статье, остаток вновь смачивают серной кислотой концентрированной, сжигают в течение 30 мин, прокаливают до постоянной массы или до тех пор, пока два последовательных результата взвешивания не будут отличаться не более чем на 0,5 мг, или содержание остатка не будет удовлетворять указанному пределу.

Количество испытуемого вещества выбирается таким образом, чтобы при указанном пределе масса остатка (обычно около 1 мг) могла быть измерена с удовлетворительной точностью.

# ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Определение

ОФС.1.2.3.0002.15

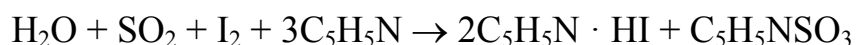
воды

Взамен ст. ГФ XI, вып.1

## 1. Метод К. Фишера (полумикрометод)

Метод основан на химическом взаимодействии воды с компонентами реактива К. Фишера.

**Реактив К. Фишера.** Реактив К. Фишера представляет собой раствор серы диоксида, йода и пиридина (или другого основания, например, имидазола) в метаноле. Взаимодействие реактива с водой протекает в две стадии стехиометрически по уравнениям:



Используемые растворы и реактивы должны быть безводными. Их хранят и применяют в условиях, исключающих возможность воздействия на них атмосферной влаги.

Йодсернистый реактив представляет собой раствор, содержащий пиридин безводный, монометилловый эфир этиленгликоля, йод и серу диоксид. В йодсернистых реактивах часто пиридин заменяют на другие основания. Использование реактивов такого состава должно быть предварительно валидировано для подтверждения в каждом конкретном случае стехиометрии реакции и отсутствия несовместимости между испытуемым веществом и реактивом.

При определении воды в твердых веществах, нерастворимых в метаноле, тонко измельченную навеску вещества взбалтывают с метанолом, после чего титруют реактивом К. Фишера. Некоторые вещества или смеси можно растворять в безводной уксусной кислоте, хлороформе, пиридине и других растворителях.

Пропанол и другие алканолаы имеют большую растворяющую способность для молекул с длинной цепью и могут использоваться как таковые или в смеси с метанолом при анализе высокомолекулярных соединений. 2-Метоксиэтанол (монометиловый эфир этиленгликоля) применяют в тех случаях, когда в присутствии метанола протекают побочные реакции (этерификация, образование кеталей и т. п.). Однако титрование в этом растворителе протекает медленнее по сравнению с метанолом. Хлороформ является хорошим растворителем для жиров и может использоваться в смеси с метанолом, содержание которого обычно составляет 50 %, но не менее 25 %. Формамид улучшает растворимость полярных веществ и может добавляться в метанол для определения воды в протеинах. Не рекомендуется использовать в качестве рабочей среды чистые апротонные растворители, которые нарушают стехиометрию реакции К. Фишера.

Масса навески, время взбалтывания навески с растворителем, а также наименование растворителя, должны быть указаны в фармакопейной статье.

С помощью реактива К. Фишера может быть определена как гигроскопическая, так и кристаллизационная вода. При этом воду можно определять в органических и неорганических соединениях, в различных растворителях и летучих веществах.

**Прибор.** Прибор для титрования по методу К. Фишера представляет собой закрытую систему, состоящую из бюретки, снабженной осушительной трубкой, заполненной, осушающим агентом, (например, молекулярными ситами), сосуда для подачи реактива и колбы для титрования, соединенных с бюреткой. Колба для титрования представляет собой сосуд вместимостью 60 – 100 мл с двумя платиновыми электродами, трубкой для подвода азота, осушительной трубкой, заполненной, осушающим агентом, (например, молекулярными ситами), и пробкой, в которую вставляется кончик бюретки. Испытуемое вещество вносят в сосуд через трубку, расположенную с противоположной стороны по отношению к трубке-осушителю, и закрываемую притертой пробкой. Перемешивание раствора в процессе

титрования осуществляют при помощи магнитной мешалки или продуванием высушенного азота через раствор.

Конечную точку титрования определяют амперометрически. Электрическая схема состоит из потенциометра с сопротивлением 2000 Ом, подключенного к источнику постоянного тока с напряжением 1,5 В и обеспечивающего необходимую разность потенциалов. Разность потенциалов отрегулирована таким образом, чтобы через платиновые электроды, соединенные последовательно с микроамперметром, проходил небольшой начальный ток. При прибавлении реактива стрелка микроамперметра отклоняется, но сразу же возвращается в исходное положение. В конце реакции получаемое отклонение должно оставаться неизменным не менее 30 с.

Конечную точку титрования допускается определять визуально по изменению окраски титруемой жидкости от желтой до красновато-коричневой при условии обеспечения необходимой точности. При этом необходимо проводить контрольный опыт.

Допускается использование автоматических титраторов в соответствии с инструкцией производителя.

Если нет других указаний в фармакопейной статье, используют методику А.

**Методика А.** Точную навеску испытуемого вещества, содержащую приблизительно от 30 до 50 мг воды, помещают в сосуд для титрования, в который предварительно внесено 5,0 мл метанола безводного. Перемешивают 1 мин и титруют реактивом К. Фишера, прибавляя его при приближении к конечной точке по 0,1 – 0,05 мл.

Параллельно проводят контрольный опыт (титруют 5,0 мл метанола безводного).

**Методика Б.** Около 20 мл метанола безводного или растворителя, указанного в фармакопейной статье, помещают в сосуд для титрования и титруют реактивом К. Фишера, определяя конечную точку титрования

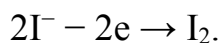
амперометрически. Затем в сосуд для титрования вносят точную навеску испытуемого вещества, указанную в фармакопейной статье. Смесь перемешивают в течение 1 мин и снова титруют реактивом К. Фишера, определяя конечную точку титрования амперометрически.

**Методика В.** Около 10 мл метанола безводного или растворителя, указанного в фармакопейной статье, помещают в сосуд для титрования и титруют йодсернистым реактивом, определяя конечную точку титрования амперометрически.

Затем быстро вносят в сосуд для титрования указанное количество испытуемого вещества и точно отмеренный объем йодсернистого реактива, взятый с избытком приблизительно на 1 мл или объем, указанный в фармакопейной статье. Сосуд закрывают пробкой, выдерживают в защищенном от света месте в течение 1 мин или в течение времени, указанного в фармакопейной статье, периодически перемешивая содержимое сосуда. Избыток йодсернистого реактива титруют до первоначального значения силы тока, используя метанол безводный или растворитель, указанный в фармакопейной статье, к которому было прибавлено точно известное количество воды, эквивалентное около 2,5 мг/мл.

## **2. Микрометод определения воды (кулонометрический)**

При кулонометрическом титровании необходимый для реакции К. Фишера йод образуется при анодном окислении йодид-иона:



Образующийся йод реагирует с присутствующей водой и диоксидом серы в присутствии основания. Йод потребляется до тех пор, пока в среде присутствует вода. Избыток йода указывает на достижение конечной точки титрования. Количество оттитрованной воды пропорционально количеству электричества, пропущенному через ячейку.

1 моль йода соответствует 1 моль воды, а количество электричества 10,71 Кл соответствует 1 мг воды.

Вследствие малого тока титрования кулонометрическое определение применяется для количественного определения микроколичеств воды: от 10 мкг до 10 мг.

Правильность и точность метода должны быть обеспечены устранением атмосферной влаги из системы.

**Оборудование.** Главным блоком прибора является кулонометрическая ячейка. Наиболее часто используемая ячейка состоит из анодного отделения, в котором протекает реакция К. Фишера, и меньшего по объему катодного отделения, в котором протекает катодная реакция восстановления. Каждое отделение содержит платиновый электрод. Анодное отделение заполняется анолитом, в качестве которого используется модифицированный реактив К. Фишера, содержащий йодид-анион вместо йода. Катодное отделение заполняется подходящим католитом, как правило, содержащим соли аммония в качестве активного компонента. Отделения разделены диафрагмой, предотвращающей смешение двух растворов. Поскольку диффузия активных компонентов не может быть полностью исключена диафрагмой, компоненты католита должны быть совместимы с анолитом. Могут использоваться и однокамерные ячейки без диафрагмы. В этом случае анодная и катодная реакции протекают в одном и том же объеме электролита, поэтому катодная реакция восстановления не должна давать продукты, способные окисляться на аноде, что может привести к завышенным результатам определения.

Реакционная ячейка должна поддерживаться в абсолютно сухом состоянии. Заливка реактива в анодное отделение производится через сухую воронку, после чего ячейка немедленно герметизируется. При этом может произойти обесцвечивание реактива. Влагу удаляют из системы предварительным электролизом.

Катодное отделение также должно быть безводным. Небольшой избыток элементарного йода в католите не оказывает влияния на титрование.

Анализируемая жидкая проба вводится в ячейку с анолитом шприцем через силиконовую прокладку. Следует избегать ввода твердых проб в ячейку.

Тем не менее, если необходимо провести испытание на твердых образцах, они вводятся через герметично закрываемый ввод; при этом должны быть предприняты меры по предотвращению поступления в ячейку атмосферной влаги, например, работать в перчаточном боксе в атмосфере сухого инертного газа. Также твердые пробы могут вводиться в виде раствора после растворения в подходящем растворителе, или вода высвобождается из пробы в трубчатой печи при нагревании и переносится в анолит потоком сухого инертного газа. Газы вводятся в анолит через трубку для ввода газа (барботер).

Объем пробы не должен превышать 10 мл. Обычно в ячейку дозируется 0,5 – 5,0 мл жидкой пробы. Газовые пробы вводятся в объеме от 100 мл до 10 л.

**Методика.** Кулонометрическое титрование выполняют до установления конечной точки титрования.

Отделение реакционной ячейки заполняют электролитом для микроопределения воды согласно инструкциям изготовителя. Влагу удаляют из системы предварительным электролизом.

Точное количество испытуемого вещества, указанное в фармакопейной статье, вносят в реакционную ячейку и перемешивают в течение 30 с или в течение времени, указанного в фармакопейной статье. Титруют до установления конечной точки титрования.

При использовании испарителя точную навеску испытуемого вещества, указанную в фармакопейной статье, помещают в трубку и нагревают. После выпаривания воды из образца в ячейку проводят титрование.

Проводят контрольный опыт и вычисляют содержание воды в испытуемом веществе в процентах.

*Проверка точности.* Между двумя последовательными титрованиями вводят точно взвешенное количество воды – такое же, как в определяемом образце, и выполняют кулонометрическое титрование. Результат должен быть в пределах от 97,5 до 102,5 % для содержания 1000 мкг воды в образце и в пределах от 90,0 до 110,0 % для содержания 100 мкг воды в образце.

### **3. Определение воды методом дистилляции**

**Прибор.** Определение проводят с помощью прибора (рисунок), состоящего из стеклянной круглодонной колбы (1) вместимостью от 250 до 500 мл, приемника (2), представляющего собой градуированную пробирку или бюретку вместимостью 6 – 10 мл с ценой деления 0,1 мл, и холодильника (3).

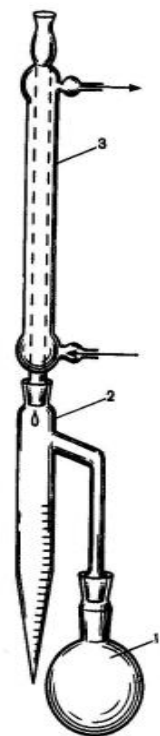


Рисунок – Прибор для определения воды методом дистилляции.  
1 – колба, 2 – приемник, 3 – холодильник

**Методика.** В колбу (1) отвешивают с точностью до 1 % указанное в фармакопейной статье количество испытуемого вещества (точная навеска от 10,0 до 20,0 г, содержащая от 2 до 3 мл воды), прибавляют 100 мл толуола или ксилола и несколько кусочков пористого материала (например, несколько кусочков пемзы). Колбу нагревают на электроплитке или песчаной бане до кипения. Кипячение ведут так, чтобы конденсирующийся растворитель не скапливался в холодильнике, а спокойно стекал навстречу поднимающимся парам жидкости со скоростью от 2 до 4 капель в секунду. Кипячение прекращают, когда объем воды в приемнике перестанет увеличиваться и верхний слой растворителя в приемнике станет прозрачным. Внутреннюю трубку холодильника промывают толуолом и продолжают нагревание еще 5

мин, после чего приемник охлаждают до комнатной температуры и стряхивают со стенок приемника все капли воды.

Вся отогнанная вода собирается в нижней части приемника. После полного разделения слоев.

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Поляриметрия

ОФС.1.2.1.0018.15

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0041-07

Оптическое вращение – свойство вещества вращать плоскость поляризации при прохождении через него поляризованного света.

В зависимости от природы оптически активного вещества вращение плоскости поляризации может иметь различное направление и величину. Если от наблюдателя, к которому направлен свет, проходящий через оптически активное вещество, плоскость поляризации вращается по часовой стрелке, то вещество называют правовращающим и перед его названием ставят знак (+); если же плоскость поляризации вращается против часовой стрелки, то вещество называют левовращающим и перед его названием ставят знак (–).

Величину отклонения плоскости поляризации от начального положения, выраженную в угловых градусах, называют углом вращения и обозначают греческой буквой  $\alpha$ . Величина угла вращения зависит от природы оптически активного вещества, длины пути поляризованного света в оптически активной среде (чистом веществе или растворе) и длины волны света. Для растворов величина угла вращения зависит от природы растворителя и концентрации оптически активного вещества. Величина угла вращения прямо пропорциональна длине пути света, т. е. толщине слоя оптически активного вещества или его раствора. Влияние температуры в большинстве случаев незначительно.

Для сравнительной оценки способности различных веществ вращать плоскость поляризации света вычисляют величину удельного вращения  $[\alpha]$ .

Удельное оптическое вращение  $[\alpha]_D^{20}$  представляет собой угол вращения  $\alpha$  плоскости поляризации монохроматического света при длине волны линии  $D$  спектра натрия (589,3 нм), выраженный в градусах, измеренный при температуре 20 °С, рассчитанный для толщины слоя испытуемого вещества 1 дм и приведенный к концентрации вещества, равной

1 г/мл. Выражается в градус-миллилитрах на дециметр-грамм  $[(^{\circ}) \cdot \text{мл} \cdot \text{дм}^{-1} \cdot \text{г}^{-1}]$ .

Иногда для измерения используют зеленую линию спектра ртути с длиной волны 546,1 нм.

При определении  $[\alpha]$  в растворах оптически активного вещества необходимо иметь в виду, что найденная величина может зависеть от природы растворителя и концентрации оптически активного вещества.

Замена растворителя может привести к изменению  $[\alpha]$  не только по величине, но и по знаку. Поэтому, приводя величину удельного вращения, необходимо указывать растворитель и выбранную для измерения концентрацию раствора.

Удельное вращение определяют в пересчете на сухое вещество или из высушенной навески, что должно быть указано в фармакопейной статье.

Измерение угла вращения проводят на поляриметре, позволяющем определить величину угла вращения с точностью  $\pm 0,02^{\circ}\text{C}$  при температуре  $(20 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ . Измерения оптического вращения могут проводиться и при других значениях температуры, но в таких случаях в фармакопейной статье должен быть указан способ учета температуры. Шкалу обычно проверяют при помощи сертифицированных кварцевых пластинок. Линейность шкалы может быть проверена при помощи растворов сахарозы.

Оптическое вращение растворов должно быть измерено в течение 30 мин с момента их приготовления; растворы или жидкие вещества должны быть прозрачными. При измерении прежде всего следует установить нулевую точку прибора или определить величину поправки с трубкой, заполненной чистым растворителем (при работе с растворами), или с пустой трубкой (при работе с жидкими веществами). После установки прибора на нулевую точку или определения величины поправки проводят основное измерение, которое повторяют не менее 3 раз.

Для получения величины угла вращения  $\alpha$  показания прибора, полученные при измерениях, алгебраически суммируют с ранее найденной

величиной поправки.

Величину удельного вращения  $[\alpha]$  рассчитывают по одной из следующих формул.

Для веществ, находящихся в растворе:

$$[\alpha] = \frac{\alpha \cdot 100}{l \cdot c}, \quad (1)$$

где  $\alpha$  – измеренный угол вращения, градусы;

$l$  – толщина слоя, дм;

$c$  – концентрация раствора, г вещества на 100 мл раствора.

Для жидких веществ:

$$[\alpha] = \frac{\alpha}{l \cdot \rho}, \quad (2)$$

где  $\alpha$  – измеренный угол вращения, градусы;

$l$  – толщина слоя, дм;

$\rho$  – плотность жидкого вещества, г/мл.

Измерение величины угла вращения проводят для оценки чистоты оптически активного вещества или для определения его концентрации в растворе. Для оценки чистоты вещества по уравнению (1) или (2) рассчитывают величину его удельного вращения  $[\alpha]$ . Концентрацию оптически активного вещества в растворе находят по формуле:

$$c = \frac{\alpha \cdot 100}{[\alpha] \cdot l}. \quad (3)$$

Поскольку величина  $[\alpha]$  постоянна только в определенном интервале концентраций, возможность использования формулы (3) ограничивается этим интервалом.

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Рефрактометрия

ОФС.1.2.1.0017.15

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0040-07

Рефрактометрия – метод анализа лекарственных средств, основанный на определении показателя преломления испытуемого вещества.

Показателем преломления (индексом рефракции) называют отношение скорости света в вакууме к скорости света в испытуемом веществе (абсолютный показатель преломления). На практике определяют так называемый относительный показатель преломления ( $n$ ), который является отношением скорости света в воздухе к скорости света в испытуемом веществе.

Показатель преломления зависит от температуры и длины волны света, при которой проводят определение. В растворах показатель преломления зависит также от концентрации вещества и природы растворителя.

Рефрактометрию применяют для установления подлинности и чистоты вещества. Метод применяют также для определения концентрации вещества в растворе, которую находят по графику зависимости показателя преломления раствора от концентрации раствора. На графике выбирают интервал концентраций, в котором наблюдается линейная зависимость между показателем преломления и концентрацией. В этом интервале концентрацию испытуемого раствора ( $X$ , %) вычисляют по формуле:

$$X = (n - n_o)/F,$$

где  $n$  – показатель преломления испытуемого раствора;

$n_o$  – показатель преломления растворителя при той же температуре;

$F$  – фактор, равный величине прироста показателя преломления при увеличении концентрации испытуемого раствора на 1 % (устанавливается экспериментально).

Для определения показателя преломления применяют рефрактометры. Определение проводят при температуре  $(20 \pm 0,5)$  °С и длине волны линии  $D$  спектра натрия (589,3 нм). Показатель преломления, определенный при таких

условиях, обозначается индексом  $n^{20}_D$ .

Современные приборы откалиброваны таким образом, что отсчеты, полученные по их шкалам, соответствуют показателям преломления для  $D$  линии спектра натрия. При проведении измерений следует соблюдать указания в отношении соответствующего источника света, приведенные в инструкции к прибору. Если используют белый свет, то рефрактометр снабжен компенсирующей системой.

Цена деления термометра не должна превышать  $0,5\text{ }^\circ\text{C}$ .

Обычно измерения показателя преломления проводят на рефрактометрах Аббе, в основу которых положено явление полного внутреннего отражения при прохождении светом границы раздела двух сред с разными показателями преломления. Диапазон измеряемых показателей преломления при измерении в проходящем свете  $1,3 - 1,7$ . Точность измерения показателя преломления должна быть не ниже  $\pm (2 \cdot 10^{-4})$ .

Могут быть использованы рефрактометры других типов с такой же или большей точностью.

Рефрактометры юстируют по эталонным жидкостям, значения показателей преломления которых обозначены на этикетке, или по дистиллированной воде, для которой  $n^{20}_D = 1,3330$  и  $n^{25}_D = 1,3325$  ( $\Delta n/\Delta t = -0,000085$ ).

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

<b>Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях</b>	<b>ОФС.1.2.1.1.0003.15 Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0042-07</b>
--	---

---

Спектроскопические методы анализа основаны на избирательном поглощении электромагнитного излучения анализируемым веществом и служат для исследования строения, идентификации и количественного определения светопоглощающих соединений.

В зависимости от используемой аппаратуры в фармацевтическом анализе различают следующие методы анализа, основанные на поглощении электромагнитного излучения и испускании света:

- спектрофотометрия в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях;
- спектрометрия в инфракрасной (ИК) области;
- атомно-эмиссионная спектрометрия (АЭС);
- атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС);
- флуориметрия;
- спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР);
- масс-спектрометрия;
- рамановская спектрометрия;
- рентгеновская флуоресцентная спектрометрия;
- рентгеновская порошковая дифрактометрия.

Ряд длин волн, для которых проводятся измерения методами абсорбционной спектрофотометрии, охватывает спектральную область от коротких длин волн в УФ-области до ИК-области. Для удобства отнесений этот спектральный ряд делится на следующие диапазоны длин волн: УФ (от 190 до 380 нм), видимый (от 380 до 780 нм), ИК (от 0,78 до 400 мкм).

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ И ВИДИМОЙ ОБЛАСТЯХ

Уменьшение интенсивности монохроматического излучения, проходящего через гомогенную поглощающую среду, количественно описывается законом Бугера-Ламберта-Бера:

$$\log_{10}(1/T) = A = \varepsilon \cdot c \cdot b, \quad (1)$$

где  $T$  – пропускание, отношение интенсивности светового потока, прошедшего через вещество, к интенсивности падающего на вещество светового потока:  $T = I/I_0$ ;

$I$  – интенсивность прошедшего монохроматического излучения;

$I_0$  – интенсивность падающего монохроматического излучения;

$\varepsilon$  – молярный показатель поглощения;

$c$  – молярная концентрация вещества в растворе;

$b$  – длина оптического пути или толщина слоя, см.

Величина  $\log_{10}(1/T)$  носит название оптической плотности, обозначается буквой  $A$  и является измеряемой величиной. В отсутствие других физико-химических факторов измеренная оптическая плотность ( $A$ ) пропорциональна концентрации вещества в растворе ( $c$ ) и толщине слоя ( $b$ ).

Величина  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  представляет собой удельный показатель поглощения, т.е. оптическую плотность раствора вещества с концентрацией 10 г/л (1 г/100 мл) в кювете с толщиной слоя 1 см. Величины  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  и  $\varepsilon$  связаны соотношением:

$$A_{1\text{см}}^{1\%} = \frac{10 \cdot \varepsilon}{M.м.}, \quad (2)$$

где М.м. – молекулярная масса исследуемого вещества.

**Измерение оптической плотности.** Если нет других указаний в фармакопейной статье, измерение оптической плотности проводят при указанной длине волны с использованием кювет с толщиной слоя 1 см и при температуре  $(20 \pm 1)$  °С по сравнению с тем же растворителем или той же смесью растворителей, в которой растворено вещество. При измерении оптической плотности раствора при данной длине волны оптическая плотность кюветы с растворителем, измеренная против воздуха при той же длине волны, не должна превышать 0,9 и, желательно, чтобы она была не

менее 0,2.

Спектр поглощения представляют таким образом, чтобы оптическая плотность или ее некоторая функция были приведены по оси ординат, а длина волны или некоторая функция длины волны – по оси абсцисс.

Если в фармакопейной статье для максимума поглощения указывается только одна длина волны, то это означает, что полученное значение максимума не должно отличаться от указанного более чем на  $\pm 2$  нм.

**Приборы.** Спектрофотометры, предназначенные для измерений в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях спектра, состоят из оптической системы, выделяющей монохроматическое излучение в области от 190 до 800 нм и обеспечивающей его прохождение через образец, и устройства для измерения оптической плотности.

Основными частями этих приборов являются: источник излучения, диспергирующий прибор (призма или решетка), щель для выделения полосы длин волн, кюветы для образцов, детектор излучаемой энергии, встроенные усилители и измерительные приборы.

*Проверка шкалы длин волн в УФ и видимой области.* Точность калибровки прибора по шкале длин волн в спектральном ряду проверяют по приведенным в табл. 1 спектральным линиям водородной (H $\beta$ ) или дейтериевой (D $\beta$ ) разрядной лампы, линиям паров ртути (Hg) кварцево-ртутной дуговой лампы, а также по максимумам поглощения раствора гольмия перхлората (Ho) (готовый реактив для калибровки спектрофотометра представляет собой 4 % раствор гольмия оксида в 14,1 % растворе хлорной кислоты). Допустимое отклонение составляет  $\pm 1$  нм для УФ и  $\pm 3$  нм для видимой области.

Таблица 1 – Максимумы поглощения для проверки шкалы длин волн

241,15 нм (Ho)	404,66 нм (Hg)
253,70 нм (Hg)	435,83 нм (Hg)
287,15 нм (Ho)	486,00 нм (D $\beta$ )
302,25 нм (Hg)	486,10 нм (H $\beta$ )
313,16 нм (Hg)	536,30 нм (Ho)

334,15 нм (Hg)	546,07 нм (Hg)
361,50 нм (Ho)	576,96 нм (Hg)
365,48 нм (Hg)	579,07 нм (Hg)

Шкала длин волн может быть калибрована также при помощи подходящих стеклянных фильтров, которые имеют фиксированные полосы поглощения в видимой и УФ областях, а также стандартных стекол, содержащих дидим (смесь празеодима и неодима), и стекол, содержащих гольмий.

*Проверка шкалы оптической плотности.* Для проверки шкалы оптической плотности используют стандартные неорганические стеклянные фильтры или раствор калия дихромата при длинах волн, указанных в табл. 2, где для каждой длины волны приведено точное значение удельного показателя поглощения  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  и допустимые пределы.

Раствор калия дихромата для проверки шкалы оптической плотности при 235, 257, 313 и 350 нм готовят следующим образом: от 57,0 до 63,0 мг (точная навеска) калия дихромата, предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 130 °С, растворяют в 0,005 М растворе серной кислоты и доводят объем раствора тем же растворителем до 1000 мл. Для проверки оптической плотности при 430 нм растворяют 57,0 – 63,0 мг (точная навеска) калия дихромата в 0,005 М растворе серной кислоты и доводят объём раствора тем же растворителем до метки.

Таблица 2 – Удельный показатель поглощения стандартов при различных длинах волн

Длина волны, нм	Удельный показатель поглощения $A_{1\text{см}}^{1\%}$	Допустимые пределы для $A_{1\text{см}}^{1\%}$
235	124,5	от 122,9 до 126,2
257	144,5	от 142,8 до 146,2
313	48,6	от 47,0 до 50,3
350	107,3	от 105,6 до 109,0
430	15,9	от 15,7 до 16,1

*Пределный уровень рассеянного света.* Рассеянный свет может быть обнаружен при данной длине волны с использованием соответствующих фильтров или растворов. Например, оптическая плотность раствора 12 г/л калия хлорида в кювете с толщиной слоя 1 см резко увеличивается между 220 и 200 нм и должна быть больше 2 при 198 нм при использовании воды в качестве раствора сравнения.

*Разрешающая способность* (для качественного анализа). Если есть указание в фармакопейной статье, определяют разрешающую способность спектрофотометра следующим образом. Записывают спектр 0,02 % (о/о) раствора толуола в гексане. Минимально допустимое значение отношения оптической плотности в максимуме поглощения при 269 нм к оптической плотности в минимуме поглощения при 266 нм указывают в фармакопейной статье.

*Ширина спектральной щели* (для количественного анализа). В случае использования спектрофотометра с изменяемой шириной спектральной щели при выбранной длине волны возможны погрешности, связанные с шириной этой щели. Для их исключения ширина щели должна быть малой по сравнению с полушириной полосы поглощения (шириной на половине оптической плотности) и в то же время должна быть максимально велика для получения высокого значения интенсивности падающего монохроматического излучения ( $I_0$ ). Таким образом, ширина щели должна быть такой, чтобы дальнейшее ее уменьшение не изменяло величину измеряемой оптической плотности.

*Кюветы.* Допустимые отклонения в толщине слоя используемых кювет должны быть не более  $\pm 0,005$  см. Кюветы, предназначенные для испытуемого раствора и раствора сравнения, должны иметь одинаковое пропускание (или оптическую плотность) при заполнении одним и тем же растворителем. В противном случае это различие следует учитывать.

*Требования к растворителям.* Для определений, производимых в УФ и видимой областях, образец анализируемого вещества растворяют в

соответствующем растворителе, который должен быть оптически прозрачным в используемой области длин волн. Для этих областей длин волн пригодны многие растворители, в том числе вода, спирты, хлороформ, низшие углеводороды, эфиры и разбавленные растворы сильных кислот и щелочей.

### **Идентификация**

Абсорбционную спектрофотометрию в УФ и видимой областях спектра применяют для определения подлинности лекарственных средств путем:

– сравнения спектров поглощения испытуемого раствора и раствора стандартного образца; в указанной области спектра должно наблюдаться совпадение положений максимумов, минимумов, плеч и точек перегиба;

– указания положений максимумов, минимумов, плеч и точек перегиба спектра поглощения испытуемого раствора; расхождение между наблюдаемыми и указанными длинами волн в максимумах и минимумах поглощения не должно обычно превышать  $\pm 2$  нм.

Возможны и другие варианты применения, оговоренные в фармакопейных статьях.

### **Количественное определение**

Определение концентрации веществ спектрофотометрическим методом основано на использовании закона Бугера-Ламберта-Бера:

$$C = \frac{A}{A_{1\text{см}}^{1\%} \cdot b}, \quad (3)$$

где  $C$  – концентрация вещества, г/100 мл;

$A$  – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$  – удельный показатель поглощения вещества;

$b$  – длина оптического пути или толщина слоя, см.

В ряде случаев даже при использовании монохроматического излучения могут наблюдаться отклонения от закона Бугера-Ламберта-Бера, обусловленные процессами диссоциации, ассоциации и комплексообразования. Поэтому предварительно следует проверить линейность зависимости оптической плотности раствора от концентрации в аналитической области. При наличии отклонений от линейной зависимости

следует пользоваться не формулой (3), а экспериментально найденной зависимостью.

Обычно определение концентрации спектрофотометрическим методом проводят с использованием стандартного образца. Расчет концентрации основан на использовании уравнения:

$$\frac{C}{C_0} = \frac{A}{A_0} , \quad (4)$$

где  $C$  и  $C_0$  – концентрации испытуемого раствора и раствора стандартного образца соответственно;

$A$  и  $A_0$  – оптические плотности испытуемого раствора и раствора стандартного образца соответственно.

Концентрации испытуемого и раствора стандартного образца должны быть близки.

Вначале измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца, приготовленного, как указано в фармакопейной статье, затем проводят измерение оптической плотности испытуемого раствора. Второе измерение проводят сразу после первого с использованием той же кюветы, в тех же экспериментальных условиях.

Метод с использованием раствора стандартного образца является более точным и надежным. Возможность применения значения удельного показателя поглощения в каждом конкретном случае следует обосновывать. Обычно метод с использованием значения удельного показателя поглощения применим при допусках содержания анализируемого вещества не менее  $\pm 10\%$  от номинального содержания.

### **Многокомпонентный спектрофотометрический анализ**

Многокомпонентный спектрофотометрический анализ (анализ смесей) применяют для одновременного количественного определения нескольких компонентов лекарственных средств, каждое из которых подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера.

Количественное определение в многокомпонентном спектрофотометрическом анализе основывается обычно на использовании

уравнения:

$$A_i = \sum_{j=1}^m E_{ij} \cdot c_j, \quad i = 1, \dots, n, \quad (5)$$

где  $A_i$  – оптическая плотность испытуемого раствора при  $i$ -ой длине волны;  
 $E_{ij}$  – показатели поглощения (зависящие от способа выражения концентрации)  $j$ -го компонента образца при  $i$ -ой аналитической длине волны;  
 $c_j$  – концентрация  $j$ -го компонента образца.

Соответствующие методики проведения анализа и расчетные формулы указываются в фармакопейных статьях.

### Производная спектрофотометрия

В производной спектрофотометрии исходные спектры поглощения (нулевого порядка) преобразуются в спектры производных первого, второго и более высокого порядков.

Спектр первой производной представляет собой график зависимости градиента кривой поглощения (скорость изменения оптической плотности от длины волны,  $dA/d\lambda$ ) от длины волны.

Спектр второй производной представляет собой график зависимости кривизны спектра поглощения ( $d^2A/d\lambda^2$ ) от длины волны. Вторая производная при любой длине волны связана с концентрацией следующим соотношением:

$$\frac{d^2A}{d\lambda^2} = \frac{d^2A_{1\text{см}}^{1\%}}{d\lambda^2} \cdot c \cdot l, \quad (6)$$

где  $A$  – оптическая плотность при длине волны  $\lambda$ ;  
 $A_{1\text{см}}^{1\%}$  – удельный показатель поглощения при длине волны  $\lambda$ ;  
 $c$  – концентрация вещества в растворе, г/100 мл;  
 $l$  – толщина слоя, см.

Производная спектрофотометрия может быть использована как для целей идентификации веществ, так и для их количественного определения в многокомпонентных смесях, а также в тех случаях, когда имеется фоновое поглощение, вызванное присутствием веществ, содержание которых не регламентируется.

**Приборы.** Используют спектрофотометры, отвечающие указанным выше требованиям и оснащенные аналоговым резистивно-емкостным дифференцирующим модулем или цифровым дифференциатором, или другими средствами получения производных спектров, в соответствии с инструкцией к прибору. Некоторые методы получения спектров второй производной приводят к смещению длин волн относительно исходного спектра, что следует учитывать там, где это необходимо.

**Разрешающая способность.** Если указано в фармакопейных статьях, записывают спектр второй производной для раствора 0,2 г/л толуола в метаноле, используя метанол в качестве раствора сравнения. На спектре должен присутствовать небольшой отрицательный экстремум, расположенный между двумя большими отрицательными экстремумами при 261 и 268 нм, в соответствии с рисунком. Если нет других указаний в фармакопейных статьях, отношение  $A/B$  должно быть не менее 0,2.

**Методика.** Процедура анализа аналогична применяемой в обычной спектрофотометрии, но вместо оптических плотностей используют производные. Готовят раствор испытуемого образца, настраивают прибор в соответствии с инструкцией производителя и рассчитывают количество определяемого вещества, как указано в фармакопейной статье.

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Спектрометрия в

ОФС.1.2.1.1.0002.15

инфракрасной области

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0043-07

Инфракрасные спектры (колебательные спектры) (ИК-спектры) возникают вследствие поглощения энергии электромагнитного излучения при колебаниях ядер атомов в молекулах или ионах, которые сопровождаются изменением дипольных моментов, и представляют собой зависимость пропускания или поглощения от длины волны ( $\lambda$ ) или частоты колебаний ( $\nu$ ).

Под инфракрасной областью (ИК-область) подразумевают электромагнитное излучение в области длин волн от 0,78 до 400 мкм. Область от 780 до 2500 нм (от 0,78 до 2,5 мкм) рассматривается как ближняя ИК-область, область от 2,5 до 25 мкм (от 4000 до 400 см<sup>-1</sup>) относится к средней ИК-области спектра и область от 25 до 400 мкм относится к дальней ИК-области. Наиболее часто используется средняя ИК-область.

Длину волны ( $\lambda$ ) в ИК-спектрах обычно измеряют в микрометрах (микронах), мкм.

Поскольку частота колебаний в ИК-спектрах имеет большие числовые значения, обычно используют не частоты ( $\nu$ ), а волновые числа ( $\bar{\nu}$ ), которые измеряются в см<sup>-1</sup> и связаны с частотой ( $\nu$ ) уравнением:

$$\bar{\nu} = \nu / c ,$$

где  $\nu$  – частота, Гц (с<sup>-1</sup>);

$c$  – скорость света в вакууме, см·с<sup>-1</sup>.

Волновое число ( $\bar{\nu}$ ) связано с длиной волны ( $\lambda$ , мкм) соотношением:

$$\bar{\nu} = 10^4/\lambda.$$

**Приборы.** Могут быть использованы инфракрасные спектрофотометры, снабженные оптической системой (призмы или дифракционные решетки), выделяющей монохроматическое излучение в измеряемой области, или спектрофотометры с Фурье-преобразованием. В последних используется полихроматическое излучение и рассчитывается спектр в заданной области

частот путем Фурье-преобразования исходных данных. В таких приборах вместо диспергирующего прибора используется интерферометр, а обработка спектральных данных производится с помощью компьютера.

**Подготовка образца.** Для записи спектра пропускания или поглощения готовят образец субстанции по одной из следующих методик.

*Жидкости.* Жидкости исследуют в форме пленки между двумя пластинками, прозрачными для инфракрасного излучения, или в кювете с малой (обычно 0,01 – 0,05 мм) толщиной слоя, также прозрачной для инфракрасного излучения.

*Жидкости или твердые вещества в растворе.* Готовят раствор испытуемой субстанции в подходящем растворителе. Выбирают концентрацию вещества и толщину слоя кюветы, позволяющие получить удовлетворительный спектр.

Обычно хорошие результаты получают при концентрациях от 10 до 100 г/л при толщине слоя от 0,5 до 0,1 мм.

Поглощение растворителя компенсируют путем помещения в канал сравнения аналогичной кюветы, содержащей выбранный растворитель.

*Кюветы.* Если кюветы, заполненные растворителем, обладают разным поглощением при выбранной длине волны, то вносят поправку на измеренное поглощение испытуемого раствора. При использовании спектрофотометров с Фурье-преобразованием коррекция кювет не требуется, поскольку одна и та же кювета может быть использована и для растворителя и для испытуемого раствора. Кюветы для спектрометрии в инфракрасной области изготавливают из солевых материалов (NaCl, KBr, CaF<sub>2</sub>, LiF и др.). Область прозрачности кюветы в ИК-области зависит от использованного материала.

*Растворители.* Не существует растворителей, которые при значительной толщине слоя были бы полностью прозрачными для ИК-спектров. Четыреххлористый углерод (при толщине слоя до 5 мм) практически прозрачен до 6 мкм (1666 см<sup>-1</sup>). Углерода дисульфид (толщиной 1 мм) подходит как растворитель до 40 мкм (250 см<sup>-1</sup>) за исключением

областей от 4,2 до 5,0 мкм (от 2381 до 2000 см<sup>-1</sup>) и от 5,5 до 7,5 мкм (от 1819 до 1333 см<sup>-1</sup>), где он имеет сильное поглощение. Другие растворители прозрачны в относительно узкой области. Растворители, применяемые в спектрометрии в инфракрасной области, должны быть инертны к материалу, из которого сделана кювета.

**Твердые вещества.** Твердые вещества исследуют в твердом состоянии (диски из галогенидов щелочных металлов), диспергированными в подходящей жидкости в виде суспензии или формируют пленку из расплавленной массы между двумя пластинами, прозрачными для инфракрасного излучения. Подготовку образца описывают в фармакопейной статье.

*Диски.* 1 – 3 мг вещества, предназначенного для испытания, растирают с 150 – 200 мг (если не указано иначе в фармакопейной статье) тщательно измельченного и высушенного калия бромида или калия хлорида (обычно используют калия бромид). Типичные условия высушивания калия бромида: при 105 °С в вакууме, в течение 12 ч. Обычно такого количества достаточно для приготовления диска диаметром 13 мм и получения спектра подходящей интенсивности. Смесь тщательно перетирают, добиваясь необходимой однородности, и прессуют диск при давлении около 800 МПа (8 т/см<sup>2</sup>) в вакууме (2 – 3 мм рт. ст.) в течение 2 – 5 мин. Причиной образования некачественных дисков могут быть такие факторы, как недостаточное или чрезмерное растирание, влага или иные примеси в дисперсионной среде. Диск не пригоден для испытания, если в области прохождения луча на диске имеются трещины, или при визуальном осмотре он неоднороден по прозрачности, или его пропускание при 2000 см<sup>-1</sup> (5 мкм) составляет менее 60 % без компенсации при отсутствии специфической полосы поглощения.

*Суспензии.* Небольшое количество вещества, предназначенного для испытания, растирают с минимальным количеством вазелинового масла или другой подходящей жидкости (смешивают 5 – 20 мг твердого вещества с 1 – 2 каплями иммерсионной жидкости). Полученную суспензию сжимают между

двумя пластинками (NaCl или KBr), прозрачными для инфракрасного излучения.

**Газы.** Газы исследуют в кювете, прозрачной для инфракрасного излучения, с длиной оптического пути около 100 мм. Откачивают воздух из кюветы и заполняют анализируемым газом через кран или при помощи игольчатого клапана.

Если необходимо, доводят давление в кювете до атмосферного, используя газ, прозрачный для инфракрасного излучения (например, азот или аргон). Для исключения помех, связанных с поглощением воды, углерода диоксида или других атмосферных газов, в канал сравнения помещают идентичную кювету, которая либо вакуумирована, либо заполнена газом, прозрачным для инфракрасного излучения.

Для записи спектра по **методу нарушенного полного внутреннего отражения** подготовку образца проводят одним из способов.

**Растворы.** Вещество растворяют в соответствующем растворителе, соблюдая условия, приведенные в фармакопейной статье. Раствор испаряют на поверхности внутреннего элемента отражения, который обычно изготавливают из кристалла бромида йодида таллия (KRS-5), германия или другого минерала с большим показателем преломления.

**Твердые вещества.** Вещество помещают на поверхность внутреннего элемента отражения таким образом, чтобы достичь как можно более плотного и полного контакта со всей поверхностью кристалла (обычно подготовку таких образцов проводят под давлением).

Подготовка образцов для **спектрометрии в инфракрасной области диффузного отражения**: испытуемое вещество растирают с тщательно измельченным и высушенным калия бромидом или калия хлоридом. Если не указано иначе в фармакопейной статье, содержание испытуемого вещества в полученной смеси должно составлять около 5 %. Смесь тщательно перетирают и регистрируют спектр.

**Идентификация с использованием стандартных образцов**

Образец испытуемого вещества и стандартный образец готовят по одной и той же методике и записывают спектры, если не указано иначе в фармакопейной статье, в области от 4000 до 650 см<sup>-1</sup>, в некоторых случаях до 200 см<sup>-1</sup>, в одних и тех же условиях. Полосы поглощения в спектре испытуемого образца должны соответствовать по положению полосам поглощения в спектре стандартного образца. Под полосами поглощения подразумевают минимумы пропускания и максимумы поглощения.

Если спектры, полученные в твердом состоянии, показывают различия в положении полос поглощения, то испытуемую субстанцию и стандартный образец обрабатывают одним и тем же способом так, чтобы они кристаллизовались или получались в одной и той же форме, или обрабатывают способом, указанным в фармакопейной статье, а затем снимают спектры.

#### **Идентификация с использованием эталонных спектров**

*Контроль разрешающей способности.* Записывают спектр пленки полистирола толщиной 0,04 мм. Разность  $x$  (рисунок) между процентом пропускания при максимуме пропускания А при 2870 см<sup>-1</sup> (3,48 мкм) и минимуме пропускания В при 2849,5 см<sup>-1</sup> (3,51 мкм) должна быть больше 18. Разность  $y$  между процентом пропускания при максимуме пропускания С при 1589 см<sup>-1</sup> (6,29 мкм) и минимуме пропускания D при 1583 см<sup>-1</sup> (6,32 мкм) должна быть больше 10.

Контроль разрешающей способности ИК-спектрометров с Фурье-преобразованием проводят в соответствии с рекомендациями производителя прибора.

*Проверка шкалы волновых чисел.* Шкала волновых чисел может быть проверена с помощью пленки полистирола, которая имеет минимум пропускания (максимум поглощения) при волновых числах (в см<sup>-1</sup>), приведенных в таблице.

*Методика.* Субстанцию готовят к испытанию в соответствии с инструкцией, прилагаемой к эталонному спектру. Используя условия, при которых проводилась проверка разрешающей способности, записывают

спектр испытуемого образца и на него накладывают полосы полистирола при  $2849,5 \text{ см}^{-1}$  (3,51 мкм),  $1601,2 \text{ см}^{-1}$  (6,25 мкм) и  $1028,3 \text{ см}^{-1}$  (9,72 мкм). Сравнивают два спектра (эталонный и спектр испытуемой субстанции) и полосы полистирола, указанные выше. При использовании положения полос полистирола в качестве стандартных величин, положения значимых полос в спектре испытуемой субстанции и в эталонном спектре должны соответствовать друг другу в пределах 0,5 % от шкалы волновых чисел. Относительная величина полос обоих спектров должна согласовываться между собой.

Таблица 1 – Минимумы пропускания и допустимые пределы для пленки полистирола

Минимумы пропускания, $\text{см}^{-1}$	Допустимые пределы, $\text{см}^{-1}$	
	ИК-спектрометр с монохроматором	ИК-спектрометр с Фурье-преобразованием
3060,0	$\pm 1,5$	$\pm 1,0$
2849,5	$\pm 1,5$	$\pm 1,0$
1942,9	$\pm 1,5$	$\pm 1,0$
1601,2	$\pm 1,0$	$\pm 1,0$
1583,0	$\pm 1,0$	$\pm 1,0$
1154,5	$\pm 1,0$	$\pm 1,0$
1028,3	$\pm 1,0$	$\pm 1,0$

### Примеси в газах

Для анализа примесей в газах используют кювету, прозрачную для инфракрасного излучения и имеющую соответствующую длину оптического пути. Кювету заполняют так, как указано в разделе «Газы». Для обнаружения и количественной оценки примесей используют методики, указанные в фармакопейных статьях.

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

Флуориметрия

ОФС.1.2.1.1.0006.15

Взамен ГФ XII, ч.1, ОФС 42-0045-07

---

Флуориметрия (или флуоресцентная спектрофотометрия) является методом анализа, основанным на измерении флуоресценции. Флуоресценция (один из видов люминесценции) – испускание света химическим веществом, находящимся в возбуждённом состоянии, при переходе в основное состояние. Первоначальный переход вещества из основного в возбуждённое состояние происходит при этом виде люминесценции за счёт поглощения им световой энергии при облучении ультрафиолетовым, видимым или иным электромагнитным излучением. Флуоресценция органических соединений охватывает спектральную область от 200 до 830 нм.

Как правило, длина волны флуоресцентного излучения больше длины волны возбуждения на 20 – 30 нм и более из-за потери части энергии в возбуждённом состоянии (Стоксов сдвиг). Поглощение и испускание излучения осуществляется благодаря переходу электронов между различными энергетическими уровнями или молекулярными орбиталями. Испускание света происходит через определённый промежуток времени после его поглощения; этот промежуток времени представляет собой длительность пребывания молекулы в возбуждённом состоянии. Для большинства флуоресцирующих веществ время затухания флуоресценции составляет обычно  $10^{-9}$  –  $10^{-8}$  с. Короткое время жизни флуоресценции отличает этот тип люминесценции от фосфоресценции, которая представляет собой долгоживущее свечение, имеющее время жизни от  $10^{-3}$  с до нескольких мин.

Метод флуориметрии в 10 – 100 раз чувствительнее абсорбционной спектрофотометрии, но флуоресцентными свойствами обладает только ограниченный круг соединений: ароматические, особенно с конденсированными структурами, гетероциклические и карбонильные

соединения. Из фармацевтических субстанций определению методом флуориметрии подлежат аминокислоты (фенилаланин, триптофан, тирозин), алкалоиды (стрихнин, резерпин, хинин), витамины (фолиевая кислота, рибофлавин, ретинола ацетат), стероидные гормоны (этинилэстрадиол).

Интенсивность флуоресценции измеряется в условных единицах, пропорциональных отклику детектора и обозначается символом  $I$ .

*Спектр испускания флуоресценции* представляет собой зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны (в нм) или частоты (в  $\text{см}^{-1}$ ) при заданной длине волны возбуждения. *Спектр возбуждения флуоресценции* представляет собой зависимость интенсивности излучения в максимуме испускания флуорофора от длины волны или частоты возбуждающего света. При этом спектр возбуждения обычно совпадает со спектром поглощения, так же как и интенсивность флуоресценции пропорциональна светопоглощению. Комбинирование спектров испускания, полученных при различных длинах волн возбуждения, даёт трёхмерную карту испускания.

**Приборы.** Для проведения флуориметрического анализа используют приборы двух типов: *фильтрационный флуориметр* и *спектрофлуориметр*.

*Фильтрационный флуориметр* состоит из источника излучения, первичного фильтра длин волн, камеры для образца, вторичного фильтра длин волн и системы детектирования флуоресценции. Как правило, детектор помещен под углом  $90^\circ$  к возбуждающему световому потоку. Геометрия прямого угла предусматривает детектирование только произведенного флуоресцентного сигнала. Однако детектор все-таки получает часть возбуждающего излучения в результате рассеивающих свойств самого раствора, а также из-за присутствия в растворе твердых частиц. Для устранения этого остаточного рассеяния используются спектральные фильтры. Первичный фильтр отбирает коротковолновое излучение, способное к возбуждению испытуемых образцов, вторичный фильтр пропускает флуоресценцию в длинноволновой области, но блокирует рассеянное возбуждение.

Детекторы флуориметров преобразуют оптический сигнал в электрический с помощью фотоумножителей разных типов. Каждый тип детектора имеет специальные характеристики: спектральная область максимальной чувствительности, степень усиления, соотношение сигнал/шум.

*Спектрофлуориметры* отличаются от фильтрационных флуориметров тем, что вместо спектральных фильтров в них используются монохроматоры типа призмы или решетки. Эти приборы более предпочтительны для аналитических целей. В спектрофлуориметрах монохроматоры снабжены щелями. Чем уже щель, тем выше разрешение и спектральная чистота, но меньше чувствительность. Выбор размера щели определяется разделением между длинами волн возбуждающего и испускаемого излучения и необходимым уровнем чувствительности.

В качестве источников возбуждающего излучения в флуориметрах используют:

- ртутные лампы низкого давления, предоставляющие большое количество длин волн возбуждения, но не являющиеся источником излучения равномерного спектра;

- ксеноновые газоразрядные лампы, обеспечивающие высокоинтенсивное почти равномерное излучение в широком диапазоне спектра (300 – 800 нм) и достаточно интенсивное в коротковолновой области вплоть до 200 нм;

- лазеры, излучающие свет высокой интенсивности в очень узком интервале длин волн (не более 0,01 нм) и позволяющие благодаря этому не использовать монохроматоры или первичные светофильтры;

- светодиоды и светодиодные матрицы, излучающие свет в определённых диапазонах длин волн.

Для размещения анализируемых проб в флуориметрах используют, как правило, прямоугольные кварцевые кюветы, отполированные со всех 4 вертикальных сторон, иногда – цилиндрические кюветы или пробирки.

Обычно объем испытуемых образцов составляет 2 – 3 мл, но к некоторым приборам прилагаются кюветы вместимостью от 100 до 300 мкл или капиллярные держатели для еще меньшего объема.

**Измерение флуоресценции.** Флуоресценцию определяют в растворах с концентрацией от  $10^{-5}$  М и менее, в диапазоне, для которого наблюдается прямая зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации. При более высоких концентрациях всё более значительная часть поступающего света поглощается образцом вблизи поверхности кюветы, и линейная зависимость величины сигнала от концентрации определяемого вещества нарушается.

Все замеры интенсивности флуоресценции должны быть скорректированы с растворителем.

Интенсивность флуоресценции зависит от:

- температуры,
- растворителя,
- величины рН испытуемого раствора,
- присутствия в растворе посторонних частиц,
- концентрации кислорода в испытуемом растворе,
- постороннего освещения.

Эффективность флуоресценции обратно пропорциональна температуре. Для некоторых веществ эффективность флуоресценции может снижаться на 1 – 2 % при повышении температуры на 1 °С. В таких случаях требуется термостатирование образцов.

Интенсивность и спектральное распределение флуоресценции зависит от растворителя. Многие соединения, флуоресцирующие в органических растворителях, фактически не флуоресцируют в воде.

Перед измерением флуоресценции из испытуемого раствора фильтрованием или центрифугированием должны быть удалены твёрдые частицы, так как они могут поглощать некоторую долю возбуждающей энергии, дезактивировать возбужденные молекулы или завышать измеряемую

величину из-за многократных отражений в кювете с образцом.

Интенсивность флуоресценции обратно пропорциональна концентрации кислорода, являющегося сильным гасителем флуоресценции. По степени тушения флуоресценции можно определять концентрацию кислорода в окружающей среде. Для удаления кислорода через испытуемый образец пропускают азот или гелий.

Большинство флуоресцирующих веществ чувствительно к свету. Во время облучения во флуориметре они могут подвергаться фоторазложению с образованием других флуоресцирующих продуктов. Такие эффекты обнаруживаются при наблюдении за откликом детектора во времени и могут быть снижены путём приглушения света с помощью светофильтров или экранов.

### **Применение флуориметрии в фармацевтическом анализе**

**Идентификация.** Спектры флуоресценции специфичны для определяемых веществ. Поэтому флуоресценция может быть применена для их идентификации.

**Количественный анализ.** При количественных определениях интенсивность флуоресценции раствора испытуемого образца сравнивают с интенсивностью флуоресценции раствора стандартного образца флуоресцирующего вещества известной концентрации, измеренной в идентичных условиях на одном и том же приборе.

**Методика.** Растворяют испытуемый образец в растворителе или в смеси растворителей, указанных в нормативной документации. Переносят раствор в кювету или пробирку флуориметра и облучают возбуждающим светом при длине волны, указанной в нормативной документации.

Измеряют интенсивность испускаемого света под углом  $90^\circ$  к возбуждающему свету после прохождения через светофильтр или монохроматор, пропускающий преимущественно испускаемый диапазон длин волн.

*Последовательность выполнения анализа.* Вначале в прибор помещают

растворитель или смесь растворителей, используемых для растворения вещества, и устанавливают регистрирующее устройство на нулевое значение. Затем вводят раствор стандартного образца и устанавливают чувствительность прибора таким образом, чтобы отклик показаний был не менее 50. Если для регулировки чувствительности требуется изменение ширины щели, должны быть повторены обнуление прибора на растворитель и измерение интенсивности флуоресценции стандартного образца. После этого вводят растворы испытуемых образцов неизвестной концентрации и регистрируют показания прибора. В случае линейной зависимости интенсивности испускаемого света от концентрации вещества рассчитывают последнюю в испытуемом растворе ( $C$ ) по формуле:

$$C = \frac{I \cdot C_0}{I_0},$$

где  $C_0$  – концентрация вещества в стандартном растворе;

$I$  – интенсивность света, испускаемого испытуемым раствором;

$I_0$  – интенсивность света, испускаемого стандартным раствором.

Если интенсивность флуоресценции не прямо пропорциональна концентрации раствора, измерение может быть произведено с использованием калибровочной кривой.

В некоторых случаях измерение флуоресценции испытуемого образца может быть выполнено относительно независимого стандарта (например, флуоресцентного стекла или раствора другого флуоресцентного вещества). В качестве стандартов могут быть использованы: раствор известной концентрации хинина в 0,05 М растворе серной кислоты или раствор флуоресцеина в 0,1 М растворе натрия гидроксида. В таких случаях концентрацию испытуемого образца следует определять с использованием предварительно полученной в тех же условиях калибровочной кривой.

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

Спектроскопия ядерного  
магнитного резонанса

ОФС.1.2.1.1.0007.15  
Взамен ГФ XII, ч.1,  
ОФС 42-0046-07

---

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) – метод, основанный на поглощении радиочастотного электромагнитного излучения ядрами образца с ненулевым магнитным моментом, помещенного в постоянное магнитное поле ( $B_0$ ). Ненулевые магнитные моменты имеют изотопы ядер элементов с нечетной атомной массой ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$  и др.).

**Общие принципы.** Вращающееся вокруг своей оси ядро имеет собственный момент количества движения (угловой момент, или спин)  $P$ . Магнитный момент ядра  $\mu$  прямо пропорционален спину:  $\mu = \gamma \cdot P$  ( $\gamma$  – коэффициент пропорциональности или гиромагнитное отношение). Угловой и магнитный моменты являются квантованными, т.е. могут находиться в одном из  $2I + 1$  спиновых состояний ( $I$  – спиновое квантовое число). Различные состояния магнитных моментов ядер обладают одинаковой энергией, если на них не действует внешнее магнитное поле. При помещении ядер во внешнее магнитное поле  $B_0$  энергетическое вырождение ядер снимается и возникает возможность энергетического перехода с одного уровня на другой. Процесс распределения ядер между различными энергетическими уровнями протекает в соответствии с законом распределения Больцмана и приводит к появлению макроскопической равновесной продольной намагниченности  $M_z$ . Время, которое требуется для создания  $M_z$  после включения внешнего магнитного поля  $B_0$ , называется временем *продольной* или *спин-решеточной релаксации* ( $T_1$ ). Нарушение равновесного распределения ядер происходит под действием радиочастотного магнитного поля ( $B_1$ ), перпендикулярного  $B_0$ , которое вызывает дополнительные переходы между энергетическими уровнями, сопровождающиеся поглощением энергии (явление *ядерного магнитного*

резонанса). Частота  $\nu_0$ , при которой возникает поглощение энергии ядрами (*Ларморова* или *резонансная частота поглощения*), изменяется в зависимости от величины постоянного поля  $B_0$ :  $\nu_0 = \gamma B_0 / 2\pi$ . В момент резонанса происходит взаимодействие между индивидуальными ядерными магнитными моментами и полем  $B_1$ , которое выводит вектор  $M_z$  из его равновесного положения вдоль оси  $z$ . В результате появляется *поперечная намагниченность*  $M_{xy}$ . Ее изменение, связанное с обменом внутри спиновой системы, характеризуется временем *поперечной* или *спин-спиновой релаксации* ( $T_2$ ).

Зависимость интенсивности поглощения энергии ядрами одного типа от частоты радиочастотного магнитного поля при фиксированном значении  $B_0$  называется *одномерным спектром ядерного магнитного резонанса* ядра данного типа. Спектр ЯМР может быть получен двумя способами: при непрерывном облучении образца радиочастотным полем с изменяющейся частотой, в результате чего регистрируется непосредственно спектр ЯМР (спектроскопия с непрерывным облучением), или при воздействии на образец короткого радиочастотного импульса (*импульсная спектроскопия*). В импульсной спектроскопии ЯМР регистрируется затухающее во времени когерентное излучение, испускаемое ядрами при возвращении в исходное спиновое состояние (*сигнал спада свободной индукции*) с последующим преобразованием временной шкалы в частотную (*Фурье-преобразование*).

В молекулах электроны атомов уменьшают величину действующего внешнего магнитного поля  $B_0$  в месте нахождения ядра, т.е. проявляется *диамагнитное экранирование*:

$$B_{\text{лок}} = B_0 \cdot (1 - \sigma),$$

где  $B_{\text{лок}}$  – напряженность результирующего поля;

$\sigma$  – константа экранирования.

Разница в резонансных частотах сигналов ядер, равная разнице в их константах экранирования, называется *химическим сдвигом* сигналов, обозначается символом  $\delta$ , измеряется в миллионных долях (м.д.). Взаимодействие магнитных моментов ядер через посредство электронов

химической связи (*спин-спиновое взаимодействие*) вызывает расщепление сигнала ЯМР (*мультиплетность, m*). Количество компонент в мультиплетах определяется спином ядра и количеством взаимодействующих ядер. Мерой спин-спинового взаимодействия является *константа спин-спинового взаимодействия (J*, измеряется в герцах, Гц). Значения  $\delta$ ,  $m$  и  $J$  не зависят от величины постоянного магнитного поля.

Интенсивность сигнала ЯМР ядра в спектре определяется заселенностью его энергетических уровней. Из ядер с естественным содержанием изотопов наиболее интенсивные сигналы дают ядра водорода. На интенсивность сигналов ЯМР также влияет время продольно-поперечной релаксации (большие  $T_1$  ведут к уменьшению интенсивности сигнала).

Ширина сигналов ЯМР (разница между частотами на полувысоте сигнала) зависит от  $T_1$  и  $T_2$ . Малые времена  $T_1$  и  $T_2$  обуславливают широкие и мало интерпретируемые сигналы спектра.

Чувствительность метода ЯМР (предельно обнаруживаемая концентрация вещества) зависит от интенсивности сигнала ядра. Для ядер  $^1\text{H}$  чувствительность составляет  $10^{-9} \div 10^{-11}$  моль.

Корреляции различных спектральных параметров (например, химических сдвигов различных ядер в пределах одной молекулярной системы) могут быть получены гомо- и гетероядерными методами в формате 2D или 3D.

**Прибор.** Импульсный спектрометр ЯМР (ЯМР-спектрометр) с высокой разрешающей способностью состоит из:

- магнита для создания постоянного магнитного поля  $B_0$ ;
- термостатируемого датчика с держателем образца для подачи радиочастотного импульса и определения излучения, испускаемого образцом;
- электронного устройства для создания радиочастотного импульса, регистрации, усиления и преобразования сигнала спада свободной индукции в цифровую форму;
- устройства для настройки и регулировки электронных контуров;

- устройства сбора и обработки данных (компьютер);

и может также включать:

проточную кювету для проведения жидкостной хроматографии ядерного магнитного резонанса или проточно-инъекционного анализа;

- систему для создания импульсного градиента магнитного поля.

Сильное магнитное поле генерируется катушкой сверхпроводимости в сосуде Дьюара, заполненном жидким гелием.

Следует проверять надлежащее функционирование ЯМР-спектрометра. Для проверки проводят соответствующие испытания, включающие, как правило, измерение ширины спектральной линии на полувысоте определенных пиков при определенных условиях (*разрешение*), воспроизводимость положения сигнала и отношение сигнал/шум (отношение между интенсивностью определенного сигнала в спектре ЯМР и случайных колебаний в области спектра, не содержащего сигналов от анализируемого вещества,  $S/N$ ) для стандартных смесей. В программном обеспечении спектрометров имеются алгоритмы по определению  $S/N$ . Все изготовители приборов предоставляют спецификации и протоколы измерения этих параметров.

### **Спектроскопия ЯМР образцов в растворах**

**Методика.** Испытуемый образец растворяют в растворителе, к которому может быть добавлен соответствующий эталон для калибровки химического сдвига, как указано в нормативной документации. Величина относительного химического сдвига ядра вещества ( $\delta_{в-во}$ ) определяется следующим выражением:

$$\delta_{в-во} = (v_{в-во} - v_{эталон})/v_{прибора},$$

где  $v_{в-во}$  – частота резонанса ядра вещества, Гц;

$v_{эталон}$  – частота резонанса ядра эталона, Гц;

$v_{прибора}$  – рабочая частота ЯМР-спектрометра (частота, на которой выполняются условия резонанса для ядер водорода при данном  $B_0$ , МГц).

Для растворов в органических растворителях химический сдвиг в спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  измеряется относительно сигнала тетраметилсилана, положение которого принято за 0 м.д. Отсчет химических сдвигов ведется в сторону слабого поля (влево) от сигнала тетраметилсилана (дельта – шкала химических сдвигов). Для водных растворов в качестве эталона в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  используется 2,2-диметил-2-силанпентан-5-сульфонат натрия, химический сдвиг протонов метильной группы которого равен 0,015 м.д. Для спектров  $^{13}\text{C}$  водных растворов в качестве эталона используют диоксан, химический сдвиг которого равен 67,4 м.д.

При калибровке спектров  $^{19}\text{F}$  в качестве первичного эталона с нулевым значением химического сдвига используют трифторуксусную кислоту или трихлорфторметан; спектров  $^{31}\text{P}$  – 85 % раствор ортофосфорной кислоты или триметилфосфат; спектров  $^{15}\text{N}$  – нитрометан либо насыщенный раствор аммиака. В  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$  ЯМР, как правило, используют внутренний эталон, который непосредственно прибавляют к испытываемому образцу. В  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  и  $^{31}\text{P}$  ЯМР часто используют внешний эталон, который находится отдельно в коаксиальной цилиндрической пробирке или капилляре.

При описании спектров ЯМР необходимо указывать растворитель, в котором растворено вещество, и его концентрацию. В качестве растворителей используют легкоподвижные жидкости, в которых для уменьшения интенсивности сигналов растворителей атомы водорода заменены атомами дейтерия. Дейтерированный растворитель выбирают, исходя из следующих критериев:

- 1) растворимости в нем испытываемого соединения;
- 2) отсутствия перекрывания сигналов остаточных протонов дейтерированного растворителя с сигналами испытываемого соединения;
- 3) отсутствия взаимодействия между растворителем и испытываемым соединением, если не указано иначе.

Атомы растворителя дают сигналы, которые легко идентифицируются по их химическому сдвигу и могут использоваться для калибровки оси

химического сдвига (вторичный эталон). Химические сдвиги сигналов остаточных протонов дейтерированных растворителей имеют следующие значения (м.д.): хлороформ – 7,26; бензол – 7,16; вода – 4,7; метанол – 3,35 и 4,78; диметилсульфоксид – 2,50; ацетон – 2,05; положение сигнала воды и протонов гидроксильных групп спиртов зависит от рН среды и температуры.

Для количественного анализа растворы не должны содержать нерастворенных частиц. При некоторых количественных определениях может потребоваться добавление внутреннего стандарта для сравнения интенсивности испытуемого и стандартного образцов. Соответствующие стандартные образцы и их концентрации должны быть указаны в нормативной документации. После помещения образца в пробирку и укупорки образец вводят в магнит ЯМР-спектрометра, устанавливают параметры испытания (параметры настройки, регистрации, оцифровки сигнала спада свободной индукции). Основные параметры испытания, приводимые в нормативной документации, записывают или сохраняют в компьютере.

Для предотвращения дрейфа спектра во времени выполняют стабилизационную процедуру (дейтериевый лок), используя сигнал дейтерия, вызываемый дейтерированными растворителями, если не указано иначе. Прибор регулируют для получения наиболее оптимальных условий резонанса и максимального соотношения  $S/N$  (*шуммирование*).

В ходе испытания возможно выполнение многократных последовательностей циклов «импульс – сбор данных – пауза» с последующим суммированием отдельных сигналов спада свободной индукции и усреднением уровня шума. Время задержки между импульсными последовательностями, в течение которого система ядерных спинов восстанавливает свою намагниченность ( $D_1$ ), для количественных измерений должно превышать время продольной релаксации  $T_1$ :  $D_1 \geq 5 T_1$ . В программном обеспечении спектрометров имеются алгоритмы по определению  $T_1$ . Если величина  $T_1$  неизвестна, рекомендуется использовать значение  $D_1 = 25$  с.

При количественных измерениях рекомендуется проводить испытание без вращения образца во избежание появления боковых сигналов.

После проведения Фурье-преобразования сигналы в частотном представлении калибруют под выбранный эталон и измеряют их относительную интенсивность путем интегрирования – измерения отношения площадей резонансных сигналов. В спектрах  $^{13}\text{C}$  интегрируют только однотипные сигналы. Точность интегрирования сигнала зависит от соотношения *сигнал – шум* ( $S/N$ ):

$$u(I)\% = 0,25 + \frac{100}{S/N},$$

где  $u(I)$  – стандартная неопределенность интегрирования.

Число накоплений спада свободной индукции, необходимое для достижения удовлетворительного соотношения  $S/N$ , должно быть приведено в нормативной документации.

Наряду с одномерными в аналитических целях используют гомо- и гетероядерные двумерные корреляционные спектры, основанные на определенной последовательности импульсов (COSY, NOESY, ROESY, HSQC, HMBC, HETCOR, CIGAR, INADEQUATE и др.). В двумерных спектрах взаимодействие между ядрами проявляется в виде сигналов, называемых кросс-пиками. Положение кросс-пиков определяется значениями химических сдвигов двух взаимодействующих ядер. Двумерные спектры предпочтительно использовать для определения состава сложных смесей и экстрактов, т.к. вероятность наложения сигналов (кросс-пиков) в двумерных спектрах существенно ниже, чем вероятность наложения сигналов в одномерных спектрах.

Для быстрого получения спектров гетероядер ( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  и др.) применяют методики (HSQC, HMBC), которые позволяют получать на ядрах  $^1\text{H}$  спектры других ядер, используя механизмы гетероядерного взаимодействия.

Методика DOSY, основанная на регистрации потери фазовой когерентности ядерных спинов за счет трансляционных перемещений молекул под действием градиента магнитного поля, позволяет получать спектры

индивидуальных соединений (спектральное разделение) в смеси без их физического разделения и определять размеры, степени агрегированности и молекулярные массы молекулярных объектов (молекул, макромолекул, молекулярных комплексов, супрамолекулярных систем).

**Области применения.** Многообразие структурной и аналитической информации, содержащейся в спектрах ядерного магнитного резонанса, позволяет использовать метод ядерного магнитного резонанса для проведения качественного и количественного анализа. Применение спектроскопии ядерного магнитного резонанса в количественном анализе основано на прямой пропорциональности молярной концентрации магнитно-активных ядер интегральной интенсивности соответствующего сигнала поглощения в спектре.

*1. Установление подлинности действующего вещества.*

Установление подлинности действующего вещества осуществляют путем сравнения спектра испытуемого образца со спектром стандартного образца или с опубликованным эталонным спектром. Спектры стандартных и испытуемых образцов должны быть получены с использованием одних и тех же методик и условий. Пики в сравниваемых спектрах должны совпадать по положению (отклонения значений  $\delta$  испытуемого и стандартных образцов в пределах  $\pm 0,1$  м.д. для ядерного магнитного резонанса  $^1\text{H}$  и  $\pm 0,5$  м.д. для ядерного магнитного резонанса  $^{13}\text{C}$ ), интегральной интенсивности и мультиплетности, значения которых следует приводить при описании спектров. При отсутствии стандартного образца можно использовать фармакопейный стандартный образец, идентичность которого подтверждают самостоятельной структурной интерпретацией спектральных данных и альтернативными методами.

При подтверждении подлинности образцов нестехиометрического состава (например, природных полимеров переменного состава) допускают несовпадение пиков испытуемого и стандартных образцов по положению и интегральной интенсивности сигналов. Сравнимые спектры должны быть

подобны, т.е. содержать одинаковые характеристические области сигналов, подтверждающие совпадение фрагментного состава испытуемого и стандартных образцов.

Для установления подлинности смеси веществ (экстрактов) допускают использование одномерных спектров ЯМР целиком, как «отпечатков пальца» объекта, без детализации значений  $\delta$  и мультиплетности отдельных сигналов. В случае использования двумерной спектроскопии ЯМР при описании спектров (фрагментов спектра), заявленных на подлинность, следует приводить значения кросс-пиков.

**2. Идентификация посторонних примесей/остаточных органических растворителей.** Идентификацию посторонних примесей/остаточных органических растворителей осуществляют аналогично установлению подлинности действующего вещества, ужесточая требования к чувствительности и цифровому разрешению.

**3. Определение содержания посторонних примесей/остаточных органических растворителей относительно действующего вещества.** Метод ЯМР является прямым абсолютным методом определения мольного соотношения действующего вещества и примесного соединения ( $n/n_{\text{примесь}}$ ):

$$\frac{S'}{S'_{\text{примесь}}} = \frac{n}{n_{\text{примесь}}},$$

где  $S'$  и  $S'_{\text{примесь}}$  – нормированные значения интегральных интенсивностей сигналов действующего вещества и примеси.

Нормирование проводят по числу ядер в структурном фрагменте, обуславливающих измеряемый сигнал.

Массовую долю примеси/остаточного органического растворителя относительно действующего вещества ( $X_{\text{пр}}$ ) определяют по формуле:

$$X_{\text{пр}} = \frac{M_{\text{пр}} \cdot S'_{\text{пр}}}{M \cdot S'},$$

где  $M_{\text{пр}}$  – молекулярная масса примеси;

$M$  – молекулярная масса действующего вещества;

$S'_{\text{пр}}$  – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала примеси;

$S'$  – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала действующего вещества.

**4. Количественное определение содержания вещества (действующего вещества, примеси/остаточного растворителя) в фармацевтической субстанции. Абсолютное содержание вещества в фармацевтической субстанции определяется методом внутреннего стандарта, в качестве которого выбирается вещество, сигналы которого находятся вблизи сигналов определяемого вещества, не перекрываясь с ними. Интенсивности сигналов определяемого вещества и стандарта не должны существенно различаться.**

Процентное содержание определяемого вещества в испытуемом образце в пересчете на сухое вещество ( $X, \%_{\text{масс}}$ ) вычисляют по формуле:

$$X, \%_{\text{масс}} = 100 \cdot (S' / S'_0) \cdot (M \cdot a_0 / M_0 \cdot a) \cdot [100 / (100 - W)],$$

где  $S'$  – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала определяемого вещества;

$S'_0$  – нормированное значение интегральной интенсивности сигнала стандарта;

$M$  – молекулярная масса определяемого вещества;

$M_0$  – молекулярная масса;

$a$  – навеска испытуемого образца;

$a_0$  – навеска вещества-стандарта;

$W$  – содержание влаги, %.

В качестве веществ-стандартов можно использовать следующие соединения: малеиновая кислота (2Н; 6,60 м.д.,  $M = 116,07$ ), бензилбензоат (2Н; 5,30 м.д.,  $M = 212,25$ ), малоновая кислота (2Н; 3,30 м.д.,  $M = 104,03$ ), сукцинимид (4Н; 2,77 м.д.,  $M = 99,09$ ), ацетанилид (3Н; 2,12 м.д.,  $M = 135,16$ ), *трет*-бутанол (9Н; 1,30 м.д.,  $M = 74,12$ ).

*Относительное содержание вещества* как доля компонента в смеси компонентов фармацевтической субстанции определяется методом внутренней нормализации. Мольная ( $X_{\text{моль}}$ ) и массовая ( $X_{\text{масс}}$ ) доля компонента  $i$  в смеси  $n$  веществ определяется по формулам:

$$X_{i, \text{моль}} = \frac{S'_i}{\sum_{j=1}^{j=n} S'_j}, \quad X_{i, \text{масс}} = \frac{M_i \cdot S'_i}{\sum_{j=1}^{j=n} M_j \cdot S'_j},$$

$$X_{i, \text{моль}}(\%) = X_{\text{моль}} \cdot 100 \quad \text{и} \quad X_{i, \text{масс}}(\%) = X_{\text{масс}} \cdot 100.$$

### **5. Определение молекулярной массы белков и полимеров.**

Молекулярные массы белков и полимеров определяют сравнением их подвижности с подвижностью соединений-стандартов с известной молекулярной массой, используя методики DOSY. Измеряют коэффициенты самодиффузии ( $D$ ) испытуемых и стандартных образцов, строят график зависимости логарифмов молекулярных масс соединений-стандартов от логарифмов  $D$ . По полученному таким образом графику методом линейной регрессии определяют неизвестные молекулярные массы испытуемых образцов. Полное описание DOSY-эксперимента должно быть приведено в нормативной документации.

### **Спектроскопия ЯМР твердых веществ**

Образцы в твердом состоянии анализируют с помощью специально оборудованных ЯМР-спектрометров. Определенные технические операции (вращение порошкообразного образца в роторе, наклоненном под магическим углом ( $54,7^\circ$ ) к оси магнитного поля  $B_0$ , силовое распаривание, перенос поляризации от легковозбудимых ядер к менее поляризуемым ядрам – кросс-поляризация) позволяют получать спектры органических и неорганических соединений с высокой разрешающей способностью. Полное описание процедуры должно быть приведено в нормативной документации. Основная область применения данной разновидности спектроскопии ЯМР – изучение полиморфизма.

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Тонкослойная  
хроматография

ОФС.1.2.1.2.0003.15  
Взамен ст. ГФ XI, вып.1

Хроматографический процесс, протекающий при движении подвижной фазы в тонком слое сорбента, нанесенном на инертную твердую подложку (пластинку) из соответствующего материала – стекла, металла или полимера, называется тонкослойной хроматографией или хроматографией в тонком слое сорбента.

Тонкослойная хроматография (ТСХ) может использоваться для анализа как однокомпонентных, так и многокомпонентных лекарственных средств. В последнем случае подбираются условия хроматографирования, обеспечивающие разделение компонентов смеси.

Разделение может осуществляться по различным механизмам: адсорбционному, распределительному, ионообменному или какой-либо их комбинации.

Хроматографическое разделение осуществляется в результате движения анализируемых веществ в тонком слое (неподвижной фазе), растворенных в растворителе или соответствующей смеси растворителей (подвижная фаза, элюент). При разделении вещества образуют на поверхности сорбента зоны адсорбции в виде пятен (круглых или эллипсовидных) или полос.

Подвижность вещества при его хроматографировании характеризуется величинами  $R_f$  и  $R_{st}$  (см. ОФС «Хроматография»).

Параметры  $R_f$  и  $R_{st}$  используются для идентификации веществ и для оценки разделительной способности системы.

### Область применения

ТСХ используется при испытаниях лекарственных средств на подлинность (идентификация анализируемых веществ), посторонние примеси (испытание на чистоту) полуколичественным и количественным методами.

### Основные приборы и материалы

- пластинки с закрепленным слоем сорбента (неподвижной фазы) различных модификаций;
- хроматографические камеры;
- калиброванные капилляры и микрошприцы;
- устройства для нанесения на хроматограммы обнаруживающих реагентов (пульверизаторы для опрыскивания, камеры для погружения хроматограмм в раствор и др.);
- стандартные образцы, растворители, реагенты для обнаружения хроматографических зон;
- ультрамикроскопы с УФ-лампами на 254 и 365 нм;
- системы обработки и хранения данных.

Используемая лампа должна удовлетворять следующим требованиям теста.

*Проверка работы лампы.* На пластинку силикагель G наносят 5 мкл 0,04 % раствора натрия салицилата в спирте 96 % для ламп с максимумом излучения при 254 нм или 5 мкл 0,2 % раствора натрия салицилата в спирте 96 % для ламп с максимумом излучения при 365 нм в виде пятна диаметром около 5 мм; пятно должно светиться. Проверка работы ламп проводится не реже одного раза в три месяца, а также при возникновении сомнений в правильности работы лампы с учетом срока её эксплуатации.

При проведении анализов расстояние между лампой и хроматографической пластинкой не должно превышать расстояния, используемого при проверке работы лампы.

Примечание. Используемый спирт должен быть свободен от флуоресцирующих веществ.

### ***Хроматографические пластинки***

Пластинка для ТСХ представляет собой твердую подложку (стеклянную, металлическую или полимерную) с нанесенным слоем сорбента. Толщина слоя сорбента от 0,10 до 0,25 мм для аналитического варианта и от 0,5 до 2,0 мм для препаративного.

В качестве сорбента в пластинках для ТСХ чаще всего используются: алюминия оксид, модифицированный и немодифицированный силикагель, модифицированная и немодифицированная целлюлоза.

Готовые хроматографические пластинки могут содержать флуоресцентный индикатор для детектирования веществ, поглощающих в ультрафиолетовой области спектра при 254 и 365 нм.

Размер частиц сорбента для классического аналитического варианта ТСХ составляет 10 – 20 мкм. Наряду с такими пластинками можно использовать пластинки для высокоэффективной тонкослойной хроматографии, содержащие сорбент с частицами размером 5 – 7 мкм. Такие пластинки позволяют увеличить эффективность разделения и уменьшить предел обнаружения.

Выпускаются также пластинки с монолитными сорбентами и пластинки с концентрирующей зоной (двухфазовые пластинки). Последние используются в фармацевтическом анализе для разделения сложных и гетерогенных смесей (экстракты из лекарственного растительного сырья, растворы таблеток со вспомогательными компонентами, мягкие лекарственные формы, смеси, содержащие пигменты, суспензии и др.).

*Предварительная подготовка пластинок.* В некоторых случаях перед хроматографированием предусмотрена предварительная обработка пластинок. Это может быть предварительное хроматографирование чистых пластинок в соответствующем растворителе, импрегнирование пластинок при помощи опрыскивания, погружения или элюирования. При необходимости перед использованием пластинки активируют нагреванием в сушильном шкафу в течение 1 ч при температуре 100 – 105 °С. Описание предварительной обработки пластинок должно быть приведено в фармакопейной статье.

### ***Хроматографические камеры***

Используют хроматографические камеры для вертикального или горизонтального элюирования с герметичными крышками. Камеры для горизонтального элюирования снабжены также устройствами для подачи

подвижной фазы на пластинку. Использование камеры для горизонтального элюирования позволяет осуществлять одновременное элюирование с противоположных сторон пластинки, что увеличивает производительность анализа в два раза по сравнению с использованием камеры для вертикального элюирования. При этом также уменьшается расход подвижной фазы приблизительно в 10 раз. В горизонтальной камере движение подвижной фазы по пластинке происходит только за счет капиллярных сил, вклад гравитации при этом отсутствует, что повышает эффективность разделения по сравнению с камерами для вертикального элюирования.

### **Подвижные фазы**

Подвижные фазы (элюенты) должны быть предпочтительно малотоксичными, содержать минимум компонентов, не вступать в химические реакции ни с сорбентом (неподвижной фазой), ни с компонентами разделяемой смеси. Подвижные фазы должны также достаточно быстро испаряться с поверхности хроматограмм после элюирования.

Для подавления диссоциации полярных молекул компонентов разделяемой смеси к подвижной фазе добавляют вещества кислого или основного характера (модификаторы).

### **Нанесение проб**

Нанесение проб осуществляют:

- калиброванными капиллярами с тупым концом;
- поршневыми микрошприцами с тупым концом иглы;
- полуавтоматическими или автоматическими приборами для нанесения образцов.

Нанесение осуществляют двумя способами: в виде пятен 2 – 5 мм диаметром (1 – 2 мм на высокоэффективных пластинках) с промежутками между пятнами не менее 10 мм и в виде полос длиной 10 – 20 мм (5 – 10 мм на высокоэффективных пластинках) с промежутком между ними не менее 10 мм. Расстояние до линии старта от нижнего края пластинки должно составлять не менее 10 мм. Если в методике фармакопейной статьи предусмотрено

использование как обычных, так и высокоэффективных пластинок, условия для высокоэффективных пластинок должны быть указаны в квадратных скобках. Расстояния на стартовой линии от боковых краев пластинки до мест нанесения первой и последней проб должны составлять не менее 10 мм. В процессе нанесения проб недопустимо повреждение сорбента на линии старта. Подсушивание нанесенных проб осуществляют в токе холодного или теплого воздуха, либо на специальном столе с электроподогревом.

### **Способы элюирования**

Используют следующие способы элюирования: восходящее элюирование (одно- и многоступенчатое, одномерное и двумерное – с поворотом пластинки на 90° или 180°) и горизонтальное.

#### ***Восходящая хроматография***

Если не указано иначе в фармакопейной статье, пластинку с нанесенными пробами помещают вертикально в камеру. При необходимости камеру предварительно насыщают парами подвижной фазы (в этом случае в фармакопейной статье должно быть указано время насыщения). Для этого перед проведением анализа обычно внутренние стенки камеры обкладывают фильтровальной бумагой, смоченной подвижной фазой. Уровень подвижной фазы должен быть расположен ниже линии старта. Камеру закрывают и проводят процесс при 20 – 25 °С в защищенном от света месте. После прохождения фронтом подвижной фазы расстояния, указанного в нормативном документе, пластинку вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей, проявляют и детектируют зоны адсорбции указанным способом.

При проведении двумерной хроматографии пластинку сушат после хроматографирования в первом направлении и хроматографируют в направлении, перпендикулярном первому.

#### ***Горизонтальная хроматография***

Пластинку с нанесенными пробами помещают в камеру и направляют поток подвижной фазы из лотка в камеру согласно инструкции к прибору для

горизонтального элюирования. Процесс проводят при 20 – 25 °С (если это указано в фармакопейной статье, одновременно с противоположных сторон пластинки). Когда подвижная фаза пройдет расстояние, указанное в нормативном документе, пластинку вынимают, сушат до удаления следов растворителей, проявляют и детектируют зоны адсорбции указанным способом.

Двухмерную хроматографию выполняют, как указано в разделе «Восходящая хроматография».

### **ВИЗУАЛЬНАЯ ОЦЕНКА**

Обнаружение (детектирование) зон адсорбции после проведения качественной и полуколичественной ТСХ осуществляют следующими способами:

- в видимом и ультрафиолетовом свете (при определенной длине волны);
- опрыскиванием растворами обнаруживающих реагентов;
- выдерживанием в парах обнаруживающего реагента;
- погружением в растворы обнаруживающих реагентов с использованием для этих целей специальных камер.

**Идентификация.** Испытание на подлинность (идентификация) анализируемых веществ проводится при одновременном хроматографировании одинакового количества анализируемого вещества и стандартного образца на одной и той же хроматографической пластинке. Основную зону адсорбции (пятно или полосу) на хроматограмме испытуемого раствора сравнивают с основной зоной адсорбции (пятном или полосой) на хроматограмме стандартного раствора (раствора сравнения), сравнивая окраску (цвет флуоресценции), размер и величину фактора  $R_f$  соответствующих зон адсорбции (ОФС «Хроматография»).

**Испытание на посторонние примеси.** При испытаниях на чистоту основное вещество и примеси в условиях хроматографирования должны иметь разные значения  $R_f$ . При этом о степени чистоты анализируемого вещества можно судить по величине и интенсивности зон адсорбции обнаруживаемых на хроматограмме примесей. Их содержание может быть определено

полуколичественно. Для этого на пластинку наносят определенные количества анализируемого вещества и свидетелей. Для определения идентифицированных примесей в качестве свидетелей используют стандартные образцы идентифицированных примесей в количествах, соответствующих их предельно допустимому содержанию. Для определения неидентифицированных примесей чаще всего используют растворы сравнения, приготовленные путем разведения испытуемого раствора. Содержание примеси в анализируемом лекарственном средстве оценивают, сравнивая зону адсорбции примеси по совокупности величины и интенсивности поглощения или окраски с соответствующими зонами адсорбции на хроматограмме свидетелей. Дополнительное пятно (пятна) на хроматограмме испытуемого раствора сравнивают визуально с дополнительным пятном (пятнами) на хроматограмме стандартного раствора, содержащего примесь (примеси), или с пятном на хроматограмме раствора сравнения, приготовленного из разбавленного испытуемого раствора.

*Проверка разделительной способности хроматографической системы.*

Требования к проверке разделительной способности приводят в фармакопейной статье.

*Проверка определения предела обнаружения определяемых примесей.*

Чувствительность считается удовлетворительной, если зона адсорбции четко обнаруживается на хроматограмме наиболее разбавленного стандартного раствора примеси или раствора сравнения.

## **КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ**

Если вещества, разделяемые методом ТСХ реагируют на излучение в ультрафиолетовой или видимой области спектра, их можно количественно определить непосредственно на пластинке, используя соответствующее оборудование. Для этого измеряют интенсивность отраженного света, передвигая пластинку или регистрирующее устройство вдоль оси хроматограммы. Аналогичным образом можно измерять флуоресценцию.

Вещества, содержащие радионуклиды, могут быть количественно определены непосредственно на пластинке с использованием соответствующего счетчика радиоактивных веществ, а также удалением неподвижной фазы в районе зон адсорбции и измерением радиоактивности с использованием жидкостного сцинтиляционного счетчика.

*Оборудование.* Для проведения количественных измерений непосредственно на хроматографической пластинке оборудование содержит:

- полуавтоматическое или автоматическое устройство для точного и воспроизводимого нанесения необходимого количества вещества в определенном месте пластинки;
- фотометр (денситометр), способный перемещать пластику или измерительное устройство вдоль осей «х» и «у», с источником монохроматического излучения для измерения отражения или пропускания; в том случае, когда измеряется флуоресценция, требуется дополнительный монохроматический фильтр для выбора соответствующей спектральной области излучаемого света; полученные в результате денситограммы обрабатывают в соответствии с методом обработки хроматограмм, описанным в ОФС «Хроматография».

Критерии оценки пригодности системы описаны в ОФС «Хроматография». В этой же ОФС приводятся пределы изменения параметров хроматографической системы, которые допустимы для выполнения условий пригодности.

### **Высокоэффективная тонкослойная хроматография**

Эффективность разделения увеличивается как вследствие увеличения площади раздела подвижной и неподвижной фазы за счет уменьшения диаметра частиц сорбента, так и благодаря большей однородности размеров этих частиц. Применяют пластинки для высокоэффективной тонкослойной хроматографии, выполненные как в нормально-фазовом (полярная неподвижная фаза), так и в обращенно-фазовом (неполярная неподвижная фаза) вариантах.

По сравнению с классической ТСХ использование высокоэффективных пластинок позволяет:

- увеличить число анализируемых проб за счет уменьшения размеров зон адсорбции первичной хроматограммы: диаметра пятен (до 1 – 2 мм) или длины полос (до 5 – 10 мм);
- значительно увеличить разделительную способность системы;
- снизить пределы обнаружения и количественного определения анализируемых веществ в 10 – 100 раз.

Применение высокоэффективной тонкослойной хроматографии обеспечивает получение более компактных зон адсорбции разделяемых соединений, что улучшает метрологические характеристики количественного определения с помощью сканирующей хроматоденситометрии.

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

**Высокоэффективная**

**ОФС.1.2.1.2.0005.15**

**жидкостная**

**хроматография**

**Взамен ст. ГФ XI, вып.1**

---

Высокоэффективная жидкостная хроматография (жидкостная хроматография высокого давления) – это метод колоночной хроматографии, в котором подвижной фазой служит жидкость, движущаяся через хроматографическую колонку, заполненную неподвижной фазой (сорбентом). Колонки для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) характеризуются высоким гидравлическим сопротивлением на входе.

В зависимости от механизма разделения веществ различают следующие варианты ВЭЖХ: адсорбционную, распределительную, ионообменную, эксклюзионную, хиральную и др. в соответствии с характером основных проявляющихся межмолекулярных взаимодействий. В адсорбционной хроматографии разделение веществ происходит за счет их различной способности адсорбироваться и десорбироваться с поверхности сорбента с развитой поверхностью, например, силикагеля. В распределительной ВЭЖХ разделение происходит за счет различия коэффициентов распределения разделяемых веществ между неподвижной (как правило, химически привитой к поверхности неподвижного носителя) и подвижной фазами.

В зависимости от типа подвижной и неподвижной фазы различают нормально-фазовую и обращенно-фазовую хроматографию. В нормально-фазовой ВЭЖХ неподвижная фаза – полярная (чаще всего силикагель или силикагель с привитыми  $\text{NH}_2$ - или  $\text{CN}$ -группами и др.), а подвижная фаза – неполярная (гексан, либо смеси гексана с более полярными органическими растворителями – хлороформом, спиртами и т.д.). Удерживание веществ растет с увеличением их полярности. В нормально-фазовой хроматографии

элюирующая способность подвижной фазы увеличивается с ростом ее полярности.

В обращенно-фазовой хроматографии неподвижная фаза – неполярная (гидрофобные силикагели с привитыми группами C4, C8, C18 и др.); подвижная фаза – полярная (смеси воды и полярных растворителей: ацетонитрила, метанола, тетрагидрофурана и др.). Удерживание веществ растет с увеличением их гидрофобности (неполярности). Чем больше содержание органического растворителя, тем выше элюирующая способность подвижной фазы.

В ионообменной хроматографии молекулы веществ смеси, диссоциированные в растворе на катионы и анионы, разделяются при движении через сорбент (катионит или анионит) за счет различной силы взаимодействия определяемых ионов с ионными группами сорбента.

В эксклюзионной (ситовой, гель-проникающей, гель-фильтрационной) хроматографии молекулы веществ разделяются по размеру за счет их разной способности проникать в поры неподвижной фазы. При этом первыми из колонки выходят наиболее крупные молекулы, способные проникать в минимальное число пор неподвижной фазы, а последними выходят вещества с малыми размерами молекул.

В хиральной хроматографии происходит разделение оптически активных соединений на отдельные энантиомеры. Разделение может осуществляться на хиральных неподвижных фазах или на ахиральных неподвижных фазах с использованием хиральных подвижных фаз.

Существуют и другие варианты ВЭЖХ.

Часто разделение протекает не по одному, а по нескольким механизмам одновременно, в зависимости от типа подвижной и неподвижной фаз, а также природы определяемого соединения.

### **Область применения**

ВЭЖХ успешно применяется как для качественного, так и для количественного анализа лекарственных средств в испытаниях

«Подлинность», «Посторонние примеси», «Растворение», «Однородность дозирования», «Количественное определение». Следует отметить, что хроматография позволяет совмещать в одной пробе несколько испытаний, в том числе «Подлинность» и «Количественное определение».

### **Оборудование**

Для проведения анализа используют соответствующие приборы – жидкостные хроматографы.

В состав жидкостного хроматографа обычно входят следующие основные узлы:

- узел подготовки подвижной фазы, включая емкость с подвижной фазой (или емкости с отдельными растворителями, входящими в состав подвижной фазы) и систему дегазации подвижной фазы;

- насосная система;

- смеситель подвижной фазы (при необходимости);

- система ввода пробы (инжектор), может быть ручным или автоматическим (автосамплер);

- хроматографическая колонка (может быть установлена в термостате);

- детектор (один или несколько с разными способами детектирования);

- система управления хроматографом, сбора и обработки данных.

Помимо этого в состав хроматографа могут входить система пробоподготовки и предколоночный реактор, система переключения колонок, постколоночный реактор и другое оборудование.

### ***Насосная система***

Насосы обеспечивают подачу подвижной фазы в колонку с заданной скоростью. Состав подвижной фазы и скорость потока могут быть постоянными или меняющимися во время анализа. В случае постоянного состава подвижной фазы процесс называют изократическим, а во втором случае – градиентным. Современная насосная система жидкостного хроматографа состоит из одного или нескольких насосов, управляемых компьютером. Это позволяет менять состав подвижной фазы по определенной

программе при градиентном элюировании. Насосы для аналитической ВЭЖХ позволяют поддерживать скорость подачи подвижной фазы в колонку в интервале от 0,1 до 10 мл/мин при давлении на входе в колонку до 40 МПа. Пульсации давления минимизируются специальными демпферными системами, входящими в конструкцию насосов. Рабочие детали насосов изготавливаются из коррозионностойких материалов, что позволяет использовать в составе подвижной фазы агрессивные компоненты.

### ***Смесители***

В смесителе происходит образование единой подвижной фазы из отдельных растворителей, подаваемых насосами, если необходимая смесь не была приготовлена заранее. Смешение компонентов подвижной фазы в смесителе может происходить как при низком давлении (до насосов), так и при высоком давлении (после насосов). Смеситель можно использовать для подготовки подвижной фазы и при изократическом элюировании.

Объем смесителя может влиять на время удерживания компонентов при градиентном элюировании.

### ***Инжекторы***

Инжекторы могут быть универсальными, с возможностью изменения объема вводимой пробы, или дискретными для ввода пробы только определенного объема. Оба типа инжекторов могут быть автоматическими («автоинжекторы» или «автосэмплеры»). Инжектор для ввода пробы (раствора) расположен непосредственно перед хроматографической колонкой. Конструкция инжектора позволяет изменять направление потока подвижной фазы и осуществлять предварительное введение пробы в петлю-дозатор определенного объема (обычно от 10 до 100 мкл) или в специальное дозирующее устройство переменного объема. Объем петли указан на ее маркировке. Конструкция дискретного инжектора, как правило, позволяет осуществлять замену петли. Современные автоматические инжекторы могут обладать рядом дополнительных функций, например, выполнять функцию

станции пробоподготовки: осуществлять смешение и разбавление образцов, проводить реакцию предколоночной дериватизации.

### ***Хроматографическая колонка***

Хроматографические колонки обычно представляют собой трубки из нержавеющей стали, стекла или пластика, заполненные сорбентом и закрытые с обеих сторон фильтрами с диаметром пор 2 – 5 мкм. Длина аналитической колонки может находиться в диапазоне от 5 до 60 см и более, внутренний диаметр – от 2 до 10 мм. Колонки с внутренним диаметром менее 2 мм используются в микроколоночной хроматографии. Существуют также капиллярные колонки с внутренним диаметром около 0,3 – 0,7 мм. Колонки для препаративной хроматографии могут иметь внутренний диаметр 50 мм и более.

Перед аналитической колонкой могут устанавливаться короткие колонки (предколонки), выполняющие различные вспомогательные функции, основная из которых – защита аналитической колонки. Обычно анализ проводят при комнатной температуре, однако для увеличения эффективности разделения и сокращения продолжительности анализа может быть использовано термостатирование колонок при температурах до 80 – 100 °С. Возможность использования повышенной температуры при разделении ограничивается стабильностью неподвижной фазы, поскольку при повышенных температурах возможна ее деструкция.

### ***Неподвижная фаза (сорбент)***

В качестве сорбентов обычно применяются:

– силикагель, оксид алюминия, используются в нормально-фазовой хроматографии. Механизм удерживания в данном случае – обычно адсорбция;

– силикагель, смолы или полимеры с привитыми кислотными или основными группами. Область применения – ионообменная и ионная хроматография;

– силикагель или полимеры с заданным распределением размеров пор (эксклюзионная хроматография);

– химически модифицированные сорбенты (сорбенты с привитыми фазами), приготовленные чаще всего на основе силикагеля. Механизм удерживания – адсорбция или распределение между подвижной и неподвижной фазами. Область применения зависит от типа привитых функциональных групп. Некоторые типы сорбентов могут использоваться как в обращенной, так и в нормально фазовой хроматографии;

– химически модифицированные хиральные сорбенты, например, производные целлюлозы и амилозы, протеины и пептиды, циклодекстрины, хитозаны, используемые для разделения энантиомеров (хиральная хроматография).

Сорбенты с привитыми фазами могут иметь различную степень химической модификации. В качестве привитых фаз наиболее часто применяются:

– октадецильные группы  $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3]$  (сорбент октадецилсилан (ODS) или  $\text{C}_{18}$ );

– октильные группы  $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3]$  (сорбент октилсилан или  $\text{C}_8$ );

– фенильные группы  $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_n-(\text{C}_6\text{H}_5)]$  (сорбент фенилсилан);

– цианопропильные группы  $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}]$  (сорбент CN);

– аминопропильные группы  $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2]$  (сорбент  $\text{NH}_2$ );

– диольные группы  $[\text{Si}-(\text{CH}_2)_3-\text{OCH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}]$  (сорбент диол).

Наиболее часто анализ выполняют на неполярных привитых фазах в обращенно-фазовом режиме с применением сорбента  $\text{C}_{18}$ .

Сорбенты с привитыми фазами, полученные на основе силикагеля, химически устойчивы при значениях pH от 2 до 7, если другое специально не оговаривается производителем. Частицы сорбента могут иметь сферическую или неправильную форму и разнообразную пористость. Размер частиц сорбента в аналитической ВЭЖХ обычно составляет 3 – 10 мкм, в препаративной ВЭЖХ – 50 мкм и более. Существуют также монолитные колонки, в которых сорбент представляет собой монолит со сквозными порами, заполняющий весь объем колонки.

Высокая эффективность разделения обеспечивается высокой площадью поверхности частиц сорбента (которая является следствием их микроскопических размеров и наличия пор), а также равномерностью состава сорбента и плотной и равномерной его упаковкой.

### *Детекторы*

В ВЭЖХ используются различные способы детектирования. В общем случае подвижная фаза с растворенными в ней компонентами после хроматографической колонки попадает в ячейку детектора, где непрерывно измеряется то или иное ее свойство (поглощение в ультрафиолетовой или видимой области спектра, флуоресценция, показатель преломления, электропроводность и др.). Полученная при этом хроматограмма представляет собой график зависимости некоторого физического или физико-химического параметра подвижной фазы от времени.

Наиболее распространенными детекторами в ВЭЖХ являются **спектрофотометрические**. В процессе элюирования веществ в специально сконструированной микрокювете измеряется оптическая плотность элюата при заранее выбранной длине волны. Широкая область линейности детектора позволяет анализировать как примеси, так и основные компоненты смеси на одной хроматограмме. Спектрофотометрический детектор позволяет проводить детектирование при любой длине волны в его рабочем диапазоне (как правило, 190 – 600 нм). Применяются также мультиволновые детекторы, позволяющие проводить детектирование при нескольких длинах волн одновременно и детекторы на диодной матрице, позволяющие регистрировать оптическую плотность одновременно во всем рабочем диапазоне длин волн (как правило, 190 – 950 нм). Это позволяет регистрировать спектры поглощения проходящих через ячейку детектора компонентов.

**Флуориметрический детектор** применяется для определения флуоресцирующих соединений или нефлуоресцирующих соединений в виде их флуоресцирующих производных. Принцип действия **флуориметрического** детектора основан на измерении флуоресцентного излучения поглощенного

света. Поглощение обычно проводят в ультрафиолетовой области спектра, длины волн флуоресцентного излучения превышают длины волн поглощенного света. Флуориметрические детекторы обладают очень высокой чувствительностью и селективностью. Чувствительность флуоресцентных детекторов примерно в 1000 раз выше чувствительности спектрофотометрических. Современные флуоресцентные детекторы позволяют не только получать хроматограммы, но и регистрировать спектры возбуждения и флуоресценции анализируемых соединений.

Для определения соединений, слабо поглощающих в ультрафиолетовой и видимой областях спектра (например, углеводов), используют **рефрактометрические** детекторы (рефрактометры). Недостатки этих детекторов – их низкая (по сравнению со спектрофотометрическими детекторами) чувствительность и значительная температурная зависимость интенсивности сигнала (детектор необходимо термостатировать), а также невозможность их использования в режиме градиентного элюирования.

Принцип работы **испарительных детекторов лазерного светового рассеяния** основан на различии давлений паров хроматографических растворителей, входящих в состав подвижной фазы, и анализируемых веществ. Подвижная фаза на выходе из колонки вводится в распылитель, смешивается с азотом или  $\text{CO}_2$  и в виде мелкодисперсного аэрозоля попадает в обогреваемую испарительную трубку с температурой 30 – 160 °С, в которой подвижная фаза испаряется. Аэрозоль из нелетучих частиц анализируемых веществ рассеивает световой поток в камере рассеивания. По степени рассеивания светового потока можно судить о количестве определяемого соединения. Детектор более чувствителен, чем рефрактометрический, его сигнал не зависит от оптических свойств пробы, от типа функциональных групп в определяемых веществах, от состава подвижной фазы и может быть использован в режиме градиентного элюирования.

Электрохимические детекторы (кондуктометрические, амперометрические, кулонометрические и др.). **Амперометрический**

детектор применяют для определения электроактивных соединений, которые могут быть окислены или восстановлены на поверхности твердого электрода. Аналитическим сигналом является величина тока окисления или восстановления. В ячейке детектора имеется по крайней мере два электрода – рабочий и электрод сравнения (хлоридсеребрянный или стальной). К электродам прикладывается рабочий потенциал, величина которого зависит от природы определяемых соединений. Измерения могут проводиться как при постоянном потенциале, так и в импульсном режиме, когда задается профиль изменения потенциала рабочего электрода в течение одного цикла регистрации сигнала. В амперометрическом детекторе используют рабочие электроды из углеродных материалов (наиболее часто стеклоуглеродный или графитовый) и металлические (платиновый, золотой, медный, никелевый).

**Кондуктометрический** детектор используют для детектирования анионов и катионов в ионной хроматографии. Принцип его работы основан на измерении электропроводности подвижной фазы в процессе элюирования вещества.

Исключительно информативным является **масс-спектрометрический** детектор, который обладает высокой чувствительностью и селективностью. Последние модели масс-спектрометров для жидкостной хроматографии работают в диапазоне масс  $m/z$  от 20 до 4000 а.е.м.

В ВЭЖХ используются также Фурье-ИК-детекторы, детекторы радиоактивного излучения и некоторые другие.

### ***Система сбора и обработки данных***

Современная система обработки данных представляет собой сопряженный с хроматографом персональный компьютер с установленным программным обеспечением, позволяющим регистрировать и обрабатывать хроматограмму, а также управлять работой хроматографа и следить за основными параметрами хроматографической системы.

### ***Подвижная фаза***

Подвижная фаза в ВЭЖХ выполняет двоякую функцию: обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке и регулирует константы равновесия, а, следовательно, и удерживание в результате взаимодействия с неподвижной фазой (сорбируясь на поверхности) и с молекулами разделяемых веществ. Таким образом, изменяя состав подвижной фазы в ВЭЖХ можно влиять на времена удерживания соединений, селективность и эффективность их разделения.

Подвижная фаза может состоять из одного растворителя, часто из двух, при необходимости – из трех и более. Состав подвижной фазы указывают как объемное соотношение входящих в нее растворителей. В отдельных случаях может указываться массовое соотношение, что должно быть специально оговорено. В качестве компонентов подвижной фазы могут быть использованы буферные растворы с определенным значением pH, различные соли, кислоты и основания и другие модификаторы.

В нормально-фазовой хроматографии обычно применяются жидкие углеводороды (гексан, циклогексан, гептан) и другие относительно неполярные растворители с небольшими добавками полярных органических соединений, которые регулируют элюирующую силу подвижной фазы.

В обращенно-фазовой хроматографии в качестве подвижной фазы используется вода или водно-органические смеси. Органическими добавками обычно служат полярные органические растворители (ацетонитрил и метанол). Для оптимизации разделения могут использоваться водные растворы с определенным значением pH, в частности буферные растворы, а также различные добавки в подвижную фазу: фосфорная и уксусная кислоты при разделении соединений кислотного характера; аммиак и алифатические амины при разделении соединений основного характера и другие модификаторы.

На хроматографический анализ большое влияние оказывает степень чистоты подвижной фазы, поэтому предпочтительно применять растворители, выпущенные специально для жидкостной хроматографии (включая воду).

При использовании УФ-спектрофотометрического детектора подвижная фаза не должна иметь выраженного поглощения при выбранной для детектирования длине волны. Предел прозрачности или оптическая плотность при определенной длине волны растворителя конкретного изготовителя часто указывается на упаковке.

Подвижная фаза и анализируемые растворы не должны содержать нерастворившихся частиц и пузырьков газа. Воду, полученную в лабораторных условиях, водные растворы, предварительно смешанные с водой органические растворители, а также анализируемые растворы необходимо подвергать тонкой фильтрации и дегазации. Для этих целей обычно применяют фильтрование под вакуумом через инертный по отношению к данному растворителю или раствору мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

#### ***Перечень условий хроматографирования, подлежащих указанию***

В фармакопейной статье должны быть приведены: полное коммерческое наименование колонки с указанием производителя и каталожного номера, размеры колонки (длина и внутренний диаметр), тип сорбента с указанием размера частиц, размера пор, температура колонки (если необходимо термостатирование), объем вводимой пробы (объем петли), состав подвижной фазы и способ ее приготовления, скорость подачи подвижной фазы, тип детектора и условия детектирования (при необходимости параметры используемой ячейки детектора), описание градиентного режима (если используется), включающее в себя стадию переуравновешивания к исходным условиям, время хроматографирования, подробное описание методики и формулы расчета, описания приготовления стандартных и испытуемых растворов.

В случае использования предколоночной дериватизации в автосамплере приводится информация о программе работы автосамплера. В случае использования постколоночной дериватизации указывается скорость подачи дериватизирующего реагента, объем петли смешения и ее температура.

## МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ВИДЫ ВЭЖХ

### *Ион-парная хроматография*

Одной из разновидностей обращено-фазовой ВЭЖХ является ион-парная хроматография, позволяющая определять ионизированные соединения. Для этого в состав традиционной обращено-фазовой ВЭЖХ подвижной фазы добавляют гидрофобные органические соединения с ионогенными группами (ион-парные реагенты). Для разделения оснований обычно используют алкилсульфаты натрия, для разделения кислот применяют соли тетраалкиламмония (тетрабутиламмония фосфат, цетилтриметиламмония бромид и др.). В ион-парном режиме селективность разделения неионогенных компонентов будет лимитироваться обращено-фазовым механизмом удерживания, а удерживание оснований и кислот заметно возрастает, при этом улучшается форма хроматографических пиков.

Удерживание в ион-парном режиме обусловлено достаточно сложными равновесными процессами, конкурирующими между собой. С одной стороны, за счет гидрофобных взаимодействий и эффекта вытеснения полярной среды подвижной фазы возможна сорбция гидрофобных ионов на поверхности алкилсиликагеля таким образом, что заряженные группы обращены к подвижной фазе. В этом случае поверхность приобретает ионообменные свойства, и удерживание подчиняется закономерностям ионообменной хроматографии. С другой стороны, возможно образование ионной пары непосредственно в объеме элюента, с последующей ее сорбцией на сорбенте по обращено-фазовому механизму.

### *Хроматография гидрофильного взаимодействия*

#### *(HILIC хроматография)*

Хроматография гидрофильного взаимодействия используется для разделения полярных соединений, слабо удерживаемых в обращено-фазовой ВЭЖХ. В качестве подвижной фазы в этом варианте хроматографии используются водно-ацетонитрильные смеси с добавлением солей, кислот или

оснований. Неподвижными фазами, как правило, являются силикагели, модифицированные полярными группами (амино-, диольные, цианопропильные группы и т.д.). Более полярные соединения удерживаются сильнее. Элюирующая способность подвижной фазы возрастает с увеличением полярности.

### ***Ионообменная и ионная ВЭЖХ***

Ионообменная хроматография используется для анализа как органических (гетероциклические основания, аминокислоты, белки и др.), так и неорганических (различные катионы и анионы) соединений. Разделение компонентов анализируемой смеси в ионообменной хроматографии основано на обратимом взаимодействии ионов анализируемых веществ с ионообменными группами сорбента. Эти сорбенты представляют собой, в основном, либо полимерные ионообменные смолы (обычно сополимеры стирола и дивинилбензола с привитыми ионообменными группами), либо силикагели с привитыми ионообменными группами. Сорбенты с группами —  $\text{NH}_3^+$ , — $\text{R}_3\text{N}^+$ , — $\text{R}_2\text{HN}^+$ , — $\text{RH}_2\text{N}^+$  и др. используются для разделения анионов (аниониты), а сорбенты с группами — $\text{SO}_3^-$ , — $\text{RSO}_3^-$ , — $\text{COOH}$ , — $\text{PO}_3^-$  и др. для разделения катионов (катиониты).

В качестве подвижной фазы в ионообменной хроматографии применяют водные растворы кислот, оснований и солей. Обычно используют буферные растворы, позволяющие поддерживать определенные значения pH. Возможно также использование небольших добавок смешивающихся с водой органических растворителей – ацетонитрила, метанола, этанола, тетрагидрофурана.

***Ионная хроматография*** – вариант ионообменной хроматографии, в котором для детектирования определяемых соединений (ионов) используется кондуктометрический детектор. Для высокочувствительного определения изменений электропроводности проходящей через детектор подвижной фазы фоновая электропроводность подвижной фазы должна быть низкой.

Существуют два основных варианта ионной хроматографии.

Первый из них – двухколоночная ионная хроматография – основан на подавлении электропроводности электролита подвижной фазы с помощью второй ионообменной колонки или специальной мембранной системы подавления, находящейся между аналитической колонкой и детектором. При прохождении через систему электропроводность подвижной фазы снижается.

Второй вариант ионной хроматографии – одноколоночная ионная хроматография. В этом варианте используется подвижная фаза с очень низкой электропроводностью. В качестве электролитов широко применяют слабые органические кислоты: бензойную, салициловую или изофталевую.

### ***Эксклюзионная ВЭЖХ***

Эксклюзионная хроматография (гель-хроматография) – особый вариант ВЭЖХ, основанный на разделении молекул по их размерам. Распределение молекул между неподвижной и подвижной фазами зависит от размеров молекул и частично от их формы и полярности.

Возможны два предельных типа взаимодействия молекул с пористой неподвижной фазой. Молекулы с размерами, превышающими максимальный диаметр пор, вообще не удерживаются и элюируются первыми, перемещаясь одновременно с подвижной фазой. Молекулы с размерами, меньшими, чем минимальный диаметр пор сорбента, свободно проникают в поры и элюируются из колонки последними. Остальные молекулы, имеющие промежуточные размеры, удерживаются в порах частично и в ходе элюирования разделяются на фракции в соответствии со своими размерами и, частично, формой, проникают в поры сорбента в зависимости от размера и частично в зависимости от своей формы. В результате вещества элюируются с различными временами удерживания.

### ***Ионоэксклюзионная хроматография***

В основе механизма ионоэксклюзионной хроматографии лежит эффект, в результате которого соединения в ионизированной форме не удерживаются на сорбенте-ионообменнике, тогда как соединения в молекулярной форме распределяются между неподвижной и водной фазами внутри пор

ионообменного сорбента и подвижной фазой, мигрирующие в пространстве между частицами сорбента. Разделение основано на электростатическом отталкивании, полярных и гидрофобных взаимодействиях между растворенными соединениями и сорбентом.

Анионогенные группы на поверхности сорбента действуют как полупроницаемая «мембрана» между стационарной и подвижной фазами. Отрицательно заряженные компоненты не достигают стационарной подвижной фазы, так как отталкиваются одноименно заряженными функциональными группами и элюируются в «мертвом» (свободном) объеме колонки. Компоненты в молекулярном виде не «отторгаются» катионообменным сорбентом и распределяются между стационарной и подвижной фазами. Различие в степени удерживания неионных компонентов смеси продиктовано совокупностью полярных взаимодействий неионных компонентов с функциональными группами катионообменного сорбента и гидрофобных взаимодействий неионных компонентов с неполярной матрицей сорбента.

### *Хиральная хроматография*

Целью хиральной хроматографии является разделение оптических изомеров. Разделение осуществляется на хиральных неподвижных фазах или на обычных ахиральных неподвижных фазах с использованием хиральных подвижных фаз. В качестве хиральных неподвижных фаз используются сорбенты с поверхностью, модифицированной группами или веществами, имеющими хиральные центры (хитозаны, циклодекстрины, полисахариды, белки и др. (хиральные селекторы). В качестве подвижных фаз в этом случае могут использоваться те же фазы, что и в нормально-фазовой или обращенно-фазовой хроматографии. При использовании ахиральных неподвижных фаз для обеспечения разделения энантиомеров в подвижные фазы добавляются хиральные модификаторы: хиральные комплексы металлов, нейтральные хиральные лиганды, хиральные ион-парные реагенты и др.

### *Ультразффективная жидкостная хроматография*

Ультраэффективная жидкостная хроматография представляет собой вариант жидкостной хроматографии, отличающийся большей эффективностью по сравнению с классической ВЭЖХ.

Особенностью ультраэффективной жидкостной хроматографии является использование сорбентов с размером частиц от 1,5 до 2 мкм. Размеры хроматографических колонок обычно составляют от 50 до 150 мм в длину и от 1 до 4 мм в диаметре. Объем вводимой пробы может составлять от 1 до 50 мкл. Использование таких хроматографических колонок позволяет значительно уменьшить время анализа и повысить эффективность хроматографического разделения. Однако при этом давление на колонке может достигать 80 – 120 МПа, требуемая частота сбора данных детектора может возрастать до 40 – 100 Гц, внеколоночный объем хроматографической системы должен быть минимизирован. Хроматографическое оборудование и колонки, используемые в ультраэффективной жидкостной хроматографии, специально адаптированы для выполнения требований этого вида хроматографии.

Оборудование, предназначенное для ультраэффективной жидкостной хроматографии, может использоваться и в классическом варианте ВЭЖХ.

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Аномальная токсичность

ОФС.1.2.4.0004.15

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на метод определения аномальной токсичности лекарственных средств. Основной целью проведения теста на аномальную токсичность является выявление токсичности препарата, превышающей контролируемый уровень по повышению летальности животных. Данное испытание позволяет определить аномальную (повышенную) токсичность лекарственного препарата в составе лекарственного средства за счет появления продуктов разложения или нежелательных примесей при изменении процесса производства, не предусмотренных регламентом производства, транспортирования или хранения.

### Методика испытания

Испытание проводят на 5 здоровых белых мышах обоего пола массой 19-21 г, которые ранее не использовались в экспериментах. Условия содержания и кормления должны обеспечивать нормальную жизнедеятельность животных.

Испытуемое лекарственное средство растворяют или разводят (в случае необходимости) 0,9 % раствором натрия хлорида для инъекций. Тест-доза должна содержаться в объеме 0,5 мл испытуемого раствора, который вводят в хвостовую вену животного со скоростью 0,1 мл в сек. Тест-дозу указывают в фармакопейной статье. Период наблюдения за животными составляет 48 ч.

Если в фармакопейной статье даны иные указания, то следуют им.

Лекарственное средство считают прошедшим испытание, если в течение предусмотренного срока наблюдения не погибнет ни одно из подопытных животных.

В случае гибели одного животного, эксперимент повторяют на 5 мышах массой  $20,0 \pm 0,5$  г. Если при повторном испытании не погибнет ни одна мышь, лекарственное средство считают прошедшим испытание.

Лекарственное средство не выдерживает испытание, если в течение предусмотренного срока наблюдения погибнет более, чем одно животное.

### **Тест для иммунобиологических лекарственных препаратов**

Испытания проводят на двух видах животных: на 5 белых мышах массой 18-20 г и/или на двух морских свинках, массой тела 250 - 300 г. Массу животных определяют в день начала испытания. В испытания берут здоровых животных, которые ранее не использовались в экспериментах. Условия содержания и кормления должны обеспечивать нормальную жизнедеятельность животных.

#### ***Испытание на белых мышах***

Испытуемое лекарственное средство вводят каждому из 5 животных внутрибрюшинно в одной максимальной разовой дозе для человека (но не более 1,0 мл), если в нормативной документации нет иных указаний. Лиофилизированный испытуемый препарат восстанавливают прилагаемым растворителем в соответствии с указаниями на этикетке. Если испытуемый препарат предназначен для внутривенного введения, то его аномальную токсичность определяют при внутривенном введении, при этом испытуемая доза не должна превышать 0,5 мл. Препарат, вводимый внутривенно, должен иметь температуру  $(36 \pm 1) ^\circ \text{C}$ .

Период наблюдения за животными составляет 7 сут. Если в нормативной документации даны иные указания, то следуют им.

Испытуемый препарат считают выдержавшим испытание, если в течение всего срока наблюдения:

- отсутствует гибель подопытных животных;
- ни у одного из животных не проявятся признаки интоксикации;
- отсутствует снижение массы тела животных по сравнению с исходной.

Если более, чем одно животное погибнет, лекарственное средство считают не выдержавшим испытание. Если погибнет одно животное, проявятся признаки интоксикации или будет отмечено снижение массы тела, то испытание повторяют на удвоенном количестве животных. Лекарственное

средство признается прошедшим испытание, если ни одно животное из второй группы не погибнет, не проявятся признаки интоксикации и не будет отмечено уменьшение массы тела за период наблюдения.

### ***Испытание на морских свинках***

Испытуемый препарат вводят 2 животным подкожно в дозе, равной одной максимальной разовой дозе для человека, но не более 10 мл (если в нормативной документации нет иных указаний).

Лиофилизированный лекарственный препарат восстанавливают прилагаемым растворителем в соответствии с указаниями на этикетке. Если испытуемый препарат предназначен для внутривенного введения, то его аномальную токсичность определяют при внутрибрюшинном введении, при этом вводимая доза не должна превышать 5 мл.

Период наблюдения за животными составляет 7 сут, если в нормативной документации не указаны другие требования.

Испытуемый препарат считают выдержавшим испытание, если в течение всего срока наблюдения:

- отсутствует гибель подопытных животных и ни у одного из них не были выявлены видимые признаки заболевания;
- отсутствует снижение массы тела каждого животного в день окончания наблюдения по сравнению с исходной;
- ни у одного животного, получавшего испытуемый препарат подкожно, не развился некроз или абсцесс в месте его введения (возможность развития других проявлений реакции в месте введения испытуемого препарата указывают в нормативной документации).

Лекарственное средство признается прошедшим испытание, если ни у одного из животных не проявятся признаки интоксикации и не будет отмечено уменьшение массы тела.

Если оба животных погибнут, лекарственное средство признается не выдержавшим испытание.

Если в течение периода наблюдения регистрируют гибель одного животного, заболевание, уменьшение массы, развитие некроза или абсцесса в месте введения испытуемого препарата хотя бы у одного животного, испытание должно быть повторено на удвоенном количестве животных того же вида. Повторное испытание считают удовлетворительным, если препарат отвечает вышеперечисленным требованиям.

Лекарственное средство признается прошедшим испытание, если ни одно животное из второй группы не погибнет или не проявятся признаки интоксикации и не будет отмечено уменьшение массы тела за период наблюдения.

## ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

**Пирогенность**

**ОФС.1.2.4.0005.15**

---

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на испытание пирогенности инъекционных растворов и фармацевтических субстанций, из которых они изготавливаются. Испытание основано на измерении температуры тела у кроликов до и после инъекции.

Содержание животных и подготовка их к проведению испытания

Каждого кролика содержат в отдельной клетке на полноценном пищевом рационе, ограждая от раздражающих воздействий (акустических, оптических и других). В помещениях, где находятся животные и проводятся испытания, поддерживают постоянную температуру воздуха ( $20 \pm 3$ ) °С. Перед испытанием проводят осмотр животных и отбирают здоровых кроликов одного пола, не альбиносов, с массой тела от 2,0 до 3,5 кг, которые не теряли в массе в течение предыдущей недели.

За 18 часов до испытания кроликов лишают корма без ограничения воды. Во время опыта животные не получают ни корма, ни воды. Кроликов, впервые предназначенных для опыта или не участвовавших в опыте более четырех недель, предварительно готовят к процедуре испытания, осуществляя все рабочие операции (осмотр, взвешивание, измерение температуры тела) за исключением инъекции.

Кролики, ранее бывшие в опыте, могут быть использованы повторно через трое суток, если введенное им лекарственное средство было апиrogenным. При повышении температуры тела у животного на 0,6 °С и более, кролик может быть использован для дальнейших опытов не ранее, чем через две недели.

Если испытуемое лекарственное средство обладает антигенными свойствами, то порядок повторного использования животных для испытаний указывают в фармакопейной статье.

## Материалы и оборудование

Посуда для разведения, шприцы и иглы для инъекций должны быть стерильными и апиrogenными, что обеспечивается нагреванием при температуре 250 °С в течение 30 мин или 200 °С в течение 60 мин.

Для разведения испытуемых лекарственных средств используют 0,9 % раствор натрия хлорида для инъекций, если в фармакопейной статье не указан другой растворитель. Все растворители должны быть стерильными и апиrogenными.

Ректальную температуру у кроликов измеряют с точностью до 0,1 °С медицинским максимальным ртутным или электронным термометром с термочувствительным датчиком. Термометр или датчик вводят в прямую кишку кролика на глубину от 5 до 7,5 см в зависимости от массы тела животного.

## **Введение испытуемого лекарственного средства**

Испытуемое лекарственное средство вводят в ушную вену кролика, если в фармакопейной статье не указан другой путь введения. Объем инъецируемого раствора должен составлять не менее 0,2 мл и не более 10 мл на 1,0 кг массы тела животного. Перед введением раствор подогревают до температуры  $(37,0 \pm 2)$  °С.

Тест-дозу испытуемого лекарственного средства, объём вводимого раствора и, если необходимо, скорость введения указывают в фармакопейной статье.

## **Проведение испытания**

Испытание лекарственного средства проводят на группе из трех кроликов с исходной температурой (38,5-39,5) °С.

Перед опытом, с интервалом не менее 30 минут, у каждого кролика дважды измеряют температуру тела. Различия в показаниях температуры у одного и того же животного не должны превышать 0,2 °С. В противном случае кролика исключают из испытания. За исходную температуру принимают величину последнего результата измерения.

Раствор испытуемого лекарственного средства вводят животным сразу после второго измерения температуры.

Измерения температуры после внутривенного введения испытуемого лекарственного средства проводят с интервалом не более 30 минут на протяжении трех часов. При других путях парентерального введения – на протяжении пяти часов.

### **Учет результатов**

Испытание лекарственного средства можно проводить поэтапно. На каждом этапе используют трех кроликов. Максимальное число этапов не должно превышать четырех.

По окончании каждого из этапов испытания определяют максимальное изменение температуры ( $\Delta t$ ) тела каждого кролика по сравнению с исходным значением. Изменение температуры тела животного ниже исходной величины принимают за нулевое и не учитывают.

Для трех кроликов определяют сумму индивидуальных максимальных повышений температур ( $\Sigma \Delta t$ ). Значения  $\Sigma \Delta t$ , полученные на разных этапах испытания, последовательно суммируют, а результаты сравнивают с уровнями, указанными в табл. 1.

После первого этапа испытания лекарственное средство признают апирогенным, если полученный результат меньше или равен 1,2 °С (табл., колонка 3), а индивидуальное повышение температуры ни у одного из трех кроликов не превышает 0,5 °С (табл., колонка 4).

Если результат, полученный на первом этапе, превышает 1,2 °С (колонка 5) или зарегистрировано индивидуальное повышение температуры более чем на 0,5 °С хотя бы у одного из трех кроликов (табл., колонка 6), то необходимо перейти к проведению следующего этапа испытания.

После второго этапа испытания лекарственное средство признают апирогенным, если полученный результат меньше или равен 2,8 °С (табл., колонка 3), а индивидуальное повышение температуры свыше 0,5 °С отмечено не более, чем у одного из шести кроликов (табл., колонка 4).

Если результат, полученный на втором этапе испытания, больше 2,8 °С, но меньше 4,3 °С (табл., колонка 5), или более, чем у одного животного зарегистрировано индивидуальное повышение температуры свыше 0,5 °С (табл., колонка 6), то необходимо перейти к проведению следующего этапа испытания.

После третьего этапа испытания лекарственное средство признают апирогенным, если полученный результат меньше или равен 4,5 °С (табл., колонка 3), а индивидуальное повышение температуры свыше 0,5°С отмечено не более, чем у двух из девяти кроликов (табл., колонка 4).

Если результат, полученный на третьем этапе испытания, больше 4,5°С, но меньше 6,0 °С (табл., колонка 5), или зарегистрировано индивидуальное повышение температуры свыше 0,5 °С более, чем у двух животных (колонка 6), то необходимо перейти к проведению следующего этапа испытания.

После четвертого этапа испытания лекарственное средство признают апирогенным, если полученный результат меньше или равен 6,6 °С (табл., колонка 3), а индивидуальное повышение температуры свыше 0,5 °С отмечено не более, чем у трех из двенадцати кроликов (табл., колонка 4).

Лекарственное средство признают пирогенным, если результат на втором или последующих этапах испытания выше, чем величины, указанные в табл., колонка 7. Лекарственное средство признают пирогенным и в том случае, если в результате четырех этапов испытания зарегистрировано индивидуальное повышение температуры свыше 0,5 °С более, чем у трех кроликов из двенадцати.

# ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

## Стерильность                    ОФС

---

Настоящая общая фармакопейная статья распространяется на методы испытания на стерильность различных лекарственных средств (ЛС) – препаратов для инъекций, инфузий, глазных капель, пленок, фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ, включая биологические лекарственные препараты и их растворители, которые в соответствии с нормативной документацией или фармакопейными статьями должны быть стерильными.

### Условия проведения испытания

Испытание на стерильность проводят в асептических условиях в ламинарных установках, чистых помещениях или изоляторах класса чистоты А. Меры, предотвращающие контаминацию, не должны оказывать губительного влияния на микроорганизмы, которые могут содержаться в испытуемых образцах. Условия проведения испытания регулярно контролируют в соответствии с соблюдением надлежащих правил производства и лабораторной практикой.

### Методы испытания стерильности

Испытание на стерильность проводят двумя методами: методом прямого посева или методом мембранной фильтрации. Метод мембранной фильтрации используют во всех случаях, когда природа препарата, его физико-химические свойства позволяют фильтровать его через мембранные фильтры.

Метод прямого посева используют для испытания на стерильность ЛС, не обладающих антимикробным действием или антимикробное действие которых можно устранить разведением или инактивированием, а также для препаратов, испытание которых невозможно выполнить методом мембранной фильтрации.

При испытании на стерильность параллельно проводятся соответствующие отрицательные контроли.

### **1. Проверка пригодности методики испытания (определение антимикробного действия)**

Проверку пригодности методики испытания на стерильность следует проводить в следующих случаях:

- а) при проведении испытания на стерильность нового препарата;
- б) при внесении любых изменений в экспериментальные условия испытания;
- в) в случае изменения состава препарата или при изменениях в технологии его производства.

Для проверки антимикробного действия используют те же тест-штаммы, что и при оценке ростовых свойств питательных сред (п. 3.3.2.табл. 3).

Определение антимикробного действия проводят теми же методами и в тех же условиях, что и испытание на стерильность.

**Мембранная фильтрация.** Проверка пригодности (определении антимикробного действия) может выполняться одновременно с испытанием на стерильность испытуемого препарата (п. 2.2.). После переноса требуемого количества испытуемого препарата на фильтр в последнюю порцию жидкости для промывания вносят не более 100 колониеобразующих единиц (КОЕ) тест-штаммов микроорганизмов (п. 2.2.8.).

**Прямой посев.** При проверке пригодности (определении антимикробного действия) готовят взвеси тест-штаммов с конечной концентрацией не более  $10^2$  КОЕ в 1 мл. Испытание проводят с каждым видом микроорганизмов.

Используют по 4 пробирки для каждого тест-штамма с 10 или 20 мл (для ИЛП) соответствующей питательной среды. В первые две пробирки вносят по 1 мл испытуемого образца, а в две другие – по 1 мл растворителя (положительный контроль). Во все четыре пробирки вносят по 1 мл соответствующего тест-штамма.

Посевы на тиогликолевой среде инкубируют при температуре  $(32,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$  в течение 3 сут. Посевы на жидкой соево-казеиновой среде или жидкой среде Сабуро инкубируют при температуре  $(22,5 \pm 2,5)^\circ\text{C}$  в течение 5 сут.

Учет результатов проводят визуально в проходящем свете, сравнивая рост тест-штаммов микроорганизмов в опытных и контрольных посевах. Если обнаруженный рост в опытных пробирках визуально сравним с ростом в контрольных посевах, не содержащих испытуемый препарат, делают вывод о том, что препарат в условиях испытания не обладает антимикробным действием. В этом случае испытание на стерильность проводят стандартными методами.

В случае если в контроле наблюдают рост тест-штамма, а в опыте рост отсутствует, считают, что испытуемый препарат обладает антимикробным действием, которое следует устранить.

### **1.1. Устранение антимикробного действия препарата**

Для устранения антимикробного действия препарата используют следующее:

**А)** Увеличивают разведение препарата, взяв больший объем растворителя/разбавителя/питательной среды, но не более 200 мл. Для иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП) допускается только разбавление питательной средой.

Экспериментально установленное соотношение объемов питательной среды и посевного материала, обеспечивающее нейтрализацию антимикробного действия препарата, должно соблюдаться при испытании препарата на стерильность.

**Б)** Применяют метод мембранной фильтрации с последующим промыванием фильтров, если препарат растворим в водных разбавителях или в изопропилмиристате (ИПМ).

**В)** Вместо стандартного разбавителя можно использовать стерильную нейтрализующую жидкость, промышленного производства или приготовленную в лаборатории, следующего состава:

- Твина-80 -30,0 г
  - Лецитина яичного -3,0 г
  - L-гистидина гидрохлорида -1,0 г
  - Пептона (мясного или казеинового) -1,0 г
  - Натрия хлорида -4,3 г
  - Калия фосфата однозамещенного -3,6 г
  - Натрия фосфата двузамещенного -7,2 г
  - Воды очищенной -1000 мл
- pH 7,0±0,2

Г) Используют неспецифические инактиваторы. Для инактивации консервантов, входящих в состав ряда лекарственных препаратов, в разбавитель и/или в питательные среды до стерилизации вносят следующие неспецифические инактиваторы: 3 % твина-80 или 0,3 % лецитина (яичного или соевого) от объема среды. В случае, если в препарате имеется более двух консервантов различной химической структуры, в среду вносят 3 % твина-80, 0,3% лецитина, 0,1% L-гистидина и 0,5 % натрия тиосульфата одновременно. Если разведение в вышеприведенном растворе не инактивирует антимикробные свойства ЛС, увеличивают концентрацию твина-80 или лецитина.

Некоторые инактиваторы антимикробного действия ЛС указаны в табл.4 ОФС «Микробиологическая чистота».

Учитывая, что в состав тиогликолевой среды входит тиогликолят натрия – инактиватор ртутных соединений, перед проведением испытаний ИЛП, содержащих ртутные консерванты, методом прямого посева, проводят определение нейтрализующих свойств этой среды, подтверждающих инактивацию.

Для нейтрализации действия других консервантов, входящих в состав ИЛП, инактиваторы не используются, а основным способом устранения их действия является разведение питательной средой. Посев испытуемого

препарата в питательную среду проводят в соотношении 1:20, с учетом результатов определения антимикробного действия препарата.

Д) Применяют специфические инактиваторы, нейтрализующие антимикробное действие ЛС, но не угнетающие рост микроорганизмов.

Для инактивации пенициллинов и цефалоспоринов, независимо от их лекарственной формы, в буферный раствор, используемый для растворения, суспендирования или эмульгирования образца, а также в питательные среды перед их применением, асептически вносят стерильный раствор  $\beta$ -лактамазы в количестве, указанном в фармакопейной статье или нормативной документации.

Ингибирующее действие  $\beta$ -лактамазы на пенициллины и цефалоспорины необходимо определять, внося в среды с ферментом и антибиотиком от 50 до 100 КОЕ *S. aureus*. Типичный рост тест-штамма в питательной среде служит подтверждением того, что концентрация фермента  $\beta$ -лактамазы достаточна.

Для инактивации сульфаниламидных препаратов, независимо от их лекарственной формы, в буферный раствор, используемый для растворения, суспендирования или эмульгирования образца, а также в питательные среды, если необходимо, до стерилизации вносят парааминобензойную кислоту (ПАБК) из расчета 0,05 - 0,1 г/л среды.

При разработке новых препаратов в фармакопейную статью и нормативную документацию следует включать сведения о наличии/отсутствии антимикробного действия препарата с рекомендациями по его устранению и информацию о методе его испытания на стерильность. В случае изменения технологического процесса или состава препарата необходимо подтвердить отсутствие антимикробного действия.

## **2. ИСПЫТАНИЕ НА СТЕРИЛЬНОСТЬ**

### **2.1. Отбор образцов для испытания**

При проведении испытания на стерильность число контролируемых первичных упаковок определяется с учетом общего количества единиц в серии. Отбирают образцы препарата, как указано в табл. 1.

Испытание на стерильность в процессе производства ИЛП проводят в соответствии с регламентом производства.

При необходимости, могут быть регламентированы особые требования в отношении необходимого количества контролируемых емкостей, обеспечивающие надежность контроля стерильности препарата.

Для посева на соответствующую питательную среду используют образец в количестве, приведенном в табл. 2.

Таблица 1 - Количество единиц препарата для проведения испытания на стерильность в зависимости от объема серии

Количество единиц (ампул, флаконов и др.) в серии*	Минимальное количество единиц (ампул, флаконов и др.) для посева на каждую питательную среду**
<b>Лекарственные средства</b>	
<b>1. Парентеральные лекарственные средства:</b>	
• Не более 100	10 % или 4
• От 100 до 500	10
• Более 500	2 % или 20
• Парентеральные лекарственные средства большого объема (более 100)	2 % или 10
• Антибиотики, твердые формы, ангро, (более 5 г)	6
<b>2. Неинъекционные лекарственные средства (в том числе глазные):</b>	
• Не более 200	5 % или 2
• Более 200	10
• Препараты в однократной упаковке	См. графу «Парентеральные лекарственные средства»
<b>3. Твердые формы, ангро:</b>	
• Не более 4 упаковок	Каждую
• Свыше 4, но не более 50	20 % или 4
• Свыше 50	2 % или 10

\* если количество единиц в серии неизвестно, то используют максимальное количество, указанное в колонке.

\*\* если содержимого одной емкости ЛС (кроме ИЛП) достаточно для инокулирования двух питательных сред, то в этой колонке приводится количество образцов, необходимых для испытания на стерильность на двух питательных средах.

Таблица 2 - Минимальное количество испытуемого препарата для посева на питательные среды

Количество препарата в первичной упаковке	Минимальное количество препарата для посева на каждую питательную среду
<b>Жидкие</b>	
• Менее 1 мл	весь объем первичных упаковок, объединенных до 1 мл

• 1 – 40 мл	½ содержимого, но не менее 1 мл
• 40 – 100 мл	20 мл
• более 100 мл	10 % содержимого, но не менее 20 мл
• Антибиотики (жидкости)	1 мл
• Другие препараты, растворимые в воде или ИПМ	содержимое упаковки, но не менее 200 мг
<b>Нерастворимые препараты, мази и кремы, поддающиеся эмульгированию или суспендированию</b>	содержимое упаковки, но не менее 200 мг
<b>Твердые</b>	
• Менее 50 мг	все содержимое
• 50 - 300 мг	½ содержимого, но не менее 50 мг
• 300 мг – 5 г	150 мг
• более 5 г	500 мг

## 2.2. Метод мембранной фильтрации

При определении стерильности ЛС, обладающих выраженным антимикробным действием, и ЛС в емкостях вместимостью более 100 мл, предпочтительным является метод мембранной фильтрации. Исключение составляют препараты с антимикробным действием, нерастворимые в водных разбавителях или ИПМ.

Процедура испытания на стерильность методом мембранной фильтрации состоит из следующих основных стадий: смачивание мембран, подготовка образцов и фильтрация содержимого всех емкостей через мембранные фильтры, отмывка мембранных фильтров соответствующим стерильным раствором, добавление питательной среды и инкубирование посевов.

Испытание выполняют с использованием фильтрационных установок открытого или закрытого типа, позволяющих в асептических условиях переносить и фильтровать испытуемый препарат через мембранные фильтры (внешний диаметр 47 мм; диаметр пор 0,45 мкм), способные улавливать микроорганизмы. Фильтрационная установка открытого типа должна быть смонтирована таким образом, чтобы испытуемый образец можно было внести и профильтровать в условиях асептики. После окончания фильтрации мембрану асептически переносят в питательную среду. При использовании закрытой стерильной системы с мембраной, смонтированной в канистру,

после фильтрации питательную среду вносят непосредственно в канистру на мембрану. Фильтры из нитратцеллюлозы используют для водных, масляных и слабых спиртовых растворов, фильтры из ацетатцеллюлозы – для концентрированных спиртовых растворов и кислот. Гидрофобный край фильтра и низкая сорбционная способность обеспечивают эффективную отмывку мембраны и сводят к минимуму адсорбцию препарата, обладающего антимикробным действием.

Для препаратов, не обладающих антимикробным действием, можно использовать фильтры без гидрофобного края, смачивая их перед фильтрацией используемым разбавителем.

Если испытуемый препарат не обладает антимикробным действием, в ходе испытания возможно исключить процедуру промывания фильтров.

Процедура проверки пригодности метода мембранной фильтрации при этом не проводится.

### **2.2.1. Испытание водных растворов ЛС**

Определенный объем препарата, стерильно отобранный из всех образцов, перемешивают и асептически переносят на один или несколько предварительно смоченных фильтров. Фильтры асептически снимают с фильтродержателя и помещают в среды или заливают их в емкости с фильтродержателями. При использовании замкнутой системы канистры заполняют равным объемом сред. При этом следует избегать аэрации тиогликолевой среды.

### **2.2.2. Испытание жидких препаратов, не смешивающихся с водой**

Испытание проводят так же, как и для водных растворов ЛС. При испытании вязких жидкостей к общей пробе перед фильтрацией асептически добавляют достаточное количество подходящего стерильного растворителя для увеличения скорости фильтрации.

Если в состав испытуемого препарата входит лецитин, масло или консервант, а сам препарат обладает антимикробным действием, для промывания фильтров используют жидкость № 2.

### **2.2.3. Пробоподготовка мазей, кремов, растворимых в ИПМ, и растворов в маслах**

Мази на жировой основе и эмульсии типа «вода в масле» растворяют в ИПМ, предварительно простерилизованном методом фильтрации (мембрана с диаметром пор 0,22 мкм). Стерильный разбавитель/растворитель и, если необходимо, испытуемый препарат, непосредственно перед фильтрацией нагревают до температуры не более 44 °С. Первоначально через мембрану пропускают стерильный ИПМ в количестве 5 мл. Затем фильтруют раствор препарата в ИПМ. Для максимальной эффективности процесса во время фильтрации над фильтром постоянно должен быть слой раствора. После фильтрации мембрану промывают тремя порциями жидкости № 2 по 100 мл каждая. Испытание проводят на питательных средах с добавлением 1 г/л твина-80.

Если в состав испытуемого препарата входит вазелин, для промывания фильтров используют жидкость № 3. Перед началом фильтрации через фильтр пропускают 5,0 мл стерильного ИПМ. Для максимальной эффективности процесса во время фильтрации над фильтром постоянно должно быть небольшое количество теплого раствора. После фильтрации образец фильтр промывают тремя порциями жидкости №3 по 100 мл каждая. Фильтры помещают в питательные среды, как указано ранее.

Если препарат представляет собой раствор в масле, фильтр и установка перед применением должны быть тщательно высушены.

### **2.2.4. Испытание препаратов в шприц-тюбиках**

Содержимое каждого шприц-тюбика переносят в установки для мембранной фильтрации или собирают общую пробу в стерильную пробирку для последующего переноса на фильтр.

### **2.2.5. Испытание твердых форм лекарственных средств для инъекций (кроме антибиотиков)**

Препарат разводят, как указано в инструкции по применению, и проводят испытание согласно методике, приведенной в разделах 2.2.1. и 2.2.2.

### **2.2.6. Испытание стерильных аэрозольных препаратов**

Требуемое количество препарата в аэрозольной упаковке асептически переносят в стерильную колбу нажатием на шток распылительного клапана. Если возможно, удаляют пропеллент путем испарения. Добавляют в колбу жидкость № 2 и осторожно перемешивают. Испытание проводят, как указано в разделах 2.2.1. и 2.2.2.

### **2.2.7. Жидкости для промывания мембранных фильтров при испытании лекарственных средств, обладающих антимикробным действием**

Для промывания фильтров можно использовать любую стерильную жидкость, не подавляющую рост микроорганизмов:

- 0,9 % раствор натрия хлорида рН  $7,0 \pm 0,2$  (после стерилизации).
- Жидкость № 1: растворяют 1 г ферментативного пептона в 1000 мл воды, фильтруют или центрифугируют для осветления, разливают в сосуды и стерилизуют; рН  $7,0 \pm 0,2$ .

При фильтрации образцов пенициллинов или цефалоспоринов (если необходимо) к жидкости № 1 добавляют валидированное количество  $\beta$ -лактамазы, указанное в фармакопейной статье и нормативной документации, достаточное для инактивации остаточного антимикробного действия антибиотика на фильтре.

- Жидкость № 2: добавляют 1 мл твина-80 к 1000 мл жидкости № 1, разливают в сосуды и стерилизуют; рН  $7,0 \pm 0,2$
- Жидкость № 3: растворяют 5 г ферментативного пептона, 3 г мясного экстракта и 10 г твина-80 в 1000 мл воды, разливают во флаконы и стерилизуют; рН  $7,0 \pm 0,2$ .

При испытании ИЛП промывку мембранных фильтров можно проводить любым стерильным раствором, не подавляющим рост микроорганизмов, использованным при определении антимикробного действия препарата, например: 0,9 % раствор натрия хлорида (рН  $7,0 \pm 0,2$ ) или жидкость № 1.

### **2.2.8. Проверка пригодности метода мембранной фильтрации при испытании ЛС, обладающих антимикробным действием**

Фильтруют объем испытуемого образца, используя для одного фильтра то же количество единиц (ампул, флаконов и т.д.), что и в испытании на стерильность (табл.2). Фильтр промывают, как минимум, тремя порциями соответствующей жидкости по 100 мл каждая. В последнюю порцию жидкости для промывания вносят по 1 мл приготовленных взвесей тест-штаммов микроорганизмов (каждого в отдельности) с концентрацией  $10^2$  КОЕ/мл: *Bacillus subtilis* (или *Staphylococcus aureus*) – для тиогликолевой среды, *Candida albicans* – для соево-казеиновой среды или бульона Сабуро. Штаммы указанных микроорганизмов приведены в табл. 3. Фильтр помещают в емкость со 100 мл соответствующей питательной среды или добавляют среду в канистру замкнутой системы. Посевы инкубируют при соответствующей температуре в течение не более 3 сут для бактерий и 5 сут для грибов.

В ходе учета результатов определяют визуально в проходящем свете наличие роста тест-штаммов микроорганизмов. В случае обнаружения роста считают, что антимикробное действие полностью инактивировано и проводят испытание на стерильность, используя то же количество препарата, аналогичный объем жидкости для промывания и те же питательные среды.

Если рост тест-штаммов микроорганизмов отсутствует, делают вывод, что антимикробное действие препарата не инактивировано. Испытание повторяют, увеличивая объем жидкости для промывания фильтра (но не более 500 мл) или используют другие способы нейтрализации (п. 1.1).

### **2.3. Метод прямого посева**

Метод прямого посева используют для испытания на стерильность ЛС, не обладающих антимикробным действием, или тех препаратов, испытание которых невозможно выполнить методом мембранной фильтрации.

В том случае, если препарат обладает антимикробным действием в условиях испытания, его нейтрализуют путем добавления подходящих

инактиваторов или увеличивая объем питательной среды (п. 1.1). Добавляемый инактиватор в заданной концентрации не должен подавлять рост тест-штаммов. При необходимости инактиватор можно добавлять и в питательную среду.

Испытуемые образцы засевают непосредственно в питательные среды в соотношении 1:10 или 1:20. Соотношение количества испытуемого материала и используемой питательной среды должно быть определено при проверке антимикробного действия препарата.

Для ИЛП, вызывающих помутнение питательной среды (препараты, содержащие сорбент, микробные клетки и др.), когда визуально нельзя определить наличие или отсутствие роста микроорганизмов или возникают сомнения при учете результатов, посев производят по указанной выше схеме, а на 5-7 сут производят пересев на свежую питательную среду. Все посевы выдерживают при адекватной температуре до окончания инкубации (14 сут со дня первичного посева).

### **2.3.1. Испытание нефилтрующих жидкостей**

Из определенного количества флаконов, ампул и т.д. (табл.1) асептически отбирают объем препарата, достаточный для посева на питательные среды в соотношении 1:10. После посева аккуратно перемешивают среду, исключая аэрацию.

### **2.3.2. Испытание мазей, кремов и растворов в маслах**

От каждой испытуемой серии отбирают необходимое количество единиц (табл. 1).

Растворы в маслах. Готовят эмульсию препарата в разведении 1:10, помещая в стерильную колбу, содержащую соответствующий стерильный разбавитель, стеклянные бусы диаметром 5-6 мм, и, при необходимости, определенное количество твина-80.

Посевы растворов в маслах ежедневно аккуратно перемешивают.

Мази и кремы. Тубы (флаконы) перед испытанием дезинфицируют, вскрывают их асептически и первую порцию препарата удаляют, не исследуя.

Мази и кремы, легко эмульгируемые в воде. Готовят разведение ЛС 1:10, помещая образец в стерильную колбу с соответствующим стерильным разбавителем (например, раствором 0,9 % натрия хлорида или жидкостью № 1) и стеклянными бусами диаметром 5-6 мм. Смесь нагревают на водяной бане до температуры 40 °С и энергично встряхивают в течение 5-15 мин до получения гомогенной эмульсии, которую высевают в жидкие среды – тиогликолевую, соево-казеиновую или Сабуро.

Мази и кремы, трудно смешиваемые с водой. Готовят разведение препарата 1:10, помещая в стерильную колбу с соответствующим стерильным разбавителем (например, раствором 0,9 % натрия хлорида или жидкостью № 3), твином-80 в количестве 50 % от массы навески и стеклянными бусами диаметром 5-6 мм. Смесь нагревают на водяной бане до температуры 40 °С (в исключительных случаях до температуры 45 °С), энергично встряхивают в течение 5-15 мин (максимально 30 мин), до получения гомогенной эмульсии, которую затем высевают в жидкие среды – тиогликолевую, соево-казеиновую или Сабуро.

### **2.3.3. Испытание твердых форм**

ЛС в виде порошка переносят в количестве, указанном в табл. 2, в жидкие среды – тиогликолевую, соево-казеиновую или Сабуро и осторожно перемешивают. Если в образец добавлен стерильный растворитель, то испытанию на стерильность подвергают полученную суспензию.

### **2.4. Условия инкубации посевов**

Посевы инкубируют не менее 14 сут при температуре  $(32,5 \pm 2,5)$  °С в жидкой тиогликолевой среде и при температуре  $(22,5 \pm 2,5)$  °С в жидких соево-казеиновой среде или среде Сабуро (независимо от метода посева).

При испытании ИЛП возможно использование только тиогликолевой среды и инкубирование посевов при двух температурных режимах  $(32,5 \pm 2,5)$  °С и  $(22,5 \pm 2,5)$  °С.

### **2.5. Учет и интерпретация результатов испытания**

Во время инкубации периодически просматривают посеvy. Наличие роста микроорганизмов определяют визуально в проходящем свете. Если испытуемое ЛС вызывает помутнение питательной среды и визуально нельзя определить наличие или отсутствие микробного роста, через 14 сут после начала испытания переносят не менее 1 мл помутневшей среды в пробирки с аналогичной стерильной средой. Инкубируют исходные и повторные посеvy. Общее время инкубации должно составлять не менее чем 14 + 4 сут от начала испытания.

Для ИЛП, вызывающих помутнение питательной среды, пересев на аналогичную питательную среду производится на 5-7 сут с последующей инкубацией 14 сут со дня первичного посева.

При отсутствии роста микроорганизмов, считают, что испытуемый препарат соответствует требованиям испытания на стерильность.

При обнаружении роста микроорганизмов, определяемого визуально по наличию мутности, осадка, хлопьев и других изменений среды и подтверждаемого микроскопическим исследованием, считают, что испытуемый препарат не соответствует требованиям испытания на стерильность. В этом случае проводят расследование причин несоответствия.

Результаты испытания на стерильность могут быть признаны недостоверными в случае, если выполняется одно или несколько условий, приведенных ниже:

- 1) получены неудовлетворительные результаты микробиологического контроля окружающей среды (воздушной среды, поверхностей и рук персонала и др.) при проведении испытания на стерильность;
- 2) выявлены ошибки, допущенные в ходе испытания;
- 3) обнаружен рост микроорганизмов в отрицательном контроле (контроль стерильного растворителя/разбавителя или питательной среды);
- 4) питательная среда нестерильна и/или её ростовые свойства неудовлетворительны;
- 5) выявлены ошибки в ходе процесса стерилизации материалов.

Если результаты испытания признаны недостоверными (в случае обнаружения ошибок в ходе анализа), тест повторяют на том же количестве образцов, что и первоначально, исключая препараты ИЛП, повторное испытание которых проводят на удвоенном количестве образцов.

Если в результате повторного испытания не обнаруживают рост микроорганизмов, считают, что препарат соответствует требованиям испытания на стерильность. Если в результате повторного испытания обнаруживают рост микроорганизмов, считают, что препарат не соответствует требованиям испытания на стерильность.

Если в ходе расследования доказана правильность выполнения теста на стерильность, считают, что препарат не соответствует требованиям испытания на стерильность.

### **3. Питательные среды**

Для испытания на стерильность используют жидкие среды – тиогликолевую, соево-казеиновую или Сабуро. Тиогликолевую среду применяют для выявления аэробных и анаэробных бактерий. Жидкую соево-казеиновую среду – для выявления грибов и аэробных бактерий. Жидкую среду Сабуро используют для выявления грибов.

При испытании на стерильность ИЛП не рекомендуется использовать жидкую среду Сабуро.

При испытании на стерильность ИЛП, в том числе, содержащих ртутные консерванты, допустимо использование только тиогликолевой среды в качестве универсальной для выявления аэробных и анаэробных бактерий и грибов (при условии предварительного определения её ростовых и нейтрализующих свойств с использованием тест-микроорганизмов в соответствии с табл.3). Инкубацию посевов осуществляют при двух температурных режимах.

#### **3.1. Приготовление питательных сред**

Питательные среды готовят в лаборатории, используя сухие питательные среды промышленного производства или отдельные компоненты. Допускается применение сред, готовых к использованию, с сертификатом производителя. Приготовленные в лаборатории питательные среды проверяют на стерильность и определяют их ростовые свойства.

Питательные среды стерилизуют в автоклаве при температуре 121°C в течение 15 мин, если нет других указаний в фармакопейной статье или нормативной документации.

#### *Тиогликолевая среда*

- L-цистина - 0,5 г
- Натрия хлорида - 2,5 г
- Глюкозы моногидрата - 5,5 г
- Агара микробиологического (влажность не более 15 %) - 0,75 г
- Дрожжевого экстракта (водорастворимого) - 5,0 г
- Панкреатического гидролизата казеина - 15,0 г
- Натрия тиогликолята - 0,5 г
- или тиогликолевой кислоты - 0,3 г
- Раствора резазурина натрия (1:1000), свежеприготовленного - 1,0 мл
- Воды очищенной - 1000,0 мл

рН после стерилизации  $7,1 \pm 0,2$ .

Добавляют в воду очищенную L-цистин, агар микробиологический, натрия хлорид, глюкозу, водорастворимый дрожжевой экстракт и панкреатический гидролизат казеина и нагревают до полного растворения. После этого вносят натрия тиогликолят или тиогликолевую кислоту и, если необходимо, доводят рН среды 1М раствором натрия гидроксида до необходимого значения. Добавляют раствор резазурина, перемешивают, разливают в пробирки соответствующего объема и стерилизуют.

#### *Жидкая соево-казеиновая среда*

- Панкреатического гидролизата казеина - 17,0 г

- Папаинового гидролизата соевой муки - 3,0 г
- Натрия хлорида - 5,0 г
- Калия фосфата двузамещенного - 2,5 г
- Глюкозы - 2,5 г
- Воды очищенной - 1000,0 мл

рН после стерилизации  $7,3 \pm 0,2$

Компоненты растворяют в воде (если необходимо – при нагревании). Охлаждают при комнатной температуре. Если требуется, добавляют 1М раствор натрия гидроксида, чтобы после стерилизации значение рН среды было  $7,3 \pm 0,2$ . Фильтруют для получения прозрачной среды, разливают в пробирки и стерилизуют.

#### *Жидкая среда Сабуро*

- Пептона ферментативного - 10,0 г
- Глюкозы моногидрата - 40,0 г
- Воды очищенной - 1000,0 мл

рН после стерилизации  $5,6 \pm 0,2$

Пептон и глюкозу добавляют в воду очищенную и полностью растворяют при слабом нагревании. Охлаждают до комнатной температуры и доводят рН до требуемого значения. Если необходимо, фильтруют, разливают в пробирки и стерилизуют.

Допускается, чтобы состав сухих и готовых к применению сред промышленного производства различался, при условии их соответствия требованиям по ростовым свойствам.

### **3.2. Стерильность питательных сред**

После стерилизации не менее 5 % емкостей от каждой партии питательной среды помещают в термостат и инкубируют в течение как минимум 14 сут для контроля стерильности параллельно с посевом испытуемого образца на стерильность. Рост микроорганизмов должен отсутствовать.

### **3.3. Определение ростовых свойств питательных сред**

Ростовые свойства сред определяют для каждой серии питательной среды, выпущенной промышленностью и имеющей номер, и для каждой партии среды, изготовленной в лаборатории.

Каждый вид микроорганизма в количестве 10-100 КОЕ/мл вносят в отдельную порцию испытуемой среды (в 2 пробирки). Инкубируют в соответствии с условиями, указанными в табл. 3. Если в течение необходимого времени инкубации в инокулированных средах визуально отмечается рост микроорганизмов, среду считают пригодной для использования.

#### **3.3.1. Подготовка тест-штаммов микроорганизмов**

Используют тест-штаммы бактерий и грибов из специализированных коллекций, которые должны быть типичными по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам.

Число пассажей рабочих культур не должно превышать пяти.

Перед испытанием культуры аэробных бактерий высевают на скошенный соево-казеиновый агар, среду № 1 или другую соответствующую плотную питательную среду; культуры грибов *C. albicans* и *A. brasiliensis* – на скошенный агар Сабуро (или среду № 2); культуры анаэробов *Clostridium novyi* и *C. sporogenes*\* – на среды для анаэробных микроорганизмов (например, жидкую тиогликолевую) и инкубируют при соответствующей температуре.

\* Возможен высев культуры на среды для аэробов при условии инкубации в анаэроостате.

#### **3.3.2. Приготовление инокулята**

Выросшие культуры тест-штаммов бактерий (в том числе, *C. sporogenes*, выращенную в анаэробных условиях) и *C. albicans* смывают с поверхности скошенного агара стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида. Готовят взвесь каждого тест-штамма, соответствующую 10 ЕД по оптическому стандартному образцу мутности.

Таблица 3 - Тест-штаммы микроорганизмов, используемые для определения ростовых свойств питательных сред и проверки антимикробного действия препарата\*

Питательные среды	Тест-штаммы микроорганизмов	Условия инкубации	
		Температура	Время
Жидкая тиогликолевая среда	<b>Аэробные бактерии:</b>	32,5 ± 2,5°C	3 сут
	<i>Bacillus subtilis</i> ГКПМ 010011, ATCC 6633 или <i>Bacillus cereus</i> ГКПМ 010014, ATCC 10702		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ГКПМ 201108, ATCC 6538		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ГКПМ 190155, ATCC 9027		
	<i>Alcaligenes faecalis</i> 415** ГКПМ 300205		
	<b>Анаэробные бактерии:</b>		
	<i>Clostridium sporogenes</i> 272 ГКПМ 300524, ATCC 19404		
	<i>Clostridium novyi</i> 198** ГКПМ 242484		
	<b>Грибы**:</b>		
<i>Candida albicans</i> NCTC885-653, ATCC 10231			
Жидкая соево-казеиновая среда	<b>Аэробные бактерии:</b>	32,5 ± 2,5°C	3 сут
	<i>Bacillus subtilis</i> ГКПМ 010011, ATCC 6633 или <i>Bacillus cereus</i> ГКПМ 010014, ATCC 10702		
	<b>Грибы:</b>	22,5 ± 2,5°C	5 сут
	<i>Candida albicans</i> NCTC 885-653, ATCC 10231		
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 9642, ATCC 16404			
Жидкая среда Сабуро	<b>Грибы:</b>	22,5 ± 2,5°C	5 сут
	<i>Candida albicans</i> NCTC 885-653, ATCC 10231		
	<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 9642, ATCC 16404		

\* могут быть использованы и другие тест-штаммы из различных коллекций, типичные по культурально-морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. Набор тест-штаммов может быть изменен в зависимости от способа применения или состава испытуемого препарата.

\*\* обозначены тест-штаммы для случаев использования тиогликолевой среды в качестве универсальной при испытании ИЛП. Культивирование производят при двух температурных режимах: ( 32,5±2,5) °C и (22,5±2,5) °C.

Концентрацию клеток *B. subtilis*, *C. albicans*, *A. brasiliensis* доводят до  $1 \cdot 10^7$  КОЕ/мл; *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. sporogenes*, *A. faecalis* – до  $1 \cdot 10^9$  КОЕ/мл. Культуру *C. novyi*, выращенную на жидкой среде культивирования для анаэробных микроорганизмов (2 посева), после центрифугирования 3000 об/мин в течение 20 мин разводят стерильной жидкостью следующего состава:

- натрия хлорид - 8,5 г,
  - тиогликолевая кислота - 0,3 мл,
  - вода очищенная - 1000 мл,
- pH  $7,2 \pm 0,2$  после стерилизации

Для смыва конидий *A. brasiliensis* используют стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида, содержащий 0,05 % твина-80. Количество конидий в 1 мл смыва определяют с помощью камеры Горяева или посевом подходящего разведения на агар Сабуро или среду № 2.

Стандартизованные взвеси бактерий и грибов доводят стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида методом последовательных десятикратных разведений до концентрации 10-100 КОЕ/мл для посева в жидкие и полужидкие питательные среды для определения их ростовых свойств.

Для подтверждения полученной концентрации инокуляты бактерий, в том числе, *C. sporogenes* (при условии инкубации последнего в анаэроостате), высевают на соево-казеиновый агар (среду № 1 или специализированную среду для клостридий соответственно) по 0,1 мл из взвеси с концентрацией  $10^3$  КОЕ/мл, *C. novyi* – на специальную среду для клостридий. Инокуляты грибов высевают на агар Сабуро (или среду № 2).

### **3.4. Определение нейтрализующих свойств тиогликолевой среды**

При проведении испытаний ИЛП, содержащих тиомерсал, для определения нейтрализующих свойств тиогликолевой среды используют тест-штамм *Alcaligenes faecalis* 415 (подготовка инокулята см п. 3.3.2.)

Предварительно перед посевом культуры в каждую пробирку в середину столбика с тиогликолевой средой вносят по 0,5 мл свежеприготовленного 0,01% раствора тиомерсала, разведенного стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида.

Тиогликолевую среду признают пригодной по нейтрализующим свойствам, если не позднее 5 суток инкубации посевов при температуре  $(32,5 \pm 2,5)^\circ \text{C}$  визуально обнаруживается рост тест-штамма *A. faecalis* 415.

### **3.5. Хранение питательных сред**

Приготовленные в лаборатории среды хранят при температуре от 2 до 25 °С в защищенном от света месте в течение не более 1 мес или в течение иного срока, подтвержденного в ходе валидационных испытаний.

В случае, если при хранении тиогликолевой среды, содержащей резазурин, верхний слой среды (более 1/3 объема) окрасится в розовый цвет, среду можно регенерировать нагреванием на кипящей водяной бане в течение 10-15 мин до исчезновения розовой окраски с последующим быстрым охлаждением. Если окраска не исчезает после нагревания, среду считают непригодной к применению. Регенерацию среды можно проводить только один раз.

Питательные среды промышленного производства, готовые к использованию, хранят в плотно закупоренных емкостях при условии сохранения их стерильности и ростовых свойств в течение срока годности.

Сухие питательные среды промышленного производства хранят в соответствии с инструкцией по применению и уничтожают по истечении срока годности, указанного производителем.