

Лекция № 5

**СОВРЕМЕННЫЕ
МЕТОДЫ ФИЗИЧЕСКОГО,
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОГО
И ХИМИЧЕСКОГО МЕТОДОВ
АНАЛИЗА.**

**ПЕРСПЕКТИВЫ
ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ
АНАЛИЗЕ**

План

1. Классификация методов анализа.
2. Физические методы анализа.
3. Физико-химические методы анализа.
4. Методы, основанные на испускании излучения.
5. Электрохимические методы.
6. Методы разделения.
7. Термические методы анализа.
8. Химические методы количественного определения.

Современные методы физического, физико–химического и химического методов анализа. Перспективы использования в фармацевтическом анализе. Выбор метода

В настоящее время в фармацевтическом анализе разрешено использование только тех методов анализа, которые валидированы в соответствии и Государственной Фармакопеей и включены в Государственную Фармакопею.

Методы анализа классифицируются на химические, физические и физико-химические.

К химическим методам можно отнести качественные реакции и титриметрические методы количественного определения.

К физическим методам относятся те, которые регистрируют определенный физический параметр вещества, например, оптическая плотность или показатель преломления.

К физико-химическим методам относятся те, которые требуют проведение химических реакций перед регистрацией физического параметра, например, метод фотоэлектроколориметрии или флюориметрии.

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

1. Температура плавления вещества. Температура плавления определяет характер кристаллической решетки и иные свойства вещества. Для количественного определения метод малопригоден, хотя возможно в некоторых случаях оценить по температуре плавления количественное содержание вещества. Чаще его используют для полимерных веществ с целью определения пределом полимеризации. В фармакопейные статьи данный метод включен для определения чистоты и подлинности фармацевтических субстанций.

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

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

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

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

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

Рентгеноспектральные методы анализа. Перспективный неразрушающий метод анализа в отношении выявления фальсифицированных лекарственных средств. Также могут достаточно успешно использоваться при наличии в молекуле тяжелых элементов (кобальт, золото, платина и др.).

Рентгеновская порошковая дифрактометрия. Рентгеновская порошковая дифрактометрия позволяет качественно и количественно определять различные фазы в их смеси на основе анализа дифракционной картины, создаваемой при облучении исследуемого образца рентгеновскими лучами. Преимуществами данного метода являются высокая достоверность и экспрессность; метод — прямой, так как дает сведения непосредственно о структуре вещества; метод не требует большого количества вещества (не более 0,1 г); анализ можно проводить без разрушения образца; метод позволяет оценить количество фаз в смеси.

Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия. Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия — метод анализа, используемый для определения концентраций элементов от бериллия (№ 4) до урана (№ 92) в диапазоне от долей ppm до 100% в веществах и материалах различного происхождения. Погрешность рентгенофлуоресцентного анализа варьируется в пределах 0,2–3%. Метод основан на зависимости интенсивности рентгеновской флуоресценции от концентрации элемента в образце. При облучении образца потоком рентгеновского излучения возникает характеристическое флуоресцентное излучение, которое пропорционально концентрации элемента в образце. Излучение разлагается в спектр при помощи кристалл-анализаторов, далее с помощью детекторов и счетной электро-

ники измеряется его интенсивность. Математическая обработка спектра позволяет проводить количественный и качественный анализ. При облучении атомов образца фотонами с высокой энергией первичным рентгеновским излучением от рентгеновской трубки атомы переходят в возбужденное состояние, но спустя доли секунды возвращаются к стабильному (основному) состоянию. Такой переход электронов сопровождается испусканием энергии в виде вторичного фотона с возникновением флуоресценции. Энергия вторичного фотона находится в диапазоне энергий рентгеновского излучения, которое располагается в спектре электромагнитных колебаний между ультрафиолетом и гамма-излучением. Рентгенофлуоресцентный анализ охватывает следующие диапазоны энергий и длин волн: $E = 0,11 - 60 \text{ кэВ}$, $\lambda = 11,30 - 0,02 \text{ нм}$.

Длина волны флуоресценции является индивидуальной характеристикой каждого элемента и называется характеристической флуоресценцией. В то же время интенсивность (число квантов, поступающих за единицу времени) пропорциональна концентрации (количеству атомов) соответствующего элемента. Это позволяет проводить качественный и количественный элементный анализ вещества.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Методы, основанные на поглощении излучения (абсорбционные методы).

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

Атомно-абсорбционная спектрофотометрия основана на использовании ультрафиолетового или видимого излучения резонансной частоты. Поглощение связано с переходом электронов внешней оболочки на возбужденный уровень, что характеризуется для каждого конкретного атома или молекулы определенной частотой. Объектами, поглощающими излучение, являются атомы в газообразном состоянии (реже молекулы). Сущность метода заключается в пропускании света через облако, содержащее атомы или ионы испытуемого вещества. Это облако создается или путем введения раствора вещества в пламя горелки с высокотемпературным пламенем (ацетилен с кислородом, закись азота с водородом и т.д.), либо через специальное устройство, переводящее раствор в парообразное состояние. Фотометрическим методом измеряют уменьшение интенсивности полосы резонансного поглощения данного вещества. Расчет количества осуществляется по формуле, отражающей зависимость от ослабления интенсивности излучения источника света за счет толщины поглощающего слоя, коэффициента поглощения и т.д. метод отличается высокой чувствительностью и точностью, предел обнаружения составляет $0,001 - 0,0001 \text{ мкг/мл}$. Чаще всего метод используют для количественного определения элементосодержащих лекарственных веществ и для количественного определения мышьяка в качестве контролируемой примеси.

Ультрафиолетовая и видимая спектрофотометрия. Наиболее простой и широко применяемый в фармации метод анализа. Его используют на всех этапах фармацевтического анализа (испытания чистоты, подлинности, количественного определения), однако наиболее достоверные данные получаются при использовании метода для количественного определения лекарственных веществ. Процесс поглощения обусловлен электронными переходами электронов, участвующих в валентных связях молекул и отражает в конечном итоге свойства всей молекулы в целом. В реальности в диапазоне измерений от 220 нм, а при частоте свыше 200 нм расположена область вакуумного ультрафиолета, поглощающими фрагментами молекул являются двойные связи, а еще лучше их комплекс, называемые хромофорной группировкой. Хорошими объектами для спектрофотометрии являются ароматические и гетероароматические соединения. В случае монохроматического излучения и разбавленных растворов (концентрация вещества обычно меньше 0,01 М) оптическая плотность прямо пропорциональна концентрации вещества в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера:

$I = I_{\text{оexp}}(-\epsilon IC)$, где I интенсивность прошедшего светового потока, $I = 1$ см, а C выражено в моль/л, то ϵ называют молярным коэффициентом поглощения.

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 нормативной документации приведены различные способы использования УФ спектроскопии для количественного определения лекарственных веществ-витаминов, антибиотиков, других препаратов. В качестве растворителей для УФ спектрофотометрии используют воду, этанол, растворы кислот или щелочей. Расчет концентрации проводят различными способами: по стандарту, удельному показателю поглощения или калибровочному графику. Для уменьшения относительной погрешности и влияния других факторов, снижающих точность анализа, в том числе примесей используют стандартные образцы или, что применяется чаще эталоны. В качестве эталонов выступают иногда растворы неорганических веществ (хромат калия, дихромат калия и т.д.), в настоящее время широко применяют РСО — рабочие стандартные образцы, приготавливаемые из заведомых субстанций или стандартных образцов.

Дифференциальные методы позволяют расширить область применения спектрофотометрии в фармацевтическом анализе. Они позволяют повысить ее объективность и точность, а также анализировать высокие концентрации веществ. Кроме того этими методами можно анализировать многокомпонентные системы без их предварительного разделения. Метод дифференциальной спектрофотометрии включен в Государственную Фармакопею. Сущность данного метода заключается в измерении светопоглощения анализируемого раствора относительно раствора

сравнения, содержащего определенное количество испытуемого вещества. Это приводит к снижению относительной погрешности анализа до 0,5–1,0%.

Новые возможности в области идентификации и количественного определения открывает использование производной УФ-спектрофотометрии. Метод основан на выделении математическими методами индивидуальных полос из УФ-спектра, представляющего собой сумму налагающихся полос поглощения или полос, не имеющих четко выраженного максимума. Основано это на том факте, что в идеальном случае кривая поглощения представляет собой кривую Гаусса — вероятностного распределения и при наличии нескольких максимумов поглощения на общей кривой будут образовываться плечи, которые дают во второй и четвертой производных четкие максимумы, позволяющие выделить каждую из этих полос. Точность такого метода, существенно ниже, но он позволяет без больших затрат и сложных экстракций производить анализ смесей. Правда, сейчас, при наличии хроматографии значимость такого метода снижается и метод производной УФ-спектрофотометрии почти не используется на практике.

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

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

МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ИСПУСКАНИИ ИЗЛУЧЕНИЯ

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

Флуориметрия может быть использована как для количественного, так и для качественного анализа. Количественный анализ выполняют на спектрофлуориметрах. Принцип их работы заключается в том, что свет от ртутно-кварцевой лампы падает на кювету с испытуемым образцом, а флуоресценция, излучаемая образцом, причем частота излучения всегда ниже частоты возбуждения флуоресценции, фиксируется под углом 90 градусов к возбуждающему источнику света. Количественное определение осуществляется по калибровочному графику в сравнении со стандартным образцом. Достоинством метода является его высокая избирательность, высокая чувствительность и точность. Недостатком — редкость применения, т.к. далеко не все органические соединения флуоресцируют. Флуоресцентный метод используют для количественного определения производных сульфониламида, новокаина, барбитураты, некоторые антибиотики (тетрацилин, стрептомицин).

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

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Потенциометрия — метод, основанный на измерении равновесных потенциалов, возникающих на границе между испытуемым раствором и погруженным в него электродом. В ГФ включен метод **потенциометрического титрования** заключающийся в установлении эквивалентного объема титранта путем измерения ЭДС индикаторного электрода и электрода сравнения, погруженных в анализируемый раствор. Метод прямой потенциометрии используется для определения pH и установления концентрации отдельных ионов. Потенциометрическое титрование

отличается от индикаторного возможностью анализировать сильно окрашенные. Коллоидные, мутные растворы, а также растворы, содержащие окислители. Кроме того, можно последовательно оттитровать в смеси несколько компонентов в водных и неводных средах. Потенциометрический метод используют для титрования на основе реакций нейтрализации, осаждения, комплексообразования, окисления-восстановления. Электродом сравнения во всех указанных методах служит каломельный, хлорсеребряный или стеклянный (последний не используется при анализе методом нейтрализации). Индикаторным при кислотном титровании является стеклянный электрод, при комплексометрическом — ртутный или ион-селективный. В методе осаждения — серебряный, в окислительно-восстановительном — платиновый.

Измерение ЭДС, возникающей при титровании за счет разности потенциалов между индикаторным электродом и электродом сравнения, производят с помощью высокоомных рН-метров. Титрант прибавляют из бюретки равными объемами, постоянно перемешивая титруемую жидкость. Вблизи точки эквивалентности титрант прибавляют по 0,1–0,05 мл. Значение ЭДС в этой точке изменяется наиболее сильно, так как абсолютная величина отношения изменения ЭДС к приращению объема прибавляемого титранта будет при этом максимальной.

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

Электропроводность является мерой способности среды проводить электрический ток. Ток, текущий через проводник, прямо пропорционален приложенной электродвижущей силе и обратно пропорционален сопротивлению проводника. Электропроводность характеризуется величиной удельного объемного сопротивления, которая равняется сопротивлению кубического объема среды с ребром в 1 см. Электропроводность по определению является величиной, обратной сопротивлению. Единицей сопротивления в международной системе СИ является Ом·м, на практике обычно выражается в Ом·см. Единицей электропроводности в международной системе СИ является $\text{См} \cdot \text{м}^{-1}$ (сименс·м⁻¹). На практике электропроводность раствора выражается в $\text{См} \cdot \text{см}^{-1}$ или в $\text{мкСм} \cdot \text{см}^{-1}$. Метод используется в оценке качества воды очищенной.

МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ

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

Хроматографические методы разделения веществ основаны на их распределении между двумя фазами: подвижной и неподвижной. По механизму процесса разделения хроматографические методы классифицируют на ионообменную,

адсорбционную, осадочную, распределительную, окислительно-восстановительную хроматографию.

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

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

Для количественного определения в фармацевтическом анализе используют адсорбционную — ТСХ или бумажную хроматографию. Мы ее рассматривали на предыдущей лекции. Здесь следует отметить, количественное определение с помощью ТСХ метод достаточно доступный и простой в осуществлении, но в сравнении с другими менее точный. Чаще всего используют хроматографические пластины с закрепленным слоем сорбента — они более точно воспроизводят результаты анализа. Преимуществом ТСХ является простота приемов и оборудования, высокая чувствительность, широкий набор стандартизированных сорбентов и пластин, их устойчивость к температурным и химическим воздействиям и, наконец, дешевизна анализа. Метод широко используют в судебной химии для анализа наркотиков в том числе и количественно. Для количественного определения используют растворы сравнения и разделенные вещества количественно определяют либо после снятия с пластины приборными методами, либо по размерам пятна на пластине. Первый метод, несомненно, более точный и достоверный, иногда используют специальные приборы.

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

Газожидкостная хроматография. Не останавливаясь особенно на этом методе, будет отдельная лекция, следует отметить, что это доступный метод анализа летучих веществ или их дериватов. Достоинством метода является совмещение идентификации лекарственного вещества, оценки его чистоты и примесей и количественное определение. Недостатком — необходимость стандартного образца для количественного определения, т.к. метод хроматографии сам по себе дает только относительное количество. Еще одним достоинством метода является его высокая точность (до 0,1%), малое количество испытуемого образца (до 10^{-4} г), дешевизна и надежность приборов. Для количественно определения 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. В этом случае необходима

большая подготовительная работа и выполнение всех анализов в строго одинаковых условиях. 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.

ВЭЖХ. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии типичный пример распределительной хроматографии. Это один из наиболее применимых сейчас методов количественного определения как в субстанциях, так и в готовых формах. Его используют также для идентификации вещества и определения и идентификации примесей. Как и вся хроматография метод дает относительные результаты и для количественного определения требуется стандарт. Чувствительность метода достигает 10^{-6} г. На разделение смеси из 10–15 компонентов затрачивается 20–30 минут. В качестве детекторов используют УФ, флуориметрический, электрохимический, масс-спектрометрический детекторы. К недостаткам следует отнести дороговизну анализа, сложность перестройки прибора с одного вещества на другое, непригодность к проведению поточных анализов и т.д.

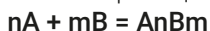
Термические методы анализа, которые включают термогравиметрию, дериватографию, дифференциальную сканирующую калориметрию используют чаще всего для анализа содержания влаги, изучения равновесного состояния жидкокристаллы, особенно когда важен показатель кристаллографии вещества. Для количественного анализа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

ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Гравиметрический (весовой) метод. Метод используют главным образом для неорганических соединений, редко для количественного определения некоторых алкалоидов в форме пикратов или кремневольфрамов и витаминов (например, тиамин бромид и рутина).

Титриметрические методы

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



где А — анализируемое вещество; В-титрант; n, m —стехиометрические коэффициенты.

По мере протекания реакции равновесные концентрации определяемого вещества и титранта уменьшаются, а равновесные концентрации продуктов реакции увеличиваются. Когда будет израсходовано количество титранта, эквивалентное количеству титруемого вещества, реакция закончится. Этот момент называется **точкой эквивалентности**. На практике фиксируют **точку конца титрования** (реакции), которая с какой-то степенью приближения соответствует точке эквивалентности. В титриметрических методах анализа ее фиксируют визуально по заметному **аналитическому эффекту** (изменению окраски раствора, выпадение осадка), вызываемому каким-либо из исходных соединений, продуктами реакции или специально добавленными в раствор веществами — **индикаторами**.

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

- ▶ реакция должна протекать количественно, то есть константа равновесия реакции должна быть достаточно высока;
- ▶ реакция должна протекать с большой скоростью;
- ▶ реакция не должна осложняться протеканием побочных процессов;
- ▶ должен существовать способ определения точки конца титрования.

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

ВЫБОР МЕТОДА

Общие требования к методам определения:

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

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

Выбор оптимального метода определения обуславливается прежде всего его возможностью оценивать лекарственное вещество по физиологически активной части молекулы. Связано это с уклоном всех методов анализа в сторону

приборного оснащения и все большей склонностью использовать физико-химические методы в количественном определении лекарственных веществ. Практически во всех готовых формах сейчас присутствует высокоэффективная жидкостная хроматография. Преимущество использования данного метода состоит в том, что он метод достоверно позволяет идентифицировать индивидуальное вещество, с другой стороны, данный метод подразумевает использование высокочувствительного оборудования и непригоден для поточного анализа. Достаточно достоверный поточный анализ возможен при использовании одного хроматографа для одного вида анализа, да и то при соблюдении целого ряда требований.