

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.
Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации
(Сеченовский Университет)

Институт Фармации им. А.П. Нелюбина
Кафедра фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева

Методические рекомендации по дисциплине:

Химико-технический контроль

основная профессиональная образовательная программа высшего
образования - программа бакалавриата

19.03.01 Биотехнология
Медицинская биотехнология

Материалы к занятию № 1

«Контроль качества, как подсистема управления качеством. Контроль качества и технологический контроль в правилах GMP. Организация работы контрольно-аналитических лабораторий на производстве»

Управление рисками – процесс принятия и выполнения управленческих решений, направленный на снижение вероятности возникновения неблагоприятного результата.

НАССР *Hazard Analysis and Critical Control Points* - концепция, предусматривающая систематическую идентификацию, оценку и управление опасными факторами, существенно влияющими на безопасность продукции.

Система ХАССП должна разрабатываться с учетом семи основных принципов:

- Проведение анализа опасных факторов (рисков) - путём процесса оценки значимости рисков и их уровня опасности на всех этапах жизненного цикла продукции.
- Определение критических контрольных точек.
- Задание критических пределов для каждой ККТ - определение критерия, который показывает, что процесс находится под контролем.
- Разработка системы мониторинга, позволяющей обеспечить контроль критических контрольных точек на основе планируемых мер или наблюдений.
- Определение корректирующих действий, которые следует предпринять в случае, когда результаты мониторинга указывают на отсутствие управления в конкретной критической контрольной точке.
- Разработка процедуры верификации, для подтверждения результативности работы системы ХАССП.
- Разработка документации в отношении всех процедур и записей, соответствующих принципам ХАССП и их применению.

GMP

– Good Manufacturing Practice – Надлежащая производственная практика –

Это свод минимальных требований к организации производства лекарственных средств, направленный на обеспечение качества продукции.

Правила GMP основаны на следующих принципах:

- Системный подход;
- Профилактическая направленность;
- Гибкость в способах исполнения требований;
- Обязанность производителя представить доказательства адекватности избранного им метода выполнения требований (валидация);

Цель правил GMP – по возможности избежать ошибок и отклонений в процессе производства лекарственных средств (а также на производственных этапах), способных отрицательно повлиять на качество готовых препаратов.

В случае допущенных ошибок соблюдение правил призвано содействовать их выявлению и устранению на возможно более ранних стадиях.

Меры по устранению и предотвращению ошибок:

- Организационные меры. Касаются общих вопросов управления предприятием, системы качества, кадров, документации, всех видов контроля качества и выпуска готовой продукции в оборот.
- Инженерные меры. Охватывают конкретные меры к зданиям, помещениям, оборудованию, приборам, вспомогательным системам и т.п.

Первый вариант появился в 1963 г в США.

В середине 60х годов в ряде стран возникли серьезные проблемы с качеством ЛС, например:

- В США – загрязнение пенициллином других препаратов;
- В Швеции и Дании – высокая бактериальная обсемененность неинъекционных препаратов;
- В Австралии – загрязнение инъекционных препаратов механическими загрязнениями;

История:

- 1970 – правила опубликованы в Химико-фармацевтическом журнале
- 1974 – Утвержден руководящий технический материал (сокращенный вариант правил) рекомендательный характер
- 1998 – утвержден ОСТ, учитывающий правила GMP, в 1999 г – введен в действие
- 2003 – указа о переходе с 2005 г на европейские правила GMP
- 2009 – выявлены случаи ошибочной маркировки препаратов листенон и милдронат.
- 2009 – утверждена Концепция развития ФАРМА 2020 с переходом всех предприятий на работу по GMP
- 2010 – Утвержден ФЗ 61 «Об обращении ЛС», по нему GMP обязателен с 01.01.2014

В рамках работы GMP на предприятии создаются структуры, отвечающие за менеджмент качества.

Эволюция менеджмента качества:

- Стандартизация – испытания продукции;
- Контроль качества и безопасности. Инспекционный контроль;
- Обеспечений качества – стандартизация производства и сертификация продукции;
- Всеобщее управление качеством – управление качеством и статистический контроль;
- Менеджмент качества – стратегический менеджмент, менеджмент риска, управление знанием и пониманием продукции и процессов.

Инструменты обеспечения качества:

- Сбор информации;
- Анализ информации;
- Анализ процесса;

- Идентификация проблемы;
- Мониторинг процесса;
- Решение проблем;
- Представление информации.
- Инструменты обеспечения качества:
- Балльная градация опасности отказов:

10 – крайне высокий уровень – серьезное влияние на качество (смерть / инвалидность)

9 – чрезвычайно опасный уровень;

8 – очень высокий уровень;

7 – высокий уровень – значительное влияние на качество;

6 – умеренный уровень;

5 – низкий уровень (отдельные рекламации);

4 – очень низкий уровень;

3 – умеренный уровень – незначительное влияние на качество;

2 – низкий уровень

1 – никакой уровень – без влияние на качество;

- Градация вероятности возникновения отказов
- Градация трудности обнаружения отказов

В рамках работы предприятия работает ОКК (отдел контроля качества) и его функциональный орган – лаборатория контроля качества.

Для осуществления на предприятии контроля качества необходимо наличие структуры, штата следующего документального обеспечения:

- Инструкции и СОП
- Должностные инструкции
- Соответствующий порядок документооборота
- Методическое обеспечение

Процессы, реализуемые в ОКК:

- Входной контроль
- Операционный (постадийный) контроль
- Контроль персонала
- Контроль окружающей среды
- Контроль качества готовой продукции
- Контроль корректирующих действий
- Контроль при рекламации
- Контроль выполнения процедур
- Контроль помещения
- Контроль оборудования

Контрольно-аналитическая лаборатория, структура:

Руководство лаборатории

Группа обеспечения качества

Научный персонал

Технический персонал

Архив

Задачи лаборатории:

- Входной контроль сырья и материалов
- Контроль продукции на промежуточных этапах производства (полупродуктов)
- Контроль качества готовой продукции непосредственно на этапе выпуска продукции на этапе обращения продукции
- Контроль микробной контаминации рук персонала, одежды персонала
- Испытание условий и эффективности стерилизации
- Разработка СОП, контроль за их выполнением
- Контроль основных и вспомогательных помещений производства
- Разработка и валидация методик анализа

Входной контроль

Под входным контролем подразумевается контроль качества сырья, материалов, полупродуктов, поступивших от поставщика.

Цель входного контроля – недопущение поступления в производства исходных компонентов, не соответствующих требованиям, установленным для них.

Входному контролю подлежат:

- Сырье – субстанции, лекарственные растения, полупродукты, поставляемые внешними поставщиками.
- Материалы – упаковочные материалы и вспомогательные вещества.

Упаковочные материалы первичной упаковки (соприкасаются с ЛС) – ампулы, флаконы, бутылки, банки, пробки, крышки, контурные упаковки.

Упаковочные материалы вторичной упаковки – коробки, полимерные пакеты, пленки, фольга и т.п.

Вспомогательные вещества – компоненты ЛС, придающие ему определенные свойства:

- Полупродукт – частично обработанное вещество, которое должно пройти дальнейшие стадии переработки, прежде чем оно станет веществом, готовым к производству ЛС

NB! Вспомогательные вещества во всех странах мира не подлежат регистрации, требования к ним описываются в национальных фармакопеях (в ГФ 13 пока что таких глав нет).

Процедура проведения входного контроля

Входной контроль качества может быть:

- Сплошным – проверка каждой упаковки сырья
- Выборочным – проверка части упаковок каждой серии

Для субстанций входной контроль должен быть сплошным!

Результаты входного контроля качества напрямую зависят от репрезентативности выборки при отборе проб.

Входной контроль предусматривает проведение двух самостоятельных процедур:

- Процедура отбора проб и их доставка в лабораторию ОКК;
- Процедура собственно испытаний в соответствии с требованиями спецификаций

В день поступления на предприятие сырья и материалов, подлежащих входному контролю качества, отдел материально-технического снабжения (склад сырья) письменно извещает группу входного контроля ОКК. Поступившее сырье и материалы при этом размещаются в зону карантина.

Сотрудник группы входного контроля, получив извещение, заносит его в журнал регистрации извещений, который хранится на складе, подшивает извещение в папку «Учет извещений», которая хранится в группе входного контроля ОКК, после чего приступает к процедуре внешнего осмотра: упаковка, маркировка, внешний вид, оформление сопроводительной документации. Результаты регистрируются в «Журнале входного контроля».

Контролер или сотрудник лаборатории осуществляет отбор проб в соответствии с СОП. Факт отбора проб фиксируется в карточке складского учета.

Отобранную пробу делят на две части. Пробы снабжают этикетками входного контроля, на которых указывают исчерпывающую информацию о пробе. Упаковки, из которых были отобраны пробы, маркируются этикеткой «проба отобрана».

Одну из частей пробы подвергают анализу, вторую опечатывают и оставляют на хранение. Пробы с образцами субстанций хранят в течение одного года после истечения срока годности, но не менее 3 лет. Вспомогательные вещества хранят 3 года.

Пробу, предназначенную для анализа, регистрируют в журнале лаборатории. По результатам анализа оформляется протокол.

При положительном результате анализа ОКК разрешает отделу материально-технического снабжения передачу сырья в производство, оформляя при этом «уведомление о разрешении использования сырья»

При отрицательном результате анализа ОКК формируется «уведомление о несоответствии требованиям» и об этом информируется отдел материально-технического снабжения. Сырье бракуется.

Материалы к занятию № 2

«Отбор проб исходных материалов, полупродукта и готового продукта. Работа с биологическими пробами. Математические методы расчета количества средней и точечных проб. Отбор проб в экологическом контроле производства»

ОФС.1.1.0004.15 Отбор проб

Данная общая фармакопейная статья устанавливает общие требования к отбору проб (выборок) произведенных (изготовленных) лекарственных средств, а также материалов для определения соответствия их качества требованиям нормативной документации.

Основные термины и определения:

- Выборка (проба) — одна или несколько выборочных единиц, отобранных в соответствии с установленной процедурой выборки из генеральной совокупности
- Выборочная единица — определенное количество лекарственных средств или материалов, образующее единство и взятое из одного места в одно время для формирования части выборки
- Генеральная совокупность
- Готовая продукция (готовый продукт, конечный продукт)
- Деление пробы — процесс отбора одной или нескольких проб из пробы нештучной нерасфасованной продукции таким способом, как нарезание, механическое деление или квартование
- Загрязнение (контаминация)
- Контроль качества;
- Образец (для испытаний) (выборка конечная (финальная) — определенное количество конкретного лекарственного средства или материала, используемое в качестве представителя этих объектов при испытании

- Образец репрезентативный — образец, полученный с использованием такой процедуры выборки, которая гарантирует, что разные части серии или разные свойства неоднородной продукции представлены пропорционально
- Объем выборки — число выборочных единиц в выборке
- Отбор проб — действия по изъятию (выборке) проб лекарственных средств и материалов для проведения их испытаний на соответствие требованиям НД или иных целей
- План отбора проб — план, который устанавливает количество выборочных единиц, необходимых для проведения испытаний и соответствующих этому критерию приемлемости
- Проба — определенное количество лекарственных средств и материалов, отобранных из контролируемой серии (партии)
- Процедура отбора проб — все операции по отбору проб, которые должны быть проведены с определенным лекарственным средством или материалом для реализации определенной цели.
- Серия (партия) — количество лекарственного средства или материалов одного наименования, произведенного в одном технологическом цикле или в течение определенного интервала времени в одних и тех же условиях и одновременно представленного на контроль. Качество серии (партии) должно быть удостоверено одним документом
- Точечная проба — количество нерасфасованной продукции или материалов, взятое единовременно за один прием, из одного места, из большего объема этих же объектов
- Упаковочная единица — упаковка, содержащая определенное количество готовой продукции.
- Фармацевтическая субстанция — лекарственное средство в виде одного или нескольких обладающих фармакологической активностью действующих веществ вне зависимости от природы происхождения, которое предназначено для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяет их эффективность.

Отбор проб (выборок) произведенных (изготовленных) лекарственных средств и материалов, используемых в процессе их производства (изготовления) или характеризующих стадии технологического процесса производства (изготовления), должен проводиться в соответствии с утвержденной процедурой отбора проб, если иное не указано в нормативной документации.

Процедура отбора проб должна соответствовать определенным целям отбора, виду испытаний и специфике отбираемых образцов.

При проведении процедуры отбора проб должны быть предусмотрены и учтены:

- план или схема отбора проб;
- объем и тип отбора проб;
- место и время отбора проб;
- извлечение и подготовка проб для испытаний;
- специальные меры предосторожности, особенно в отношении стерильных и опасных лекарственных средств или материалов;
- перечень используемого оборудования для отбора проб;
- требования по очистке и хранению оборудования для отбора проб и др.;
- тип, характеристика и маркировка тары для хранения проб;
- параметры окружающей среды при отборе и подготовке проб для испытаний.

При формировании плана отбора проб необходимо принимать во внимание конкретные цели отбора проб; физико-химические, биологические и другие свойства исследуемого объекта, его однородность, стабильность; количество отбираемого образца; риски и последствия, связанные с ошибочными решениями по выбору плана отбора.

Отбору проб подлежат:

- лекарственные препараты (серия);
- промежуточная продукция на критических стадиях процесса производства/изготовления;
- вспомогательные вещества;
- упаковочные и печатные материалы.

Правила отбора проб

- Пробы отбирают от партии/серии, состоящей из выборочных единиц.
- При отборе проб, характеризующих стадии технологического процесса производства (изготовления), партия/серия устанавливается внутренними документами предприятия-производителя (изготовителя) лекарственных средств.
- В процессе проведения отбора проб необходимо учитывать факторы, которые должны контролироваться с тем, чтобы обеспечить достоверность результатов испытаний.
- Методика отбора должна предусматривать предотвращение загрязнения лекарственных средств и материалов, из которых отбираются пробы, самих отбираемых проб, а также других лекарственных средств, материалов и окружающей среды.
- Методика отбора проб материалов при внутрипроизводственном процессе должна учитывать критические стадии процесса производства (изготовления) лекарственных средств и включать установленные контрольные точки отбора проб (емкости, места отбора и т.п.).
- Не допускается отбор проб одновременно от двух и более наименований лекарственных средств или материалов, двух и более серий (партий) готовой продукции во избежание ошибок при отборе проб. К отбору от следующей серии (партии) готовой продукции или материалов можно приступить только после выполнения всей процедуры отбора от предыдущей серии (партии).

- Перед отбором проб необходимо провести внешний осмотр каждой упаковочной единицы всей серии (партии) готовой продукции или материалов. При осмотре необходимо обратить внимание на соответствие упаковки и ее маркировки требованиям НД, определить количество готовой продукции и материалов, целостность и наличие пломб на упаковке, правильность оформления сопроводительной документации и соответствия в ней данных серии (партии) готовой продукции или материалов, предназначенной для отбора проб.
- Пробы отбирают только из неповрежденных, укупоренных и упакованных согласно НД упаковочных единиц. Готовая продукция и материалы в поврежденной упаковке, не соответствующей требованиям НД, должна быть отклонена.

Методы отбора проб

Пробы могут быть отобраны методом случайного отбора от установленного количества выборочных единиц при выборочном контроле; от каждой выборочной единицы при сплошном контроле или другим методом в соответствии с разработанным статистически обоснованным планом отбора.

Случайный отбор проб

Для осуществления случайного отбора проб необходимо последовательно пронумеровать каждую выборочную единицу, затем, воспользовавшись таблицей случайных чисел (или сгенерированными компьютером случайными числами), установить, из каких случайных выборочных единиц производить отбор необходимого количества проб.

Многоступенчатый отбор проб.

При отсутствии указаний в фармакопейных статьях при отборе образцов (проб, выборок) лекарственных средств для проведения их испытаний на соответствие требованиям нормативной документации проводят многоступенчатый отбор проб, считая при этом, что серия (партия) лекарственного средства

является однородной продукцией. Аналогичным образом осуществляется отбор материалов.

При многоступенчатом отборе пробу образуют по ступеням и готовую продукцию или материалы в каждой ступени отбирают случайным образом в пропорциональных количествах из упаковочных единиц, отобранных в предыдущей ступени. Число ступеней определяется видом упаковки.

Если продукция в потребительской (вторичной) упаковке помещена в групповую упаковку, а затем и в транспортную тару, то возможен трехступенчатый отбор проб.

I ступень: отбор единиц транспортной тары (ящиков, коробок, мешков и др.).

II ступень: отбор упаковочных единиц групповой упаковки (коробок, пакетов, рулонов и др.)

III ступень: отбор продукции в потребительской (вторичной) упаковке (флаконов, туб, контурных упаковок и др.).

Для расчета количества отбираемых упаковочных единиц (N) на каждой ступени используют формулу для однородной продукции:

$$N = 0,4 * \sqrt{n} \quad (1)$$

где n — общее количество упаковочных единиц данной ступени одной серии (партии).

Полученное в результате подсчета по формуле (1) дробное число округляют в сторону увеличения до целого числа, оно должно быть не менее 3 и не более 30.

В случае недостаточного количества упаковочных единиц для проведения испытания повторно отбирают упаковочные единицы, как указано выше.

Из отобранных на последней ступени упаковочных единиц после контроля по внешнему виду берут пробу (выборку) для исследования лекарственного средства на соответствие требованиям нормативной документации в количестве, необходимом для реализации определенной цели (с учетом

испытания на микробиологическую чистоту, стерильность, испытания парентеральных и офтальмологических растворов на механические включения и т.п.).

Если подлинность однородной продукции достоверна, то для расчета количества отбираемых упаковочных единиц следует использовать формулу:

$$N=1 + \sqrt{n} \quad (2)$$

Полученное в результате подсчета по формуле (2) дробное число округляют в сторону увеличения или уменьшения до целого числа путем простого округления. Если упаковочных единиц 4 и менее, то отбираются все единицы.

Если продукция неоднородная и/или получена из неизвестного источника, для расчета количества отбираемых упаковочных единиц можно использовать формулу:

$$N=1,5 \sqrt{n} \quad (3)$$

Полученное в результате подсчета по формуле (3) дробное число округляют в сторону увеличения до целого числа.

Требования к отбору проб из нерасфасованных лекарственных средств и материалов

Проба из нерасфасованных лекарственных средств или материалов должна представлять собой объединенные точечные пробы, взятые примерно в равных количествах, смешанные и, при необходимости, уменьшенные до массы (объема) образца, необходимой для испытания лекарственного средства или материалов на соответствие требованиям нормативной документации для реализации определенной цели.

Для отбора проб применяют специальные пробоотборники. Используемые пробоотборники должны быть чистыми и сухими, в случае использования пробы для определения микробиологической чистоты — стерильными.

Отбор точечных проб проводят подходящим пробоотборником с разных уровней: верхнего, среднего и нижнего

слоев каждой отобранной упаковочной единицы. Для отбора проб жидкостей их сначала тщательно перемешивают; в случае, если перемешивание затруднено (большие емкости), точечные пробы отбирают без перемешивания из разных слоев.



В случае отбора проб продукции для проверки ее однородности точечные пробы сыпучей, вязкой, гетерогенной и другой установленной продукции исследуют по отдельности и при внешнем осмотре убеждаются в однородности отобранных точечных проб.

Если точечные пробы однородны, то их объединяют, тщательно перемешивая, на чистой сухой поверхности или в подходящей емкости для получения объединенной пробы.

При необходимости для деления (уменьшения) объединенной пробы применяют обоснованные ручные или автоматизированные методы.

Требования к отбору проб лекарственных препаратов в потребительской упаковке

Лекарственные препараты одной серии одного производителя, полученные от одного поставщика, можно считать однородными.

Выборка лекарственных препаратов должна состоять из ненарушенных упаковочных единиц.

Объем выборки лекарственных препаратов определяется целью отбора, требованиями метода испытания, видом лекарственной формы и другими факторами.

Отбор выборок лекарственных препаратов осуществляется в соответствии с требованиями ОФС на конкретные лекарственные формы, на методы испытаний или в соответствии с требованиями фармакопейных статей.

Упаковка, маркировка, хранение отобранных образцов

Отобранные образцы (конечная, финальная выборка) лекарственных средств и материалов помещают в подготовленную тару и/или упаковывают, при необходимости пломбируют или печатают на месте отбора.

Упаковка должна обеспечивать пригодность пробы для проведения последующих испытаний и не изменять исследуемые показатели качества при транспортировании и хранении.

Отбор проб нерасфасованной продукции или материалов должен осуществляться в стерильную тару.

Пробы, прошедшие отбор, должны соответствующим образом идентифицироваться с использованием единой маркировки и оформляться актом отбора или другим документом, включающим дату, время и место отбора, условия окружающей среды при отборе, фамилию, имя и отчество лица, проводившего отбор, и другую необходимую информацию.

До и после проведения испытаний пробы должны храниться в отдельном помещении в соответствии с требованиями нормативной документации на лекарственные средства или материалы. Условия в помещении должны обеспечивать сохранность проб в течение срока хранения.

Упаковочные единицы, из которых были отобраны пробы, должны быть аккуратно вскрыты и закрыты; на них должна быть нанесена маркировка, показывающая, что из этой упаковки (тары) были взяты пробы, и уточнено оставшееся количество анализируемого объекта.

Если для отбора пробы был сделан прокол упаковки, то после отбора необходимо запечатать место прокола и промаркировать.

Работа с биологическими пробами

При работе с биопробами необходимо соблюдать меры, предупреждающие заражение людей, контаминирование объектов внешней среды, возможность переноса анализа от одной пробы к другой.

При работе с биологическими пробами следует:

- использовать средства индивидуальной защиты
халат
перчатки
очки
- рекомендуется применять одноразовые дозирующие устройства или одноразовые сменные элементы данных устройств (наконечники)
- рекомендуется применять одноразовые контейнеры для каждой пробы
- утилизация проб должна проводиться уполномоченными организациями

Отбор проб в экологическом контроле производства

В экологическом контроле производства производится отбор проб:

- Воздуха (с помощью аспираторов и фильтров)
- Воды (сточной)
- Исследуются смывы с контрольных поверхностей



Состав сточных вод сильно колеблется и зависит от технологического процесса производств, поэтому различают:

- Средние пробы (постоянный состав)
- Среднепропорциональные пробы (переменный состав)

Различают:

Простую пробу – характеризует состав воды в данный момент времени в данном месте

Смешанную пробу – характеризует средний состав воды за определенный промежуток времени в определенном объеме

Пробы могут быть подвергнуты анализу сразу или законсервированы. Для ряда определяемых параметров консервация не допустима (рН, кислород растворенный, сульфаты, фториды и т.д.)

Материалы к занятию № 4
«Физические и физико-химические методы контроля в производстве биотехнологических лекарственных средств»

Физические и физико-химические методы применяют для:

1. Качественного анализа
 - Подтверждение подлинности
 - Идентификация примесей
2. Количественного анализа
 - Действующего вещества
 - Примесей

Методы физического и физико-химического анализа (согласно ГФ):

1. Спектроскопические методы анализа
2. Хроматографические методы анализа
3. Прочие методы анализа

1. Спектроскопические методы анализа:

- 1.1. Спектрометрия в ближней инфракрасной области (ОФС.1.2.1.1.0001.15)
- 1.2. Спектрометрия в инфракрасной области (ОФС.1.2.1.1.0002.15)
- 1.3. Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях (ОФС.1.2.1.1. 0003.15)
- 1.4. Атомно-эмиссионная спектрометрия (ОФС.1.2.1.1. 0004.15)
- 1.6. Флуориметрия (ОФС.1.2.1.1. 0006.15)
- 1.7. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ОФС.1.2.1.1. 0007.15)
- 1.8. Масс-спектрометрия (ОФС.1.2.1.1. 0008.15)
- 1.9. Рамановская спектрометрия (ОФС.1.2.1.1.0009.15)
- 1.10. Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия (ОФС.1.2.1.1.0010.15)
- 1.11. Рентгеновская порошковая дифрактометрия (ОФС.1.2.1.1.0011.15)

2. Хроматографические методы анализа

- 2.1. Хроматография (ОФС.1.2.1.2.0001.15)
- 2.2. Хроматография на бумаге (ОФС.1.2.1.2.0002.15)
- 2.3. Тонкослойная хроматография (ОФС.1.2.1.2.0003.15)
- 2.4. Газовая хроматография (ОФС.1.2.1.2.0004.15)
- 2.5. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФС.1.2.1.2.0005.15)
- 2.6. Сверхкритическая флюидная хроматография (ОФС.1.2.1.2.0006.15)

Осмолярность (ОФС.1.2.1.0003.15)

Ионометрия (ОФС.1.2.1. 0004.15)

Растворимость (ОФС.1.2.1.0005.15)

Электрофорез (ОФС.1.2.1. 0021.15)

Капиллярный электрофорез (ОФС.1.2.1. 0022.15)

Электрофорез в полиакриламидном геле (ОФС.1.2.1.0023.15) и др. (см ГФ 14)

Основные методы физического и физико-химического анализа биотехнологических препаратов – хроматография и электрофорез

Капиллярный электрофорез ОФС.1.2.1.0022.15

Капиллярный электрофорез это физический метод анализа, основанный на миграции внутри капилляра заряженных частиц в растворе электролита под влиянием приложенного электрического поля.

Скорость миграции частиц определяется их электрофоретической подвижностью и электроосмотической подвижностью буферного раствора. Электрофоретическая подвижность вещества зависит от его характеристик (электрического заряда, размеров и формы) и от характеристик буферной среды, в которой происходит разделение (типа и ионной силы электролита, рН, вязкости и добавок).

Когда к капилляру, заполненному буферным раствором, приложено электрическое поле, внутри капилляра образуется поток растворителя, называемый электроосмотическим потоком. Скорость и направление электроосмотического потока зависят от электроосмотической подвижности, определяемой знаком и плотностью заряда на внутренней стенке капилляра, а также характеристиками буфера.

Электрофоретическая и электроосмотическая подвижность ионов могут быть направлены в одну и ту же или в противоположные стороны в зависимости от заряда частиц.

Если электроосмотическая скорость выше электрофоретической, можно одновременно разделить как положительно, так и отрицательно заряженные ионы.

Как правило, капилляры из плавленного кварца без покрытия при рН выше 3 несут на внутренней поверхности отрицательный заряд из-за диссоциации силанольных групп. При этом электроосмотический поток направлен от анода к катоду. В некоторых случаях необходимо уменьшить или изменить направление электроосмотического потока. Для этого различным образом модифицируют внутреннюю стенку капилляра или изменяют рН буферного раствора.

После введения образца в капилляр каждый анализируемый ион движется внутри фонового электролита в виде отдельной зоны в соответствии со своей электрофоретической подвижностью. Степень размывания каждой зоны растворенного соединения определяется совокупностью различных причин. В идеальном случае единственной причиной размывания зон является продольная молекулярная диффузия растворенного вещества вдоль капилляра.

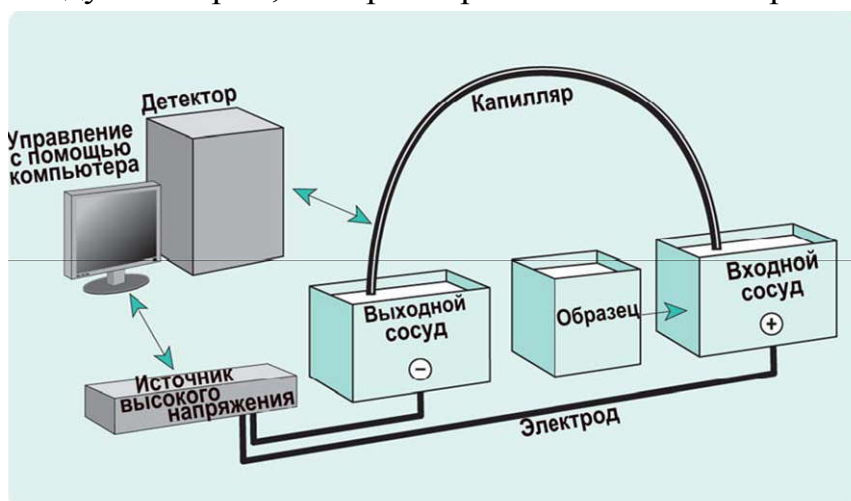
На практике на размывание полос значительное влияние оказывают тепловое рассеяние, адсорбция образца на стенке капилляра, различная проводимость между образцом и буфером, длительность ввода пробы, размеры детектирующей ячейки и различия уровней жидкости в емкостях с буферными растворами.

Оборудование

Система для капиллярного электрофореза состоит из высоковольтного источника напряжения; двух флаконов с буферными растворами и погруженными в них электродами; капилляра, заполненного соответствующим раствором и погруженного обоими концами во флаконы с буферными растворами; системы ввода образца; детектора, способного в режиме реального времени регистрировать вещества, проходящие мимо оптического окна капилляра; системы термостатирования; регистрирующего прибора или подключенного компьютера.

Для введения пробы могут использоваться три способа: гидростатический за счет разного уровня буферных растворов, гидродинамический - с помощью прилагаемого давления или вакуума и электрокинетический - благодаря прилагаемому напряжению.

Детектирование осуществляется с помощью абсорбционной спектрофотометрии в ультрафиолетовой и видимой областях, флуориметрии, кондуктометрии, амперометрии или масс-спектрометрии.



Обработка результатов

Качественный анализ. К качественным результатам относится определение идентичности компонента пробы внутреннему или внешнему стандартному веществу по времени появления соответствующего пика.

Полуколичественный анализ. Полуколичественным результатом считается определение концентрации компонента пробы по площади или высоте пика при соотношении сигнал/фон от 2:1 до 3:1.

Отношение сигнал/шум (S/N) рассчитывают по формуле:

$$S/N = \frac{2H}{h},$$

где: H высота пика целевого компонента на электрофореграмме раствора сравнения, измеренная от максимума пика до базовой линии сигнала;
h уровень шума на электрофореграмме, полученной после ввода холостой пробы.

Количественный анализ. Количественным результатом является определение концентрации искомого компонента пробы по площади пика при соотношении сигнал/шум больше, чем 3:1.

При количественном анализе образца для компенсации различий во временах миграции от анализа к анализу и для устранения различий в сигналах компонентов образца, обладающих различными временами миграции, площади пиков должны быть нормированы на соответствующие времена миграции.

Абсолютное содержание компонентов рассчитывают по отношению площадей анализируемого пика и пика стандарта. Процентное содержание одного или более компонентов анализируемого образца рассчитывают путем определения процентной доли скорректированных площадей пиков от общей площади всех пиков, за исключением пиков, вызванных растворителями или другими добавленными реактивами (процедура нормализации).

Ролики, демонстрирующие работу систем капиллярного электрофореза:
<https://www.youtube.com/watch?v=wStV1rFjHOo>

Электрофорез в полиакриламидном геле ОФС.1.2.1.0023.15

Разделение в полиакриламидном геле происходит за счёт различий заряда разделяемых молекул и отличий молекулярных масс, а также в зависимости от конфигурации молекул.

Изменяя концентрацию полимера, можно получать гели с широким диапазоном размеров пор, позволяющих проводить разделение белков и пептидов с молекулярными массами от 2 до 300 тыс. кДа. Можно также изменять электрический заряд макромолекул (путем вариации рН буферного раствора) и их конформацию за счет введения в буферный раствор денатурирующих агентов или детергентов.

Протекание через жидкость электрического тока неизбежно связано с выделением тепла, поэтому следует обеспечивать теплоотвод и стабильность температурного режима с целью исключения изменений вязкости, проводимости и скорости потока и, следовательно, искажения зон анализируемых компонентов.

Для наблюдения за процессом в исходный препарат добавляют краситель, молекулы которого несут электрический заряд того же знака, что и фракционируемые молекулы, но не взаимодействуют с ними, причем скорость миграции наиболее подвижных макромолекул пробы должна быть несколько ниже, чем у молекул красителя. Когда фронт красителя достигает противоположной границы геля, электрофорез прекращают.

Разделившиеся зоны биополимеров во избежание их диффузии немедленно фиксируют. Для этого гель извлекают из стеклянной формы и выдерживают в смеси кислоты со спиртом так, что белки или нуклеиновые кислоты фиксируются в том самом месте, где закончилась их миграция.

После фиксации или одновременно с ней проводят окрашивание зон путем выдерживания геля в растворе красителя, прочно связывающегося с белком или нуклеиновой кислотой. Излишек красителя удаляют.

Вместо окрашивания или наряду с ним могут использоваться радиоактивные метки и приемы регистрации полос на фотопленке посредством автордиографии или флюорографии и различные способы счета радиоактивности в геле с помощью жидкостных сцинтилляционных счетчиков.

Оборудование

Прибор для электрофореза состоит из:

- 1) источника постоянного тока с регулируемым напряжением и со стабилизатором напряжения;
- 2) камеры для электрофореза, служащей для размещения пластинки или трубки геля и поддержания постоянных условий проведения анализа. Камера обычно имеет прямоугольную форму, с двумя изолированными буферными резервуарами (анодным и катодным), содержащими раствор электролита. В каждый резервуар погружен электрод (например, платиновый),

подключенный к соответствующему полюсу источника тока. Должен поддерживаться одинаковый уровень электролитов в резервуарах, чтобы предотвратить поток жидкости и гидростатическое давление на гель.

3) устройства для заливки геля, представляющего собой стеклянную трубку, стеклянную пластину или пару прямоугольных пластин (ячейку), служащих для формирования поддерживающей среды, в которой непосредственно проводится процесс электрофоретического разделения.

Процесс

Заполняют нижний и верхний резервуары камеры предписанным электродным буферным раствором. Готовят испытуемый и стандартный растворы, содержащие краситель и сахарозу или другой плотный и вязкий растворитель. Наносят образцы шприцем или микропипеткой в основания лунок, сразу включают электрический ток и начинают электрофорез, соблюдая предписанные условия (температуру и величину напряжения).

После окончания процесса (когда краситель достигает нижней границы пластины) ток выключают, пластину удаляют из камеры, зоны фиксируют, окрашивают и при необходимости пластину высушивают.

Высокоэффективная жидкостная хроматография *ОФС.1.2.1.2.0005.15*

Высокоэффективная жидкостная хроматография (жидкостная хроматография высокого давления) - это метод колоночной хроматографии, в котором подвижной фазой (ПФ) служит жидкость, движущаяся через хроматографическую колонку, заполненную неподвижной фазой (сорбентом). Колонки для высокоэффективной жидкостной хроматографии характеризуются высоким гидравлическим сопротивлением на входе.

В зависимости от механизма разделения веществ различают следующие варианты высокоэффективной жидкостной хроматографии: адсорбционную, распределительную, ионообменную, эксклюзионную, хиральную и др.

В адсорбционной хроматографии разделение веществ происходит за счет их различной способности адсорбироваться и десорбироваться с поверхности сорбента с развитой поверхностью, например, силикагеля.

В распределительной высокоэффективной жидкостной хроматографии разделение происходит за счет различия коэффициентов распределения разделяемых веществ между неподвижной (как правило, химически привитой к поверхности неподвижного носителя) и подвижной фазами.

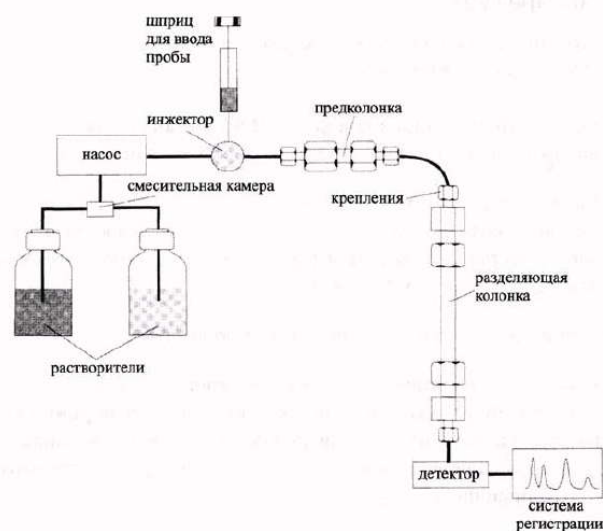
В зависимости от типа подвижной и неподвижной фазы различают нормально-фазовую и обращенно-фазовую хроматографию. В нормально-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии неподвижная фаза - полярная (чаще всего силикагель или силикагель с привитыми NH₂- или CN-группами и др.), а подвижная фаза - 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.

Оборудование

1. Емкость для ПФ
2. Насос
3. Инжектор
4. Колонка
5. Термостат колонок
6. Детектор
7. Регистрирующее устройство



Характеристики сорбента

Из кинетической теории хроматографии известно, что высота, эквивалентная теоретической тарелке, зависит от коэффициента сопротивления массопереноса, который пропорционален квадрату размера частиц носителя.

- более 10 мкм – классическая жидкостная хроматография;
- 3-10 мкм – ВЭЖХ (HPLC);
- менее 3 мкм – СВЭЖХ (UPLC);



В качестве сорбентов обычно применяются:

- силикагель, оксид алюминия, используются в нормально-фазовой хроматографии;
- 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.

Сорбенты с привитыми фазами могут иметь различную степень химической модификации. В качестве привитых фаз наиболее часто применяются:

- октадецильные группы (сорбент октадецилсилан (ODS) или C18);
- октильные группы (сорбент октилсилан или C8);
- фенильные группы (сорбент фенилсилан);
- цианопропильные группы (сорбент CN);
- аминопропильные группы (сорбент NH₂);
- диольные группы (сорбент диол).

Наиболее часто анализ выполняют на неполярных привитых фазах в обращенно-фазовом режиме с применением сорбента C 18

Детекторы

- Спектрофотометрический детектор
 - в УФ области;
 - в УФ и видимой области;

- Флуоресцентный детектор
- Рефрактометрический детектор
- Масс - селективный детектор
- Амперометрический детектор
- Кондуктометрический детектор

УФ / УФ + видимый спектр детекторы

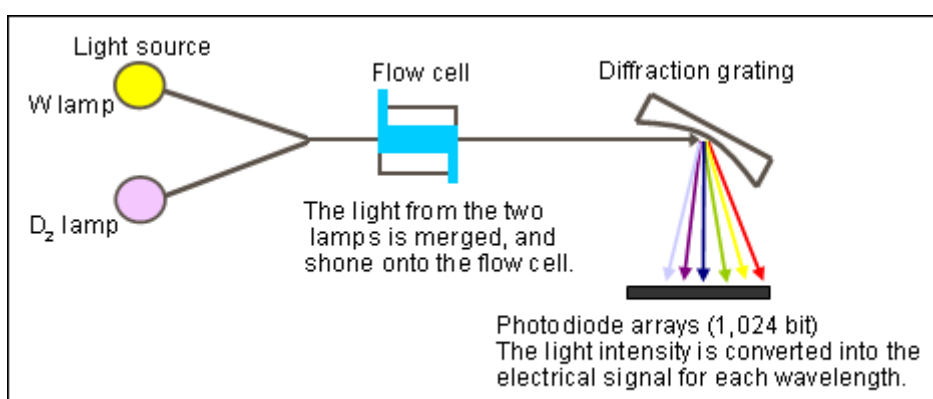
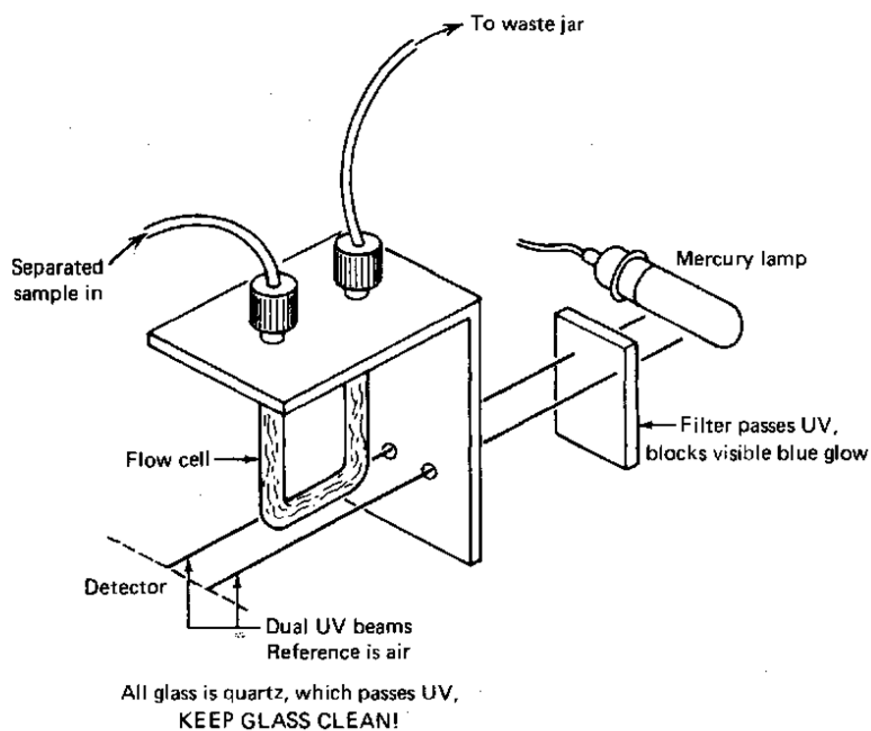


Figure2. Diagrammatic illustration of a DAD optical system

ФЛД детекторы

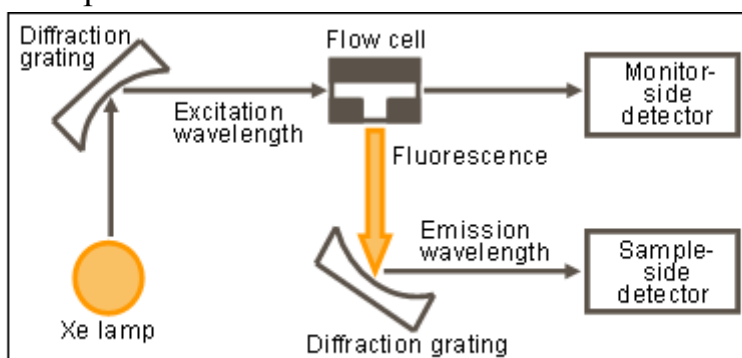
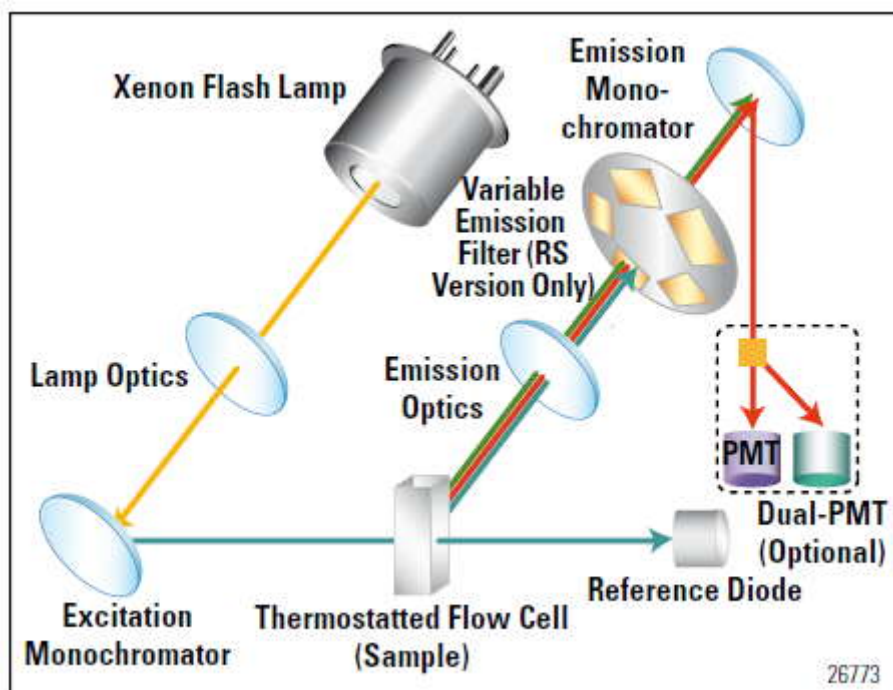


Figure 1. Diagrammatic illustration of a FL detector optical system (a patent of HITACHI)



Подвижная фаза

Подвижная фаза – жидкость

НФ должна быть близка по полярности к полярности разделяемых компонентов;

ПФ должна быть менее близка к полярности компонентов и НФ.

Чем больше различие в полярности ПФ и НФ тем лучше разделяются компоненты пробы.

Растворитель	Индекс полярности P'	Элюирующая сила $\varepsilon^0(\text{SiO}_2)$	Граница прозрачности в УФ-области, нм
Фторированные алканы	< -2	-0,2	200
Циклогексан	0,04	0,03	200
Н-гексан	0,1	0,01	195
Тетрахлорид углерода	1,6	0,11	265
Диизопропиловый эфир	2,4	0,22	220
Толуол	2,4	0,22	285
Диэтиловый эфир	2,8	0,38	215
Метиленхлорид	3,1	0,34	230
Тетрагидрофуран	4,0	0,35	210
Хлороформ	4,1	0,26	235
Этанол	4,3	0,68	205
Этилацетат	4,4	0,38	255
Диоксан	4,8	0,49	215
Метанол	5,1	0,73	205
Ацетонитрил	5,8	0,50	190
Нитрометан	6,0	0,49	380
Вода	10,2	большая	170

Ролик, демонстрирующий работу ВЭЖХ

<https://www.youtube.com/watch?v=IUwRWn9pEdg>

Материалы к занятию № 3

«Химические методы контроля в производстве биотехнологических лекарственных средств»

Химические методы применяют для:

1. Качественного анализа
 - Реакции подлинности
 - Реакции идентификации примесей
2. Количественного анализа
 - Действующего вещества
 - Примесей

Качественный анализ:

1. Реакции подлинности
 - Общие реакции подлинности приведены в **ОФС 1.2.2.0001.15** (алюминий, амины ароматические первичные, аммоний, ацетаты, бензоаты, бромиды, висмут, железо (II) и железо (III), йодиды, калий, кальций, карбонаты, магний, мышьяк (арсениты, арсенаты), натрий, нитраты, нитриты, ртуть (II), салицилаты, сульфаты, сульфиты, тартраты, фосфаты, хлориды, цинк, цитраты).
 - Частные реакции подлинности приведены в частных фармакопейных статьях, включенных в ГФ или в фармакопейных статьях предприятий (ФСП).

Некоторые общие реакции подлинности

- алюминий – по взаимодействию с тиоцетамидом в кислой среде (образование геля при подщелачивании)
- амины ароматические первичные – по взаимодействию с натрием нитритом в кислой среде, с последующим взаимодействием с щелочным раствором β -нафтола с образованием окрашенного осадка (азокраситель)
- аммоний – по взаимодействию с раствором щелочи (запах аммиака и посинение влажной красной лакмусовой бумаги)
- ацетаты: А. образование этилацетата в присутствии серной кислоты концентрированной (характерный запах). Б. взаимодействие с железом (III) хлоридом с образованием красно-бурого окрашивания, исчезающего при прибавлении разбавленных минеральных кислот.
- бензоаты – по взаимодействию с железом (III) хлоридом с образованием розовато-желтого осадка, растворимого в эфире.

- бромиды. А. взаимодействие с хлорамином в присутствии хлористоводородной кислоты с экстракцией образующегося брома в хлороформный слой (желто-бурое окрашивание). Б. взаимодействие с серебром нитратом с образованием желтоватого творожистого осадка, нерастворимого в азотной кислоте разведенной и трудно растворимого в растворе аммиака.
- железо (II) – по взаимодействию с калия феррицианидом в присутствии хлористоводородной кислоты (образование синего осадка)

2. Реакции идентификации примесей

Реакции идентификации примесей приведены в ГФ:

- ОФС 1.2.2.2.0002.15 – аммоний
- ОФС 1.2.2.2.0003.15 – кальций
- ОФС 1.2.2.2.0004.15 – мышьяк
- ОФС 1.2.2.2.0005.15 – ртуть
- ОФС 1.2.2.2.0006.15 – селен
- ОФС 1.2.2.2.0007.15 – сульфаты
- ОФС 1.2.2.2.0008.15 – фосфаты
- ОФС 1.2.2.2.0009.15 – хлориды
- ОФС 1.2.2.2.0010.15 – цинк
- ОФС 1.2.2.2.0011.15 – железо
- ОФС 1.2.2.2.0012.15 – тяжелые металлы
- ОФС 1.2.2.2.0013.15 – зола общая
- ОФС 1.2.2.2.0014.15 – сульфатная зола
- Частные реакции на **специфические примеси** приведены в частных фармакопейных статьях, включенных в ГФ или в фармакопейных статьях предприятий (ФСП).

ОФС 1.2.2.2.0012.15 – тяжелые металлы

Методы определения содержания примесей тяжелых металлов (**свинец, ртуть, висмут, сурьма, олово, кадмий, серебро, медь, молибден, ванадий, рутений, платина, палладий**) в лекарственных средствах основаны на образовании окрашенных сульфидов. Кроме указанных элементов окрашенные сульфиды образуют железо в количестве более 0,05 % и мышьяк.

В качестве источника сульфидов используют раствор натрия сульфида (метод 1) или тиоацетамидный реактив (метод 2).

После проведения реакции интенсивность окраски испытуемого раствора сравнивают с окраской эталонного раствора. Окраска, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать окраску эталонного раствора.

Определение считается достоверным, если в эталонном растворе наблюдается слабое коричневое окрашивание по сравнению с контрольным раствором.

Определение тяжелых металлов в растворах лекарственных средств возможно для субстанций, образующих прозрачные, бесцветные растворы и не влияющих на взаимодействие ионов металлов с сульфид-ионом вследствие наличия комплексообразующих свойств. В остальных случаях определение проводят из сульфатной золы или после другого способа минерализации испытуемого лекарственного средства.

Предельно допустимое содержание тяжелых металлов, метод испытания и условия подготовки испытуемого образца должны быть указаны в фармакопейной статье.

Определение тяжелых металлов в растворах лекарственных средств

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

Эталонный раствор. К 2 мл стандартного раствора свинец-иона (5 мкг/мл) прибавляют 8 мл воды.

Контрольный раствор. 10 мл воды.

Примечание. Если при приготовлении испытуемого раствора используется органический растворитель, то эталонный, контрольный и стандартный раствор свинец-иона готовят с использованием того же растворителя.

Метод 1. К полученным растворам прибавляют по 1 мл уксусной кислоты разведенной 30 %, 2 капли 2 % раствора натрия сульфида, перемешивают и через 1 мин сравнивают окраску растворов. В сравниваемых растворах допустима слабая опалесценция от выделившейся серы.

Метод 2. К полученным растворам прибавляют по 2 мл ацетатного буферного раствора рН 3,5, перемешивают, прибавляют по 1 мл тиоацетамидного реактива, перемешивают и через 2 мин сравнивают окраску растворов.

Определение тяжелых металлов в зольном остатке органических лекарственных средств

Испытуемый раствор. Зольный остаток, полученный после сжигания 1,0 г (если не указано иначе в фармакопейной статье) испытуемого образца в присутствии серной кислоты концентрированной, обрабатывают при нагревании на сетке 2 мл насыщенного раствора аммония ацетата,

нейтрализованного раствором натрия гидроксида, прибавляют 3 мл воды и фильтруют в пробирку через беззольный фильтр, предварительно промытый 1 % раствором уксусной кислоты, а затем горячей водой. Тигель и фильтр промывают 5 мл воды, пропуская её через тот же фильтр в ту же пробирку.

Эталонный раствор 1. В тигель помещают серную кислоту концентрированную в количестве, взятом для сжигания испытуемого образца, и далее поступают как с испытуемым образцом, но промывание тигля и фильтра производят лишь 3 мл воды, после чего к фильтрату прибавляют 2 мл стандартного раствора свинец-иона (5 мкг/мл).

Эталонный раствор 2. В тигель помещают серную кислоту концентрированную в количестве, взятом для сжигания испытуемого образца, и далее поступают как с испытуемым образцом, но промывание тигля и фильтра производят лишь 3 мл воды, после чего к фильтрату прибавляют 2 мл стандартного раствора свинец-иона (10 мкг/мл).

Контрольный раствор. Готовят так же, как и испытуемый раствор, но без испытуемого образца. Далее определение проводят любым из описанных выше методов определения тяжелых металлов в растворах лекарственных средств.

Стандартные растворы свинец-иона

Стандартный раствор 100 мкг/мл свинец-иона. 0,0799 г свинца нитрата помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл и растворяют в 50 мл воды с добавлением 0,5 мл азотной кислоты концентрированной, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Стандартный раствор 10 мкг/мл свинец-иона. 10,0 мл стандартного раствора свинец-иона (100 мкг/мл свинец-иона) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Срок хранения 1 сут.

Стандартный раствор 5 мкг/мл свинец-иона. 5,0 мл стандартного раствора свинец-иона (100 мкг/мл свинец-иона) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Срок хранения 1 сут.

Приведенные выше методы не являются селективными и могут быть использованы только для определения предельного суммарного содержания перечисленных тяжелых металлов в лекарственных средствах.

Для количественного определения отдельных ионов следует использовать следующие методы:

- атомно-абсорбционную спектрометрию;

- атомно-эмиссионную спектрометрию с индуктивно связанной плазмой;
- масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой.

Методики количественного определения тяжелых металлов в лекарственных средствах должны быть валидированы и описаны в фармакопейной статье.

Количественный анализ:

- Количественный анализ примесей – используются методики для качественного анализа примесей, но в сравнении со стандартными растворами.
- Количественный анализ действующего вещества
 - Приведен в частной фармакопейной статье на ЛВ или в ФСП
 - Приведен в ГФ в разделе **1.2.3. Методы количественного определения**, например:

ОФС.1.2.3.0010.15 Метод сжигания в колбе с кислородом

ОФС.1.2.3.0011.15 Определение азота в органических соединениях методом Кьельдаля

ОФС.1.2.3.0012.15 Определение белка

ОФС.1.2.3.0013.15 Нитритометрия

ОФС.1.2.3.0014.15 Кислотно-основное титрование в неводных средах

ОФС.1.2.3.0012.15 Определение белка

Определение содержания белка проводят в лекарственных средствах, выделенных из природных источников или полученных биотехнологическими методами.

Для таких лекарственных средств могут использоваться модифицированные методики определения белка, указанные в фармакопейных статьях, в которых могут быть изменены рекомендуемые области концентраций белка и/или объемы испытуемого раствора и реактивов и некоторые другие условия в соответствии с индивидуальными свойствами определяемого компонента.

Колориметрические и некоторые спектрофотометрические методы требуют использования стандартного образца. В качестве стандартного образца белка используют: стандартный образец присутствующего в препарате белка, или бычий сывороточный альбумин, или сывороточный альбумин человека, высушенные перед испытанием до постоянной массы (стандартный образец и условия высушивания указывают в фармакопейной статье).

Для количественного определения белка используют спектрофотометрические, колориметрические и спектрофлуориметрические методы.

Метод 1 (Спектрофотометрический)

Метод основан на способности ароматических аминокислот (тирозина, триптофана и, в меньшей степени, фенилаланина), входящих в последовательность молекулы белка, поглощать ультрафиолетовый свет при длине волны около 280 нм.

Для растворения молекул белка используют различные растворители: воду, натрия хлорид раствор 0,9 %, различные буферные растворы и др.

При низких концентрациях белок адсорбируется на стенках кюветы, что может приводить к заниженным результатам содержания белка в растворе. В этом случае испытуемый раствор препарата предварительно концентрируют или используют при приготовлении испытуемого раствора неионные детергенты.

Испытуемый раствор. Готовят раствор испытуемого вещества в буферном растворе, указанном в фармакопейной статье, с концентрацией белка от 0,2 мг/мл до 2,0 мг/мл.

Стандартный раствор. Готовят раствор соответствующего стандартного образца в том же буферном растворе и с той же концентрацией белка, что и в испытуемом растворе.

Методика. Испытуемый раствор, стандартный раствор и раствор сравнения выдерживают при одинаковой температуре. Определяют оптические плотности испытуемого и стандартного растворов в кварцевых кюветах при длине волны 280 нм, используя тот же буферный раствор в качестве раствора сравнения.

Для высокоочищенных белков концентрацию белка в растворе вычисляют с использованием удельного показателя поглощения.

Метод 2 (Метод Лоури, колориметрический)

Метод основан на реакции белков с солями меди (II) в щелочном растворе и восстановлении фосфорномолибдено-вольфрамового реактива (реактив Фолина) с образованием окрашенных продуктов, интенсивность окраски которых определяют по оптической плотности при длине волны 750 нм. Реактив Фолина взаимодействует с остатками ароматических аминокислот белка, главным образом тирозина, а также триптофана и фенилаланина и, в меньшей степени, цистеина. Развитие окраски достигает максимума через 20 - 30 мин при комнатной температуре, в дальнейшем идет

уменьшение ее интенсивности. Степень окрашивания зависит от природы белка. Поскольку различные виды белков могут давать цветные реакции различной интенсивности, испытуемый белок должен соответствовать стандартному образцу.

Стандартные растворы. Растворяют соответствующий стандартный образец белка в буферном растворе, указанном в фармакопейной статье. Части полученного раствора разводят в том же буферном растворе для получения не менее чем пяти стандартных растворов, имеющих концентрации белка, равномерно распределенные в интервале между 5 мкг/мл и 100 мкг/мл.

Испытуемый раствор. Готовят раствор испытуемого лекарственного средства в буферном растворе, указанном в фармакопейной статье, с концентрацией белка, находящейся в пределах интервала концентраций калибровочного графика.

Контрольный раствор. Используют буферный раствор, применяемый для приготовления стандартных и испытуемого растворов.

Метод А (без предварительного осаждения белка). К 1,0 мл каждого из стандартных растворов, испытуемого раствора и к 1,0 мл контрольного раствора, прибавляют по 5,0 мл реактива В. Содержимое пробирок перемешивают и оставляют на 10 - 30 мин при комнатной температуре. Затем в каждую пробирку прибавляют 0,5 мл реактива Фолина, разбавленного перед употреблением водой в 2 раза, быстро и тщательно перемешивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. Измеряют оптическую плотность испытуемого и стандартных растворов на спектрофотометре при длине волны 750 нм (или указанной в фармакопейной статье), используя контрольный раствор в качестве раствора сравнения.

Окраска остается стабильной в течение 2 часов.

Строят зависимости оптических плотностей стандартных растворов от концентраций белка и используют линейную регрессию для построения калибровочной кривой. Определяют концентрацию белка в испытуемом растворе.

Приготовление реактива А. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2 г натрия карбоната, растворяют в 0,1 М растворе натрия гидроксида и доводят объем до метки этим же раствором, перемешивают. Срок годности раствора 1 мес.

Приготовление реактива Б. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,5 г меди сульфата, 1 г калия-натрия тартрата, растворяют в воде и доводят до метки. Срок годности раствора: 2 мес.

Приготовление реактива В. Перед анализом смешивают 50,0 мл реактива А и 1,0 мл реактива Б.

Метод Б (с натрия додецилсульфатом). Определение проводят, как описано в методе А, но вместо 5 мл реактива В к растворам прибавляют по 1 мл щелочного реактива меди и по 0,5 мл разведенного реактива Фолина.

Приготовление сульфатного реактива меди. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют в воде 0,2 г меди сульфата и 0,4 г натрия тартрата, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. В мерной колбе вместимостью 100 мл растворяют в воде 10 г натрия карбоната, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Медленно приливают раствор натрия карбоната к раствору меди сульфата при перемешивании.

Приготовление щелочного реактива меди. 1 объем полученного раствора сульфатного реактива меди смешивают с 2 объемами 5 % раствора натрия додецилсульфата (50 г/л) и 1 объемом 3,2 % раствора натрия гидроксида (32 г/л).

Приготовление разведенного реактива Фолина. Смешивают 5 мл реактива Фолина с 55 мл воды.

Метод В (с предварительным осаждением белка).

Приготовление 0,15 % раствора натрия дезоксихолата. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,15 г натрия дезоксихолата и растворяют в воде. Объем раствора доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Приготовление 72 % раствора трихлоруксусной кислоты. В мерную колбу вместимостью 500 мл помещают 360 г трихлоруксусной кислоты и растворяют в воде. Объем раствора доводят до метки водой и тщательно перемешивают.

Метод 3 (Метод Бредфорд, колориметрический)

Метод 4 (Метод с бицинхоиновой кислотой, колориметрический)

Метод 5 (Колориметрический метод с биуретовым реактивом)

Метод 6 (Флуориметрический метод с о-фталальдегидом)

Метод 7 (Определение белка по содержанию азота)

Метод 7 (Определение белка по содержанию азота)

Определение белка по содержанию азота основано на том, что содержание азота в большинстве белков практически одинаково и может

быть принято равным 16 %. По количеству найденного азота во взятой пробе рассчитывают содержание белка в лекарственном средстве, используя коэффициент пересчета азота на белок, равный 6,25.

На результаты определения будут оказывать влияние другие азотсодержащие вещества, присутствующие в испытуемом образце. Методика определения белка по содержанию азота основана на разложении испытуемого образца в ходе проведения анализа, но не лимитирована содержанием белка в водной среде. При нагревании азотсодержащего органического соединения с серной кислотой концентрированной, азот превращается в аммония сульфат, который можно определить количественно.

Метод А (Метод Кьельдаля)

Определение проводят в соответствии с требованиями, указанными в ОФС «Определение азота в органических соединениях» (метод 2 микрометод Кьельдаля) из точной навески препарата, содержащей 10 - 20 мг белка. После минерализации азотсодержащего органического соединения с серной кислотой концентрированной азот превращается в аммония сульфат, который можно определить количественно.

Метод Б

Большинство приборов для определения азота используют пиролиз, то есть сжигание образца в кислороде при температуре приблизительно 1000 С, в ходе которого выделяется азота монооксид (NO) и другие оксиды азота (NO_x), из азота присутствующего в испытуемом веществе. Некоторые приборы преобразуют оксиды азота в азот, который количественно определяется с помощью детектора по теплопроводности. В других приборах азота монооксид (NO) смешивается с озоном (O₃) для получения азота диоксида (NO₂) в возбужденном состоянии, испускающего свет при распаде, который может быть количественно определен с помощью хемилюминесцентного детектора. Для оптимизации навески и параметров пиролиза и обеспечения стабильности показателей при проведении анализа используется стандартный образец соответствующей чистоты и подходящий по составу с исследуемому белку.

Материалы к занятиям № 5-6 «Антибиотики группы бета-лактамов»

К бета-лактамным антибиотикам относятся пенициллины и цефалоспорины. Они имеют сходную химическую структуру: содержат β -лактамное кольцо и являются N-ацильными производными соответствующих аминокислот – 6-аминопенициллановой (пенициллины) и 7-аминоцефалоспороановой или 7-аминодезацетоксицефалоспороановой (цефалоспорины).

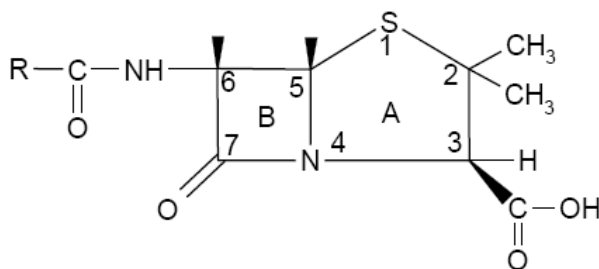
Бензилпенициллин был впервые открыт А. Флемингом (1929 г.) и до сих пор широко используется в медицине. Русские исследователи и врачи задолго до выделения Флемингом пенициллина наблюдали антибиотическое действие зеленой плесени (В.А. Манассеин и др.). Русские врачи А.Г. Полотебнов и М.Г. Тарковский применяли зеленую плесень в лечебных целях. Эти замечательные открытия наших русских ученых не получили широкой известности в то время (XIX век).

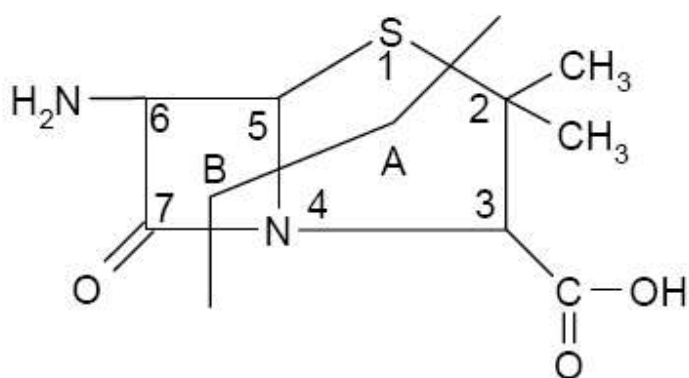
Заслуга создания советского пенициллина, разработка способа его получения из отечественных штаммов плесени принадлежит З.В. Ермольевой, профессору, впоследствии академику (1942 г).

Во Всесоюзном НИИ антибиотиков (в настоящее время – Государственный научный центр по антибиотикам) получены полусинтетические пенициллины – метициллин, оксациллин, ампициллин, карбенициллин и др., а также полусинтетические цефалоспорины и ряд других антибиотиков (С.М. Навашин и др.).

Химическое строение, физические и физико-химические свойства пенициллинов

Общая формула пенициллинов:





6-аминопенициллановая кислота (6-АПК)

Название препарата	Значение R	Остаток кислоты $R-C(=O)-$
1. Бензилпенициллин (натриевая, калиевая, новокаиновая соли)	 бензил	 фенилацетил (остаток фенилуксусной кислоты)
2. Феноксиметилпенициллин	 феноксиметил	 феноксиацетил (остаток феноксиуксусной кислоты)
3. Оксациллин (натриевая соль)	 3-фенил-5-метил-4-изоксазолон	 остаток 5-метил-3-фенилизоксазол-4-карбоновой кислоты
4. Ампициллин (натриевая соль)	 аминобензил	 фениламиноацетил (остаток фениламиноуксусной кислоты)
5. Карбенициллин (динатриевая соль)	 карбоксибензил	 карбоксифенилацетил (остаток карбоксифенилуксусной кислоты)

Пенициллины представляют собой белые или почти белые кристаллические порошки. Пенициллины со свободной карбоксильной группой в 3 положении (например, феноксиметилпенициллин, ампициллин, амоксициллин) мало растворимы в воде. Соли щелочных металлов (натриевая и калиевая соли бензилпенициллина, натриевые соли

оксациллина, ампициллина, динатриевая соль карбенициллина) легко растворимы в воде; соли органических оснований (новокаиновая и N,N'-дибензилэтилендиаминовая соли бензилпенициллина) мало растворимы в воде.

Соли бензилпенициллина неустойчивы в растворах и разрушаются при приеме внутрь (в кислой среде), поэтому их выпускают в виде герметически укупоренных сухих рассыпок для парентерального введения. Феноксиметилпенициллин более устойчив в кислой среде и может применяться внутрь в виде таблеток.

Так как в молекулах пенициллинов содержатся асимметрические атомы углерода (C3, C5 и C6), растворы пенициллинов являются оптически активными и вращают плоскость поляризации вправо, что используется для характеристики их качества (определения удельного вращения).

Беталактамы поглощают в ИК области спектра. При наличии стандартных образцов это отличный способ идентификации препаратов, который используется по НД, главным образом, для полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов. Определение проводят либо в дисках с бромидом калия, либо в пасте с вазелиновым маслом. Полученный ИК-спектр испытуемого препарата сравнивают с ИК-спектром стандартного образца.

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

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

Амидная группа пенициллинов обуславливает первую и вторую амидные полосы вторичного нециклического амида соответственно в областях 1690-1645 см⁻¹, вызванные валентными колебаниями карбонильной группы, и 1585-1550 см⁻¹, соответствующие деформационным колебаниям группы NH.

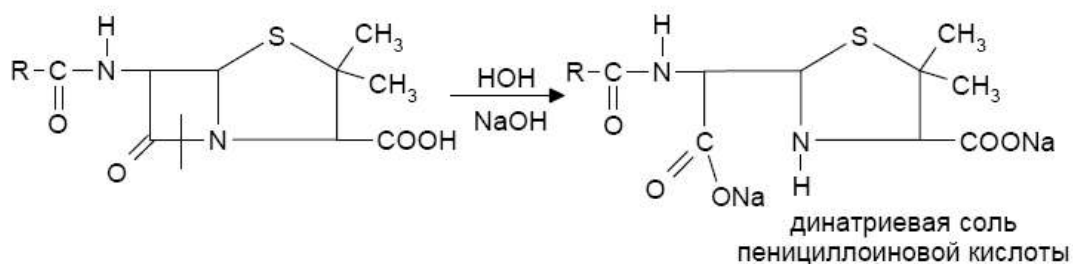
Большинство пенициллинов являются солями, поэтому в препаратах этой группы карбоксильные группы ионизированы, что подтверждается наличием полосы при 1615-1600 см⁻¹.

Химические свойства и реакции подлинности

Наиболее лабильной частью молекулы пенициллина является беталактамное кольцо, которое подвергается гидролитическому

расщеплению под действием щелочей, кислот, фермента пенициллиназы с потерей биологической активности.

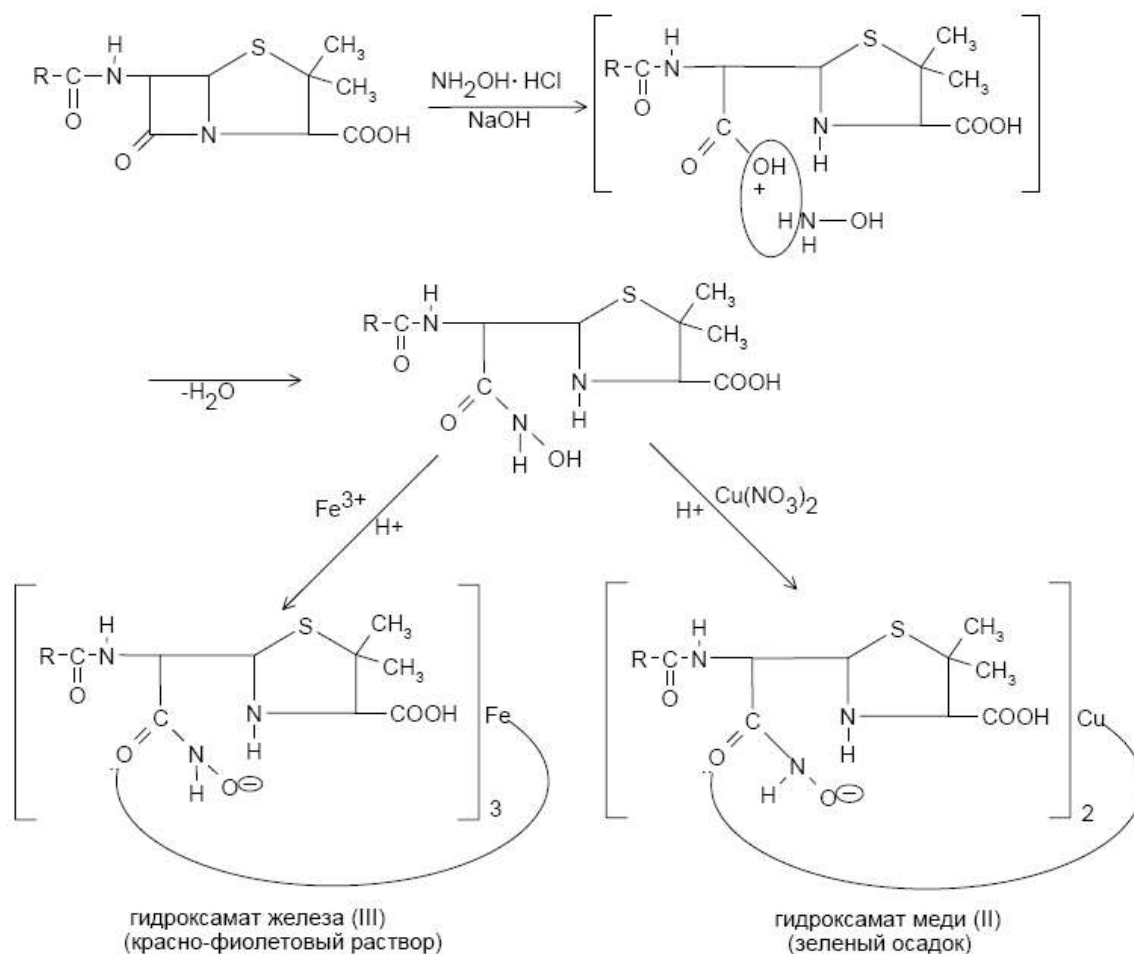
Щелочи и пенициллиназа гидролизуют беталактамное кольцо с образованием неактивной пенициллоиновой кислоты:



Гидроксамовая реакция

Общегрупповой реакцией на беталактамы является гидроксамовая реакция. Она основана на наличии беталактамного кольца в молекуле пенициллина. При взаимодействии пенициллинов со щелочным раствором гидросиламина гидрохлорида происходит реакция гидросиламинолиза с образованием гидроксамовой кислоты, которая после подкисления образует окрашенные комплексные соли с солями тяжелых металлов: с солями железа (III) фиолетового цвета раствор гидроксамата железа (III) и зеленого цвета осадок гидроксамата меди (II).

Вначале происходит щелочной гидролиз препарата с образованием пенициллоиновой кислоты; в момент гидролиза пенициллоиновая кислота реагирует с гидросиламином, образуя гидроксамовую кислоту.



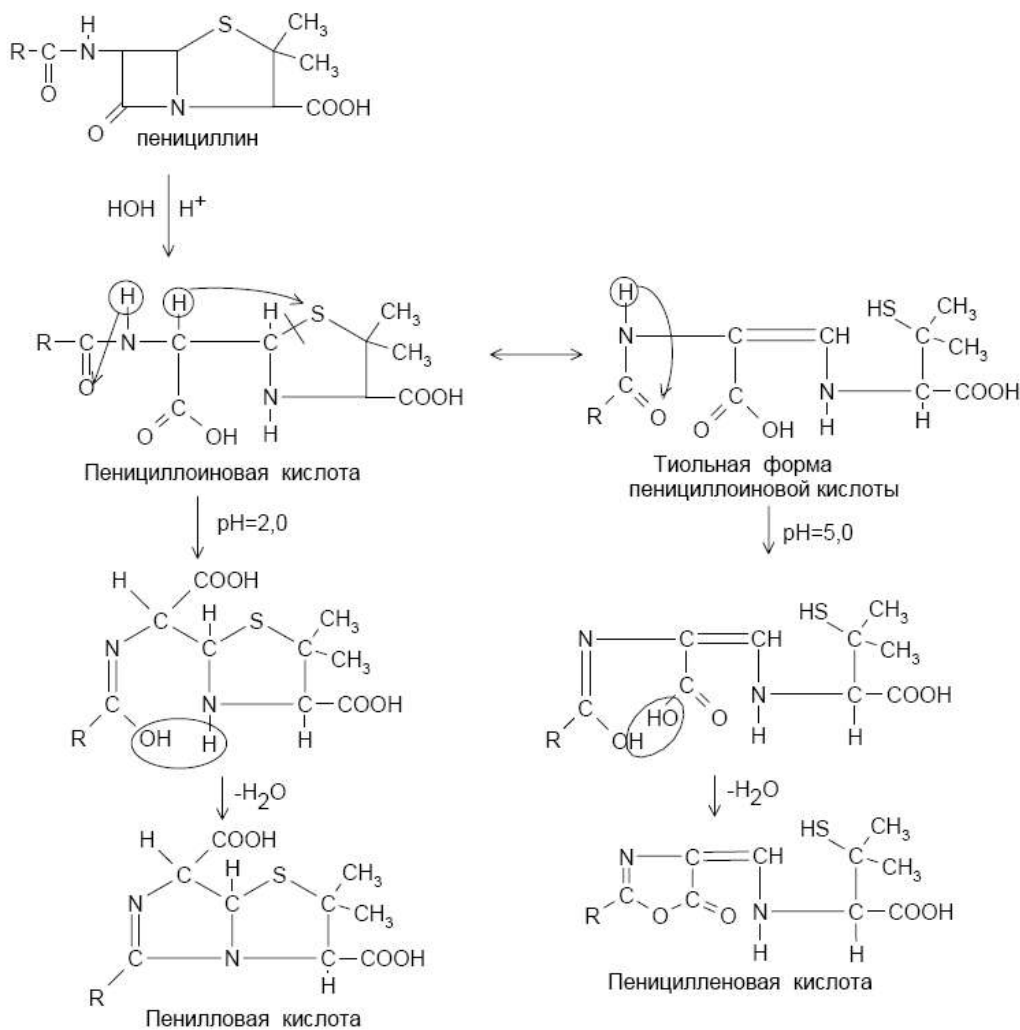
Образование пенилловой и пеницилленовой кислот

Под действием кислот пенициллины инактивируются с образованием пенилловой и пеницилленовой кислот, которые являются продуктами изомеризации пенициллина. Пенилловая кислота образуется при pH 2,0, а пеницилленовая – при pH 5,0.

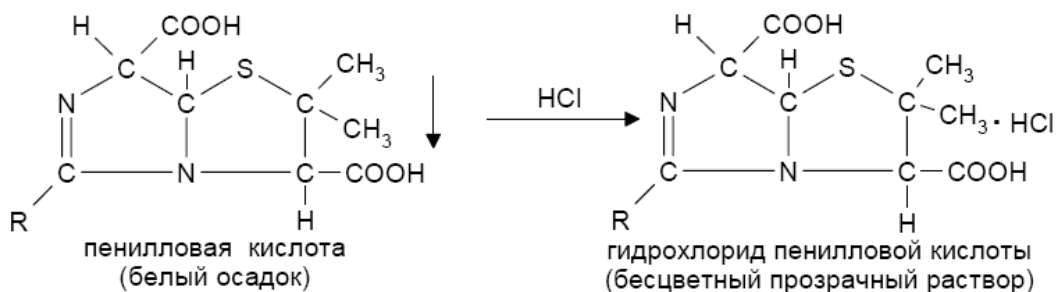
В обоих случаях на первом этапе расщепляется беталактамный цикл с образованием пенициллоиновой кислоты. Затем происходит конденсация карбоксильной группы (пеницилленовая кислота) или амидной группы (пенилловая кислота) с гидроксильной группой ацильного радикала.

На образовании пенилловой кислоты основана одна из реакций подлинности на растворимые соли пенициллинов.

При взаимодействии растворимых солей пенициллина (натриевых, калиевых) с 25% хлороводородной кислотой выделяется белый осадок кислотной формы пенициллина, который растворяется при добавлении избытка реактива.



Кислотная форма пенициллина при взаимодействии с избытком хлороводородной кислоты подвергается гидролитическому расщеплению и изомеризации до пенилловой кислоты, которая является амфолитом и за счет основных свойств атомов азота образует с хлороводородной кислотой растворимую соль – гидрохлорид:

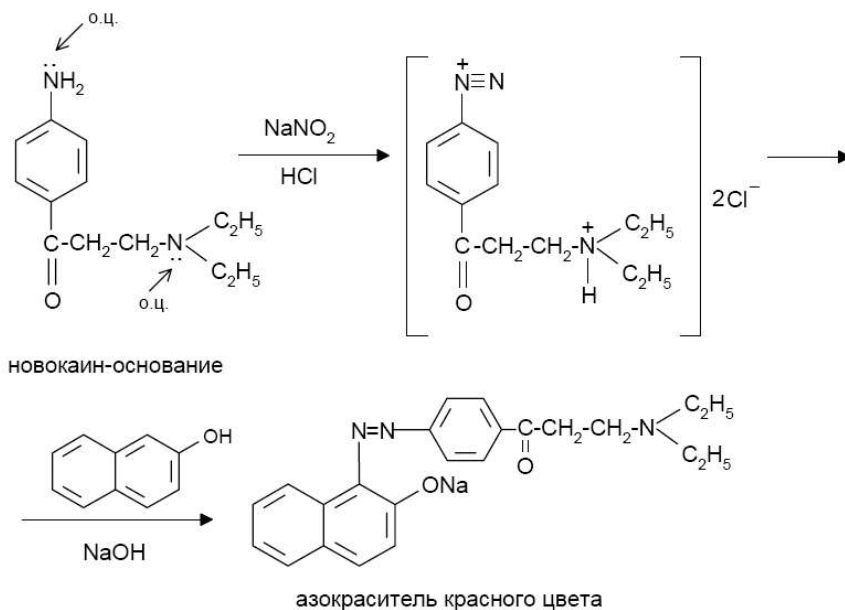


Реакции на катионы солей пенициллинов

Реакция на калий: около 0,1 г препарата сжигают в тигле. Остаток дает характерную реакцию А на калий – с виннокаменной кислотой.

Реакция на натрий: препарат дает характерную реакцию Б на натрий – по окраске пламени.

Реакция на новокаин – основание в новокаиновой соли бензилпенициллина: реакция образования азокрасителя на первичную ароматическую аминогруппу:



Для пенициллинов характерны другие реакции:

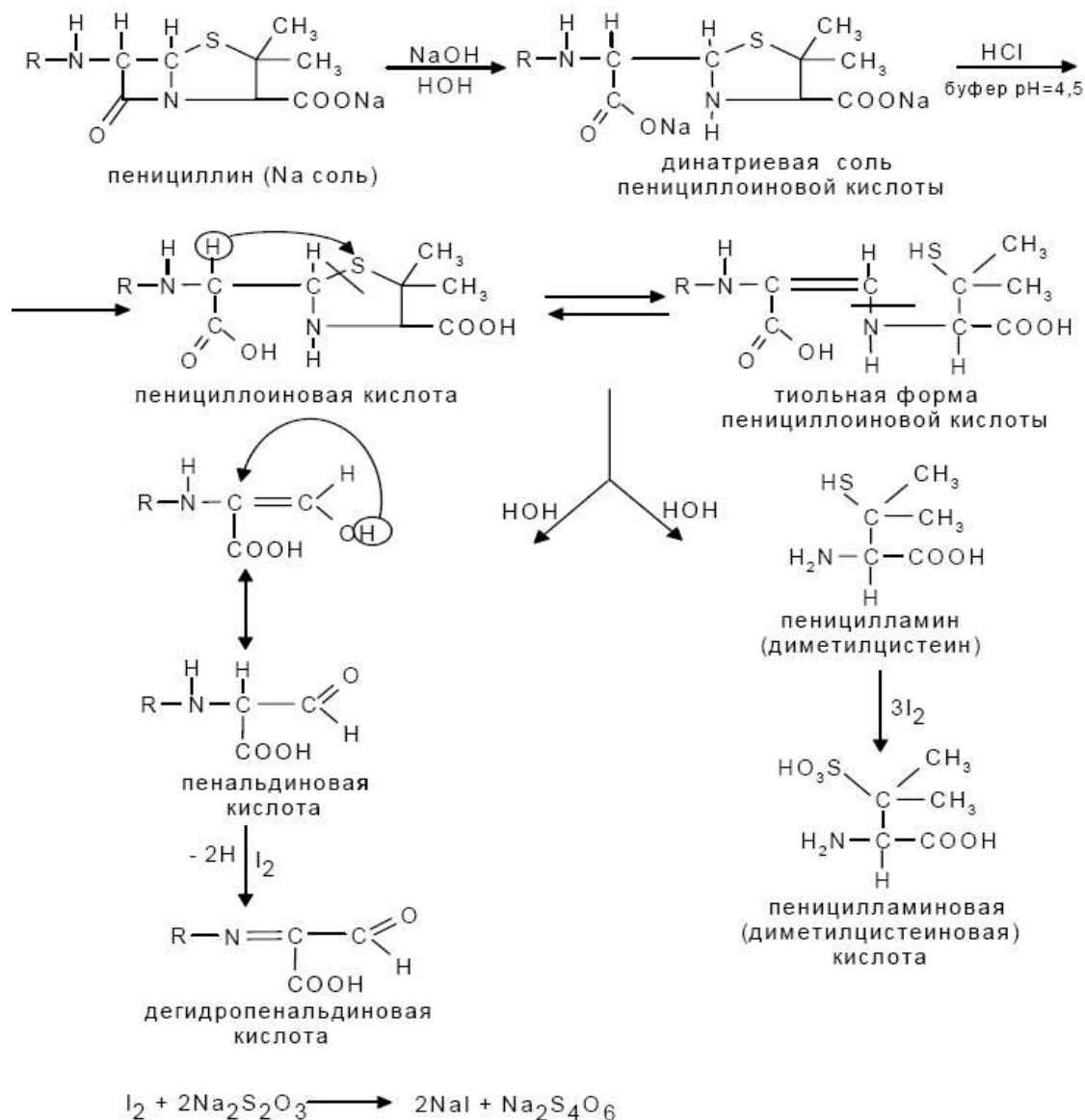
1. Реакция с хромотроповой кислотой с образованием окрашенных продуктов реакции.
2. Реакция с реактивом Марки (на фенольный гидроксил).
3. Реакция образования азокрасителя.
4. Реакции окисления (способность восстанавливать серебро из аммиачного раствора серебра нитрата, оксид меди (I) из реактива Фелинга, ртуть – из реактива Несслера, йод из калия иодата и др.

Методы количественного определения

Так как пенициллины являются гетерогенными соединениями, то по НД требуется определение суммы пенициллинов и определяемого пенициллина. Сумму пенициллинов в солях бензилпенициллина и феноксиметилпенициллине определяют иодометрическим методом.

Натриевую и калиевую соли бензилпенициллина растворяют в воде, а феноксиметилпенициллин – в фосфатном буфере с pH = 7,0. Затем добавляют раствор гидроксида натрия и оставляют на двадцать минут. После щелочного гидролиза к смеси прибавляют соляную кислоту, раствор ацетатного буфера (pH = 4,5 + 0,05) и избыток 0,01 н раствора йода. Оставляют на 20 минут в темном месте и титруют избыток 0,01 н раствора йода 0,01 н раствором натрия тиосульфата. Параллельно проводят контрольный опыт с таким же количеством препарата, но без щелочного гидролиза.

Избыток йода оттитровывают раствором натрия тиосульфата. На окисление расходуется 8 эквивалентов йода.



Содержание суммы пенициллинов в процентах (X) вычисляют по формуле, где: V – разность в объёмах 0,01 н раствора йода между опытным и контрольным титрованием (или разность в объёмах 0,01 н раствора натрия тиосульфата между контрольным и опытным титрованием), мл;

K – поправка 0,01 н раствора натрия тиосульфата;

Э – величина эквивалента 1 мл 0,01 н раствора йода в граммах стандартного образца натриевой соли бензилпенициллина или в граммах стандартного образца феноксиметилпенициллина (с пересчетом на химически чистое вещество);

C – коэффициент пересчета стандартного образца натриевой соли бензилпенициллина на исследуемый пенициллин, указанный в соответствующей статье;

a – навеска препарата, г.

$$X = \frac{V \cdot K \cdot \varepsilon \cdot 100 \cdot C}{a \cdot 5} \cdot 100$$

Рекомендация: Ознакомиться с ОФС.1.2.4.0010.15 Определение антимикробной активности антибиотиков методом диффузии в агар.

ЦЕФАЛОСПОРИНЫ

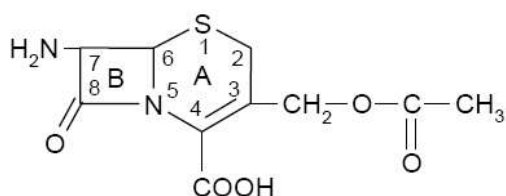
Первые сведения о цефалоспориных относятся к 1945 г., когда итальянский микробиолог Brotzu при исследовании флоры морской воды близ берегов Сардинии обнаружил микроорганизмы с выраженной антибактериальной активностью. Развиваясь в питательной среде эти организмы продуцируют вещество, ингибирующее развитие многих бактерий.

В 1948 г. было установлено, что изолированная Brotzu культура относится к виду *Cephalosporium salmosynnematum* и что она продуцирует 7 различных антибиотиков, одним из которых является цефалоспорин C.

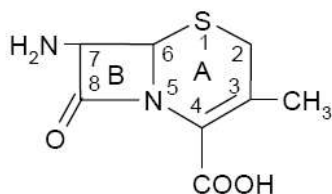
Структура ядра цефалоспоринов сходна со структурой пенициллинов. Как оказалось, биогенез ядер этих двух типов антибиотиков идентичен; единственное исключение составляет способ замыкания серусодержащего кольца. У цефалоспоринов атом углерода, соответствующий одной из двух метильных групп у C2 молекулы пенициллина, входит в состав шестичленного дигидротиазинового кольца.

В основе строения цефалоспоринов и полусинтетических цефалоспоринов лежат 7-аминоцефалоспориновая кислота (7-АЦК) и 7-аминодезацетоксицефалоспориновая кислота (7-АДЦК), которые состоят из двух конденсированных колец: β-лактамного (B) и метадигидротиазинового (A).

Цефалоспорины являются ацильными производными 7-АЦК или 7-АДЦК.

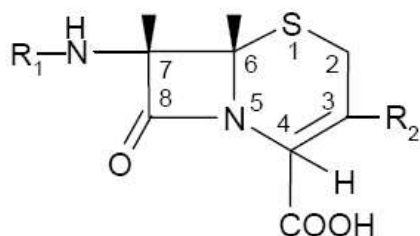


7-АЦК



7-АДЦК

Общая формула цефалоспоринов:



Название антибиотика	R ₁	R ₂	Примечание
1. Цефалотин	<p>тиенил-2-ацетил</p>	<p>ацетоксиметил</p>	производное 7-АЦК
2. Цефалексин	<p>α-амино-фенилацетил</p>	<p>метил</p>	производное 7-АДЦК

Препараты – белые или белые со слегка желтоватым оттенком (за счет возможного окисления метадигидроthиазинового кольца) порошки. Кислотные формы трудно и мало растворимы в воде, натриевые соли – легко растворимы. Препараты оптически активны (асимметрические атомы углерода в положениях 6 и 7), правовращающие. В НД нормируется значение удельного вращения.

Водные растворы цефалоспоринов дают в УФ области характерную полосу поглощения с максимумом при длине волны около 260 нм, что обусловлено колебанием связи при возможном участии серы ядра. У цефалексина, кроме того, имеется дополнительный хромофор – фенильный радикал в ацильной части молекулы. В УФ спектре цефалотина имеется 1 максимум при длине волны 237 нм и плечо при 265 нм. Поглощение при длине волны 237 нм обусловлено, главным образом, присутствием тиенильной группировки, а при 265 нм – кольцевой системы 7-аминоцефалоспорановой кислоты.

По НД требуется определять оптическую плотность 0,002% водных растворов цефалоспоринов для идентификации и характеристики степени чистоты препаратов

Цефалоспорины являются кислотами (за счет карбоксильной группы в положении 4); некоторые из них применяются в виде натриевых солей (цефалотин). Цефалексин обладает амфотерными свойствами: кроме карбоксильной группы в положении 4, содержит основную группу – алифатическую аминогруппу в остатке D- α -аминофенилуксусной кислоты.

Общие химические свойства цефалексина и цефалотина обусловлены наличием в составе их молекул атома серы в дигидротиазининовом кольце (способность к окислению) и β -лактамного кольца (гидроксамовая реакция).

Реакцию окисления проводят 80% раствором серной кислоты, содержащей 1% азотной кислоты. Цефалексин образует желтое окрашивание, цефалотина натриевая соль – оливково-зеленое, переходящее в красновато-коричневое.

Гидроксамовая реакция на β -лактамное кольцо проводится по методике для пенициллинов. Цефалотин, кроме того, дает гидроксамовую реакцию и на сложно-эфирную группу.

Цефалексин так же, как ампициллин и амоксициллин, содержит в ацильной части молекулы остаток α -фениламиноуксусной кислоты и поэтому дает реакцию с нингидрином (вишневое окрашивание) и с сульфатом меди после нейтрализации раствором гидроксида натрия (оливково-зеленое окрашивание).

Цефалотина натриевая соль дает реакцию на натрий – по окрашиванию бесцветного пламени горелки в желтый цвет.

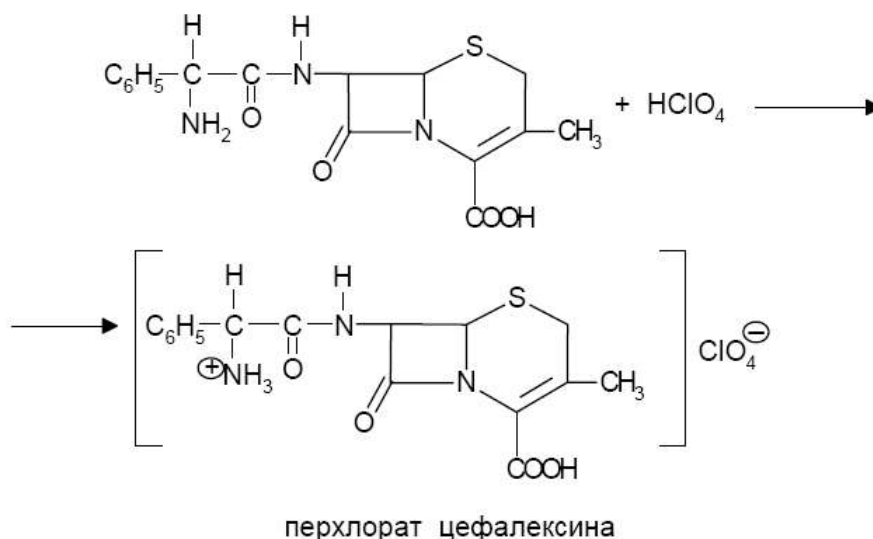
Количественное определение.

1. Определение активности проводят микробиологическим методом диффузии в агар с тест-культурой *Bacillus subtilis* в сравнении со стандартными образцами препаратов.

2. Иодометрический метод проводится как для солей бензилпенициллина, с применением ацетатного буфера $\text{pH} = 4,7 + 0,05$. Содержание цефалексина и цефалотина должно быть не менее 95,0% в пересчете на сухое вещество.

3. Цефалоспорины по Европейской фармакопее определяют методом жидкостной хроматографии.

4. Для цефалексина-стандарта рекомендуется метод кислотно-основного титрования в неводной среде: растворяют вещество в муравьиной кислоте, затем добавляют ледяную уксусную кислоту и титруют потенциометрически раствором хлорной кислоты:



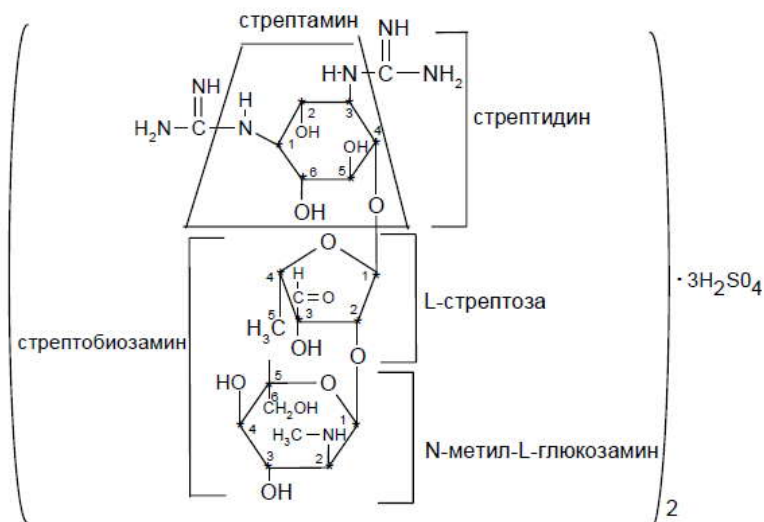
Испытания на чистоту.

В испытаниях на чистоту регламентируется значение pH , удельное вращение, оптическая плотность растворов, вода (для цефалотина натриевой соли – не более 1,5%; для цефалексина кристаллогидрата – не менее 4,0% и не более 8,0%). Т.к. препараты полусинтетические (7-АДЦК и 7-АЦК получают из природных цефалоспоринов), то необходимо испытание на токсичность (как и для пенициллинов). Посторонние примеси определяют методом ТСХ.

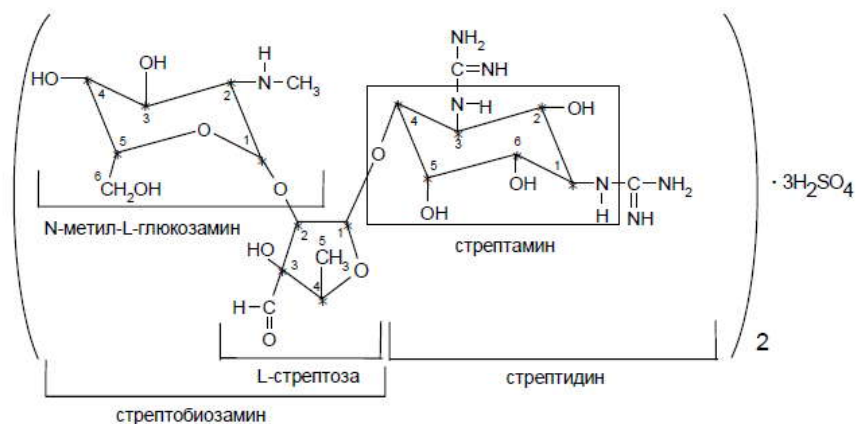
дезоксистрептамин, который отличается от стрептидина наличием аминогрупп вместо остатков гуанидина и отсутствием оксигруппы при С₂.

Аминогликозиды применяются в медицинской практике в виде солей – сульфатов.

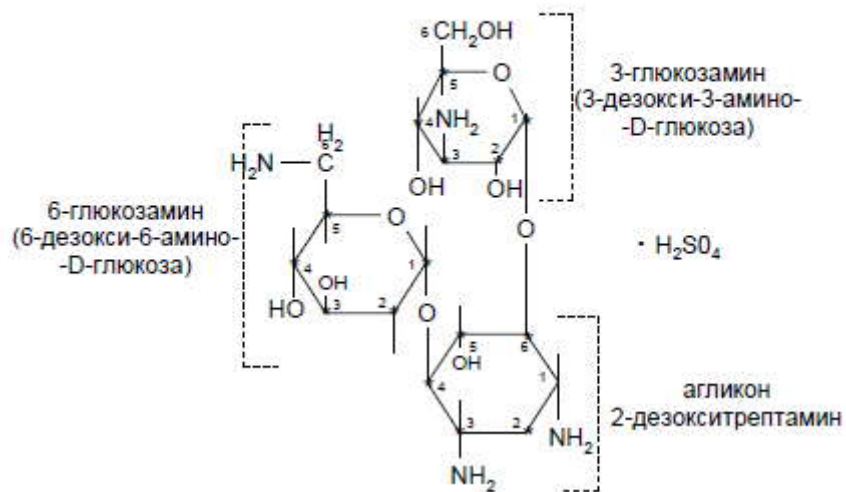
Streptomycini sulfas. Стрептомицина сульфат.



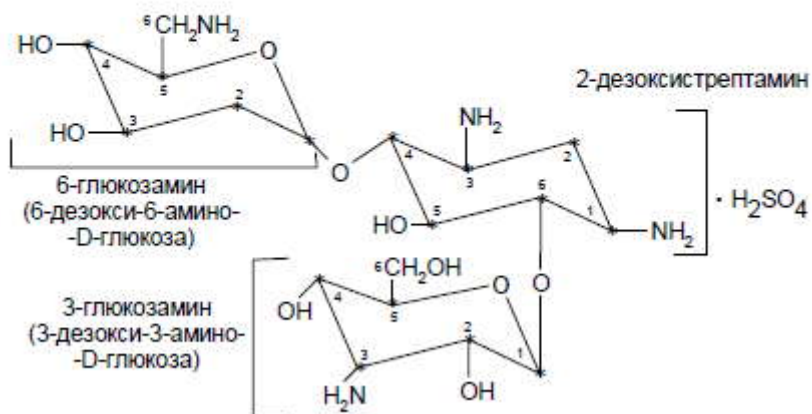
ИЛИ



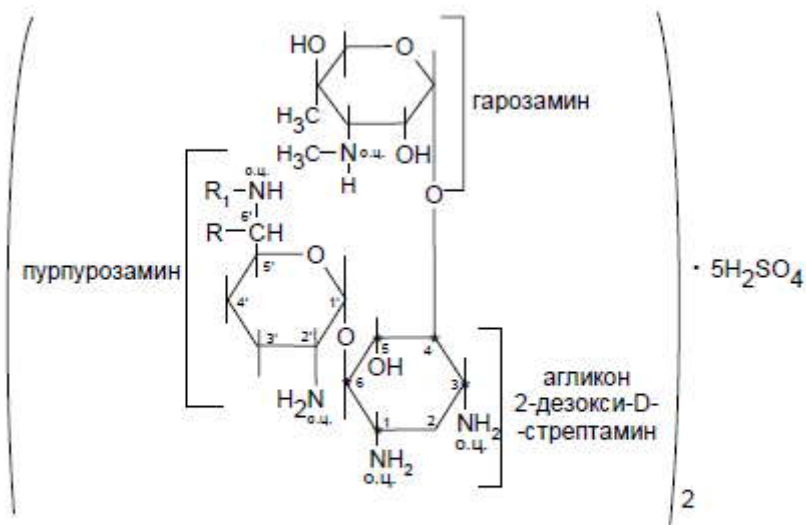
Канамуцини monosulfas. Канамицина моносульфат.



ИЛИ

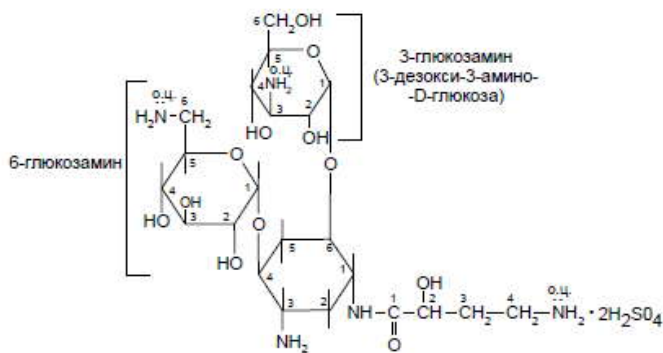


Gentamycini sulfas. Гентамицина сульфат.

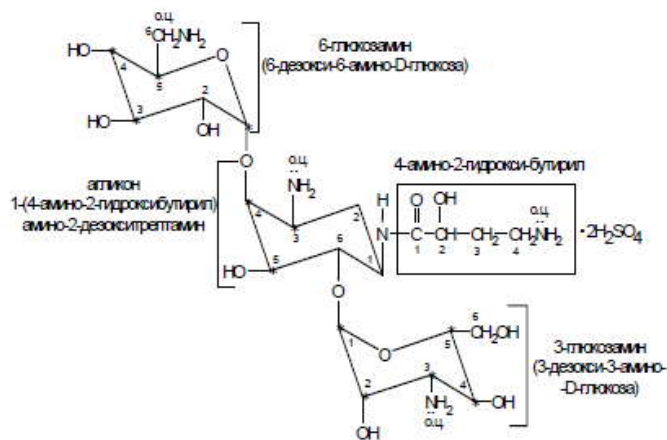


гентамицин C₁: R=R₁=CH₃
 гентамицин C₂: R=CH₃; R₁=H
 гентамицин C_{1A}: R=R₁=H

Amicacini sulfas. Амикацина сульфат.



ИЛИ



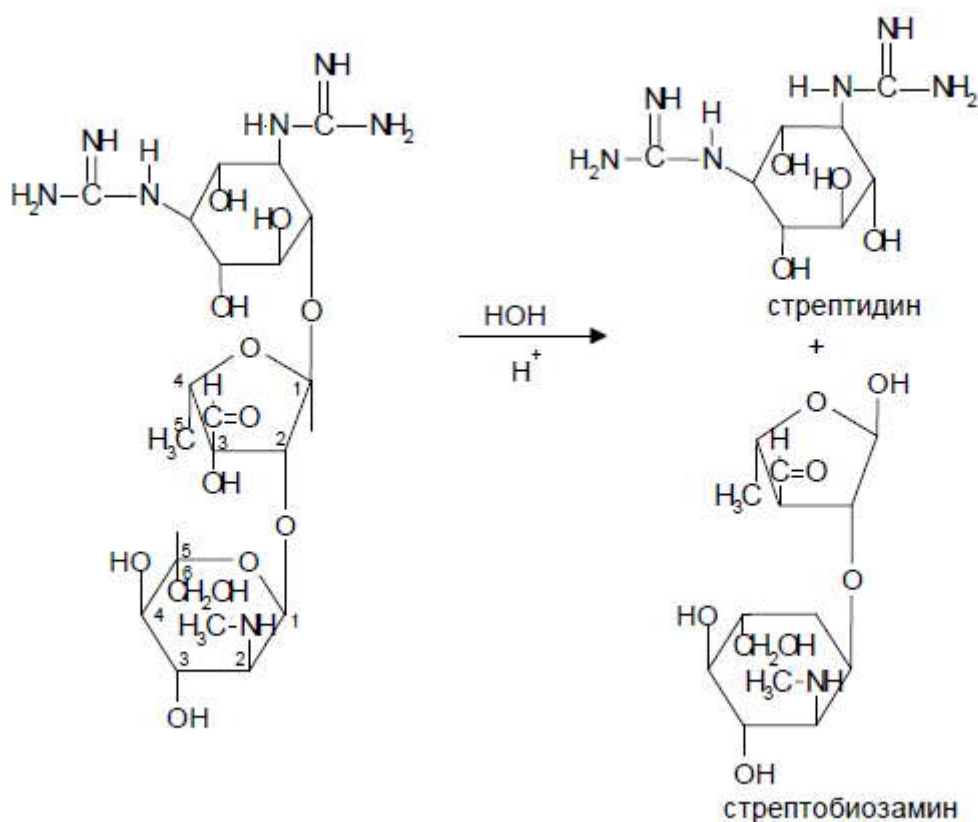
Аминогликозиды – белые или белые с кремоватым (гентамицина сульфат) или желтоватым (амикацина сульфат) оттенком порошки, легко растворимы в воде, практически нерастворимы в спирте, эфире, хлороформе.

Лекарственные вещества данной группы оптически активны, так как содержат в своем составе остатки D- или L-сахаров. В нормативной документации нормируется значение удельного вращения этих лекарственных веществ.

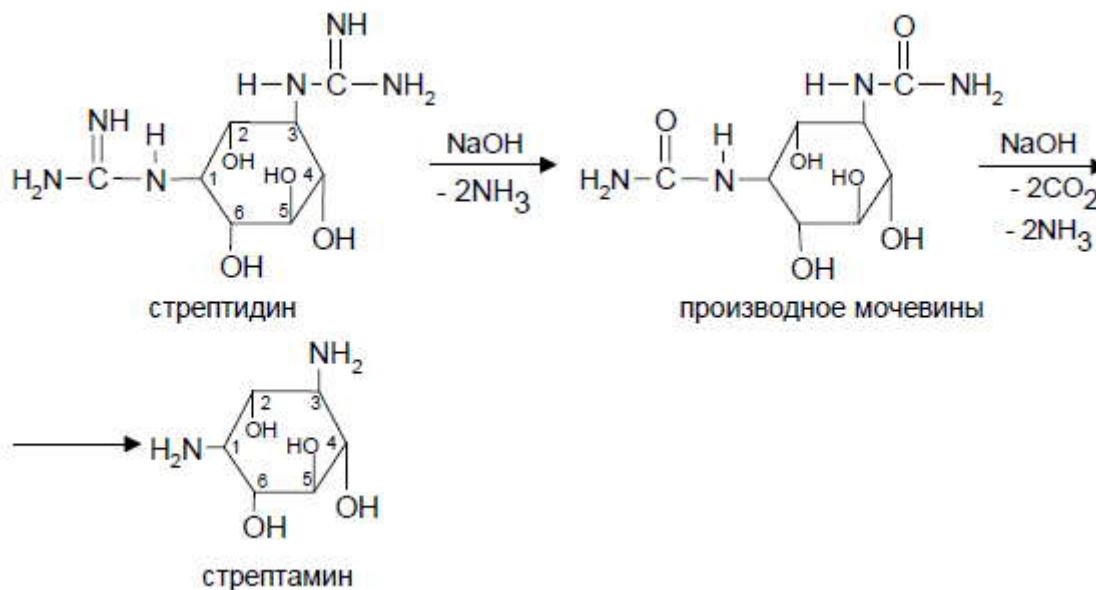
Аминогликозиды не имеют характерных максимумов поглощения в УФ области спектра от 200 до 400 нм.

Для испытания на подлинность канамицина и гентамицина используют ИК-спектроскопию и спектроскопию протонного магнитного резонанса (ПМР-спектроскопию). ИК- и ПМР-спектры испытуемых и стандартных образцов должны быть идентичны.

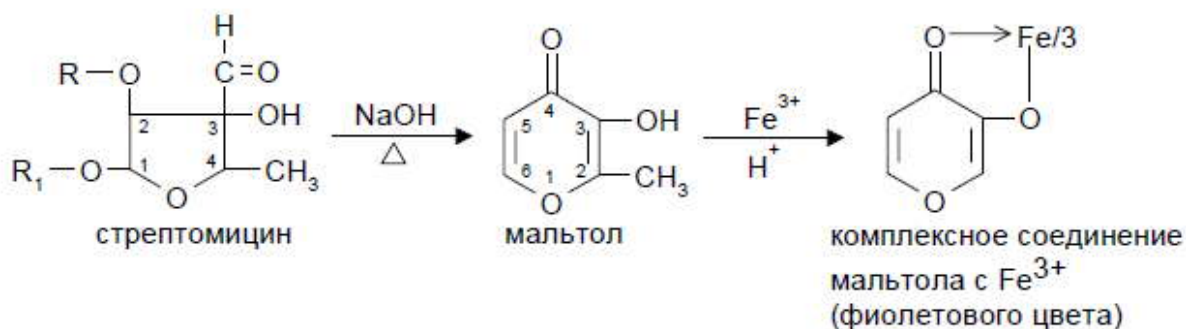
Все лекарственные вещества данной группы, как гликозиды, подвергаются гидролитическому расщеплению в кислой среде с образованием агликона и сахаров. Так, например, при кислотном гидролизе стрептомицина образуется агликон стрептидин и сахарная часть в виде биозы – стрептобиозамина:



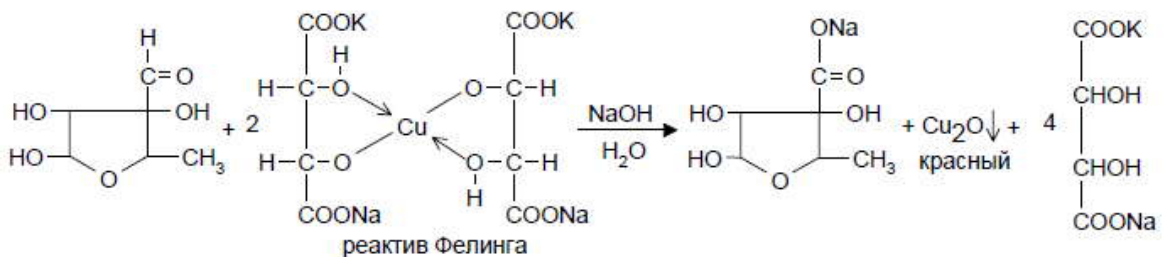
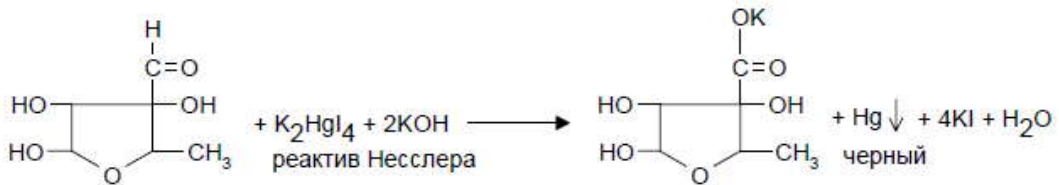
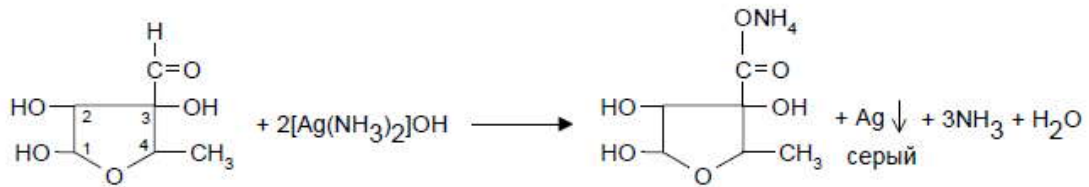
Стрептидин представляет собой двухосновное соединение; при действии на него щелочью он превращается сначала в производное мочевины, а затем – в стрептамин:



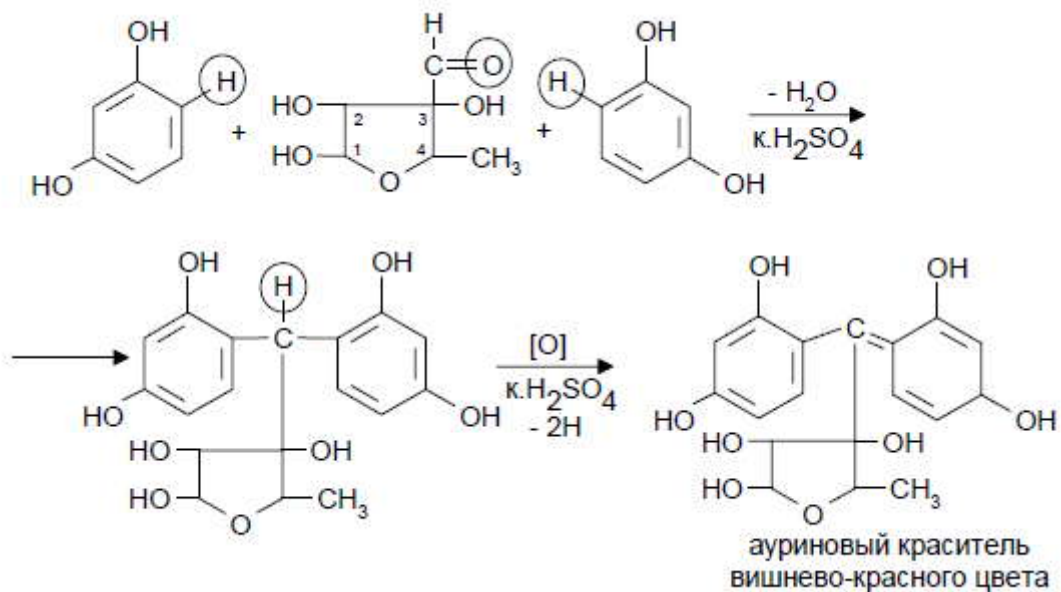
Стрептомицин в отличие от других аминогликозидов подвергается гидролитическому расщеплению не только в кислой, но и в щелочной среде. При щелочном гидролизе стрептомицина при нагревании из остатка L-стрептозы образуется мальтол, который открывается по получению окрашенного в фиолетовый цвет комплекса с солями железа (III). Эта реакция используется для идентификации и количественного определения препарата спектрофотометрическим или фотоэлектроколориметрическим методом.



Стрептомицин с реактивом Фелинга образует красный осадок оксида меди (I), с аммиачным раствором серебра нитрата – «серебряное зеркало» на стенках пробирки; с реактивом Несслера – темный осадок металлической ртути:



При взаимодействии стрептомицина с фенолами, например, с резорцином в присутствии кислоты серной концентрированной образуется ауриновый краситель вишнево-красного цвета:

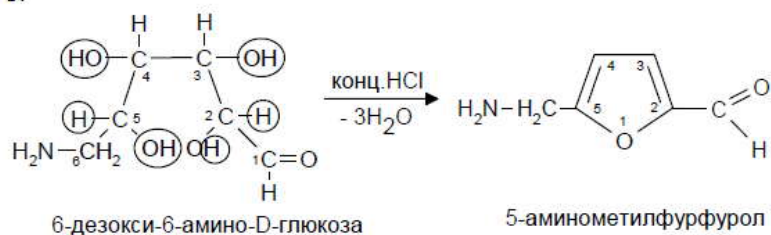


Канамицина моносульфат, как гликозид, способен гидролизоваться в кислой среде; при кипячении с кислотами он подвергается гидролитическому расщеплению с полной потерей активности. В отличие от стрептомицина

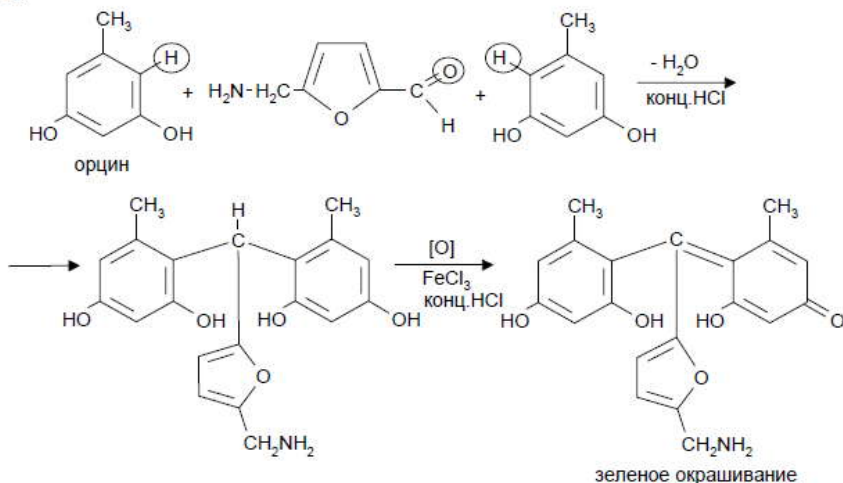
канамицин устойчив в растворах щелочей. После кислотного гидролиза канамицин дает реакции на сахара (с реактивами Фелинга, Несслера, аммиачным раствором серебра нитрата).

При взаимодействии сахарных компонентов канамицина (например, 6-глюкозамина) с концентрированной соляной кислотой образуется 5-аминофурфурол, который можно обнаружить с орцином в присутствии железа (III) хлорида. Предполагают, что реакция протекает следующим образом:

1.



2.



Для определения подлинности гентамицина сульфата, который представляет собой смесь сульфатов гентамицина С1, С2 и С1а, применяют метод тонкослойной хроматографии на стеклянные пластинки с закрепленным слоем силикагеля КСК N 2,5. Определение проводят параллельно с использованием стандартного образца гентамицина сульфата.

Три основных пятна на хроматограмме, полученные с испытуемым препаратом, должны соответствовать трем пятнам на хроматограмме, полученным со стандартным образцом.

Амикацина сульфат, как гликозид, подвергается гидролитическому расщеплению с полной потерей активности. После кислотного гидролиза амикацин дает реакции на сахара (с реактивами Фелинга, Несслера, аммиачным раствором серебра нитрата и др.).

В отличие от канамицина амикацин за счет амидной группы образует окрашенные комплексы с солями тяжелых металлов. Для идентификации

амикацина применяется реакция с кобальта нитратом после нейтрализации раствором натрия гидроксида (фиолетовое окрашивание).

Испытания на чистоту.

Так как аминогликозиды могут окисляться с образованием окрашенных и нерастворимых продуктов, в НД рекомендуется определение прозрачности и цветности. Раствор стрептомицина сульфата должен быть прозрачным и бесцветным в течение 24 часов. Растворы канамицина моносульфата и гентамицина сульфата должны быть прозрачными, допускается окраска, которая не должна быть интенсивнее определенного эталона цветности.

В НД приводятся значения рН водных растворов аминогликозидов.

Название препарата	рН, концентрация водного раствора
Стрептомицина сульфат	4,5 – 7,5 (28%)
Канамицина моносульфат	7,5 – 8,5 (1%)
Гентамицина сульфат	3,5 – 5,5 (4%)
Амикацина сульфат	2,0 – 4,0 (1%)

Методы количественного определения.

Количественное определение аминогликозидных антибиотиков проводится микробиологическим методом диффузии в агар с определенным тест-микробом по соответствующему стандарту.

Для стрептомицина сульфата описаны также спектрофотометрические методы в видимой области спектра, основанные на цветных реакциях (мальтозной, с нингидрином и др.). Канамицин можно определять по цветной реакции с орцином.

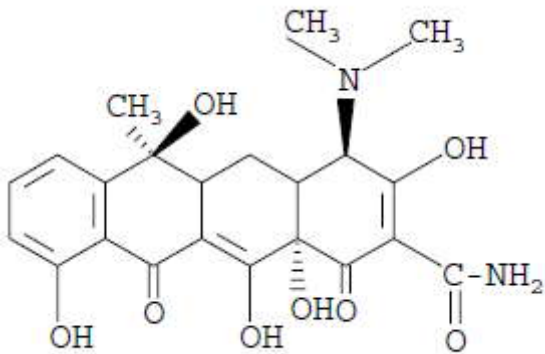
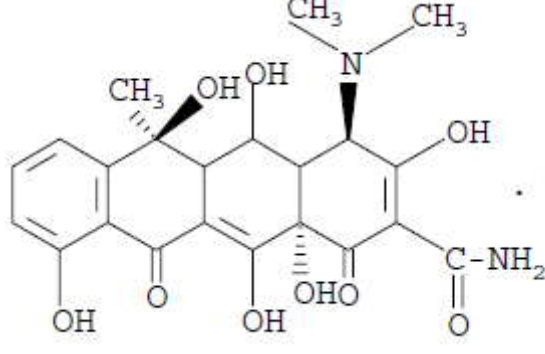
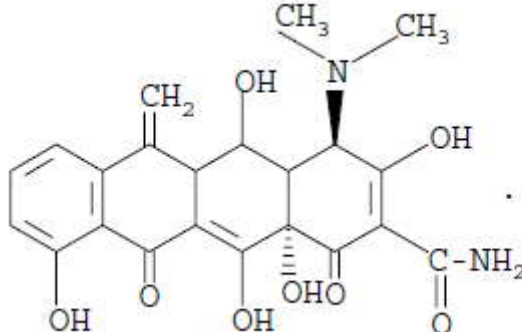
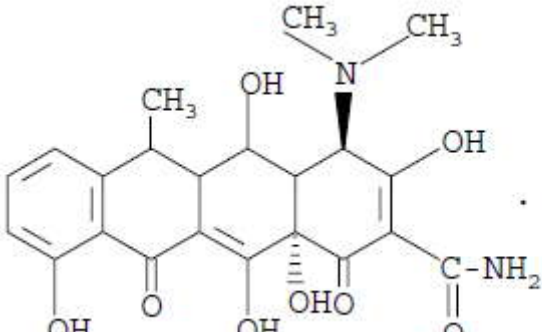
Для этих же препаратов разработаны методы газожидкостной и жидкостной хроматографии, полярографический метод и др.

ТЕТРАЦИКЛИНЫ

Группа тетрациклинов включает ряд природных антибиотиков, к которым относятся тетрациклин, окситетрациклин, а также полусинтетические тетрациклины – метациклин, доксициклин.

По химической структуре тетрациклины принадлежат к ряду частично гидрированных производных нафтацена, содержащих несколько функциональных групп (фенольный, енольные и спиртовые гидроксилы, карбамидная группа, алифатическая аминогруппа, оксогруппа).

Из рассматриваемой группы тетрациклины окрашены в желтый цвет. Окраска обусловлена наличием хромофоров в структуре препаратов.

Тетрациклин	Окситетрациклина гидрохлорид
 <p>The structure shows a tetracycline molecule with a dimethylamino group (N(CH₃)₂) at C-4, a methyl group at C-10, and a primary amide group (C-NH₂) at C-5. It features multiple hydroxyl groups at C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, and C-12, and a hydroxyl group on the phenyl ring at C-7. A ketone group is present at C-11.</p>	 <p>The structure is identical to tetracycline but includes an additional hydroxyl group at C-11. It is shown as a hydrochloride salt with a ". HCl" label.</p>
Метациклина гидрохлорид	Доксициклина гидрохлорид
 <p>The structure is identical to tetracycline but includes a methylene group (=CH₂) at C-11. It is shown as a hydrochloride salt with a ". HCl" label.</p>	 <p>The structure is identical to tetracycline but includes a methyl group at C-10. It is shown as a hydrochloride salt with a ". HCl" label.</p>

Кислотно-основные свойства тетрациклинов

Тетрациклины являются амфотерными соединениями. Диметиламиногруппа обладает основными свойствами, поэтому тетрациклины образуют соли с органическими и неорганическими кислотами. Реакция используется в количественном определении – кислотно-основное титрование в неводных средах.

За счет енольных и фенольных гидроксильных групп они проявляют кислотные свойства и могут образовывать растворимые соли с гидроксидами щелочных металлов. Тетрациклины также образуют нерастворимые окрашенные хелатные комплексы с поливалентными катионами. Для идентификации тетрациклинов применяются реакции образования окрашенных солей с железом (III) хлоридом.

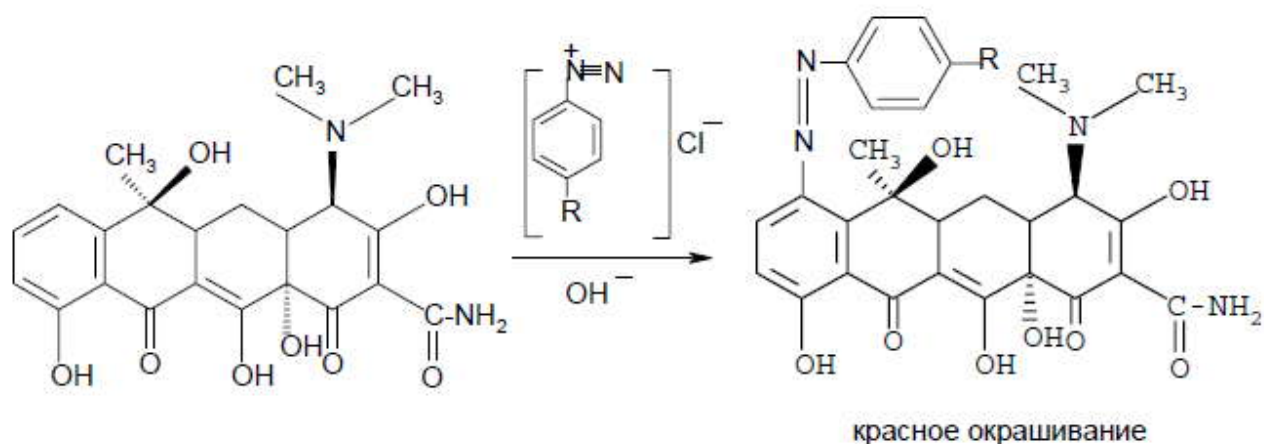
Кроме того, можно провести ряд реакций на фенольный гидроксил

Образование азокрасителя

Тетрациклин растворяют в растворе гидроксида натрия и добавляют 1 – 2 капли соли диазония. Соль диазония из-за нестойкости готовят

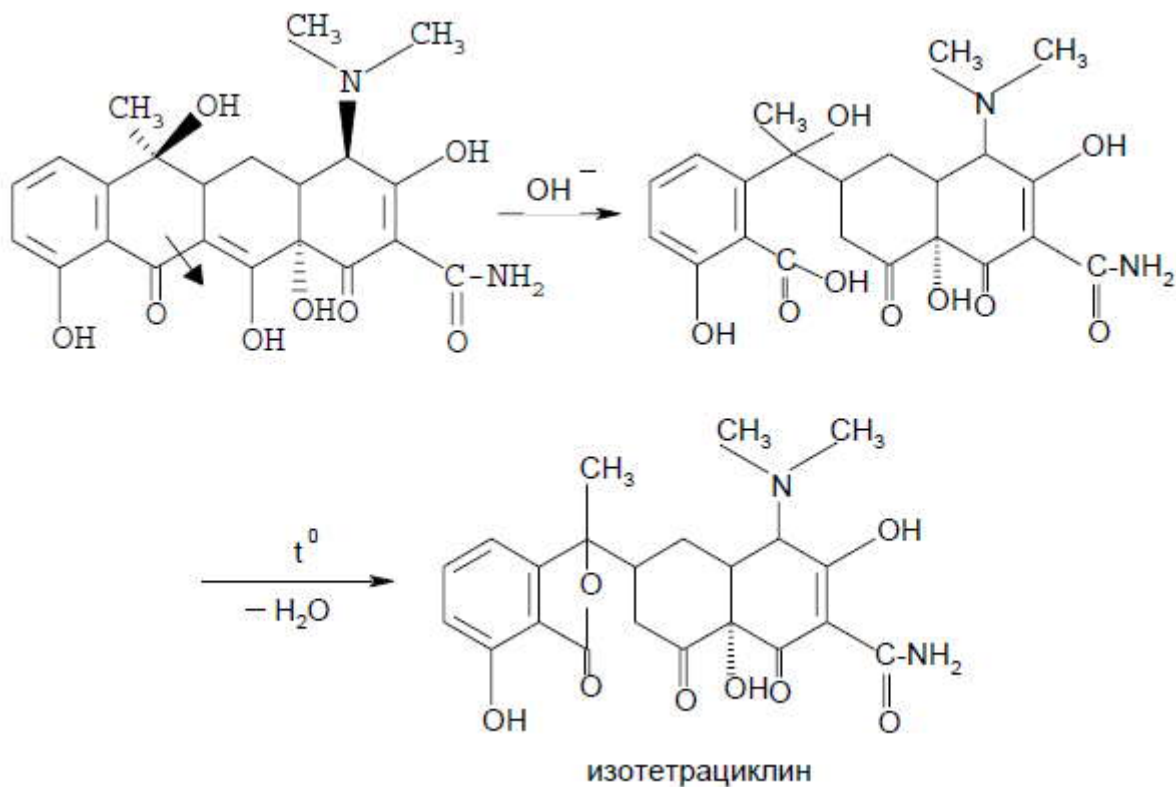
непосредственно перед проведением испытания, при этом используют соединения с первичной ароматической аминогруппой.

Данная реакция используется для качественного и количественного анализа (фотоэлектроколориметрический метод).



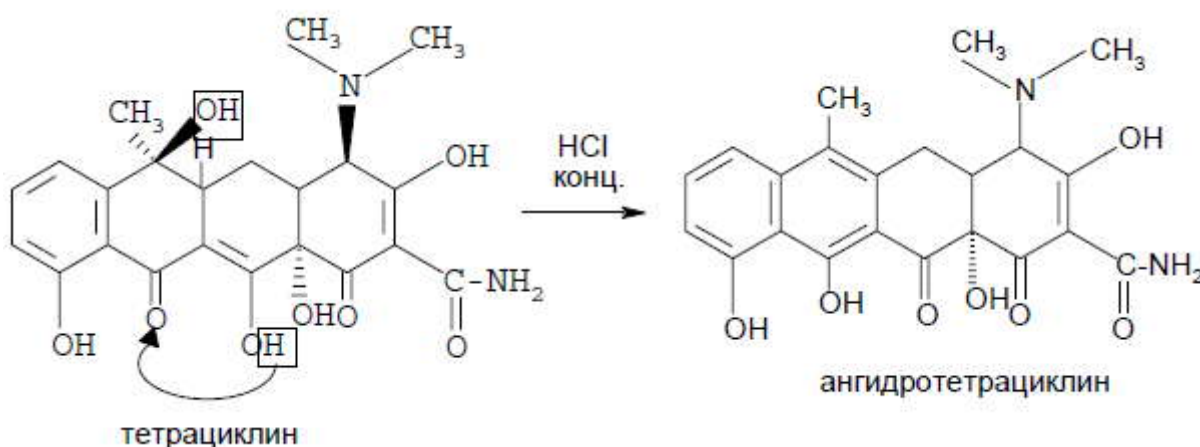
Реакция изомеризации под действием щелочи

В щелочной среде протекает изомеризация тетрациклинов с образованием окрашенных в желтый цвет флуоресцирующих продуктов. Эта реакция используется для идентификации и спектрофотометрического количественного определения тетрациклинов (λ_{max} 380 нм):



Образование ангидротетрациклина

В сильноокислой среде, например, при действии кислоты хлороводородной концентрированной, тетрациклины превращаются в ангидротетрациклины, которые имеют темно-желтую окраску ($\lambda_{\max} = 437$ нм) и желтую флуоресценцию в УФ-свете:

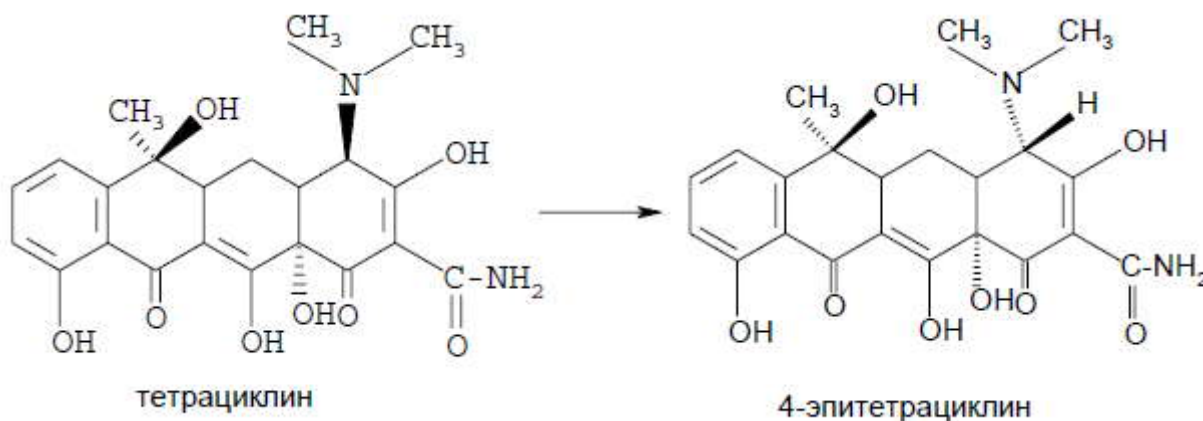


Реакция отличия тетрациклина от окситетрациклина

Для отличия тетрациклина от окситетрациклина используют кислоту серную концентрированную. На первой стадии образуется ангидротетрациклин, а затем проходит реакция окисления с образованием окрашенных в различный цвет продуктов: тетрациклины – фиолетовое окрашивание, окситетрациклины – вишнево-красное.

Анализ чистоты

Тетрациклины вследствие наличия ациклической структуры колец А, В, С их молекул, а также фенольного гидроксила неустойчивы и в процессе хранения могут образовывать неактивные или токсичные продукты: 4-эпитетрациклины, которые необходимо учитывать при оценке качества. Эти примеси можно обнаружить методом тонкослойной хроматографии с применением соответствующих стандартных образцов:



Количественное определение

Фармакопейным методом количественного определения тетрациклинов является метод диффузии в агар с тест-микробами.

Материалы к занятию № 8-9

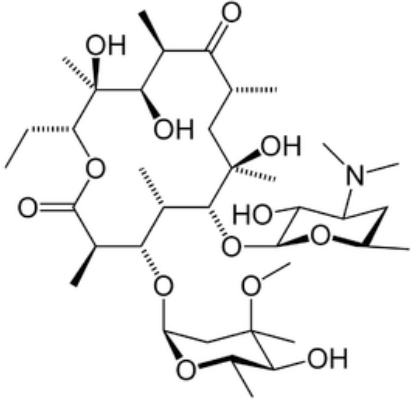
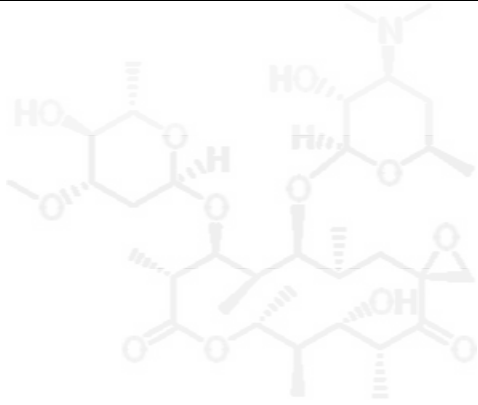
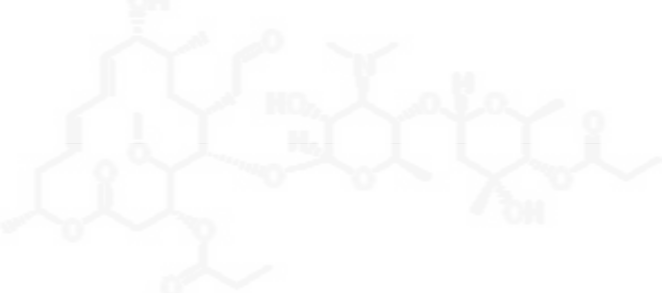

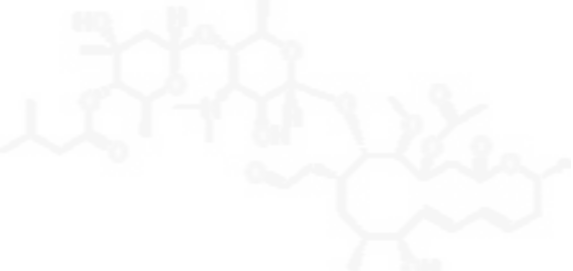
«Антибиотики группы макролидов, полипептидные антибиотики»

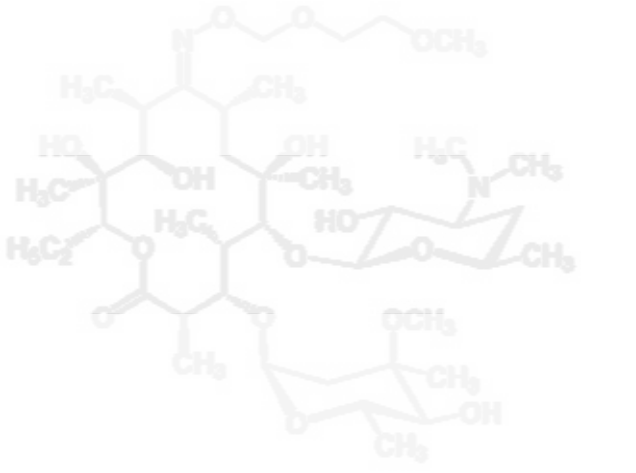
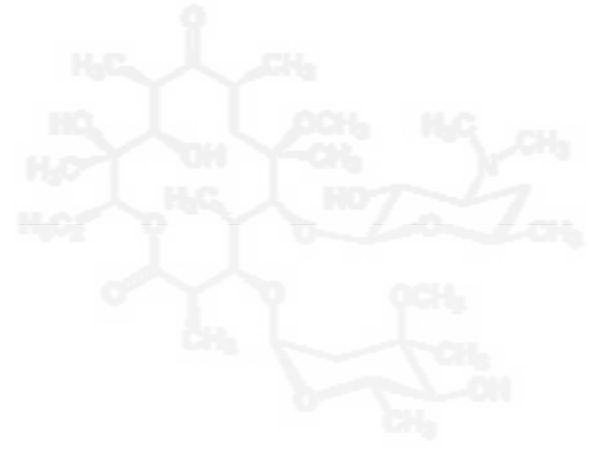
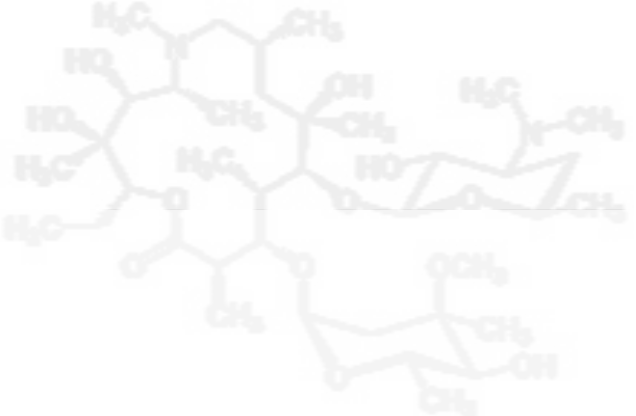
МАКРОЛИДЫ

Группа макролидов объединяет родственные по химическому строению антибиотики, основой химической структуры которых является макроциклическое 14- или 16-членное лактонное кольцо, к которому присоединены один или несколько углеводных остатков.

Различают макролиды природные и полусинтетические.

По физическим свойствам это бесцветные порошки, плохо растворимые в воде.

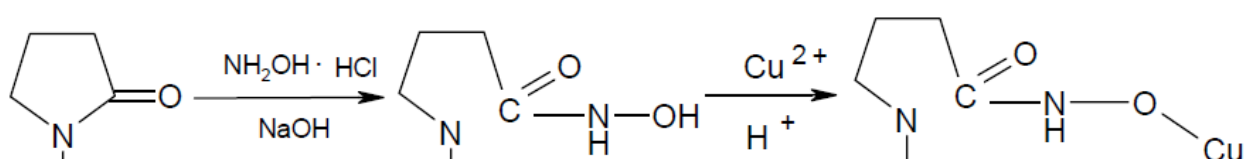
Природные 14-ти членные макролиды:	
Эритромицин	Эритромицин
	
Природные 16-ти членные макролиды:	
Мидекамицин	Спирамицин
	
Джозамицин	
	

Полусинтетические 14-ти членные макролиды:	
Рокситромицин	Кларитромицин
	
Полусинтетические 15-ти членные макролиды:	
Азитромицин	
	

Химические свойства. Реакции подлинности.

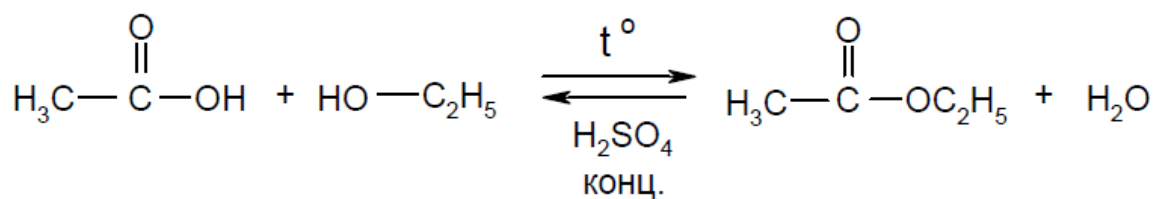
Анализ соединений группы макролидов осуществляется по функциональным группам:

1. Все лекарственные вещества данной группы, как гликозиды, подвергаются гидролитическому расщеплению в кислой среде с образованием агликона и сахаров.
2. Соединения, содержащие сложноэфирные группы или амидные группы вступают в реакцию с гидроксиламином:



Анализ соединений группы макролидов осуществляется по функциональным группам:

3. Алифатические спирты способны вступать в реакцию этерификации



Анализ подлинности

В связи с наличием центров хиральности в молекулах макролидов, в нормативной документации нормируется значение удельного вращения этих лекарственных веществ.

Для испытания на подлинность используют ИК-спектроскопию и спектроскопию протонного магнитного резонанса (ПМР-спектроскопию). ИК- и ПМР-спектры испытуемых и стандартных образцов должны быть идентичны.

Анализ чистоты. Количественный анализ.

Качественный и количественный анализ антибиотиков группы макролидов проводят методом ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии). Данный метод позволяет провести анализ примесей и определить содержание основного вещества.

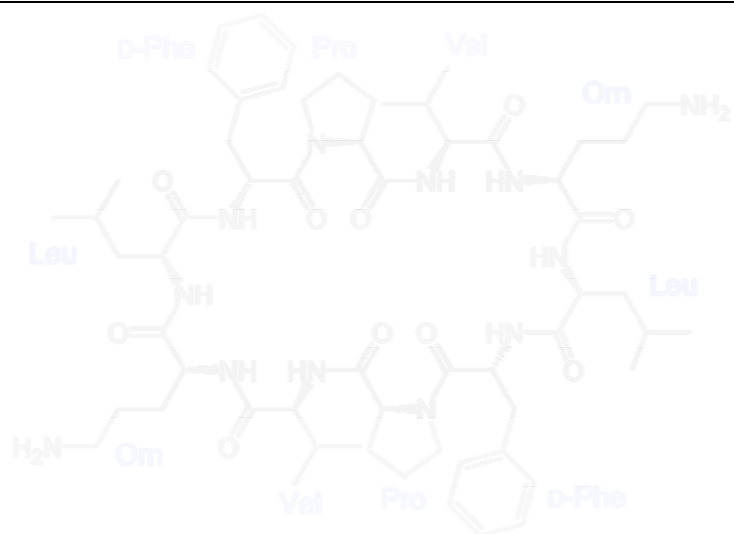
Определение активности проводят микробиологическим методом диффузии в агар с тест-культурой *Bacillus subtilis* в сравнении со стандартными образцами препаратов.

АНТИБИОТИКИ ГРУППЫ ПОЛИПЕПТИДОВ

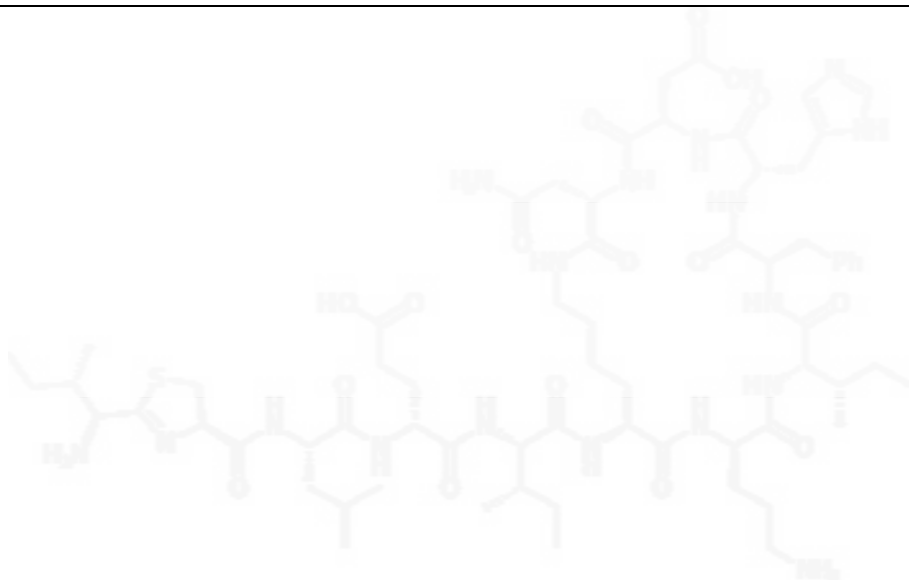
Продуцентами антибиотиков этой группы являются микроорганизмы из рода *Bacillus*. В химическом отношении это простые пептиды с молекулярной массой около 1000 Дальтон с поверхностно активными липофильными и липофобными группами внутри молекулы. Они оказывают действие на многие грамотрицательные бактерии, задерживают рост кишечной и дизентерийной палочки, брюшного тифа, паратифов, включая *Pseudomonas aeruginosa*, которые обычно нечувствительны ко многим антибиотикам.

К полипептидным антибиотикам относятся следующие вещества: полимиксин В и М, колистин, бацитрацин, флоримицин, грамицидин, тиротрицин.

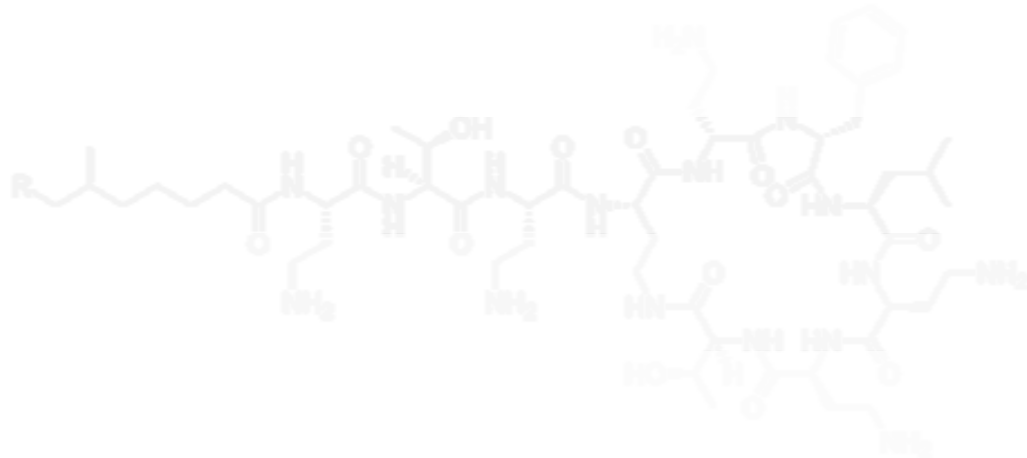
Грамицидин



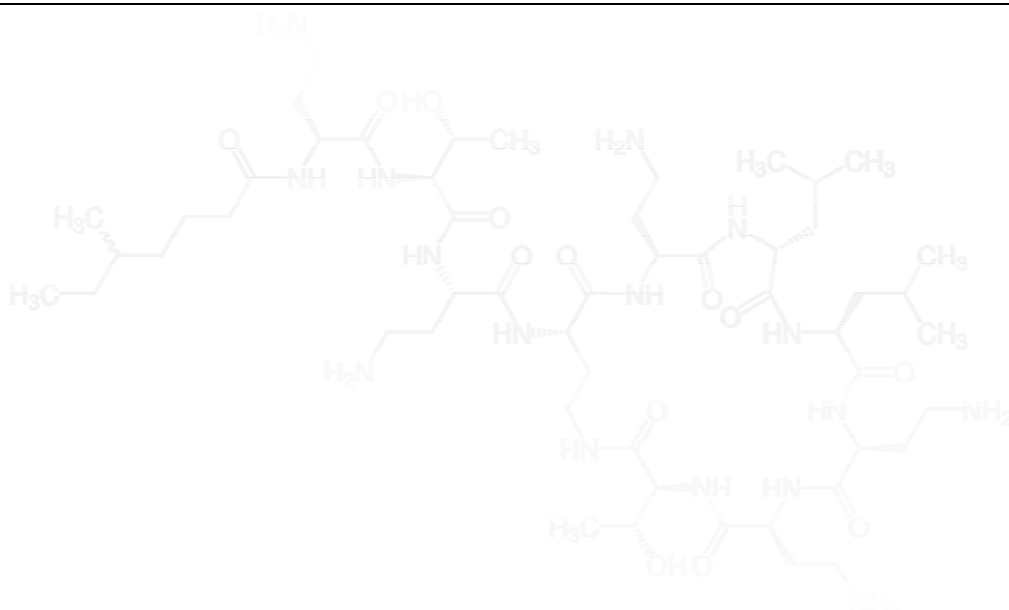
Бацитрацин



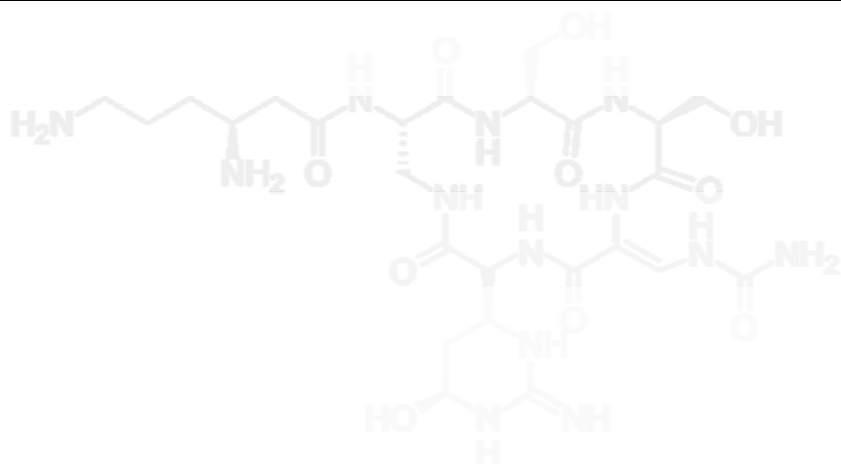
Полимиксин В



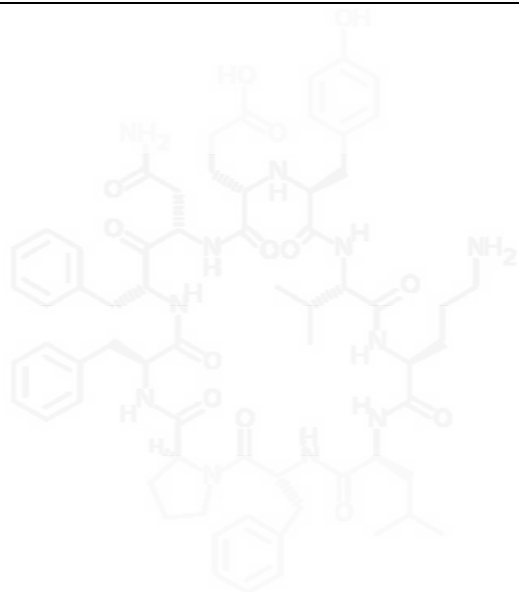
Колистин

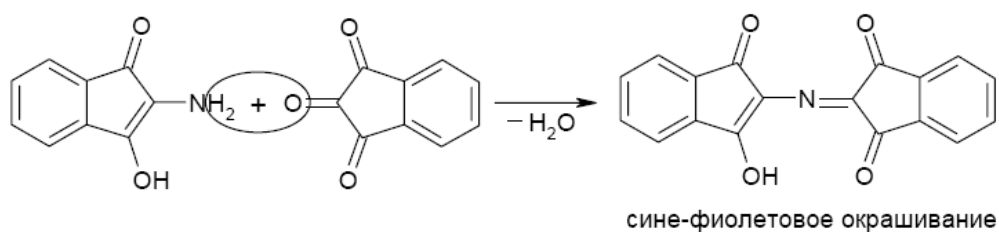
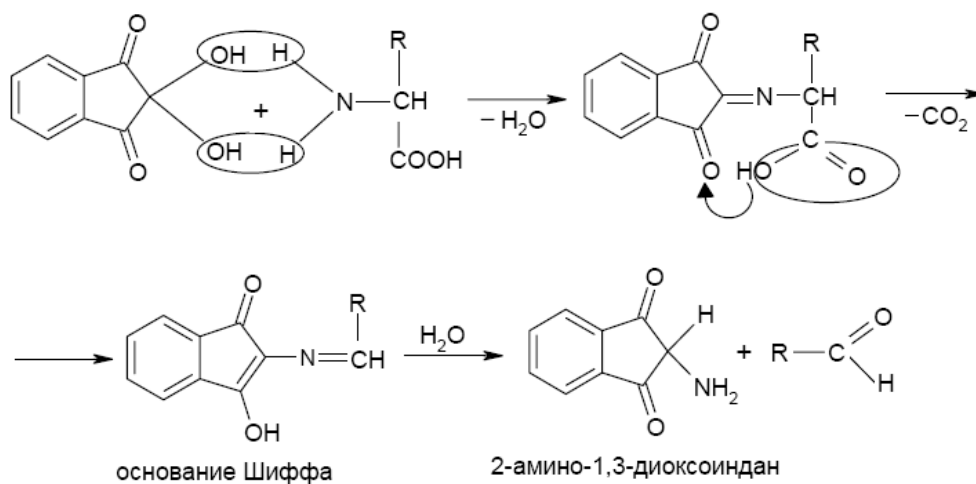


Виомицин

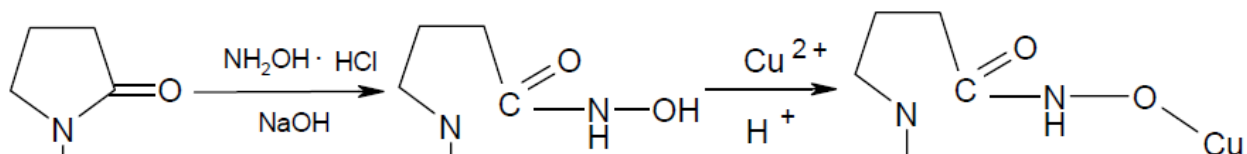


Тиротрицин



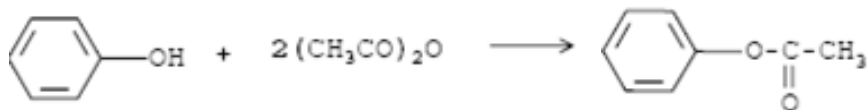


Полипептидные антибиотики вступают в гидроксамовую реакцию

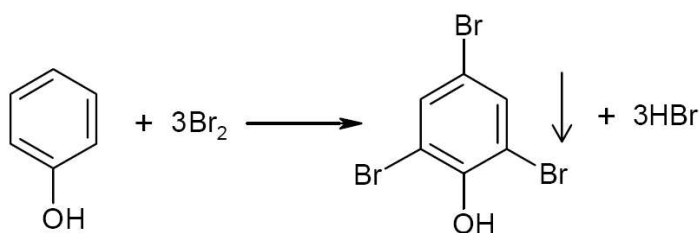


Полипептидные антибиотики содержащие фенольный гидроксил вступают в соответствующие реакции:

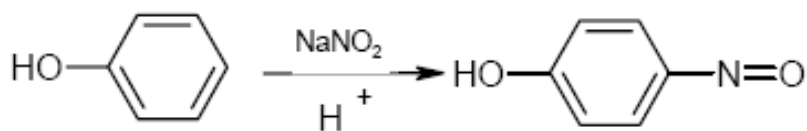
1. Взаимодействие с железа (III) хлоридом с образованием окрашенных комплексов.
2. Образование сложных эфиров:



3. Галогенирование:

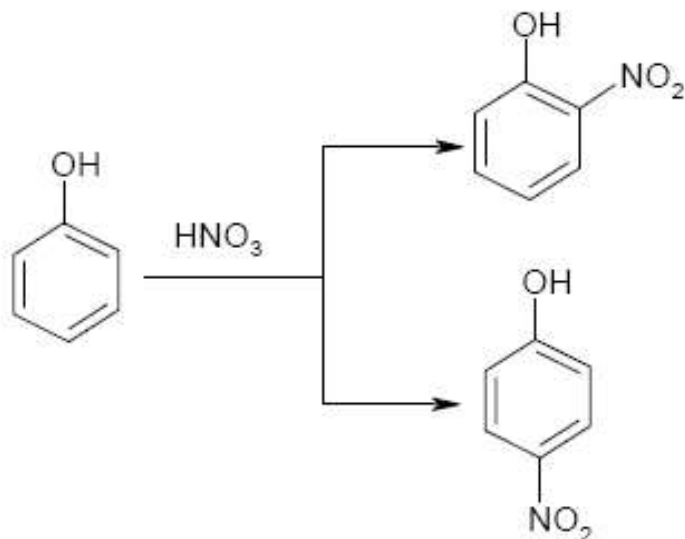


4. Нитрозирование:

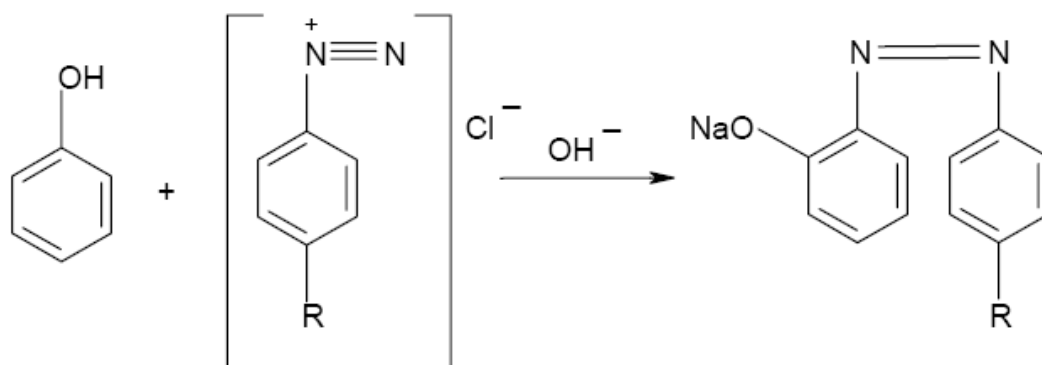


п-нитрозофенол (зеленого цвета)

5. Нитрование:

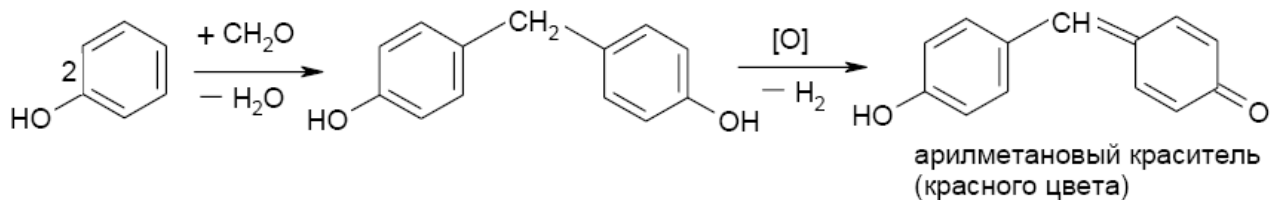


6. Реакция образования азокрасителя (цвет от желтого до вишнево-красного, в зависимости от заместителей в бензольном кольце и pH среды):

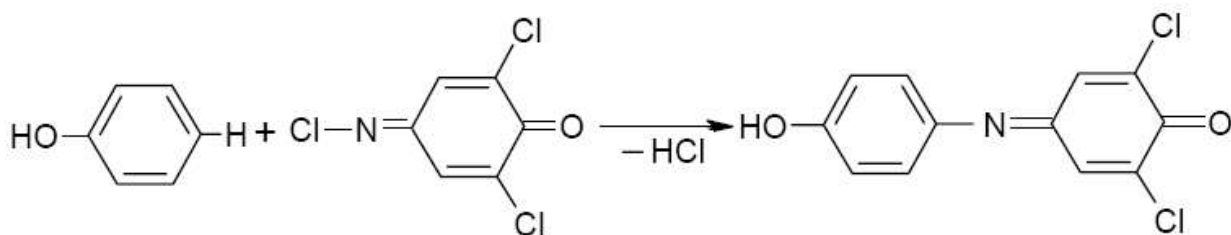


Реакция образования азокрасителя (цвет от желтого до вишнево-красного, в зависимости от заместителей в бензольном кольце и pH среды): pH среды при образовании азокрасителя не должна быть выше 9,0 – 10,0, так как в сильно-щелочной среде соль диазония образует неспособный к азосочетанию диазогидрат

7. Реакция образования арилметанового красителя, при взаимодействии с реактивом Марки (смесь концентрированной серной кислоты и раствора формальдегида)



8. Реакция образования индофенолового красителя (при наличии свободного пара-положения):



Для испытания на подлинность используют инструментальные методы: ИК-спектроскопию и спектроскопию протонного магнитного резонанса (ПМР-спектроскопию). ИК- и ПМР-спектры испытуемых и стандартных образцов должны быть идентичны.

Качественный и количественный анализ антибиотиков группы полипептидов проводят методов ВЭЖХ. Определяют примеси и соответствующий антибиотик.

Определение активности проводят микробиологическим методом диффузии в агар с тест-культурой *Bacillus subtilis* в сравнении со стандартными образцами препаратов.