

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В СОВРЕМЕННОЙ ФАРМАКОЛОГИИ

PHYSICAL METHODS USED IN MODERN PHARMACOLOGY

Евсиков Ф.Д., студент 4 курса фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия

Evsikov F.D., 4th year student of the Faculty of Pharmaceutics FSBEI HE «Voronezh State University», Voronezh, Russia

Дунилин А.Д., студент 4 курса фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия

Dunilin A.D., 4th year student of the Faculty of Pharmaceutics FSBEI HE «Voronezh State University», Voronezh, Russia

Гудкова А.А., доктор фармацевтических наук, доцент ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия

Gudkova A.A., Doctor of Pharmacy, Docent, Associate Professor FSBEI HE «Voronezh State University», Voronezh, Russia

Аннотация. В современной фармации для контроля качества сырья и выпускаемой продукции широко используются физические и физико-химические методы. В работе сделан обзор наиболее известных используемых в фармацевтическом анализе методов и оборудования, основанных на физических процессах, и показан принцип их работы.

Ключевые слова: физические методы анализа, ультразвук, микроскопический анализ, хромато-масс-спектрометрия, колориметрия, спектрофотометрия, поляриметрия, рефрактометрия.

Abstract. In modern pharmacy, physical and physico-chemical methods are widely used to control the quality of raw materials and products. The paper reviews the most well-known methods and equipment based on physical processes used in pharmaceutical analysis and shows the principle of their work.

Keywords: physical methods of analysis, ultrasound, microscopic analysis, chromat-mass spectrometry, colorimetry, spectrophotometry, polarimetry, refractometry.

Контроль качества сырья и выпускаемой продукции всегда был важной задачей, решение которой в значительной мере обеспечивает ее конкурентоспособность как на внутреннем, так и на внешнем рынках, и экономическую эффективность производства. Эти обстоятельства требуют широкого применения для контроля качества продукции современных методик. Именно поэтому в современной фармации широко используются физические и физико-химические методы.

Цель настоящей работы – сделать обзор используемых в фармацевтическом анализе методов и оборудования, основанных на физических процессах, и показать сущность их работы.

1. Ультразвуковые методы

Ультразвуковые методы – это методы, которые основаны на отражении части волн ультразвука от поверхности раздела между средами с различными акустическими свойствами. В фармации ультразвук находит применение при экстрагировании сырья, растворении труднорастворимых веществ, получении эмульсий и суспензий, изготовлении микрогранул, стерилизации и фонофорезе, производстве ампул, т.е. там, где ультразвук непосредственно контактирует через жидкую фазу с молекулой вещества [1-5].

Обычно используется ультразвуковая ванна, представляющая собой ёмкость из нержавеющей стали, ко дну или стенкам которой прикреплены пьезоэлектрические (как правило) ультразвуковые преобразователи (см. рис. 1). На преобразователи подаётся переменное напряжение соответствующей частоты с электронного ультразвукового генератора.

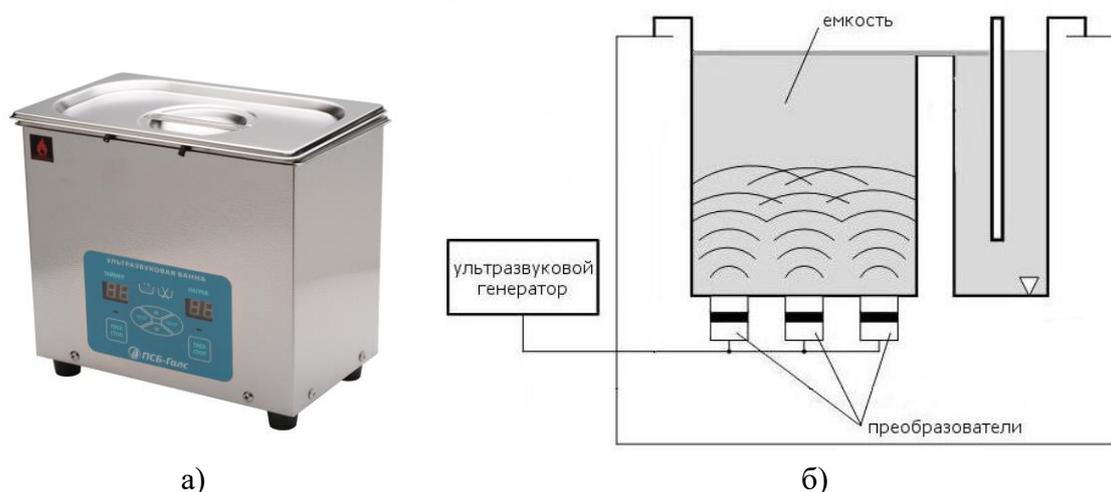


Рисунок 1 – а) Ультразвуковая ванна ПСБ 2.8 литра; б) Схема ультразвуковой ванны

При обычных условиях ультразвук, проходя через любую среду, создает в ней знакопеременное давление. В результате молекулы растворителя, исследуемые лекарственные вещества, находящиеся в жидкости различные частицы и включения должны с частотой волны повторить ее движение. Большинство лекарственных веществ – это конфигурационно сложные микрообъекты. Поэтому во время прохождения ультразвука через такую молекулу ее легкая часть колеблется в резонансе с частотой волны, а тяжелая часть отстает. В результате возникают зоны напряженности и значительные силы трения, превосходящие силы химической связи, что приводит к разрыву цельной молекулы вещества. Таким образом, в растворе могут наблюдаться явления химической деполимеризации, образование новых макрорадикалов, гомогенизация обрывков и т.д. В результате кавитационной эрозии и дробления твердых частиц под действием ультразвука возрастает поверхность контакта между растворяемым веществом и растворителем, поэтому скорость растворения значительно увеличивается. Применение низкочастотного ультразвука (22...44 кГц) в десятки и сотни раз

сокращает время экстракции флавоноидов, феногликозидов, дубильных и других веществ из различного растительного сырья.

2. Микроскопические методы анализа

Микроскопические методы анализа в фармации широко используются для качественного анализа различных образцов. Например, микроскопический анализ применяется для идентификации и определения подлинности растительного сырья, входящего в состав таблетированных лекарственных средств [6].

Приборами для микроскопического анализа служат и обычный оптический микроскоп, использующий систему линз и призм, и более сложные электронные аппараты, такие как показанный на рисунке 2 растровый микроскоп (РЭМ). РЭМ позволяет наблюдать и изучать неоднородные органические и неорганические материалы и поверхности на нанометрическом уровне. Пример изображений, полученных с помощью РЭМ, представлены на рисунке 3. Благодаря простоте интерпретации результаты исследования объектов в РЭМ могут служить исходной информацией для принятия решения по дальнейшему проведению анализа.



Рисунок 2 – Сканирующий (растровый) электронный микроскоп JEOL JSM-7600

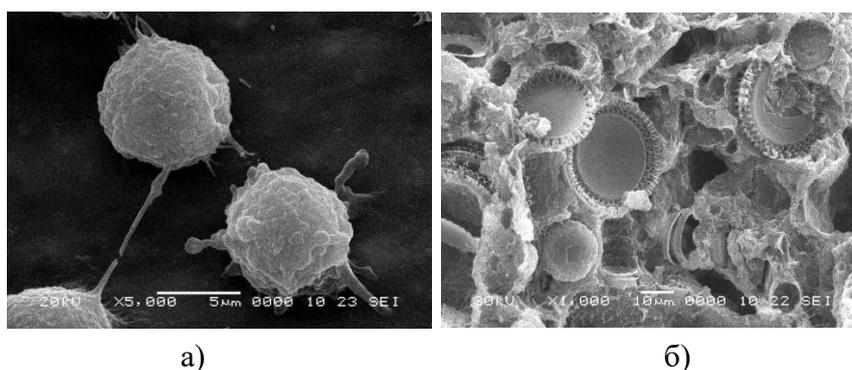


Рисунок 3 – Изображения, получаемые с помощью растрового электронного микроскопа:
а) асцитная карцинома Эрлиха; б) мел с останками микроорганизмов

На рисунке 4 показано принципиальное устройство растрового электронного микроскопа [7]. На катод подаётся ускоряющее напряжение (обычно до 40 эВ). Сформированный цилиндром Венельта пучок электронов от катода К проходит через анодную диафрагму А, затем через конденсорные и фокусирующую электронные линзы собирается в

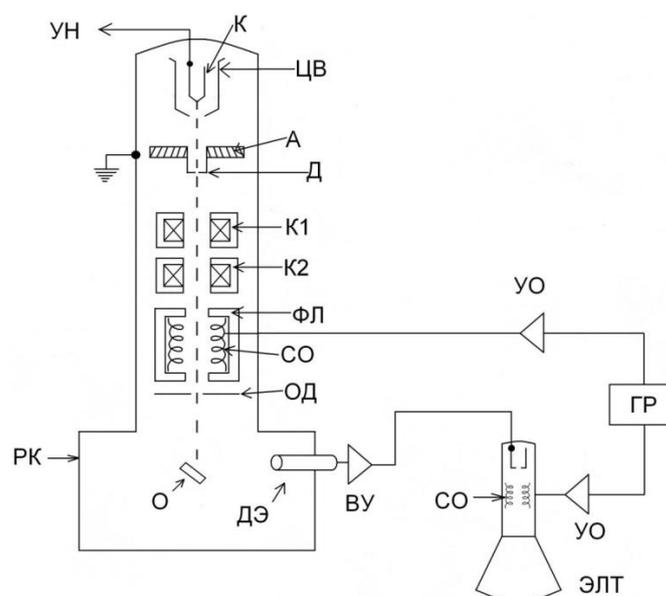


Рисунок 4 – Принципиальное устройство растрового электронного микроскопа:
 УН – ускоряющее напряжение; ЦВ – цилиндр Венельта; К – катод; А – анод; Д – диафрагма;
 К1 – 1-ая конденсерная линза; К2 – 2-ая конденсерная линза; ФЛ – фокусирующая линза;
 СО – отклоняющая система; ОД – объектная диафрагма; РК – рабочая камера; О – образец
 ДЭ – детектор электронов; ВУ – видео-усилитель; УО – усилитель отклонения;
 ЭЛТ – электронно-лучевая трубка; ГР – генератор развёртки

фокус на поверхности образца. Электронно-оптическая система юстируется так, чтобы вблизи поверхности образца диаметр пучка составлял примерно 10 нм. Часть покидающих поверхность электронов собирается детектором (коллектором) и передаётся на усилитель, выход которого управляет потенциалом модулирующего электрода электронно-лучевой трубки, влияющим на яркость пятна на мониторе видеоконтрольного устройства. Управление увеличением осуществляется регулировкой амплитуды развёртки отклоняющей системы электронно-оптической колонны, а цифровая развёртка позволяет производить накопление и обработку изображений в цифровой форме. Стереоскопический эффект в РЭМ достигается при наблюдении двух изображений одной и той же области под разным углом. Для получения стереопар используют или параллельный перенос, или наклон образца между двумя последовательными экспозициями.

3. Хроматографические методы анализа

Для определения качественного анализа фармацевтических препаратов используются также хроматографические методы. Хроматографией называется метод разделения смесей веществ, который основан на многократном перераспределении их между двумя контактирующими фазами, одна из которых неподвижна, а другая имеет постоянное направление движения. Принцип действия современных сложных хроматографических аппаратов базируется на физических процессах, связанных с движением заряженных частиц в магнитных и электрических полях.

Хромато-масс-спектрометрия (ХМС) – аналитический метод, основанный на сочетании возможностей хроматографа и масс-спектрометра, использующийся для количественного и качественного определения отдельных компонентов в сложных смесях, например, эфирных



а)



б)

Рисунок 5 – а) Хроматографический комплекс Agilent Technologies (США);
б) схема хромато-масс-спектрометра

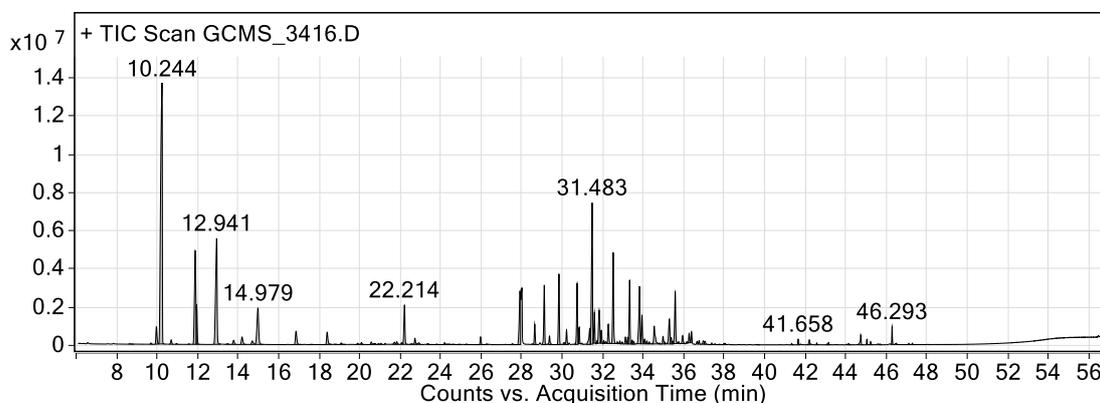


Рисунок 6 – Хроматограмма эфирного масла можжевельника, исследуемого методом ХМС

масел [8]. Фотография современного хроматографического комплекса и принципиальная схема действия хромато-масс-спектрометра приведены на рисунке 5. Проходя через хроматограф, проба разделяется на компоненты, а масс-спектрометр отвечает за их идентификацию и анализ. В зависимости от особенностей исследуемого состава и требований к точности результата, используется или высокоточная жидкостная, или газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием. Исследуемый состав вводится в испаритель хроматографа, где переводится в газообразную форму, смешивается с инертным газом-носителем и затем под давлением подается в колонку. Проходя через хроматографическую колонку, проба разделяется на компоненты, которые подаются в масс-спектрометр и пропускаются через спектрметрическую составляющую устройства. Для получения спектра, молекулы компонентов пробы ионизируются, специальный датчик считывает изменение ионного тока, на основании чего записывается хроматограмма (пример хроматограммы показан на рисунке 6). Программное обеспечение сверяет полученные пики с эталонными пиками и тем самым определяет качественное и количественное содержание компонентов препарата.

4. Оптические методы

Оптические методы анализа основаны на различных оптических свойствах вещества, таких как испускание, поглощение, рассеяние, отражение, преломление, поляризации света,

проявляющихся при взаимодействии электромагнитного излучения с веществом и зависящих от концентрации этого вещества в анализируемой системе.

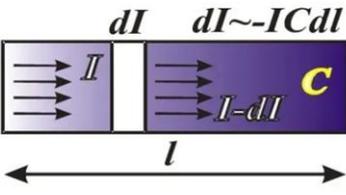
4.1. Колориметрия

Колориметрией называют методы анализа, основанные на измерении поглощения света окрашенными растворами в видимой части спектра [9]. В колориметрии используют химические реагенты, которые образуют окрашенные соединения с определяемым веществом. Сравнивая полученную окраску с окраской стандартного раствора того же вещества, определяют содержание вещества в исследуемом растворе. Интенсивность окраски раствора находится в прямой зависимости от концентрации растворенного окрашенного вещества и от толщины рассматриваемого слоя раствора. Эта зависимость выражается основным законом колориметрии: законом Бугера-Ламберта-Бера (рис. 7а).

закон Бугера—Ламберта—Бера

$$D = -\lg\left(\frac{I}{I_0}\right) = \varepsilon \times C \times l$$

D – оптическая плотность
 I, I_0 – интенсивность излучения
 ε – коэффициент экстинкции (характеризует интенсивность поглощения излучения. Чем труднее проходит свет, тем выше ε)
 C – концентрация
 l – длина кюветы





а)

б)

Рисунок 7 – а) закон Бугера-Ламберта-Бера; б) Фотоэлектроколориметр КФК-2

Визуальные методы в значительной степени субъективны, так как сравнение интенсивности окрашивания растворов проводят невооруженным глазом. Приборы, предназначенные для измерения интенсивности окраски визуальным методом, называют колориметрами. Более объективной является оценка интенсивности окраски фотоэлектрическими методами посредством фотоэлектроколориметров (рис. 7б). В фотоколориметре интенсивность окраски определяют с помощью фотоэлемента, который представляет из себя слой полупроводника, нанесенный на металлическую пластинку. Фотоэлемент преобразует световую энергию в электрическую. Световой поток, попадая на фотоэлемент, возбуждает в нем электрический ток. Возникающий в фотоэлементе ток регистрирует с включенным в цепь чувствительным гальванометром, отклонение стрелки которого пропорционально освещенности фотоэлемента. Для определения концентрации вещества измеряют оптическую плотность исследуемого раствора и стандартного раствора. Для измерения концентрации исследуемого раствора при массовых фотоколориметрических анализах пользуются градуировочной кривой, графически определяя концентрацию исследуемого раствора по его оптической плотности.

4.2. Спектрофотометрия

Спектрофотометрический анализ проводят с применением монохроматического излучения в видимом, ультрафиолетовом и инфракрасном участках спектра, что дает

возможность работать с широким диапазоном волн [10]. Спектрофотометрия, как и колориметрия, основана на законе светопоглощения Бугера-Ламберта-Бера. Приборы, применяемые в спектрофотометрии, более сложны, чем приборы, используемые в фотоколориметрии. Используемый в этом методе прибором является спектрофотометр (рис. 8а).

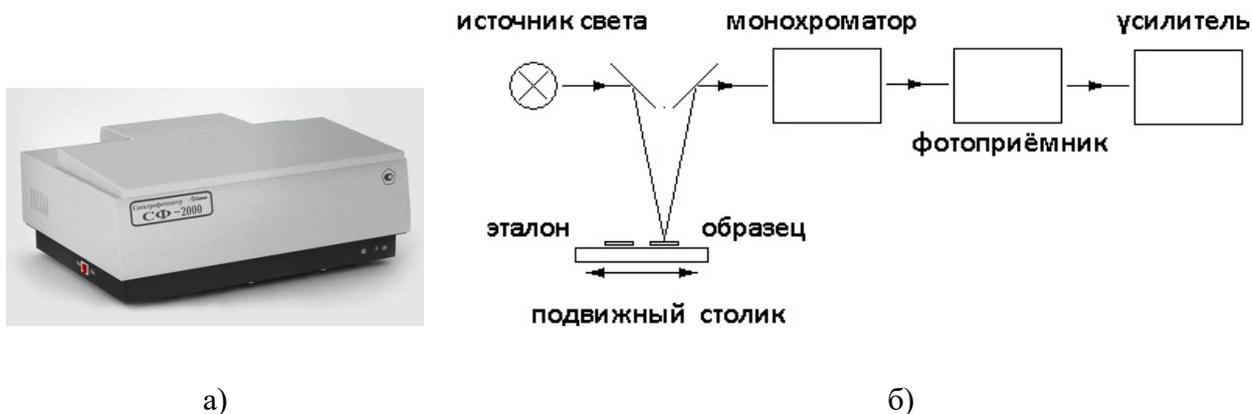


Рисунок 8 – а) Спектрофотометр СФ-2000; б) схема спектрофотометра

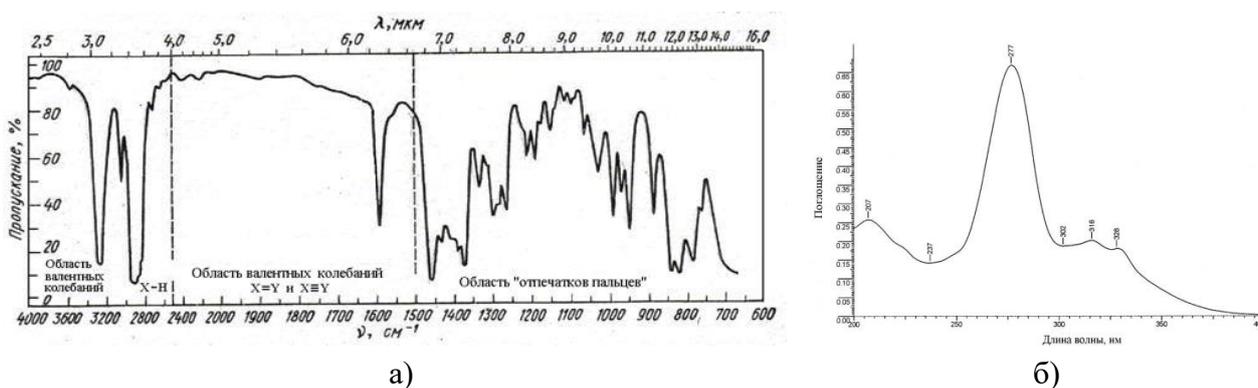


Рисунок 9 – а) ИК-спектр; б) УФ-спектр

Измерение оптической плотности проводят на указанной в соответствующей фармакопейной статье длине волны с использованием кювет с толщиной слоя 1 см при температуре $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ по сравнению с тем же растворителем или той же смесью растворителей, в которой растворено вещество. Спектрофотометры, предназначенные для измерений в ультрафиолетовой и видимой областях спектра, состоят из оптической системы, выделяющей монохроматическое излучение в области от 190 до 780 нм и обеспечивающей его прохождение через образец, и устройства для измерения оптической плотности. Основными частями спектрофотометров являются (см. рис. 8б): источник излучения, диспергирующий прибор, щель для выделения полосы длин волн, кюветы для образцов, детектор излучаемой энергии, встроенные усилители и измерительные приборы. При помощи данного метода можно определить вещества, в составе молекул которых присутствуют определенные группы – хромофоры, поглощающие электромагнитное излучение. Основным недостатком этого метода является то, что различные спектрофотометры дают значительные отклонения по величине поглощения для одного и того же стандартного раствора.

Инфракрасная спектрофотометрия – способ измерения оптической плотности исследуемого лекарственного вещества в ИК-области спектра от 780 до 2500 нм. Аналитическим инструментом для идентификации материалов этим методом, является инфракрасный спектрофотометр. Он регистрирует относительное количество поглощенной энергии как функцию длины волны на частоту ИК-излучения при прохождении через образец. Химическая структура материалов отражает индивидуальные различия в ИК-спектре поглощения. Примеры ИК- и УФ-спектрограмм показаны на рисунке 9.

4.3. Поляриметрия

Поляриметрия – метод, который используется в фармацевтическом анализе при изучении разнообразных оптически активных (способных вращать плоскость поляризации проходящего через их слой) веществ и соединений [11]. К ним относятся все энантимеры и хиральные вещества. Поляриметрический контроль за чистотой, прописан как эталонный во многих мировых стандартах. Фотография одного из существующих поляриметров и формула для определения концентрации исследуемого вещества в растворе показаны на рисунке 10. В зависимости от природы оптически активного вещества вращение плоскости поляризации может иметь различное направление и величину. Значение отклонения плоскости поляризации от начального положения, выраженное в угловых градусах, называют углом вращения и обозначают греческой буквой α . Для сравнительной оценки способности различных веществ вращать плоскость поляризации света вычисляют величину удельного вращения $[\alpha]$ (единицы измерения $^{\circ}\cdot\text{мл}\cdot\text{дм}^{-1}\cdot\text{г}^{-1}$). Удельное оптическое вращение $[\alpha]_{20D}$ представляет собой угол вращения α плоскости поляризации монохроматического света при длине волны линии D спектра натрия (589,3 нм), выраженный в градусах, измеренный при температуре 20°C , рассчитанный для толщины слоя испытуемого вещества 1 дм и приведенный к концентрации вещества, равной 1 г/мл. Измерение угла вращения проводят на поляриметре с точностью $\pm 0,02^{\circ}\text{C}$ при температуре $(20 \pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Измерения оптического вращения могут проводиться и при других значениях температуры. Шкалу обычно проверяют при помощи сертифицированных кварцевых пластинок. Линейность шкалы может быть проверена при помощи растворов сахарозы.



Поляриметрия (ОФС 42-0041-07)

- Чистоту определяют по величине удельного вращения, которое рассчитывается по формуле:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \cdot 100}{C \cdot \ell}$$

- Количественное содержание оптически активного вещества в растворе рассчитывают по формуле:

$$C = \frac{\alpha \cdot 100}{[\alpha]_D^{20} \cdot \ell}$$

Рисунок 10 – Поляриметр OFC 42-0041-07

4.4. Рефрактометрия

В аналитической и фармацевтической практике для идентификации лекарственных веществ, установления их чистоты и количественного анализа широко используется

рефрактометрический метод, который является одним из самых простых физико-химических методов анализа [12]. Рефрактометрический метод анализа обладает высокой чувствительностью, селективностью, экспрессностью, объективностью, возможностью автоматизации и компьютеризации процесса анализа. Рефрактометрический метод анализа основан на измерении показателя преломления анализируемого вещества.

Вещества, свободные от примесей, характеризуются определенным показателем преломления. Преломление света обусловлено различной скоростью распределения света в различных средах. Отношение синуса угла падения луча (α) к синусу угла преломления (β) для двух соприкасающихся называется показателем преломления (n) и является константой. Показатель преломления зависит от ряда факторов: 1) природы вещества; 2) длины волны падающего света; 3) плотности раствора; 4) природы растворителя; 5) температуры. Фактор показателя преломления F – это величина прироста показателя преломления при увеличении концентрации на каждый процент.



Рефрактометрия (ОФС 42-0040-07)

- Подлинность и чистоту определяют по показателю преломления, который должен соответствовать значениям, приведенным в частной ФС.
- Количественное содержание в однокомпонентном растворе рассчитывают по формуле:
$$C = \frac{n - n_0}{F}$$

В многокомпонентном растворе:

$$C_n = \frac{n - (n_0 + C_1F_1 + C_2F_2 + \dots + C_{n-1}F_{n-1})}{F_n}$$

Рисунок 11 – Рефрактометр OFC 42-0040-07

Используемый в этом методе прибор называется рефрактометром (рис. 11). Основной частью прибора являются призмы – измерительная и осветительная. Призмы прижаты друг к другу гипотенузными гранями. Осветительная призма имеет матовую грань, а измерительная – полированную. При определении показателя преломления исследуемой жидкости ее помещают между гранями. Лучи света проходят осветительную призму, входят в исследуемую жидкость и попадают на полированную грань измерительной призмы. Показатель преломления измерительной призмы известен. В окуляре наблюдают преломление или отражение света, при этом верхняя часть поля зрения будет освещена, а нижняя остается темной. Величину предельного угла α определяют по границе света и тени, совмещая ее с точкой пересечения линий. По шкале отсчитывают величину показателя преломления данного раствора.

В заключение следует отметить, что в работе были рассмотрены наиболее известные применяемые в фармации физические методы анализа. Очевидно, что научные открытия в физике будут стимулировать появление новых технических устройств, с помощью которых можно будет совершенствовать методы анализа, применяемые в фармакологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акопян, В.Б. Ультразвук в медицине, ветеринарии и биологии : учебное пособие для вузов / В.Б. Акопян, Ю.А. Ершов, С.И. Щукин ; под редакцией С.И. Щукина. – 3-е изд., испр. и доп. – Москва : Издательство Юрайт, 2020. – 224 с.
2. Подолина, Е.А. Ультразвуковая экстракция и УФ-спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов и дубильных веществ в надземной части василька синего / Е.А. Подолина, М.А. Ханина, О.Б. Рудаков, А.Е. Небольсин // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2018. – № 2. – С.28-35.
3. Лукашов, Р.И. Влияние ультразвука на экстракцию флавоноидов из календулы цветков / Р.И. Лукашов, Н.С. Гурина // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики. – 2021. – №10. – С.440-445.
4. Евсиков, Ф.Д. Влияние ультразвука на извлечение флавоноидов из зверобоя травы // Ф.Д. Евсиков, А.С. Чистякова, А.А. Гудкова // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: Сборник трудов 8-й Международной научно-методической конференции. Под общей редакцией А.С. Беленовой, А.А. Гудковой. – Воронеж, 2022. – С. 208-212.
5. Влияние ультразвука на извлечение БАВ из каштана цветков / Ф.Д. Евсиков, А.Д. Дунилин, А.А. Гудкова, А.С. Чистякова // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств : Сборник трудов 8-й Международной научно-методической конференции. Под общей редакцией А.С. Беленовой, А.А. Гудковой. – Воронеж, 2022. – С. 213-219.
6. Погоцкая, А.А. Идентификация растительных порошков в составе таблеток микроскопическим методом анализа / А.А. Погоцкая, Д.П. Политова / Вестник фармации. – 2020. – №1 (87). – С. 62-66.
7. Агапов, Б.Л. Растровая электронная микроскопия / Б.Л. Агапов, Т.В. Куликова. – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2018. – 28 с.
8. Хромато-масс-спектрометрия // МетаХром. – URL: <https://www.metachrom.ru/company/articles/khromato-mass-spektrometriya/> (дата обращения: 14.11.2021).
9. Харитонов, Ю.Я. Аналитическая химия. Аналитика 2. Количественный анализ. Физикохимические (инструментальные) методы анализа: учебник / Ю.Я. Харитонов. – 6-е изд., испр. и доп. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2014. – 656 с.
10. Власова, И.В. Спектрофотометрические методы в анализе лекарственных препаратов (обзор) / И.В. Власова, А.В. Шилова, Ю.С. Фокина // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2011. – Том 77, № 1. – С. 21-28.
11. Илларионова, Е.А. Метод поляриметрии. Применение в фармацевтическом анализе / Е.А. Илларионова, И.П. Сыроватский. – Иркутск: Иркутский государственный медицинский университет, 2017. – 30 с.
12. Вишневская, Т.А. Рефрактометрия в анализе лекарственных средств аптечного изготовления / Т.А. Вишневская. – Ярославль: Ярославльский медицинский техникум, 2016. – 31 с.