

Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации
Ярославский государственный университет им. П. Г. Демидова
Кафедра органической и биологической химии

А. С. Лебедев

В. Ю. Орлов

**Лабораторный контроль
лекарственных средств
в соответствии с правилами
GLP и GMP**

Учебно-методическое пособие

Ярославль
ЯрГУ
2019

УДК 661.12(075.8)
ББК Л66я73
Л33

*Рекомендовано
Редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного издания. План 2019 года*

Рецензент
кафедра органической и биологической химии ЯрГУ

Лебедев, Антон Сергеевич.
Л33 Лабораторный контроль лекарственных средств в соответствии с правилами GLP и GMP: учебно-методическое пособие / А. А. Лебедев, В. Ю. Орлов; Яросл. гос. ун-т им. П. Г. Демидова. — Ярославль: ЯрГУ, 2019. — 52 с.

Пособие знакомит студентов с основами проведения лабораторного контроля по оценке качества лекарственных средств и лекарственных препаратов, с принципами надлежащих практик GxP, основными положениями валидации аналитических методик.

По изучаемому курсу представлен комплекс лабораторных работ, позволяющий закрепить полученные знания, умения и навыки.

Предназначено для студентов, изучающих дисциплину «Организации производства и контроля качества лекарственных средств в соответствии с правилами GMP и GLP».

УДК 661.12(075.8)
ББК Л66я73

© ЯрГУ, 2019

1. Концепция надлежащих практик GxP.

Жизненный цикл лекарственных средств и препаратов

В большинстве стран стандарты надлежащих практик являются требованиями, предъявляемыми к организациям здравоохранения на этапе разработки, исследований, производства и реализации лекарственных средств (ЛС) и лекарственных препаратов (ЛП). Руководства по надлежащим практикам устанавливают стандарты качества на различных этапах «жизненного цикла» ЛС и ЛП. Понятие жизненного цикла ЛС и алгоритм его разработки были введены в 2005 г. Международным советом по гармонизации (ICH) документом ICH1 Q8. Схема жизненного цикла ЛС представлена на рис. 1.1.



Рис. 1.1. Этапы жизненного цикла ЛС и ЛП

Надлежащие практики GxP представляют собой комплекс стандартов, среди которых можно выделить следующие.

GLP — надлежащая лабораторная практика, доклинические исследования (Good Laboratory Practice);

GCP — надлежащая клиническая практика, клинические испытания (Good Clinical Practice);

GMP — надлежащая производственная практика, производство (Good Manufacturing Practice);

GSP — надлежащая практика хранения, складское дело (Good Storage Practice);

GDP — надлежащая практика дистрибуции, оптовая реализация (Good Distribution Practice);

GPP — надлежащая аптечная практика, реализация в аптеках (Good Pharmacy Practice);

GPCL — надлежащая практика для национальных лабораторий контроля качества лекарственных средств, вопросы, касающиеся разработки и регистрации лекарственных средств;

GVP — надлежащая практика фармаконадзора, набор руководящих принципов для осуществления фармаконадзора в ЕС.

В связи с этим возникает цепочка обеспечения качества, охватывающая все стадии жизненного цикла ЛС, сутью которого являются последовательность и непрерывность. Ниже рассмотрим некоторые этапы жизненного цикла ЛС и ЛП в соответствии с концепцией GxP (этапы разработки и производства).

Этап 1. Фармацевтическая разработка

Цель — создание качественного фармацевтического препарата и его производства на постоянной основе и придание ему необходимых функциональных характеристик. Ниже приведена схема, показывающая место фармацевтической разработки в структуре исследования нового, ранее неизвестного ЛП (рис. 1.2).

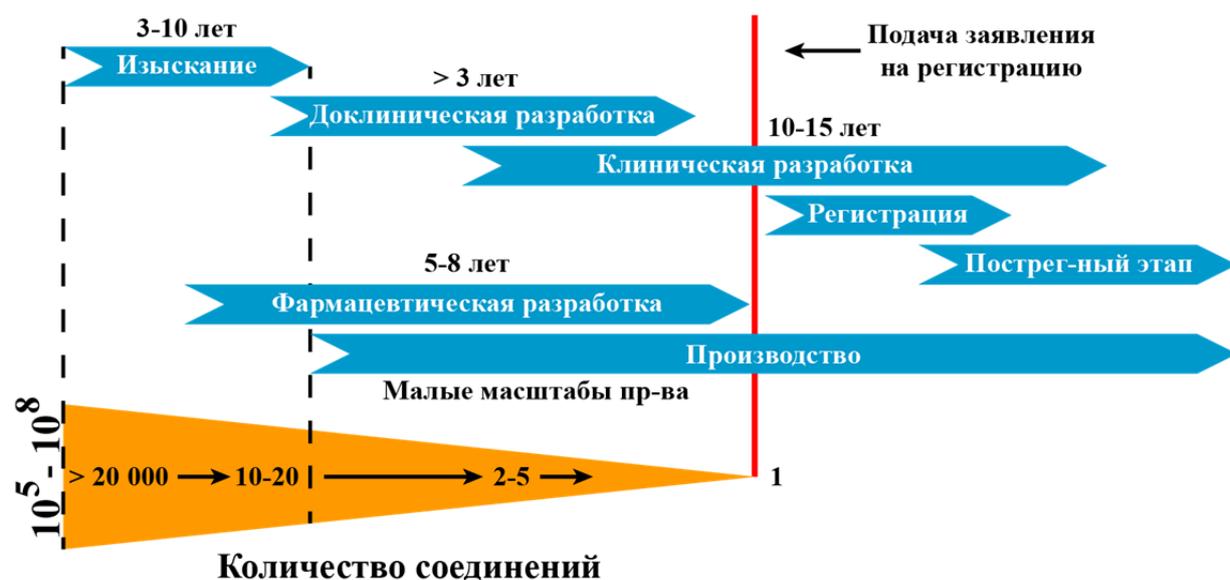


Рис. 1.2. Стадии фармацевтической разработки нового ЛС и ЛП

Фармацевтическая разработка включает в себя стадии доклинических и часть клинических исследований, разработку методов контроля, упаковки, производства (в малых масштабах) и хранения.

Основные факторы, обуславливающие создание новых ЛП, можно разделить на две группы: **медико-биологические** и **социально-экономические**.

К первым можно отнести изменения иммунной системы человека, появление новых заболеваний, увеличение резистентности возбудителей, факторы локальной и глобальной экологической обстановки и т. д.

К социально-экономическим факторам относят окончание действия патентов на уже используемые ЛП и, как следствие, возможные убытки в случае вывода конкурентами аналогичного препарата на рынок. Немаловажным аспектом выступает возможное увеличение прибыли в случае разработки нового ЛП. Еще одним социально-экономическим фактором выступает спрос и требования общества, например борьба с ВИЧ-инфекцией.

Еще до этапа фармацевтической разработки проводят «изыскание» — стадию разработки, включающую генерацию идей создания ЛП и подготовку к проведению дальнейших широкомасштабных исследований. Изыскание довольно длительно и может занимать от трех до десяти лет. По сути это различные доклинические исследования, проводимые *in vitro* («в пробирке»), *in vivo* («в живой системе») и *in silico* (компьютерное моделирование).

Фармацевтическая разработка включает этапы доклинических исследований и частично клинические исследования.

Этап 2. Доклинические испытания.

Надлежащая лабораторная практика GLP

Для рационального применения новых ЛС, достижения их максимального терапевтического действия и предупреждения побочных реакций необходимо на стадии испытаний получить всестороннюю характеристику потенциального препарата, данные обо всех его лечебных и возможных отрицательных свойствах.

Доклинические исследования (ДКИ) ЛП для медицинского применения — вид исследования, **косвенно** позволяющий определить влияние ЛП на человека, не прибегая при этом к экспериментам на человеке.

Можно выделить основные задачи ДКИ:

1. Проверка биологического действия веществ.
2. Определение биологически активных доз.
3. Выбор потенциальной стартовой дозы, режимов повышения дозы, диапазона безопасных доз, режима дозирования в клинических исследованиях.
4. Установление выполнимости предполагаемого клинического пути введения.
5. Обоснование критерия отбора пациентов.
6. Отбор физиологических показателей, подлежащих контролю при клинических исследованиях.
7. Выявление потенциальных рисков для здоровья населения.

На этапе доклинических испытаний, когда проводится изучение фармакологической активности, токсичности и других характеристик потенциальных ЛС на животных (биологических тест-системах), одной из основных задач является обеспечение объективности получаемых данных. Правила GLP определяют методологию, уровень организации и проведения доклинических исследований ЛС.

По целям ДКИ выделяют:

1. Фармакологические исследования: фармакодинамика и фармакокинетика.
2. Токсикологические исследования: общие виды токсичности, специфические виды токсичности, токсикокинетика, экологическая безопасность.

Фармакодинамика — раздел фармакологии, изучающий локализацию, механизм действия и фармакологические эффекты лекарственных средств, силу и длительность их действия. Отвечает на вопрос «**Что с пациентом?**».

Фармакокинетика — раздел фармакологии, изучающий кинетические закономерности химических и биологических процессов, происходящих с лекарственным средством в организме (абсорбция, биораспределение, метаболизм, выведение). Отвечает на вопрос «**Что с субстанцией и ЛС?**».

Правилами надлежащей лабораторной практики регламентируются требования:

- к административной структуре испытательного центра;

- квалификации и обязанностям специалистов;
- организации рабочих мест;
- документированию проводимых исследований;
- испытываемым веществам;
- эталонным препаратам.

Надлежащая лабораторная практика (GLP) охватывает организационные мероприятия и регламентирует условия, при которых экспериментальные исследования планируются, выполняются, корректируются, регистрируются, представляются в виде отчета и сохраняются в архиве.

Правила GLP применяют при проведении доклинических исследований безвредности потенциальных фармакологических, агрохимических, косметических средств, пищевых добавок, а также медицинской аппаратуры, которая имеет непосредственный контакт с тканями организма.

Внедрение правил на основе общепринятых стандартных процедур позволяет получать высококачественные, обоснованно гарантированные данные, которые взаимно признают другие страны, что предотвращает дублирование исследований, облегчает обмен информацией, способствует защите здоровья человека и окружающей среды.

Стандартизация организационных процессов и условий проведения лабораторных исследований позволяет компетентным государственным органам признавать результаты, полученные в различных странах. Использование стандартов GLP при доклинических испытаниях гарантирует безопасность последующих клинических испытаний, что в итоге способствует обеспечению качества ЛС в целом.

Этап 3. Клинические исследования.

Надлежащая клиническая практика GCP

Стандарт GCP («*Good Clinical Practice*», Надлежащая клиническая практика, ГОСТ Р 52379-2005) — международный стандарт этических норм и качества научных исследований, описывающий правила разработки, проведения, ведения документации и отчетности об исследованиях, которые подразумевают **участие человека** в качестве испытуемого (клинические исследования).

Соответствие исследования этому стандарту говорит о публичном соблюдении прав участников исследования, правил по обеспечению их безопасности, стремления к ненанесению вреда, требований к достоверности исследований.

Клиническое испытание — это любое исследование, проводимое с участием человека в качестве субъекта для выявления или подтверждения клинических, фармакологических и/или фармакодинамических эффектов исследуемого продукта(-ов), и/или выявления нежелательных реакций на исследуемый(-ые) продукт(-ы), и/ или изучения его(их) всасывания, распределения, метаболизма.

Клинические испытания предназначены для оценки терапевтической или профилактической эффективности и безопасности ЛС. Результаты клинических испытаний позволяют определить наиболее рациональные дозировки и схемы применения ЛС, его взаимодействие с другими средствами, выявить преимущество одного препарата перед другим.

Этап 4. Производство лекарственных средств. Надлежащая производственная практика GMP

Good Manufacturing Practices (GMP) — надлежащая производственная практика — это единая система требований по организации производства и контролю качества лекарственных средств от начала переработки сырья до получения готовых продуктов, включая общие требования к помещениям, оборудованию, персоналу и т. д.

GMP включает обширный ряд показателей (требований), которым должны соответствовать предприятия, выпускающие фармацевтическую продукцию. В нем максимально учтены факторы, оказывающие влияние на качество ЛС, а именно: здания и помещения, персонал, оборудование, организация и ведение технологического процесса, документация, контроль процесса производства, контроль качества готового продукта и т. д.

GMP можно рассматривать как часть концепции обеспечения качества, гарантирующую последовательную выработку и контроль продуктов по стандартам качества, соответствующим их применению (по назначению) и требованиям регистрационного досье.

GMP — система норм, правил и указаний в отношении производства лекарственных средств, медицинских устройств, изделий диагностического назначения, продуктов питания, пищевых добавок и активных ингредиентов. В отличие от процедуры контроля качества путем исследования выборочных образцов таких продуктов, которая обеспечивает пригодность к использованию лишь самих этих образцов (и, возможно, партий, изготовленных в ближайшее время), стандарт GMP отражает целостный подход, регулирует и оценивает собственно параметры производства и лабораторной проверки.

Правила GMP

Правила GMP регламентируют следующие положения: организационную структуру предприятия; обязанности отдела контроля качества; квалификацию персонала; характеристики зданий, помещений и оборудования; особенности проведения контроля компонентов и укупорочных материалов ЛС; организацию технологического процесса; критерии оценки и использования маркировочных материалов; операции по упаковке и маркировке; сроки годности, хранения и отгрузки; регистрацию, лабораторный контроль (анализ физико-химических параметров, определение стабильности, хранение стандартных образцов, содержание лабораторных животных) и отчетность.

2. Валидация аналитических методик

Валидация (Validation) — документально оформленные действия, дающие высокую степень уверенности в том, что методика, процесс, оборудование, материал, операция или система соответствуют заданным требованиям и их использование будет постоянно приводить к результатам, соответствующим **заранее установленным критериям приемлемости**.

Объективное свидетельство, необходимое для валидации, является результатом испытания или других форм определения, таких как осуществление альтернативных расчетов или анализ документов. На рис. 2.1 приведены основные этапы валидации.

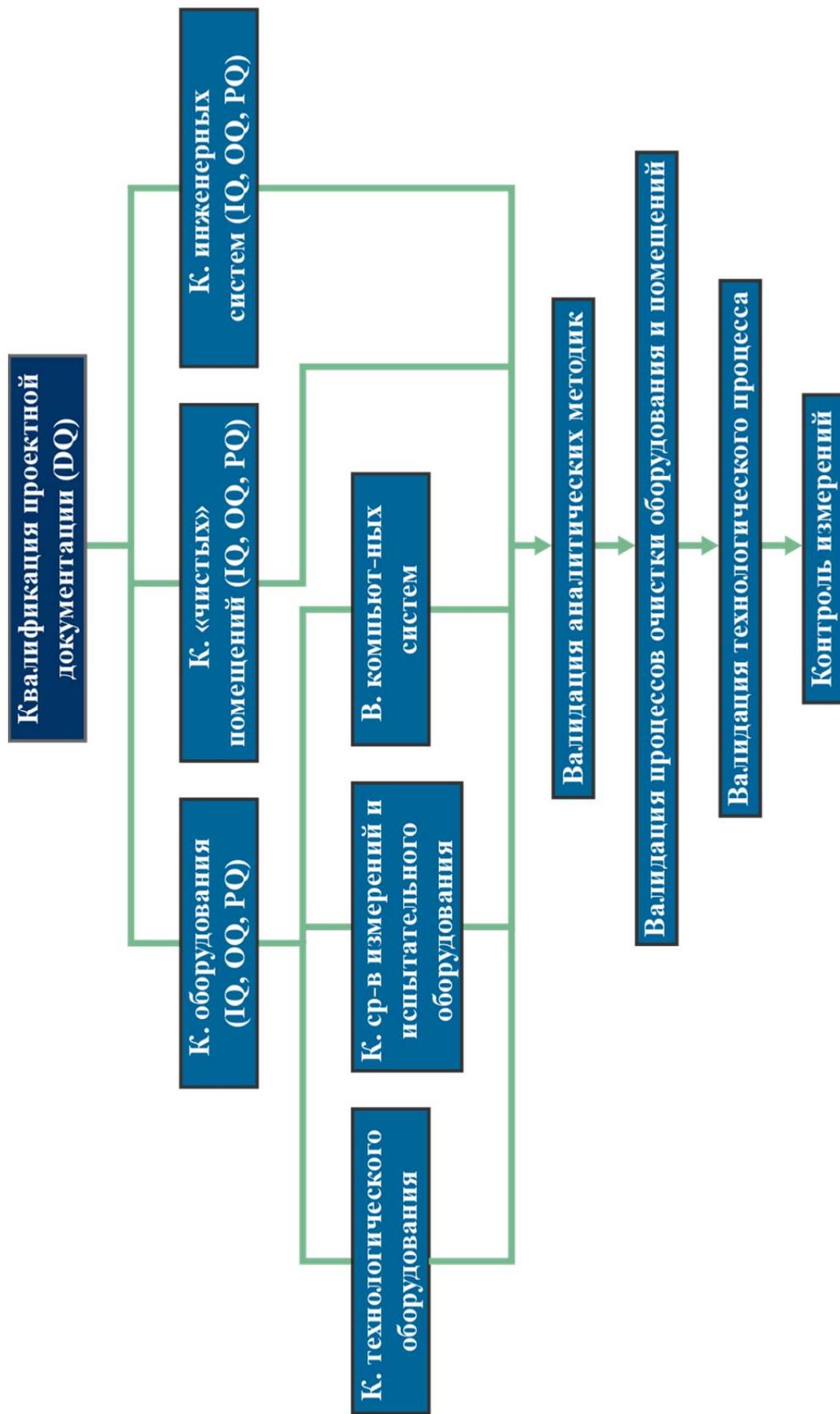


Рис. 2.1.1. Этапы валидации

Для понимания сущности термина «валидация» следует соотносить его с понятиями «квалификация» и «верификация».

Термин «квалификация», как правило, применяется к оборудованию и помещениям. Исключением являются лишь компьютеризированные системы, для которых используют термин «валидация». Валидацию применяют, как правило, к различного рода процессам, таким как процессы анализа, очистки, производства, а также к компьютеризированным системам (табл. 1).

Теперь следует привести более четкие определения понятий «валидация» и «верификация», которые несколько отличаются от представленных в нормативных документах.

Валидация — действия, доказывающие, что процессы (процедуры, оборудование, системы) работают в соответствии с ожиданиями и позволяют получить нужные результаты.

Верификация — разовый процесс, призванный подтвердить заявленные характеристики системы перед использованием.

Таблица 1

Применимость понятий «валидация» и «квалификация»

Элемент фармацевтического производства	Квалификация	Валидация
Проектная документация	+	
Производственные помещения, «чистые» помещения и зоны, складские помещения и др	+	
Инженерные системы, непосредственно влияющие на качество производимой продукции (воздухо- и водоподготовка и др.)	+	
Технологическое и контрольно-измерительное оборудование	+	
Аналитические методики		+
Технологический процесс		+
Вспомогательные процессы (процессы очистки оборудования, уборки «чистых» помещений)		+
Компьютеризированные системы		+

При валидации необходимо разрабатывать собственные требования, спланировать и провести экспериментальную работу для **определения** характеристик процесса или метода (с целью доказать совместимость с требованиями). При верификации необходимо **подтвердить** уже существующие характеристики и принять решение о том, подходят они нам или нет.

В случае валидации разработка, трансфер, воспроизводство метода или процесса лежит на нас. И мы определяем нужные нам параметры, проводим получение данных, обработку и сравниваем с теми изначальными требованиями, которые мы установили. В случае верификации требования уже выставлены, и мы определяем, проходит ли процесс или методика по ним путем испытаний (получение объективных доказательств).

Таким образом, понятие «верификация» также является инструментом и частью процесса валидации.

Валидация методик

Основные положения по валидации аналитических методик изложены в следующих документах.

ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик.

ICH Q2 (R1). Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств (Validation of analytical procedures: Text and Methodology).

Рассматриваются подходы к валидации следующих типов аналитических методик:

1. Испытания на идентификацию (подлинность).
2. Испытания для определения количественного содержания примесей (quantitative tests for impurities content).
3. Испытания для определения предельного содержания примесей в пробе (limit tests for the control impurities).
4. Количественные испытания (на содержание или активность) (quantitative tests of the active moiety) для определения активной части молекулы действующего вещества в испытуемом образце.

При валидации проводится оценка аналитической методики по следующим характеристикам: специфичность, предел обнаружения (ПОМ), предел количественного определения (ПКО), линейность, аналитическая область, правильность, прецизионность, устойчивость.

Валидация различных типов аналитических методик

Наименование характеристики	Основные типы методик			
	Испытание на подлинность	Посторонние примеси		Количественное содержание основного действующего в-ва, нормируемых ком-в
		Колич. методики	Предел содержания	
Специфичность**	Да	Да	Да	Да
ПОМ	Нет	Нет****	Да	Нет
ПКО	Нет	Да	Нет	Нет
Линейность	Нет	Да	Нет	Да
Аналитическая область (диапазон применения)	Нет	Да	Нет	Да
Правильность	Нет	Да	*	Да
Прецизионность: - повторяемость - внутрилаб. прецизионность	Нет	Да	Нет	Да
	Нет	Да***	Нет	Да***
Устойчивость (робастность)	Нет	*		

* — Может определяться при необходимости.

** — Отсутствие специфичности одной аналитической методики может быть компенсировано использованием другой аналитической методики.

*** — Если определена воспроизводимость, определение промежуточной прецизионности не требуется.

**** — Может потребоваться в некоторых случаях (например, когда предел обнаружения и нормируемый предел содержания определяемой примеси близки).

Рассмотрим указанные характеристики более подробно.

Специфичность (specificity)

Способность аналитической методики однозначно оценивать определяемое вещество при наличии сопутствующих компонентов.

Изучение специфичности необходимо осуществлять в ходе валидации испытаний на идентификацию, примеси и количественное определение (все типы методик). Процедуры подтверждения специфичности зависят от целевого назначения аналитической методики.

Доказательство специфичности валидируемой методики обычно основывается на рассмотрении полученных с ее использованием данных анализа модельных смесей известного состава. Специфичность валидируемой методики может быть доказана также соответствующей статистической обработкой результатов анализов реальных объектов, выполненных с ее использованием, и, параллельно, с использованием другой, заведомо специфичной методики (специфичность которой доказана).

Специфичность для различных видов испытаний означает следующее.

1. При **испытании на идентификацию** — подтверждение того, что методика позволяет идентифицировать именно определяемое вещество.

2. При **испытании на примеси** — подтверждение того, что методика позволяет правильно распознать примеси в образце (например, испытание на родственные соединения, тяжелые металлы, содержание остаточных растворителей и т. д.).

3. При **количественных испытаниях** — подтверждение того, что методика позволяет установить содержание или активность именно определяемого вещества в образце.

Примеры тестов на специфичность:

1. Качественные реакции (не всегда высокая специфичность, часто требуется дополнительное подтверждение).

2. Определение физико-химических констант (в основном для субстанций): температура плавления, показатель преломления, температура кипения (для растворителей), рН раствора, тесты на растворимость и т. д.

3. Физико-химические методы: ИК-спектроскопия, УФ-спектроскопия (идентичность спектров, идентичность максимумов), ВЭЖХ (время удерживания, сигнальные отношения, соответствие спектральных характеристик) и т. д.

Предел обнаружения методики (limit of detection)

Наименьшее количество (концентрация) определяемого вещества в образце, которое может быть обнаружено (или приближенно оценено) с использованием валидируемой методики.

Возможны различные подходы к определению предела обнаружения в зависимости от того, является методика инструментальной или неинструментальной. Выделяют визуальную оценку, оценку по соотношению «сигнал/шум», по стандартному отклонению сигнала и наклону калибровочной кривой, по стандартному отклонению калибровочного раствора.

Визуальная оценка может использоваться как для неинструментальных, так и для инструментальных методик. Предел обнаружения устанавливается путем анализа проб с известными концентрациями определяемого вещества и определения его минимального содержания, при котором оно достоверно обнаруживается (положительный контроль).

Подход по соотношению «сигнал/шум» применим только к аналитическим методикам, для которых наблюдается шум базовой линии. Определение отношения «сигнал/шум» проводится методом сравнения сигналов, полученных от проб с известными низкими концентрациями, с сигналами, полученными от **холостых проб**, и установления минимальной концентрации, при которой определяемое вещество может быть достоверно обнаружено. Для оценки предела обнаружения приемлемой считается величина отношения «сигнал/шум» от **3:1** до **2:1**.

При оценке ПОМ (LOD) по наклону калибровочной кривой применяется следующая формула (1):

$$LOD = 3.3 * \frac{S_y}{b} \quad (1)$$

S_y — стандартное отклонение аналитического сигнала (амплитуда, площадь и т. д.);

b — тангенс угла наклона калибровочной кривой.

Оценка ПОМ может проводиться и по стандартному отклонению холостой пробы. При этом измеряется величина аналитического сигнала для достаточного количества холостых проб и рассчитывается стандартное отклонение (2) их значений (S):

$$S = \sqrt{S^2} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}{n-1}} \quad (2)$$

S^2 — выборочная дисперсия;

$n - 1$ — число степеней свободы;

Y_i — действительное значение сигнала.

При оценке ПОМ по стандартному отклонению калибровочного раствора следует провести анализ одного и того же стандартного раствора 8–20 раз. Концентрация стандартного раствора должна соответствовать сигналу, который примерно в 5–20 раз больше уровня шума (лучше брать концентрации в большую сторону, нежели в меньшую), или самой маленькой концентрации калибровочного раствора. На основе полученной выборки вычисляется стандартное отклонение сигнала (S_y).

Предел количественного определения (limit of quantification)

Наименьшее количество вещества в образце, которое можно количественно определить с соответствующей прецизионностью и правильностью.

Предел количественного определения является необходимой валидационной характеристикой методик, используемых для определения низких содержаний веществ в образце, в частности для определения примесей и/или продуктов деградации. При оценке ПКО используются те же подходы, что и для ПОМ.

При визуальной оценке проводят испытания образцов с различными известными количествами (концентрациями) анализируемого вещества и устанавливают минимальное значение, при котором результат анализа может быть оценен визуально с требуемой правильностью и прецизионностью.

Для оценки ПКО по соотношению «сигнал/шум» приемлемой считается величина отношения **10:1**.

При оценке ПКО (LOQ) по наклону калибровочной кривой применяется следующая формула (3):

$$LOQ = 10 * \frac{S_y}{b} \quad (3)$$

Линейность методики (linearity)

При валидации методики ее линейность в аналитической области проверяют экспериментально измерением аналитических сигналов для не менее чем **5 проб с различными количествами или концентрациями** определяемого вещества (если проб меньше, то такой подход должен быть обоснован).

В большинстве случаев используют линейные зависимости, отвечающие условию $R_{XY} \geq 0.99$ (R_{XY} — коэффициент корреляции Пирсона), и только при анализе следовых количеств допускается рассматривать линейные зависимости, для которых $R_{XY} \geq 0.90$.

По полученным данным строят график зависимости сигнала от концентрации или от количества определяемого компонента и визуально оценивают его линейность (прикидочное суждение). Если линейная зависимость наблюдается, то результаты обрабатывают подходящим статистическим методом, например методом наименьших квадратов.

Аналитическая область методики (range)

Интервал между верхним и нижним значением аналитических характеристик определяемого компонента в объекте анализа (его количества, концентрации, активности и т. п.). В этом интервале результаты, получаемые с использованием валидируемой методики, должны иметь приемлемый уровень правильности и прецизионности. Диапазон применения методики зависит от ее назначения и определяется при изучении линейности.

Минимально допустимые диапазоны применения методик:

1. Для количественного определения активной субстанции или готового лекарственного препарата: как правило, от 80 % до 120 % от номинального содержания.

2. Для однородности дозирования: от 70 % до 130 % от номинального содержания, если для испытания не требуется более широкий интервал, обусловленный свойствами лекарственной формы (например, дозированные ингаляторы).

3. Для испытаний на растворение: $\pm 20\%$ (абсолютных) от нормируемой величины высвобождения. Например, если при контроле высвобождения пролонгированных лекарственных препаратов нормируемая величина высвобождения составляет от 20 % за первый час и до 90 % за 24 ч, то диапазон применения должен быть от 0 % до 110 % от номинального содержания.

4. Для определения примесей: от концентрации, в которой примесь обычно обнаруживается (или от ПКО), до 120 % от нормируемого содержания.

Правильность (trueness)

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное. Валидируемая методика признается правильной, если значения, принимаемые за истинные, лежат внутри доверительных интервалов соответствующих средних результатов анализов, полученных экспериментально по данной методике. Правильность должна быть установлена для всего диапазона применения аналитической методики.

Для оценки правильности методик количественного определения применимы следующие подходы:

1. Анализ с использованием валидируемой методики **стандартных образцов или модельных смесей** с известным содержанием (концентрацией) определяемого вещества.

2. **Сравнение** результатов, полученных с использованием валидируемой методики и **образцовой методики**, правильность которой ранее установлена.

3. Использование **метода стандартной добавки** (внесение в образец известного количества или концентрации вещества).

4. Рассмотрение результатов изучения линейности валидируемой методики: **если свободный член (интерсепт) в линейной модели аппроксимации статистически достоверно не отличается от нуля, то использование такой методики дает результаты, свободные от систематической ошибки.**

Правильность оценивают не менее чем для девяти определений для трех различных концентраций, охватывающих весь диапазон применения, т.е. **три концентрации и три повтора** для каждой концентрации, при этом должны проводиться все стадии методики.

Прецизионность (precision)

Степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных регламентированных условиях (степень рассеивания результатов относительно среднего значения).

Выделяют: повторяемость, промежуточную прецизионность и воспроизводимость.

Повторяемость (сходимость) — характеристика прецизионности в условиях минимального варьирования влияющих факторов внутри лаборатории (тот же образец, тот же оператор, то же оборудование и реактивы, короткий промежуток времени).

Воспроизводимость — характеристика прецизионности, используемая для характеристики рассеяния результатов в условиях межлабораторного эксперимента (тот же образец, разные операторы, разное оборудование и реактивы). Повторяемость и воспроизводимость являются **крайними случаями прецизионности** и отвечают минимальной и максимальной вариативности условий эксперимента.

Также выделяют **внутрилабораторную воспроизводимость** (промежуточную прецизионность, внутрилабораторную прецизионность).

Промежуточная прецизионность подразумевает выполнение серии анализов одного и того же образца, в одной лаборатории при вариации различных факторов: разное время анализа, разные операторы, разные партии реактивов одного и того же вещества, разные приборы и т. п.

Результаты оценки методики анализа по каждому из вариантов прецизионности обычно характеризуются соответствующим значением **величины стандартного отклонения результата отдельного определения**.

Обычно при разработке оригинальной методики определяется повторяемость (сходимость) результатов, получаемых с ее использованием. При необходимости включения разработанной методики в нормативную документацию дополнительно определяется ее внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность. Межлабораторная прецизионность (воспроизводимость) методики оценивается при предполагаемом ее включении в проект общей фармакопейной статьи или в нормативную документацию на фармакопейные стандартные образцы.

Устойчивость (robustness)

Способность сохранять найденные для нее в оптимальных (номинальных) условиях характеристики, приведенные в таблице, при вероятных небольших отклонениях от этих условий проведения анализа.

Устойчивость должна изучаться только в тех случаях, когда валидируемая методика основана на использовании особо чувствительных к внешним условиям методов анализа, таких как различные виды хроматографии (ВЭЖХ, ВЭКЭ, ГХ) и функционального анализа. При необходимости оценка устойчивости методики проводится на стадии ее разработки. Если вероятна невысокая устойчивость методики, проверка ее пригодности осуществляется в обязательном порядке непосредственно в процессе практического использования.

Примеры типичных изменений:

1. Стабильность растворов, используемых в аналитических методиках.

2. Время экстрагирования.

Для ВЭЖХ:

1. Изменение рН подвижной фазы.

2. Изменение состава и силы подвижной фазы.

3. Разные колонки (разные серии и поставщики).

4. Температура.

5. Скорость потока и т. д.

Для газовой хроматографии:

1. Различные колонки (разные серии и поставщики).

2. Температура термостата.

3. Скорость газа-носителя и т. п.

В ряде случаев для методик, системы или процесса требуется проводить повторную валидацию (ревалидацию). **Ревалидация** может быть необходима в следующих случаях (при этом ими не ограничивается):

- изменение схемы синтеза фармацевтической субстанции;
- изменение состава лекарственного препарата;
- изменение аналитической методики.

Повторная валидация не проводится, если производителем представлено соответствующее обоснование. Объем повторной валидации зависит от характера внесенных изменений.

ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

Лабораторная работа 1

1.1. Идентификация ароматических карбоновых кислот при помощи качественных реакций

Цель работы: установить присутствие ароматической карбоновой кислоты в испытуемом растворе.

Реактивы: растворы бензойной ($c = 500$ мг/л), 4-гидроксибензойной ($c = 500$ мг/л), салициловой ($c = 500$ мг/л) кислот, раствор хлорида железа(III) 6-водного ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $c = 1$ г/л), гидроксид натрия (NaOH ; $\omega = 15\%$).

Оборудование: пипетки, пипет-дозаторы, пробирки, штатив для пробирок, пузырьки объемом 10 мл, термометры, термостойкие химические стаканы, бюксы, мерные колбы на 100 мл, водяная баня, электроплитка, шпатели, аналитические весы.

Ход работы

Приготовление растворов ароматических кислот 500 мг/л

Дистиллированная вода предварительно подогревается до кипения. На аналитических весах взвешивают 100 мг ароматической кислоты. Навеску количественно переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл сначала при помощи 5 мл ДМФА и 0.25 мл NaOH ($\omega = 15\%$), а затем при помощи горячей дистиллированной воды ($t = 70\text{--}90$ °С). Раствор до метки не доводят. При необходимости раствор можно нагреть до растворения осадка на водяной бане или в токе горячей водопроводной воды. Раствор доводят до метки дистиллированной водой, перед этим раствор охлаждают до комнатной температуры.

Приготовление раствора железа (III) 6-водного хлористого 1 г/л

На аналитических весах взвешивают 100 мг $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Навеску количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл при помощи дистиллированной воды. Объем до метки доводят дистиллированной водой.

Приготовление раствора сравнения

В пустую пробирку или пузырек последовательно приливают 3 мл дистиллированной воды, а затем 3 мл раствора $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 1$ г/л). Полученный раствор перемешивают.

Определение ароматических кислот

В каждую из трех пробирок (или пузырьков) вносят последовательно 3 мл раствора $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 1$ г/л) и 3 мл ароматической кислоты. Полученные растворы перемешивают. В случае прозрачного раствора к нему добавляют еще 3 мл ранее вносимой ароматической кислоты или ждут 5–7 минут. Наблюдают за изменением окраски растворов. Определяют, в какой пробирке находится бензойная, 4-гидроксibenзойная и салициловая кислоты. При оформлении работы необходимо объяснить протекание соответствующих реакций, нарисовать схемы превращений.

Контрольные вопросы

1. Для чего проводится добавление ДМФА? Почему ДМФА нужно вносить вначале?
2. В каких случаях было отмечено визуальное протекание реакций? Что за реакции вы наблюдали в ходе работы?
3. Что является лигандом и комплексообразователем при протекании реакций с ароматическими карбоновыми кислотами?
4. Почему 4-гидроксibenзойная кислота не образует комплексное соединение того же или схожего цвета, что и салициловая кислота?
5. Что такое монодентатные и полидентатные лиганды? Приведите примеры лигандов и соединений.
6. Что такое хелаты?
7. Для чего нужен отрицательный контроль?
8. Покажите комплексообразователь, лиганд, внешнюю и внутреннюю сферы; назовите координационное число указанных преподавателем комплексных соединений.

1.2. Получение раствора Люголя

Цель работы: получить раствор Люголя (водорастворимый йод).

Реактивы: иодид калия (KI, сух.), йод кристаллический (I₂, сух.).

Оборудование: весы, шпатели, пипетки, пробирки, штатив для пробирок, пузырьки объемом 10 мл.

Ход работы

В две пробирки или в пузырьки вносят по маленькому кристаллу йода. Затем приливают 5–10 мл дистиллированной воды. В одну из пробирок внести на кончике шпателя иодид калия. Отметить полученные изменения. Объяснить суть проведенных операций.

Контрольные вопросы

1. Почему йод плохо растворяется в воде?
2. Что происходит, когда к водному раствору йода добавляют иодид калия?
3. В каких сферах применяется водорастворимый йод?

Лабораторная работа 2

2.1. Обнаружение салициловой кислоты в аспирине

Цель работы: установить наличие или отсутствие салициловой кислоты в фармацевтическом препарате «Аспирин».

Реактивы: таблетки «Аспирин», салициловая кислота (сух.), раствор хлорида железа(III) 6-водного (FeCl₃*6H₂O; c = 2.5 г/л), ДМФА, ацетон.

Оборудование: фарфоровая (или агатовая) ступка и пестик, пипетки, пипет-дозаторы, пробирки, шпатели, пузырьки объемом 10 мл, воронки, фильтровальная бумага, весы аналитические.

Ход работы

Выделение основного вещества из аспирина

Берут две таблетки ацетилсалициловой кислоты и при помощи пестика размалывают аспирин в мелкий порошок. Отбирают 0.1 г аспирина в пенициллиновый пузырек или пробирку и растворяют в 4 мл ДМФА или ацетона, проводят перемешивание суспензии в течение минимум 7 минут, а затем фильтруют в чистый пенициллиновый пузырек, пробирку или иную емкость небольшого размера через фильтровальную бумагу.

Положительный и отрицательный контроль

Параллельно готовят тест положительного и отрицательного контроля. В случае положительного контроля на кончике шпателя или канцелярской скрепки в пенициллиновый пузырек или пробирку вносят салициловую кислоту, приливают 4 мл ДМФА или ацетона, растворяют, а затем вносят 2 мл раствора $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 2.5$ г/л). В случае отрицательного контроля в пробирку наливают 4 мл ДМФА или ацетона и приливают 4 мл раствора $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 2.5$ г/л).

Обнаружение салициловой кислоты

Приливают 2 мл раствора FeCl_3 к органическому раствору аспирина. Наблюдают за окраской раствора на фоне листа белой бумаги, рядом располагают пробирки с положительным и отрицательным контролем. Если окраска не появилась сразу (визуальный контроль), то ожидают в течение как минимум 5 минут. Делают соответствующие выводы, если установлено присутствие салициловой кислоты, предполагают источники ее появления.

Контрольные вопросы

1. Для чего используется ДМФА? Почему образец аспирина нельзя растворить в воде или в этиловом спирте?
2. Что такое положительный и отрицательный контроль? Как эти тесты соотносятся с ошибками первого и второго рода?
3. Как синтезируют ацетилсалициловую кислоту? Какие ацилирующие агенты вам известны?
4. Откуда может взяться салициловая кислота в аспирине? Какой тип реакций этому способствует?
5. Какой тип реакций использован для обнаружения салициловой кислоты?
6. Почему использован более концентрированный раствор $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, чем в лабораторной работе 1?
7. Как называются соединения металлов с органическими лигандами?

2.2. Реакция салициловой кислоты с бромной водой

Цель работы: провести качественную реакцию на салициловую кислоту.

Реактивы: салициловая кислота (сух.), бромная вода.

Оборудование: пипетки, мерные цилиндры, пробирки, штатив для пробирок, пузырьки объемом 10 мл, химические стаканы, весы аналитические, шпатели.

Ход работы

В емкость на кончике шпателя или канцелярской скрепки помещают небольшое количество салициловой кислоты, приливают 2–6 мл воды и добиваются полного растворения кристаллов. К раствору по каплям добавляют бромную воду. После первых капель (1-я стадия) появляется мутный осадок, растворяющийся при перемешивании. При добавлении еще 10–30 капель бромной воды окраска жидкости становится светло-желтой и выпадают белые хлопья осадка, не растворяющиеся при перемешивании (2-я стадия).

Контрольные вопросы

1. Укажите тип протекающих реакций, напишите уравнения реакций. Назовите атакующий агент и тип ориентации. Объясните, почему реакция протекает даже в мягких условиях. Чем обусловлена бледно-желтая окраска раствора?

2. Для каких соединений данная реакция также является качественной? Укажите механизмы этих реакций.

Лабораторная работа 3

3.1. Гидролиз ацетилсалициловой кислоты

Цель работы: провести гидролиз ацетилсалициловой кислоты в кислотных и щелочных условиях.

Реактивы: таблетки «Аспирин», раствор хлорида железа(III) 6-водного ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $c = 2.5$ г/л), ДМФА, ацетон, гидроокись натрия (NaOH ; $\omega = 2\%$), соляная кислота (HCl ; $\omega = 10\%$).

Оборудование: фарфоровая (или агатовая) ступка и пестик, пипетки, пипет-дозаторы, мерные цилиндры, химические термостойкие стаканы на 50–150 мл, воронки, фильтровальная бумага, пузырьки объемом 10 мл, термометры ртутные, универсальная индикаторная бумага (УИБ), кипелки, шпатели, весы аналитические, электроплитка, водяная баня.

Ход работы

Выделение основного вещества из аспирина

Берут две таблетки ацетилсалициловой кислоты и при помощи пестика размалывают аспирин в мелкий порошок. Отбирают 0.02 г аспирина в емкость и приливают сначала 6 мл ДМФА (или ацетона), а затем 14 мл дистиллированной воды. Подогревают раствор до растворения ацетилсалициловой кислоты (кипение не допускается; $t = 50\text{--}70\text{ }^{\circ}\text{C}$). При наличии осадка раствор фильтруют в чистый пенициллиновый пузырек через фильтровальную бумагу.

Гидролиз ацетилсалициловой кислоты

В два термостойких стакана объемом 50 мл переносят 2 мл полученного раствора аспирина в водно-органической фазе. Добавляют 20 мл дистиллированной воды в каждый из стаканов. В один из стаканов приливают 0.4 мл 2 %-го раствора NaOH (реакция раствора должна быть слабощелочной), контроль pH по УИБ. Если цвет УИБ не изменился, по каплям подщелачивают раствор до появления слабощелочной реакции. Во второй стакан вносят 2–4 капли 10 %-го раствора HCl до слабокислой или выраженной кислой реакции. В оба стакана вносят кипелки. Далее на электроплитке проводят нагревание растворов до начала кипения. С момента начала кипения засекают 5 мин и кипятят, не допуская выплескивания раствора из стакана. После этого содержимое охлаждают на водяной бане или на воздухе до комнатной температуры. В емкость со щелочью добавляют 10 %-й раствор HCl до получения слабокислой реакции (обычно 2–5 капель). Далее в оба стакана приливают 10 мл раствора FeCl_3 (2.5 г/л). Содержимое стаканов перемешивают и наблюдают за изменением окраски и ее интенсивностью.

Приготовление раствора сравнения

В емкость вместимостью 50 мл вносят 1 мл раствора аспирина в водно-органическом растворителе, добавляют 20 мл дистиллированной воды и затем 10 мл раствора $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (2.5 г/л). В работе записывают схему реакции гидролиза ацетилсалициловой кислоты в кислой и щелочной среде, фиксируют механизм гидролиза ацетилсалициловой кислоты в кислых и щелочных условиях. Делают соответствующие выводы о характере гидролиза.

Контрольные вопросы

1. Для чего растворяют аспирин в ДМФА или в ацетоне?
2. Для чего нужен контроль рН при подщелачивании р-ра ацетилсалициловой кислоты?
3. Почему нейтрализуем щелочь после кипения?
4. Запишите реакцию гидролиза сложного эфира в кислой и щелочной средах.
5. Разберите механизм реакции гидролиза в кислой и щелочной средах.
6. Почему реакция гидролиза в щелочной среде идет более интенсивно?
7. Как называется реакция, обратная гидролизу сложного эфира? Какие ацилирующие агенты вам известны?

Лабораторная работа 4

4.1. Образование ауринового красителя

Цель работы: провести реакцию обнаружения салициловой кислоты через образование ауринового красителя.

Реактивы: таблетки «Аспирин», салициловая кислота (сух.), бензойная кислота (сух.) формалин, серная кислота (H_2SO_4 ; конц.).

Оборудование: пипетки, пипет-дозаторы, фарфоровая (или агатовая) ступка и пестик, химические термостойкие стаканы, конические колбы, пузырьки объемом 10 мл, весы аналитические, шпатели.

Ход работы

Обнаружение салициловой кислоты в аспирине

Берут две таблетки ацетилсалициловой кислоты и при помощи пестика размалывают аспирин в мелкий порошок. Отбирают 0.01 г аспирина в емкость (например, пенициллиновый пузырек) и приливают сначала 0.5 мл концентрированной серной кислоты, а затем вносят 2–4 капли формалина и наблюдают за изменениями.

Положительный контроль

Процедуру получения ауринового красителя проводят в тех же условиях, но в качестве субстрата используют 0.01 г салициловой кислоты.

Отрицательный контроль

В пенициллиновый пузырек вносят 0.01 г бензойной кислоты, затем приливают 0.5 мл концентрированной серной кислоты. Далее добавляют 2–4 капли раствора формальдегида (триоксана) и наблюдают за изменениями.

Контрольные вопросы

1. Что такое формалин? Почему формалин был в виде суспензии? Что такое триоксан и параформ?

2. Каков механизм реакции? Какова функция серной кислоты в данной реакции? Каковы побочные реакции? Укажите электрофил и нуклеофил, разберите электронные эффекты в субстрате и реагенте. Сформулируйте понятия субстрата и реагента, их отличия друг от друга.

3. Что такое реакции конденсации?

4. Можно ли достоверно определить содержание салициловой кислоты в ацетилсалициловой данным методом?

4.2. Растворимость бензойной кислоты

Цель работы: изучить растворимость бензойной кислоты при различных рН.

Реактивы: бензойная кислота (сух.), соляная кислота (HCl; $\omega = 10\%$), гидроксид натрия (NaOH; $\omega = 20\%$).

Оборудование: пузырьки объемом 10 мл, химические стаканы, пипетки, пипет-дозаторы, конические колбы, мерный цилиндр, весы аналитические, шпатели.

Ход работы

В две конические колбы вместимостью 250 вносят 0.3 г бензойной кислоты, приливают 25 мл дистиллированной воды, перемешивают и оставляют в покое на 1 минуту, фиксируют степень растворимости бензойной кислоты. Далее в одну коническую колбу приливают 2 мл дистиллированной воды, а во вторую — 2 мл NaOH ($\omega = 20\%$). Содержимое интенсивно перемешивают и дают отстояться 5 минут, отмечают степень растворимости бензойной кислоты. Затем в колбу со щелочью вносят 5 мл HCl ($\omega = 10\%$), а в первую колбу вносят 5 мл дистиллированной воды. Отмечают растворимость бензойной кислоты.

Контрольные вопросы

1. Объясните изменение характера растворимости бензойной кислоты при различных рН раствора. Каким физическим свойством это определяется? Объясните, каково влияние минеральной кислоты и щелочи.

2. Подумайте, как можно применять полученные данные в аналитической практике.

Лабораторная работа 5

5.1. Окисление полифенолов при различных значениях рН среды

Цель работы: провести реакцию окисления полифенола, сделать заключение о характере протекания реакции в средах с различным рН.

Реактивы: резорцин или гидрохинон (сух.), соляная кислота (HCl; $\omega = 10\%$), соляная кислота (HCl; $\omega = 1\%$), гидроокись натрия (NaOH; $\omega = 10\%$), ДМФА, ацетон.

Оборудование: химические стаканы, пенициллиновые пузырьки или иные емкости с плотными крышками, пипетки, пипет-дозаторы, электроплитка, шпатели, весы аналитические, термометры, фарфоровая (или агатовая) ступка и пестик, универсальная индикаторная бумага (УИБ).

Ход работы

При необходимости полифенол предварительно размалывают в ступке. В химическом стакане взвешивают 0.01 г гидрохинона или 0.05–0.1 г резорцина. Растворяют навеску в 2 мл ДМФА или в ацетоне, далее добавляют 20 мл дистиллированной воды. Допускается незначительное подогревание раствора (до 65 °С).

Полученный раствор объемом 2 мл переносят в три пенициллиновых пузырька (в каждый из трех). В первом пузырьке рН доводят до нейтрального значения раствором HCl ($\omega = 1\%$; контроль по УИБ), во второй пузырек добавляют несколько капель HCl ($\omega = 10\%$) до выраженной кислой реакции, в третий по каплям добавляют 10 % NaOH до отчетливой щелочной реакции. Во все три пузырька добавляют 5 мл дистиллированной воды, пузырьки закрывают крышками. Растворы выдерживают. В случае

резорцина необходимо провести подогревание пенициллиновых пузырьков на электрической плитке до начала кипения. Отмечают изменение окраски.

Контрольные вопросы

1. Что такое полифенолы? Назовите основных представителей полифенолов. Как в фармацевтической практике используются гидрохинон и резорцин? Что такое карболовая кислота?

2. Назовите характер протекающего окисления (ионный или радикальный), аргументируйте ваши предположения. Назовите ключевой интермедиат реакции.

3. Откуда берется окислитель, за счет чего образуется атакующий агент?

4. Почему реакции окисления полифенолов лучше протекают в водных растворах, нежели в порошках? Почему реакция лучше идет именно при определенных значениях рН? Почему в случае нейтрального водного раствора полифенола необходимо подкислить среду? У какого из указанных преподавателем фенолов наиболее выражены кислотные свойства?

5.2. Качественные реакции на аскорбиновую кислоту

Цель работы: провести качественные реакции на аскорбиновую кислоту (в драже).

Реактивы: драже аскорбиновой кислоты или чистая субстанция, соляная кислота (HCl; $\omega = 10\%$), раствор красной кровяной соли ($K_3[Fe(CN)_6]$; $\omega = 0.12\%$), раствор хлорида железа(III) 6-водного ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$; $\omega = 0.2\%$), раствор нитрата серебра ($AgNO_3$; $c = 2$ ммоль/л).

Оборудование: фарфоровая (или агатовая) ступка и пестик, химические стаканы, пенициллиновые пузырьки, пипетки, пипет-дозаторы, конические колбы, электроплитка, весы аналитические, мерные цилиндры.

Ход работы

Пробоподготовка. Драже аскорбиновой кислоты размалывают в фарфоровой или агатовой ступке до порошкообразного состояния. 0.5 г размолотого драже переносят в стакан емкостью более 100 мл и растворяют в 50 мл дистиллированной воды. Допускается нагревание раствора до 60 °С.

Опыт 1. 10 мл раствора переносят в стеклянный химический стакан объемом 50 мл, последовательно прибавляют 4–5 капель HCl ($\omega = 10\%$), 1 мл $K_3[Fe(CN)_6]$ ($\omega = 0.12\%$) и 1 мл $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ($\omega = 0.2\%$). Наблюдают за изменением окраски. Делают соответствующие выводы. После пары минут в стакан снова вносят 3 мл $K_3[Fe(CN)_6]$ ($\omega = 0.12\%$) и 1 мл $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ($\omega = 0.2\%$). Раствор выстаивают 20–30 минут и наблюдают выпадение осадка.

Опыт 2. В стакан вместимостью 50 мл последовательно вносят 3 мл $AgNO_3$ ($c = 2$ ммоль/л) и 20 мл дистиллированной воды. Стакан нагревают на электроплитке до начала кипения, затем по каплям (4–12 капель) начинают прибавлять ранее приготовленный р-р аскорбиновой кислоты и наблюдают за изменениями.

Контрольные вопросы

1. Нарисуйте формулу аскорбиновой кислоты в восстановленной и окисленной формах (формулы Фишера и Хеурса).

2. Почему водные растворы аскорбиновой кислоты неустойчивы?

3. Что за осадок наблюдается в опыте 1? Напишите уравнения протекающих реакций.

4. Назовите реакцию из опыта 2, напишите ее схему. Охарактеризуйте получаемую дисперсную систему. Что является дисперсионной средой, а что — фазой?

Лабораторная работа 6

6.1. Обнаружение редуцирующей активности углеводов

Цель работы: провести реакции обнаружения редуцирующей способности различных углеводов.

Реактивы: сахар пищевой, D-глюкоза, раствор Фелинга I ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$; $\omega = 4\%$), раствор Фелинга II (калий-натрий виннокислый; $\omega = 20\%$ раствор в 15% NaOH), соляная кислота (HCl; $\omega = 10\%$), гидроокись натрия (NaOH; $\omega = 10\%$), фенолфталеин ($\omega = 1\%$ спиртовой раствор).

Оборудование: весы аналитические, шпатели, стаканы химические, колбы Эрленмейера на 100–250 мл, плоскодонные колбы, пипетки, пипет-дозаторы, водяная баня, универсальная индикаторная бумага (УИБ), термостат, электроплитка, мерные цилиндры.

Ход работы

Приготовление растворов сахаров

0.6 г сахара и D-глюкозы взвешивают на весах в отдельных емкостях. Каждую из навесок растворяют в 200 мл дистиллированной воды (сначала приливают 100 мл воды, раствор встряхивают до полного растворения и приливают оставшиеся 100 мл).

Проведение инверсии сахарозы

Отбирают 25 мл 0.3 %-го водного раствора пищевого сахара, приливают 0.5 мл HCl ($\omega = 10\%$). Раствор термостатируют при температуре не выше 65–67 °С в течение 10 минут. Далее в раствор добавляют 1–2 капли индикатора фенолфталеина и титруют раствор 10 % NaOH до появления слабой розовой окраски (в отсутствие фенолфталеина рН контролируют по УИБ).

Обнаружение редуцирующих веществ

Обнаружение редуцирующей способности проводят в растворах сахара, D-глюкозы и инвертного сахара. Для этого в химический стакан или колбу объемом 100 или 250 мл, вносят 10 мл исследуемого раствора, 10 мл раствора Фелинга I и 10 мл раствора Фелинга II. Раствор доводят до кипения и кипятят ровно 3 минуты. После оседания осадка надосадочную жидкость аккуратно сливают, не допуская контакта осадка с воздухом. К остаткам надосадочной жидкости с осадком аккуратно, не допуская всплесков, приливают 20 мл горячей прокипяченной дистиллированной воды. Если раствор остается окрашенным, процедуру декантации и внесения горячего дистиллята повторяют. Визуально оценивают количество образовавшегося осадка в растворах сахара, D-глюкозы и инвертного сахара. При необходимости полученные осадки фильтруют через фильтровальную бумагу и их количество также оценивают визуально. Делают соответствующие выводы. В рабочем журнале отмечают протекание реакции образования осадка.

Контрольные вопросы

1. Какие соединения будут вступать в проведенную реакцию? Напишите схему превращений. Нарисуйте формулы используемых в работе углеводов. Что такое редуцирующая способность? Назовите углеводы, не обладающие редуцирующей способностью.

2. Что такое инверсия? Нарисуйте схему реакции. Укажите практическое применение данной реакции. Что будет происходить, если перегреть или передержать раствор сахара при нагревании? Что такое реакции Майяра?

3. Что такое мутаротация? За счет чего она происходит? Укажите таутомеры сахаров, образующиеся в водных растворах, какие из них наиболее устойчивы? Что такое оптическая изомерия, каковы условия ее реализации? Сколько оптических изомеров будет иметь указанный преподавателем углевод? Что такое поляриметрия и сахариметрия? Назовите область применения и ограничения метода.

4. Что такое декантация? Для чего ее применяли в данной лабораторной работе? Для чего использовали кипяченую дистиллированную воду? Почему нельзя, чтобы осадок контактировал с воздухом? Для каких аналитических методов используется проведенная вами реакция?

5. Почему растворы Фелинга хранят отдельно друг от друга? Для чего раствор Фелинга II необходимо растворять в щелочи? Укажите формулу основного соединения в данном растворе и назовите количество оптических изомеров.

6. Что такое эпимеризация? Какие условия для нее нужны? Почему фруктоза обладает восстанавливающей способностью, хотя является кетозой?

Лабораторная работа 7

7.1. Проверка пипет-дозатора гравиметрическим методом

Цель работы: провести проверку пипет-дозатора гравиметрическим методом.

Реактивы: фильтрованная дистиллированная вода, лед.

Оборудование: весы аналитические, водяная баня, бюксы, стаканы химические объемом 150, 250 мл, испытуемые пипет-дозаторы (объем 100, 200, 500, 1000 мкл), термометр ртутный, фильтровальная бумага.

Ход работы

Подготовка дистиллированной воды. 100–150 мл фильтрованной через мембранный фильтр или через фильтр Шотта ди-

стиллированной воды приливают в чистый химический стакан вместимостью 150–250 мл. В кастрюлю или иную емкость кладут лед с небольшим количеством водопроводной воды, затем помещают стакан и охлаждают содержимое до температуры 20–22 °С, контроль осуществляют по ртутному термометру.

Проведение поверки. Берут как можно меньшую по весу тару (обычно до 12 г) и тарируют на предварительно откалиброванных аналитических весах. При помощи поверяемого пипет-дозатора вносят фактический объем воды в тару и записывают показания ($m_{i_H_2O}$; кончик наконечника погружают в раствор не более чем на 3–5 мм). Затем производят тарирование и вновь с помощью поверяемого пипет-дозатора вносят фактический объем воды в тару. Процедуру повторяют 10 раз (необходимо получить 10 измерений; $m_{i_H_2O}$), полученные данные заносят в журнал, находят средний объем 10 измерений (V_{cp}). В ряде случаев есть смысл отбросить первые два измерения, но общая выборка все равно должна содержать не менее 10 измерений. После завершения процедуры жидкость аккуратно выливают из тары, при необходимости тару вытирают, возвращают обратно на весы и снова тарируют. Последовательно вносят 10 объемов подготовленной дистиллированной воды и фиксируют показания весов в рабочем журнале. Находят среднее значение объема ($V_{cpB} = (m_{i_H_2O}/\rho(t, ^\circ C))/10$). Объем дистиллированной воды ($V_{i_H_2O}$) высчитывают по формуле:

$$V_{i_H_2O} = \frac{m_{i_H_2O}}{\rho(t, ^\circ C)}$$

$m_{i_H_2O}$ — масса, полученная на аналитических весах, г;

$\rho(t, ^\circ C)$ — плотность дистиллированной воды, зависящая от температуры (по справочной таблице), г/мл.

Рассчитывают абсолютную (Δx) и относительную погрешность ($\Delta, \%$) по следующим формулам:

$$\Delta x = \left| \bar{V} - V_{ном} \right| \qquad \Delta, \% = \frac{\left| \bar{V} - V_{ном} \right|}{V_{ном}} * 100 = \frac{\Delta x}{V_{ном}} * 100$$

V_{cp} — среднее полученное в результате 10 измерений (первый способ), мл;

$V_{ном}$ — номинальный объем пипет-дозатора, мл.

Сопоставляют значения V_{cp} и V_{cpB} . Модуль их разности не должен превышать $2 \cdot \Delta x$. В противном случае полученные результаты неверны и набор данных следует повторить.

Рассчитывают погрешность повторяемости (S , %), используя следующую формулу:

$$S, \% = \frac{S_V}{\bar{V}} * 100 = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n |V_{i_H_2O} - \bar{V}|^2}{n-1}}}{\bar{V}} * 100$$

S_V — стандартное отклонение по фактическим объемам;

n — число измерений (по умолчанию — 10).

Заполняют рабочий журнал. Сравнивают полученные значения погрешностей с табличными (спецификация представлена ниже).

Рабочий журнал «Проверка пипет-дозатора гравиметрическим методом»

Расчеты лучше проводить в программе Excel.

Исходные (сырые) данные о проверке пипет-дозаторов вносят в табл. 1.

Таблица 1

Исходные данные для проверки пипет-дозатора

Номер показания	m_i , г	$\rho(t, ^\circ\text{C})$	$V_{i_H_2O}$, мл*
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			

* Расчет до 4-го знака после запятой

Расчетные показания заносят в табл. 2.

Таблица 2

**Расчетные показания абсолютной
и относительной погрешности**

Показатель	Значение
V_{cp} (10 измерений), мл	
$V_{\text{ном}}$ (номинальный объем дозатора), мл	
$V_{\text{срБ}}$ (средний объем после 10 внесений воды), мл	
Δx , мл (округленное и неокругленное до 4-го знака)	
$ V_{\text{cp}} - V_{\text{срБ}} $	
Δ , % (округленное и неокругленное до 4-го знака)	
S , %	

Результаты поверки оформляют в виде протокола (табл. 3).

Таблица 3

Протокол испытаний

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА					
Объект	Контролируемый параметр	Допустимое значение, %	Полученный результат, %	Соответствует (Да/Нет)	Дата выполнения
Пипет-дозатор (_____мкл)	Δ , %	\pm			
	S , %	\leq			

Таблица 4

Спецификация на пипет-дозаторы

Тип пипет-дозатора (номинальный объем, мкл)	Относительная ошибка (Δ , %)	Ошибка повторяемости (S , %)
100	$\pm 1,5$	$\leq 1,0$
200		
500	$\pm 1,0$	
1000		

Контрольные вопросы

1. К какой величине описательной статистики относится формула для расчета погрешности повторяемости (S , %)? Какие описательные статистики вам известны?

2. Проанализируйте график зависимости плотности от температуры: назовите предиктор и отклик, тип используемой аппроксимации, силу и направление связи, степень зависимости и т. д.

3. Что такое поверка, к какому этапу валидации она относится? Как часто нужно проводить такую поверку для пипет-дозаторов?

4. Что такое погрешность?

5. Опишите правила работы на аналитических весах. Что такое калибровка измерительного прибора? Чем внешняя калибровка отличается от внутренней?

Лабораторная работа 8

8.1. Построение калибровочной зависимости

Цель работы: построить калибровочный график и определить концентрацию аналита в образце.

Реактивы: фармацевтическая субстанция, имеющая максимум поглощения в диапазоне 210–700 нм (например, метиловый эфир 4-гидроксibenзойной кислоты), изопропанол, растворы аналита с неизвестной концентрацией.

Оборудование: бюксы, пипетки, пипет-дозаторы, химические термостойкие стаканы, конические колбы, мерные колбы, пузырьки объемом 10 мл, плитка электрическая, термометр ртутный, УФ-ВИД-спектрофотометр, весы аналитические, шпатели.

Ход работы

Нахождение оптимального значения длины волны для калибровки (λ_{\max})

На электрической плитке подогревают 100–150 мл дистиллированной воды.

Несколько кристаллов соединения при помощи шпателя или канцелярской скрепки помещают в пенициллиновый пузырек вместимостью 10 мл и заливают горячей дистиллированной водой. Встряхивают пузырек до полного растворения, раствор охлаждают. Проводят получение электронного спектра в следующих условиях:

диапазон сканирования — 190–1100 нм, шаг сканирования — 1 нм, длина оптического пути — 10 мм, раствор сравнения — дистиллированная вода. Если сигнал максимума (-ов) более 800 mAU, проводят разведение раствора для спектроскопии до тех пор, пока значение сигнала не попадет в область 200–800 mAU (0.2–0.8 AU).

Приготовление калибровочных растворов

Сначала готовят исходный (опорный) стандартный раствор (ИСР), для этого на предварительно откалиброванных аналитических весах взвешивают в бюксе (0.050 ± 0.001) г аналита. Далее в бюкс вносят 1 мл изопропанола в качестве предрасстворителя и дожидаются полного растворения навески (при медленном растворении — перемешивание). Затем полученный раствор количественно переносят в мерную колбу на 50 мл и доводят объем до метки холодной дистиллированной водой. Содержание аналита в ИСР составляет 1000 ppm. Далее готовят рабочие калибровочные растворы, следуя указанию из табл. 1. Объем ИСР отбирают пипеткой на 1 мл. Все растворы доводят до метки дистиллированной водой.

Таблица 1

Процедура приготовления калибровочных растворов

V ИСР, мл	0.25	0.5	0.5	1
V мерной колбы, мл	200 (250)	200 (250)	100	100
Концентрация, мг/л	1.25(1)	2.5 (2)	5.0	10.0

Далее калибровочные растворы спектрофотометрируют, начиная с раствора самой низкой концентрации и заканчивая раствором с наибольшей концентрацией (10 мг/л). Для определения абсорбции проводят не менее трех измерений при оптимальной длине волны (λ_{\max}). По полученным данным проводят регрессионно-корреляционный анализ: находят коэффициенты корреляции и детерминации, вычисляют коэффициенты простой линейной регрессии, оценивают достоверность полученных коэффициентов и адекватность регрессионной модели. Делают заключение о необходимости использования интерсепта при вычислении концентраций образцов. Также вычисляют коэффициент экстинкции на всех калибровочных уровнях ($\epsilon(\lambda_{\max})$, л/(моль*см)) исходя из закона Бугера — Ламберта — Бера ($A = \epsilon * c * l$).

Расчет концентраций испытуемых образцов

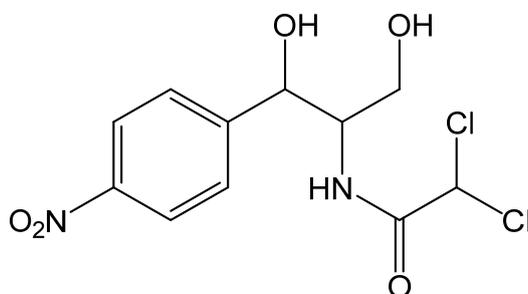
Образец раствора с неизвестной концентрацией спектрофотометрируют. Если значение абсорбции выходит за калибровочный диапазон, проводят соответствующее разведение раствора. По полученному уравнению регрессии вычисляют концентрации analyта в образце(-ах).

Контрольные вопросы

1. Что такое калибровка аналитической методики? Почему в качестве предразтворителя использовался изопропанол? Можно ли брать иной предразтворитель и, если можно, то какой (какие)?
2. Для чего получали спектр поглощения?
3. Почему «снимать» калибровочные растворы необходимо последовательно от меньшей концентрации к большей?
4. Для чего рассчитывали значимость коэффициентов регрессии?

Лабораторная работа 9

9.1. Расчет практического выхода хлорамфеникола после очистки



1-(*p*-нитрофенил)-2-дихлорацетиламино-1,3-пропандиол

Цель работы: очистить хлорамфеникол и рассчитать его практический выход гравиметрическим методом.

Реактивы: загрязненный крахмалом хлорамфеникол (левомицетин), спирт этиловый, ацетон.

Оборудование: пробирки для вакуумной дистилляции, химические стаканы, колбы конические, колбы плоскодонные, колбы Бунзена, воронка Бюхнера, фильтровальная бумага, пипетки, шпатели, весы аналитические, роторный испаритель, электрическая плитка.

Ход работы

Пробирку для вакуумной дистилляции помещают в химический стакан и взвешивают (m_0). В другой химический стакан объемом не менее 100 мл вносят навеску загрязненного левомецетина ~ 3–4 г и определяют точную массу навески до очистки (m_1). В емкость с навеской вносят 30 мл этилового спирта или ацетона и ждут полного растворения (нагревать раствор не допускается). Экстракт фильтруют под вакуумом и переносят в пробирку для вакуумной дистилляции. Исходную емкость, фильтр и колбу Бунзена промывают последовательно 5 мл этилового спирта (ацетона) трижды. Порции раствора для промывки также переносят в емкость с экстрактом. Полученный объединенный экстракт упаривают в роторном испарителе досуха при температуре сначала 76(55) °С, постепенно повышая ее до 100 °С. Пробирку с сухим остатком взвешивают, получая массу навески с тарой после очистки (m_2). Практический выход рассчитывают по следующей формуле:

$$X = \frac{m_2}{m_1 + m_0} * 100$$

Контрольные вопросы

1. Почему хлорамфеникол хорошо растворяется в спирте и ацетоне? Почему нельзя нагревать данный раствор?
2. Почему необходимо определять массу тары (m_0) до внесения навески загрязненного левомецетина?
3. Опишите конструкцию и принцип работы роторного испарителя. Какой метод использован для разделения растворителя и растворенного вещества?
4. Почему не рекомендуется в бане роторного испарителя использовать водопроводную воду?
5. Что такое внешняя и внутренняя калибровка весов?
6. Опишите основные принципы работы с аналитическими весами.
7. Опишите преимущества и недостатки гравиметрического метода анализа. Что такое термогравиметрия?

Лабораторная работа 10

10.1. Качественные реакции на хлорамфеникол

Цель работы: провести качественные реакции на левомицетин (хлорамфеникол).

Реактивы: таблетки «Левомицетин», «Левомицетин Актитаб» или субстанция левомицетина, гидроокись натрия (NaOH , $\omega = 15\%$), раствор сульфата меди 5-водного ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\omega = 4\%$), соляная кислота (HCl ; $\omega = 10\%$), спирт этиловый ректификованный ($\omega = 95\text{--}96\%$), спирт изопропиловый, ДМФА, ацетон.

Оборудование: пипетки, пипет-дозатор на 200 мкл, мерные цилиндры, химические термостойкие стаканы, бюксы с притертыми крышками на 45 мл и более, пузырьки объемом 10 мл, электроплитка, фарфоровая (или агатовая) ступка и пестик, конические колбы, воронки, электроплитка, установка для кипячения с обратным холодильником, универсальная индикаторная бумага (УИБ), кипелки, шпатели, весы аналитические, спектрофотометр.

Ход работы

Подготовка исследуемого образца

Берут 4–5 таблеток, содержащих левомицетин, и при помощи пестика размалывают в мелкий порошок. Субстанция левомицетина дополнительных операций пробоподготовки не требует.

Опыт 1. В термостойком химическом стакане взвешивают 0.1 г образца, приливают последовательно 2 мл спирта, ДМФА или ацетона (взбалтывают р-р для растворения аналита), 20 мл дистиллированной воды, 200 мкл NaOH ($\omega = 15\%$) и 0.8 мл $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($\omega = 4\%$). Содержимое стакана активно взбалтывают. Полученные операции проводят аналогично для варианта опыта без навески исследуемого образца (отрицательный контроль).

Отмечают полученные изменения. Допускается наличие комков и взвеси (нерастворимые компоненты образца). При необходимости снимают спектр поглощения полученного соединения и сравнивают со спектром поглощения стандартного раствора левомицетина ($c = 0.01$ мг/л).

Опыт 2. К 3 мл раствора, содержащем полученное в опыте 1 хелатное соединение, приливают 3 мл HCl ($\omega = 10\%$). Наблюдают за изменениями.

Опыт 3. В термостойком химическом стакане или конической колбе взвешивают 0.3 г образца, вносят кипелки, приливают последовательно 15 мл дистиллированной воды, 1–2 мл NaOH ($\omega = 15\%$) и кипятят (либо открыто, либо с обратным холодильником) на электроплитке не менее 7 минут (допускается наличие комков и взвеси), отмечают последовательные изменения окраски. В ходе кипячения периодически подносят смоченную дистиллятом УИБ, отмечают изменения. При необходимости снимают спектр поглощения полученного соединения и сравнивают со спектром поглощения стандартного раствора левомецетина ($c = 0.01$ мг/л).

Контрольные вопросы

1. Какие реакции происходят в первом опыте? Для чего необходима щелочь? Почему для проведения реакций не требуется более сильных оснований, чем NaOH?
2. Для чего нужен отрицательный контроль?
3. Что происходит с хелатным соединением, полученным в первом опыте при добавлении соляной кислоты?
4. Какое соединение контролируют при помощи УИБ?
5. Какие реакции происходят при кипячении левомецетина со щелочью?
6. Можно ли использовать указанные опыты при количественном определении левомецетина? Если можно, то детализируйте ответ.

10.2. Качественные реакции на сульфаниламидные препараты

Цель работы: провести качественные реакции на сульфаниламид.

Реактивы: субстанция сульфаниламида («Стрептоцида»), медь сернокислая 5-водная ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\omega = 4\%$), гидроокись натрия (NaOH; $\omega = 15\%$), нитрит натрия (NaNO_2), соляная кислота (HCl; $\omega = 1\%$), кристаллы ароматического гидроксипроизводного (нафтол-1, нафтол-2, резорцин и т. д.).

Оборудование: пипетки, пипет-дозаторы, химические термостойкие стаканы, пузырьки объемом 10 мл, бюксы, мерные цилиндры, воронки, электроплитка, весы аналитические, шпатели, термометры ртутные.

Ход работы

Опыт 1. На весах взвешивают 0.01–0.02 г сульфаниламида и приливают при помощи мерного цилиндра 20 мл дистиллированной воды. Полученную суспензию нагревают на электроплитке до полного растворения кристаллов (допускается кипячение), снимают сосуд с электроплитки, ждут прекращения кипения раствора и последовательно вносят 200 мкл $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($\omega = 4\%$) и 200 мкл NaOH ($\omega = 15\%$). Наблюдают за изменениями. Далее снова добавляют последовательно 200 мкл $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($\omega = 4\%$) и 200 мкл NaOH ($\omega = 15\%$). Наблюдают за изменениями.

Опыт 2. На весах в термостойком химическом стакане на 50 мл взвешивают сначала 0.1 г NaNO_2 , а после тарирования вносят 0.01–0.02 г сульфаниламида и приливают при помощи мерного цилиндра 20 мл дистиллированной воды. Далее в ту же тару вносят 200 мкл HCl ($\omega = 1\%$) и нагревают на электроплитке до полного растворения осадка. Наблюдают за изменениями. Затем раствор охлаждают до температуры 20–65 °С, вносят на кончике шпателя кристаллы ароматического гидроксипроизводного и кипятят не менее 5 минут. Наблюдают за изменениями.

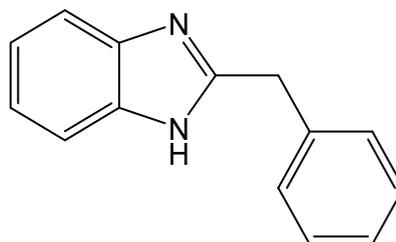
Контрольные вопросы

1. За счет каких атомов молекулы сульфаниламида происходит образование окрашенного комплексного соединения (опыт 1)?
2. Как называется реакция, происходящая между нитритом натрия и стрептоцидом (опыт 2)? За счет чего возможно ее протекание? Какой продукт образуется в результате данной реакции?
3. Что происходит после добавления кристаллов ароматического гидроксипроизводного?
4. Каковы механизмы действия антибиотиков?

Лабораторная работа 11

11.1. Качественные реакции на дибазол

2-(Фенилметил)-1Н-бензимидазол



Цель работы: провести качественные реакции на дибазол.

Реактивы: таблетки «Дибазол-УБФ», серная кислота (H_2SO_4 ; конц.), ДМФА, кислота соляная (HCl ; $\omega = 1\%$), р-р иода (I_2 ; $c = 0.1$ моль/л).

Оборудование: пенициллиновые пузырьки, химические стаканы на 50 мл, пипетки, мерные цилиндры на 50 и 100 мл.

Ход работы

Подготовка образцов дибазола

Одну таблетку дибазола (0.02 г) разламывают на две части. Одну из них помещают в химический стакан и размалывают до порошкообразного состояния, последовательно приливают 2 мл ДМФА и 23 мл дистиллированной воды. Содержимое энергично перемешивают в течение одной минуты. Полученную суспензию фильтруют. Фильтрат используют для дальнейших операций.

Опыт 1. К 1 мл образца дибазола приливают 2–4 капли HCl ($\omega = 1\%$), а затем вносят одну каплю р-ра иода. Наблюдают за изменениями. Вносят еще 2–8 капель раствора иода и наблюдают за изменениями, результаты фиксируют в рабочем журнале.

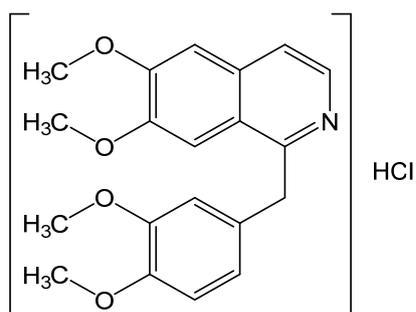
Опыт 2. Вторую половинку таблетки дибазола помещают в пенициллиновый пузырек, размалывают до порошкообразного состояния и приливают 0.5 мл H_2SO_4 (конц.). Ждут одну минуту и фиксируют изменения. Ждут 5–7 минут и фиксируют изменения.

Контрольные вопросы

1. Что такое алкалоиды? Какими свойствами они обладают? Какие атомы или функциональные группы определяют данные свойства? Назовите примеры других природных алкалоидов.

2. Опишите фармакологическое действие дибазола. Что такое фармакодинамика и фармакокинетика?

11.2. Качественные реакции на папаверин



1-(3,4-диметоксибензил)-6,7-диметокси-изохинолина гидрохлорид

Цель работы: провести качественные реакции на папаверин.

Реактивы: таблетки «Папаверин», «Папазол» или субстанция папаверина гидрохлорида, азотная кислота (HNO_3 ; конц.), серная кислота (H_2SO_4 ; конц.), формалин, р-р иода (I_2 ; $c = 0.1$ моль/л), соляная кислота (HCl ; $\omega = 1 \%$) фосфорномолибденовая кислота ($\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{MoO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\omega = 10 \%$).

Оборудование: фарфоровая (или агатовая) ступка и пестик, пипетки, пипет-дозаторы, химические термостойкие стаканы, пузырьки объемом 10 мл, бюксы, мерные цилиндры, воронки, фильтровальная бумага, электроплитка, весы аналитические, шпатели.

Ход работы

Подготовка образца папаверина

5–6 таблеток папаверина размалывают в ступке до однородного порошкообразного состояния.

Опыт 1. В пенициллиновый пузырек помещают 0.02 г образца и приливают 1 мл HNO_3 (конц.). Раствор выстаивают 2–3 минуты и наблюдают за изменением окраски.

Опыт 2. В пенициллиновый пузырек помещают 0.02 г образца и приливают 1 мл H_2SO_4 (конц.). Раствор выстаивают 2–5 минут и наблюдают за изменением окраски. Далее пузырек нагревают на электроплитке, отмечают протекающие изменения.

Опыт 3. Реакция Соболевой. В пенициллиновый пузырек вносят последовательно 0.02 г размолотого папаверина, 0.5 мл концентрированной серной кислоты. Затем по каплям приливают раствор формалина. Отмечают последовательные изменения окраски. Результаты фиксируют в лабораторном журнале.

Опыт 4. Реакция Бушарда, Вагнера, Люголя. В химическом стакане на 50 мл взвешивают 0.05 г образца, приливают 20 мл дистиллированной воды. Суспензию встряхивают в течение 3–5 минут, затем фильтруют через фильтровальную бумагу. В пузырек отбирают 4 мл фильтрата, вносят 1–2 капли HCl ($\omega = 1 \%$) и добавляют несколько капель раствора йода (реактив Бушарда, Вагнера, Люголя). Наблюдают за изменениями.

Опыт 5. 4 мл ранее полученного фильтрата вносят в пенициллиновый пузырек, приливают 2–4 капли фосфорномолибденовой кислоты ($\omega = 10 \%$) и нагревают на электроплитке до начала кипения. Наблюдают за изменениями.

Контрольные вопросы

1. За счет чего папаверин образует соль с соляной кислотой? Почему используется именно соляная кислота?
2. Каковы механизмы реакций, протекающих в данной лабораторной работе в опытах 1–3? Опишите атакующие агенты и то, как они образуются.
3. Что такое реактив Марки? Почему реакция не будет идти в присутствии разбавленной серной кислоты?
4. Что такое реактив Бушарда, Вагнера, Люголя? За счет чего удается растворить йод в полярном растворителе?

Лабораторная работа 12

12.1. Качественные реакции на парацетамол

Цель работы: провести качественные реакции на парацетамол.

Реактивы: таблетки «Парацетамол-МС», раствор хлорида железа(III) 6-водного ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $c = 1$ г/л), раствор бихромата калия ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$; $c = 2$ г/л), кислота соляная (HCl ; $\omega = 10\%$), ДМФА.

Оборудование: пипетки, химические термостойкие стаканы, пузырьки объемом 10 мл, электроплитка, фарфоровая (или агатовая) ступка и пестик, колба Бунзена, воронка Бюхнера, конические колбы, воронки, мерные цилиндры, весы аналитические.

Ход работы

Подготовка образца парацетамола

Берут 4–5 таблеток парацетамола и при помощи пестика размалывают таблетки в мелкий порошок. Отбирают 0.5 г парацетамола в емкость (например, в пенициллиновый пузырек или бюкс) и приливают 2 мл ДМФА. Полученную суспензию перемешивают 2–3 минуты. Органическую фазу количественно переносят в химический термостойкий стакан при помощи 25 мл дистиллированной воды. Полученный раствор также энергично перемешивают. Если есть комочки, их растирают стеклянной палочкой. Далее раствор фильтруют через фильтровальную бумагу либо под вакуумом. Полученный раствор используют для дальнейшего анализа.

Опыт 1. В пенициллиновый пузырек переносят 2 мл подготовленного образца парацетамола, а затем приливают 2 мл р-ра

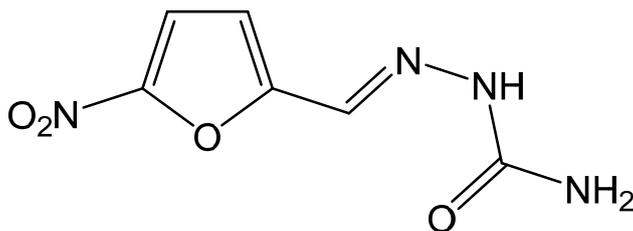
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($c = 1$ г/л). Наблюдают полученный результат и фиксируют его в лабораторный журнал.

Опыт 2. В один пенициллиновый пузырек вносят 5 мл образца парацетамола, а в другой — 5 мл дистиллированной воды, в оба пузырька вносят 4–5 капель HCl ($\omega = 10\%$) и кипятят на электрической плитке 2 минуты. Далее растворы охлаждают до $50\text{--}60^\circ\text{C}$ и вносят 2 мл р-ра $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($c = 2$ г/л). Растворы снова кипятят на электрической плитке 1–3 минуты. Отмечают полученные изменения, делают соответствующие выводы.

Контрольные вопросы

1. Какое соединение образуется в первом опыте?
2. Для чего нужен раствор бихромата калия, соляной кислоты и воды? Напишите уравнения протекающих реакций (опыт 2).

12.2. Реакции подлинности на фурацилин



2-[(5-Нитро-2-фуранил)метилен]гидразинкарбоксамид

Цель работы: провести качественные реакции на парацетамол.

Реактивы: водно-органический р-р фурацилина, гидроокись натрия (NaOH ; $\omega = 10\%$).

Оборудование: пипетки, пипет-дозаторы, химические термостойкие стаканы, электроплитка, мерные цилиндры.

Ход работы

В термостойкий химический стакан на 50 мл помещают 2–4 мл водно-органического раствора фурацилина, приливают 20 мл дистиллированной воды. При наличии взвеси раствор подогревают, не допуская кипения. Далее вносят 2 мл NaOH ($\omega = 10\%$) и наблюдают за изменениями. Полученный раствор кипятят 10–15 минут и наблюдают за изменением окраски.

Контрольные вопросы

1. Что обуславливает желтую окраску соединения и раствора фурацилина? Что такое основные и дополнительные цвета?
2. Чем обусловлена смена окраски раствора фурацилина при добавлении щелочи?

Лабораторная работа 13

13.1. Различие аминокислот по способности к комплексообразованию

Цель работы: провести качественное определение аминокислот при помощи реакции комплексообразования.

Реактивы: раствор 2-аминоуксусной кислоты ($\omega = 1\%$), раствор аминоэтансульфоновой кислоты ($\omega = 1\%$), гидроокись натрия (NaOH; $\omega = 10\%$), медь сернокислая 5-водная ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\omega = 4\%$).

Оборудование: стаканы химические, пузырьки объемом 10 мл, пипетки, пипет-дозаторы, пробирки.

Ход работы

В один из пенициллиновых пузырьков вносят 2 мл раствора 2-аминоуксусной кислоты ($\omega = 41\%$), в другой — 2 мл раствора аминоэтансульфоновой кислоты ($\omega = 1\%$). В каждую из емкостей вносят 2 мл 10% раствора NaOH ($\omega = 10\%$) и 0.2 мл раствора $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($\omega = 4\%$). Наблюдают за ходом реакций, делают соответствующие выводы.

Контрольные вопросы

1. Назовите тривиальные названия аминокислот, используемых в лабораторной работе. Изобразите полученные комплексные соединения. Укажите биологическое значение данных аминокислот.

13.2. Взаимодействие 2-аминоуксусной кислоты с ионами Fe^{2+} и Fe^{3+}

Цель работы: провести реакции 2-аминоуксусной кислоты с солями Fe^{2+} и Fe^{3+} .

Реактивы: сульфат железа (III) ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, сух.), сульфат железа (II) (FeSO_4 , сух.), раствор 2-аминоуксусной кислоты ($\omega = 1\%$).

Оборудование: стаканы химические объемом 50 мл, пузырьки объемом 10 мл, пипетки, пипет-дозаторы, пробирки, шпатели, весы аналитические, плитка электрическая.

Ход работы

В две химические емкости помещают 0.05 г. $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (сух.) и FeSO_4 (сух.) соответственно (одно соединение — одна емкость). Приливают 10 мл дистиллированной воды и нагревают на электроплитке до растворения. В обе емкости вносят 3 мл раствора 2-аминоуксусной кислоты ($\omega = 1\%$). Оба раствора подогревают до начала кипения, наблюдают за изменением окраски. Отмечают протекание соответствующих реакций, делают выводы.

Контрольные вопросы

1. Предположите, как в фармацевтической отрасли используют данные реакции.

Литература

1. ГОСТ Р 52249-2009. Правила производства и контроля качества лекарственных средств. Good manufacturing practice for medicinal products (GMP). — URL : <http://docs.cntd.ru/document/1200071754>
2. ОСТ 42-510-98. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP). — URL : <http://docs.cntd.ru/document/901755081>
3. ГОСТ Р ИСО 9001-2008. Системы менеджмента качества. Требования. Quality management systems. Requirements. — URL : <http://docs.cntd.ru/document/1200068732>
4. Приказ Минпромторга России от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики». — URL : http://pharmacta.ru/docs/internal/Order_Minprom_916.pdf
5. Директива 2003/94/ЕС от 08.10.2003 «Об установлении основных принципов и правил надлежащей производственной практики лекарственных препаратов для человека и исследуемых лекарственных препаратов для человека». — URL : https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2003_94/dir_2003_94_en.pdf
6. ICH Q8, «Фармацевтическая разработка» (ICH Q8 — Pharmaceutical Development). — URL : <https://book.xyz/dl/2525830/dffbb6>
7. ICH Q10 «Фармацевтическая система качества» (ICH Q10 — Pharmaceutical Quality System). — URL : https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q10/Step4/Q10_Guideline.pdf
8. ОФС.1.1.0012.15. Валидация аналитических методик. — URL : <http://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik/>
9. ICH Q2 (R1). Руководство по валидации аналитических методик проведения испытаний лекарственных средств (Validation of analytical procedures: Text and Methodology). — URL : https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf

Оглавление

1. Концепция надлежащих практик GxP.	
Жизненный цикл лекарственных средств и препаратов.....	3
2. Валидация аналитических методик	9
Лабораторные работы	21
Лабораторная работа 1	21
Лабораторная работа 2.....	23
Лабораторная работа 3.....	25
Лабораторная работа 4.....	27
Лабораторная работа 5.....	29
Лабораторная работа 6.....	31
Лабораторная работа 7.....	33
Лабораторная работа 8.....	37
Лабораторная работа 9.....	39
Лабораторная работа 10.....	41
Лабораторная работа 11.....	43
Лабораторная работа 12.....	46
Лабораторная работа 13.....	48
Литература	50

Учебное издание

Лебедев Антон Сергеевич
Орлов Владимир Юрьевич

**Лабораторный контроль лекарственных средств
в соответствии с правилами GLP и GMP**

Учебно-методическое пособие

Редактор, корректор М. Э. Левакова
Верстка М. Э. Леваковой

Подписано в печать 06.03.2019. Формат 60×84 1/16.

Усл. печ. л. 3,02. Уч.-изд. л. 2,2.

Тираж 2 экз. Заказ

Оригинал-макет подготовлен
в редакционно-издательском отделе ЯрГУ.

Ярославский государственный университет
им. П. Г. Демидова.
150003, Ярославль, ул. Советская, 14.