Занятие № 1

Тема: **ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА СКОРОСТЬ ИХ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ИЗ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ**

Физическое состояние лекарственных средств оказывает существенное влияние на их фармакологическое действие. Это понятие включает такие показатели, как степень измельчения, полиморфизм лекарственных веществ, агрегатное состояние, степень чистоты, упаковка и срок хранения препарата.

Наиболее существенное влияние на фармакотерапию оказывает дисперсность лекарственных средств. Степень измельчения имеет не только технологическое значение, определяя такие параметры, как сыпучесть, однородность смешивания, точность дозирования, насыпную массу, но и может значительно изменять скорость и полноту всасывания препарата. Выбор степени измельчения в каждом конкретном случае индивидуален. На фармакотерапию влияет как недостаточная дисперсность, так и микронизирование частиц. Поэтому лекарственные вещества в лекарственных препаратах должны иметь оптимальную степень измельчения.

Одним из существенных свойств лекарственных средств, влияющих на фармакотерапию, является полиморфизм. Одни и те же лекарственные вещества могут находиться в различных полиморфных модификациях (от 2 до 10 и более), активных и неактивных. Рациональное использование явления полиморфизма является одним из требований при создании препаратов.

На фармакотерапию оказывает существенное влияние агрегатное состояние лекарственного вещества (форма и характер кристаллов, растворимость, вязкость и рН среды, оптические свойства, электропроводимость, поверхностное натяжение, температура плавления и др.). Особую роль в фармакологической активности играет растворимость лекарственных веществ. От растворимости, характера дисперсной среды, рН зависит скорость и полнота наступлеG ния эффекта, а также его длительность.

На действие лекарственного препарата влияет степень его чистоты. Вид и наличие загрязнений может способствовать как изменению терапевтического эффекта, так и появлению нежелательного побочного действия.

Таким образом, физическое состояние лекарственных препаратов оказывает существенное влияние на фармакологическое действие, может усилить и, наоборот, уменьшить его активность, а также побочные эффекты, поэтому изучение данной темы является актуальным.

**Цель занятия:** Формирование знаний, умений, практических навыков по изучению влияния степени измельчения стрептоцида и полиморфных модификаций цинкинсулина на скорость их высвобождения из соответствующих лекарственных форм.

**Для этого необходимо:** Знать физико-химические свойства лекарственных веществ и уметь находить их в аналитической нормативной документации (АНД) и справочной литературе.

Знать и использовать влияние физических и технологических факторов на скорость высвобождения субстанций из лекарственной формы.

Знать причины возникновения полиморфных модификаций лекарственных веществ.

Готовить тритурационные мази с учетом количеств и физикохимических свойств лекарственных веществ.

Пользоваться методом «агаровых пластинок» и диффузии через полупроницаемую мембрану для оценки степени высвобождения лекарственных веществ из мазей.

Владеть методами анализа сульфаниламидных препаратов в диализате.

Уметь работать с лабораторными животными. Рассчитывать дозу препарата для введения животному и вводить препарат подкожно.

Проводить забор крови из ретроорбитального венозного сплетения или хвостовой вены белой крысы и ушной вены кролика. Владеть методикой определения глюкозы в крови.

Обобщать полученные данные и проводить статистическую обработку полученных результатов. Строить кривые кинетики высвобождения субстанций из лекарственных форм и делать выводы о влиянии степени дисперсности стрептоцида и полиморфных модификаций цинкинсулина на процесс их высвобождения из соответствующих лекарственных форм.

**Теоретические вопросы, на основании которых возможно выполнение целевых видов деятельности**

1.Биофармация как научное направление и ее значение при разработке состава и технологии лекарственных форм.

2.История развития биофармации.

3.Основные понятия и термины биофармации.

4.Основные задачи биофармации на современном этапе и их роль для практического здравоохранения.

5.Фармацевтические факторы, влияющие на терапевтическую эффективность лекарственных средств.

6.Физическое состояние лекарственных и вспомогательных веществ в лекарственных формах и их влияние на скорость высвобождения и всасывания препаратов.

7.Использование различной степени дисперсности лекарственных веществ с целью создания лекарственных препаратов с различной биологической доступностью.

8. Понятие о полиморфизме.

9. Влияние кристаллической структуры и полиморфизма лекарственных веществ на терапевтическую активность лекарственных препаратов.

10. Влияние природы растворителя, растворимости, степени вязкости и рН среды на всасывание лекарственных средств.

11. Степень чистоты лекарственного препарата и ее влияние на фармакотерапию.

12. Зависимость терапевтической активности лекарственных средств от вида и качества упаковки.

Аудиторная самостоятельная работа

**Задание № 1**

Установить влияние степени дисперсности стрептоцида на процесс его высвобождения из мазей методом «агаровых пластинок».

Методические рекомендации

к выполнению задания

Изучение влияния степени измельчения вещества на процесс всасывания удобно определять для мазей или суппозиториев, приготовленных на одной и той же основе, применяя фракции лекарственного вещества, величина частиц которых заметно отличается. Метод прямой диффузии в агаровый гель, известный под названием «агаровых пластинок», основан на образовании окрашенных продуктов лекарственных веществ с реактивами. Объектами исследования служат 10 % стрептоцидовые мази с различной степенью измельчения стрептоцида: мазь № 1 — диаметр частиц стрептоцида (ds) = 0,1 мм; мазь № 2 — диаметр частиц стрептоцида (ds) = 0,38 мм. Перед выполнением задания ознакомьтесь с алгоритмом экспериментальной работы к заданию № 1 (приложение 1).

**АЛГОРИТМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РАБОТЫ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ВЛИЯНИЯ СТЕПЕНИ ДИСПЕРСНОСТИ СТРЕПТОЦИДА НА ПРОЦЕСС ЕГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ИЗ МАЗЕЙ МЕТОДОМ «АГАРОВЫХ ПЛАСТИНОК»**

|  |
| --- |
| Приготовление  агаровых пластинок  в чашках Петри |

|  |
| --- |
| Приготовление мазей стрептоцидовых 10 %  № 1 (ds = 0,1 мм) и № 2 (ds = 0,38 мм |

|  |
| --- |
| Внесение мазей в лунки агаровых пластинок |

|  |
| --- |
| Инкубирование чашек Петри при температуре 37 °С в термостат |

|  |
| --- |
| Измерение диаметра окрашенной зоны через 0,5; 1; 2 часа от начала опыта |

|  |
| --- |
| Статистическая обработка результатов опыта |

|  |
| --- |
| Выводы |

Приготовление геля и агаровых пластинок Агаровый гель готовят 2 % концентрации в предварительно старированном стеклянном стакане, плотно закрытом крышкой. Измельченный агар (ГОСТ 6470 – 53) заливают водой очищенной и оставляют на 30 мин для набухания. Набухший агар нагревают до кипения, доводят до необходимой массы и к теплому гелю добавляют 5 % реактива Эрлиха. Состав реактива Эрлиха: пдиметиламинобензальдегида 0,5 г, концентрированной кислоты хлороводородной и этанола 95 % по 15 мл, нGбутанола 90 мл. Приготовленный агаровый гель разливают в чашки Петри (диаметр 98–100 мм, высота 20 мм), которые расG

Приготовление агаровых пластинок в чашках Петри

Приготовление мазей стрептоцидовых 10 % № 1 (ds = 0,1 мм) и № 2 (ds = 0,38 мм)

Внесение мазей в лунки агаровых пластинок

Инкубирование чашек Петри при температуре 37 °С в термостате

Измерение диаметра окрашенной зоны через 0,5; 1; 2 часа от начала опыта

Статистическая обработка результатов опыта

Выводы

ставляют на столе, предварительно выверенном по горизонтальному уровню с помощью ватерпаса. Агар разливают в чашки двумя порциями по 10 и 15 мл. После застывания первой порции агара на ее поверхность в каждую чашку помещают три цилиндра из нержавеющей стали или стекла (наружный диаметр 8 мм, высота до 10 мм) и заливают второй слой агара. После застывания агара цилиндры осторожно вынимают.

**Технология мазей**

Для получения фракций различной степени дисперсности 50 г стрептоцида просеивают через набор сит, отделяя частицы размером 0,38 мм. Стрептоцид с частицами менее 0,38 мм дополнительно измельчают в ступке с 95 % спиртом в течение 10 мин и просеивают через сита, отбирая фракцию с размером частиц 0,1 мм. Мази готовят 10 % концентрации с использованием любой имеющейся в наличии мазевой основы (например, вазелина), часть которой предварительно подплавляют и смешиают с определенной фракцией стрептоцида. Во избежание нежелательного дальнейшего измельчения частиц дисперсной фазы, мазевую основу подплавляют и смешивают с веществом, используя пропеллерную мешалку (1500 об/мин). При отсутствии пропеллерной мешалки мазь можно приготовить следующим образом: в ступку помещают стрептоцид с определенным размером частиц и смешивают по правилу Дерягина с половинным количеством расплавленной основы, а затем добавляют оставшуюся нерасплавленную основу и перемешивают.

**Определение скорости высвобождения**

**лекарственных веществ из мазей**

Мази, содержащие лекарственное вещество с различной степенью дисперсности, помещают в лунки двух чашек с агаром. Чашки нумеруют или указывают степень измельчения. Мазь в лунки вносят с помощью стеклянной

палочки, осуществляя контроль за тем, чтобы был хороший контакт с агаром. Чашки помещают в термостат с температурой 37 °С. Лекарственное вещество, высвобождаясь из мази, диффундирует в агаровый гель, взаимодействуя с реактивом Эрлиха и образуя окрашенную зону. Через 0,5; 1; 2 часа с помощью линейки измеряют диаметр окрашенной зоны. В случае образования эллипса измеряют больший и меньший диаметр и определяют среднее значение диаметра окрашенной зоны. Статистическую обработку полученных результатов проводят по методу Монцевичюте Эрингене. Ошибку среднего арифметического вычисляют по формуле: т = ± Σ а · k, где т — ошибка среднего арифметического диаметров окрашенных зон; Σ — сумма; а — цифровые значения отклонений диаметров зон от среднего арифметического со знаком «плюс» или «минус»; k — величина, зависящая от числа вариантов, т. е. количества опытов (п) для каждого образца мази (табл. 1).

Пример расчета Мазь № 1. (ds = 0,1 мм). 1 час d1 = 20 мм d2 = 20 мм dсp = 20 20 21 3 ++ = 20,3 (мм) d3 = 21 мм

№ опыта 1 20,3 – 20 = +0,3

2 20,3 – 20 = +0,3

3 20,3 – 21 = – 0,7

a = | + 0,3 | + | +0,3 | + | − 0,7 | = 1,3 (значения «а» суммируются без учета алгебраических знаков);

m = 1,3 · 0,29004 = 0,38;

d = 20,3 ± 0,38 (мм).

Полученные данные внесите в табл. № 1.

**ДИФФУЗИЯ СТРЕПТОЦИДА С РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНЬЮ ДИСПЕРСНОСТИ ИЗ МАЗЕЙ**

Мазь Диаметр окрашенной зоны, мм

0,5 часа 1 час 2 часа

№ 1

№ 2

После выполнения задания сформулируйте выводы о влиянии степени дисперсности стрептоцида на его высвобождение.

**Задание № 2**

Установить влияние степени дисперсности стрептоцида на процесс его высвобождения из мазей методом диализа через полупроницаемую мембрану.

**Методические рекомендации**

**к выполнению задания**

Для оценки степени высвобождения лекарственных веществ из мазей используют метод прямой диффузии, при которой лекарственное вещество из мазевой основы диффундирует в среду, отделенную от мази полупроницаемой мембраной. В качестве мембраны используют целлофан толщиной 45 мкм. Средой является вода очищенная. Перед выполнением задания ознакомьтесь с алгоритмом экспериментальной работы к заданию № 2 (приложение 2).

**АЛГОРИТМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РАБОТЫ ПО ИЗУЧЕНИЮ ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОРФНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ПРЕПАРАТОВ ИНСУЛИНА НА СКОРОСТЬ ЕГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ**

|  |
| --- |
| **Животные (4головы)** |

|  |
| --- |
| **ЦинкGинсулин аморфный ЦинкGинсулин кристаллический** |

|  |
| --- |
| **Разведение препаратов (1:100)** |

|  |
| --- |
| **Взвешивание животных** |

|  |
| --- |
| **Расчет дозы** |

|  |
| --- |
| **Введение препаратов животным** |

|  |
| --- |
| **Определение концентрации глюкозы в крови** |

|  |
| --- |
| **Забор крови через 1; 1,5; 2 часа от начала опыта** |

|  |
| --- |
| **Построение кривых кинетики изменения концентрации глюкозы в крови под влиянием препаратов инсулина** |

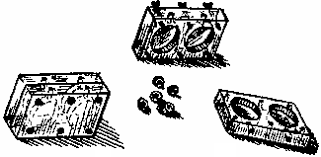
|  |
| --- |
| **Выводы** |

Полученные экспериментальные данные внесите в таблицу № 3 и на их основании постройте график в коордиG натах: по оси ординат — концентрация глюкозы в крови (С, м моль/л); по оси абсцисс — время (t, ч).

**Определение степени высвобождения**

**стрептоцида из мазей**

Для эксперимента используют камеру для диализа с двумя ячейками, состоящую из двух частей. Ячейки нумеруют, в 1ю донорную ячейку помещают стрептоцидовую мазь с диаметром частиц 0,1 мм, во 2Gю — с диаметром частиц 0,38 мм. Ячейки должны быть заполнены доверху. На поверхность накладывают целлофан и собирают диализатор (рис. 1). С помощью пипетки с тонким концом или шприца с иглой в рецепторные ячейки вносят по Диализатор Мазь стрептоцида 10 % № 1 Мазь стрептоцида 10 % № 2 Заполнение донорных ячеек диализатора мазями Отбор проб диализатора из рецепторных ячеек через 0,5; 1; 1,5 часа от начала опыта Заполнение рецепторных ячеек диализатора водой очищенной Инкубирование диализатора в термостате при температуре 37 °С Выводы Количественное определение стрептоцида Построение кривых кинетики высвобождения стрептоцида из мази 15 15 мл воды очищенной. Диализатор помещают в термостат при температуре 37 °С

****

**Рис. 1.** Диализатор в собранном виде (а) и разобранном (б)

Отбор проб диализата из рецепторных ячеек проводят через 0,5; 1; 1,5 часа от начала опыта, восполняя водой очищенной отобранное количество раствора. Образец пробы диализата анализируют на содержание стрептоцида. Количественное определение стрептоцида В мерную колбу на 100 мл вносят 2 мл анализируемого диализата, содержащего 0,05–0,5 мг стрептоцида, прибавляют 8 мл воды очищенной и 2,5 мл 10 % раствора кислоты хлороводородной. Колбу помещают на 10 минут в ванну со льдом, затем прибавляют 5 мл 0,5 % свежеприготовленного раствора натрия нитрита. Через 5 мин прибавляG ют 1 г мочевины и взбалтывают. Спустя 15 мин прибавляют 1 мл свежеприготовленного 0,5 % раствора тимола в 10 % растворе натрия гидрооксида и 5 мл 10 % раствора натрия гидрооксида. Через 10 мин содержимое колбы доводят водой до метки. Содержание стрептоцида определяют на фотоэлектроколориметре КФМGЦG2 с синим светофильтром (максимум пропускания 400 нм) в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве контроля используют смесь всех реактивов, обработанную аналогично. а б Рис. 1. Диализатор в собранном виде (а) и разобранном (б) 16 Фотоэлектроколориметр КФМGЦG2 предварительно калибруют по стандартному раствору. Приготовление стандартного раствора В мерную колбу на 1000 мл вносят 0,05 г (точная навеска) стрептоцида, растворяют в 10 мл спирта этилового и доводят водой очищенной до метки. В 1 мл раствора содержится 0,05 мг стрептоцида. В мерную колбу на 100 мл вносят 6 мл приготовленного раствора стрептоцида, прибавляют 4 мл воды очищенной. Далее поступают, как указано в разделе количественного определения стрептоцида. Приготовленный стандартный раствор используют для калибровки фотоэлектроколориметра КФМGЦG2, устанавливая масштаб таким образом, чтобы показания прибора численно совпадали с концентрацией вещества в пределах ±2 единицы счета (0,3 ± 0,02). Расчет количества стрептоцида (Х, мг), высвободившегося из мази за определенный промежуток времени, проводят по формуле:

Xп = C .V + Yn

V1

где С — содержание стрептоцида в 2 мл диализата, найденное по показаниям прибора (мг);

V — объем диализата в ячейке камеры (мл);

V1 — объем диализата, отобранного для анализа (мл);

Yn — количество стрептоцида, содержащееся в ранее отобранном диализате (мг)

Y1 = 0; Y2 = С1 ; Y3 = С1 +С2 .

**Пример расчета**

Мазь № 1. (ds = 0,1 мм).

0,5 часа — 0,048 мг

Х 1 = 0 048 15: 2 ⋅ = 0,36 (мг)

1 час — 0,067

мг Х2 = 0 067. 15:2 , ⋅ + 0,048 = 0,55 (мг)

1,5 часа — 0,081

мг Х3 = 0 067 . 15 : 2 , ⋅ + 0,048 + 0,067 = 0,72 (мг)

Полученные данные о количестве высвободившегося стрептоцида за определенные промежутки времени внесите в табл. 2, а затем на их основании постройте график в координатах: по оси ординат откладывают концентрацию высвободившегося стрептоцида (С, мг); по оси абсцисс — время (t, ч).

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Мазь | Количество высвободившегося стрептоцида, мг | | |
|  | 0,5 часа | 1 час | 1,5 часа |
| № 1 |  |  |  |
| № 2 |  |  |  |

После выполнение задания сформулируйте выводы о влиянии степени дисперсности стрептоцида на его высвобождение и сравните результаты, полученные методами «агаровых пластинок» и диализа.

**Задание № 3**

Установить влияние полиморфных модификаций препаратов инсулина на скорость его высвобождения методом «in vivo».

**Методические рекомендации**

**к выполнению задания**

***Объектами исследования*** служат цинкинсулин аморфный и кристаллический, широко используемые в медицинской практике при сахарном диабете. 0,5 часа 1 час 1,5 часа № 1 № 2 Количество высвободившегося стрептоцида, мг Мазь 18 Проводя эксперимент, в учебных целях используют трех животных (белые крысы или кролики) одинаковой массы после 18Gчасового голодания. У животных определяют исходную концентрацию глюкозы в крови. После этого двум животным подкожно вводят соответственно препараты: цинкинсулин аморфный и цинкинсулин кристаллический в дозе 1,0 ЕД/кг. Принимая во внимание небольшую массу тела опытных животных (белых крыс), используют препараты в разведении 1:100. Третье животное является контрольным. Определение концентрации глюкозы в крови животных проводят через 1; 1,5; 2 часа от начала опыта. Перед выполнением задания ознакомьтесь с алгоритмом экспериментальной работы к заданию № 3 (приложение 3). Определение глюкозы в крови В четыре центрифужные пробирки помещают по 1,5 мл 3 % раствора трихлоруксусной кислоты. В три из них вносят по 0,1 мл крови, взятой из ретроорбитального венозного сплетения или хвостовой вены соответствующего животного, а в четвертую — 0,4 мл стандартного раствора глюкозы. Смесь взбалтывают и центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин, затем в 4 химические пробирки помещают по 1,5 мл ортотолуидинового реактива и добавляют по 1 мл центрифугата. Пробирки со смесью встряхивают и помещают в кипящую водяную баню на 10 мин. После этого их охлаждают под струей холодной воды. Оптическую плотность раствора измеряют с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭКG56 ПМ) при красном светофильтре (№ 8) с длиной волны 600–650 нм в кювете с толщиной слоя жидкости 5 мм. В качестве раствора сравнения используют воду очищенную. Концентрацию глюкозы в крови (м моль/л) рассчитывают по формуле:

**Con Ccm . Eon**

|  |
| --- |
| ***Eon*** |
|  |

где Cоп — концентрация глюкозы в опытной пробе (м моль/л);

Сст — концентрация глюкозы в стандартной пробе (м моль/л);

Eoп — оптическая плотность опытной пробы;

Ест — оптическая плотность стандартного раствора

**АЛГОРИТМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ РАБОТЫ ПО ИЗУЧЕНИЮ ВЛИЯНИЯ ПОЛИМОРФНЫХ МОДИФИКАЦИЙ ПРЕПАРАТОВ**

**ИНСУЛИНА НА СКОРОСТЬ ЕГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ**

Животные (4 головы) Цинк-инсулин аморфный

| Цинк-инсулин кристаллический

Взвешивание животных |

Разведение препаратов(1:100)

Расчет дозы

|

Введение препаратов животным

|

Определение концентрации глюкозы в крови

|

Забор крови через 1; 1,5; 2 часа от начала опыта

|

Построение кривых кинетики изменения концентрации глюкозы в крови под влиянием препаратов инсулина

|

Выводы

Полученные экспериментальные данные внесите в таблицу № 3 и на их основании постройте график в координатах: по оси ординат — концентрация глюкозы в крови (С, м моль/л); по оси абсцисс — время (t, ч).

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Маркировка | Масса животного, кг | Препарат | Концентрация глюкозы в крови,  м моль/л | | | |
| Исходная | 1 час | 1,5 часа | 2 часа |
|  |  |  |  |  |  |  |

После выполнения задания сформулируйте выводы о влиянии полиморфных модификаций цинкинсулина на уровень сахара в крови