**Лабораторно-практическое занятие №1.**

**Тема: Основные понятия биофармацевтического анализа ЛС.Основные положения аналитического контроля ЛС.**

**Техника безопасности в лаборатории**

**Цель работы:** изучить технику безопасности и теоретических основ анализа - лекарственных средств, сформировать умения и практических навыков правильного и точного выполнения анализа.

**Материалы и оборудование**:- инструкция по ТБ, паспорта лабораторного оборудования.

**Теоретическое обоснование работы**

**Биофармацевтический анализ -** раздел клинической фармации, биофармации и клинической фармакокинетики. Основоположником метода в России является доктор фармацевтических наук, заслуженный деятель науки РФ, профессор В.Г.Беликов, им предложен и сам термин «биофармацевтический анализ».

Биофармацевтический анализ используется в следующих случаях:

• при исследовании фармакокинетики нового препарата или новой лекарственной формы;

• в клинико-фармакологических исследованиях (для расчета оптимальных схем дозирования, проведения терапевтического мониторинга);

• в судебно-медицинских и клинико-токсикологических исследованиях (для определения препарата, вызвавшего отравление, и для контроля за детоксикационными мероприятиями).

Основной задачей биофармацевтического анализа является разработка способов выделения, очистки, идентификации и количественного определения ЛВ и их метаболитов в таких биологических жидкостях, как моча, слюна, кровь, плазма или сыворотка крови и др. с целью фармакокинетической оптимизации процессов фармакотерапии.

Цели биофармацевтического анализа:

Определение концентрации лекарственных веществ и их метаболитов в биологических жидкостях организма человека;

• Изучение фармакокинетики лекарственных средств;

• Изучение биологической доступности лекарственных средств;

• Изучение биотрансформации лекарственных средств;

Установление диапазона минимального терапевтического и токсического уровней препаратов в организме;

Выявление зависимости фармакокинетических параметров и концентрации лекарственного вещества от состояния организма человека;

Расчет индивидуальных схем дозирования лекарственных средств на основе их количественного определения в биожидкостях.

Фармакокинетические исследования проводятся специалистами в области аналитической химии, провизорами, биологами, но результаты таких исследований могут быть очень полезны для врачей. На основании данных о фармакокинетике того или иного препарата определяют дозы, оптимальный путь введения, режим дозирования и продолжительность лечения. Знания основных принципов фармакокинетики особенно нужны в случаях, когда неясны причины неэффективного лечения или плохой переносимости препарата, при лечении больных с заболеваниями печени и почек, при одновременном применении нескольких лекарственных средств. Фармакокинетические исследования необходимы при разработке новых препаратов, новых лекарственных форм, а также при экспериментальных и клинических испытаниях лекарственных средств.

Составные части фармакокинетических процессов - всасывание, распределение, биотрансформация и выведение.

Особенно важно определять в биологических жидкостях концентрацию ЛВ, когда они наряду с терапевтическим эффектом проявляют токсичность. Необходимо также контролировать содержание ЛВ в биологических жидкостях больных, страдающих желудочно-кишечными заболеваниями и заболеваниями печени и почек. При таких заболеваниях изменяются процессы всасывания, нарушаются метаболические процессы, замедляется выведение ЛВ из организма.

Биологические жидкости - очень сложные объекты для выполнения анализа. Они представляют собой многокомпонентные смеси, включающие большое число неорганических и органических соединений различной химической структуры: микроэлементы, аминокислоты, полипептиды, белки, ферменты и др. Их концентрация колеблется от 10 мг/мл до нескольких нанограммов. Даже в такой относительно простой физиологической жидкости, как моча, идентифицировано несколько сотен органических соединений. Всякий биологический объект - очень динамичная система. Ее состояние и химический состав зависят от индивидуальных особенностей организма, воздействия факторов внешней среды (состав пищи, физическая и психическая нагрузка и т.д.). Все это еще в большей степени усложняет выполнение биофармацевтического анализа, так как на фоне столь большого количества сложных по химическому строению органических веществ нужно определять нередко очень малые концентрации лекарственных веществ. Вводимые в биологические жидкости лекарственные вещества в процессе биологической трансформации образуют метаболиты, количество которых нередко исчисляется несколькими десятками. Выделение этих веществ из сложных смесей, разделение на индивидуальные компоненты и установление химического состава - задача необычайно трудная.

Таким образом, можно выделить следующие особенности биофармацевтического анализа:

1. Объекты анализа представляют собой многокомпонентные смеси веществ, сходных по химическому строению, поэтому можно использовать только высокоселективные методы анализа.

2. В пробах находятся малые количества определяемых веществ, поэтому метод анализа должен быть высокочувствительным.

3. Лекарственные вещества могут быть связаны в биологической пробе с белками, гормонами и другими компонентами пробы, что затрудняет их определение.

4. Условия подготовки пробы зависят от вида биожидкости.

Помимо теоретического значения, которое имеют исследования в области биофармацевтического анализа для изучения вновь создаваемых лекарственных веществ, несомненна и практическая роль этой отрасли знаний.

Следовательно, биофармацевтический анализ представляет собой своеобразный инструмент, необходимый для проведения не только биофармацевтических, но и фармакокинетических исследований.

Фармацевтический анализ — основа фармацевтической химии. Это — наука о химической характеристике и измерении БАВ на всех этапах производства (от контроля сырья до оценки качества полученных лекарств), изучения их стабильности, установления срока годности и стандартизации готовой лекарственной формы. Фармацевтический анализ имеет свои особенности:

- анализу подвергают вещества различной химической природы: неорганические, элементоорганические, радиоактивные, органические соединения от простых алифатических до сложных природных БАВ.

- объектами являются индивидуальные лекарственные вещества и смеси, содержащие различное число компонентов.

В зависимости от поставленных задач фарманализ включает различные формы контроля качества лекарств: фармакопейный анализ; постадийный контроль производства лекарственных средств; анализ лекарственных форм индивидуального приготовления; экспресс-анализ в условиях аптеки и биофармацевтический анализ. На основании полученных результатов анализа делается заключение о соответствии лекарственного средства требованиям ГФ или другой НТД. При отклонении от этих требований лекарство не допускается к применению.

Фармацевтический анализ начинают с внешнего осмотра ЛВ (описание): цвет/прозрачность, степень мутности, запах, агрегатное состояние (твердое вещество, жидкость, газ), форма кристаллов, гигроскопичность или степень выветриваемости на воздухе, устойчивость к воздействию света, кислорода воздуха; летучесть, подвижность, воспламеняемость, упаковка и т.д.

Далее берут среднюю пробу для установления подлинности и чистоты лекарственных веществ.

Испытание на подлинность — это подтверждение идентичности анализируемого лекарственного вещества (лекарственной формы), осуществляемое на основе требований ГФ или другой НТД. Испытания выполняют различными методами:

1. Физические методы установления подлинности:

• Физической константой, характеризующей подлинность и степень чистоты ЛС, является температура плавления. Чистое вещество имеет постоянную температуру плавления, которая изменяется в присутствии примесей (чаще снижается). ГФ рекомендует использовать капиллярный метод, при этом подразумевается интервал температур, при котором происходит процесс плавления препарата, т.е. от появления первых капель жидкости до полного перехода вещества в жидкое состояние. Для ЛВ, содержащих некоторое количество допустимых примесей, ГФ регламентирует интервал температуры плавления между началом и окончанием плавления, он должен находится в пределах 2°С. Для веществ, которые плавятся с разложением, обычно указывается температура, при которой вещество разлагается и происходит резкое изменение его вида.

• Для ряда жидких ЛС измеряют температуру затвердевания (это наиболее высокая, остающаяся в течение короткого времени постоянная температура, при которой происходит переход вещества из жидкого состояния в твердое) или кипения (по ГФ XI: «температурные пределы перегонки») — это интервал между начальной и конечной температурой кипения при нормальном давлении 760 мм рт.ст. Температура, при которой в приемник перегнались первые 5 капель жидкости, называют начальной температурой кипения, а температуру, при которой перешло в приемник 95% жидкости, — конечной температурой кипения. Температура кипения должна укладываться в интервал, приведенный в частной статье. Более широкий интервал свидетельствует о присутствии примесей. Примеси снижают терапевтический эффект и могут вызывать побочные действия.

Определяют допустимые значения плотности с помощью пикнометра или ареометра, реже вязкости, подтверждающие подлинность и доброкачественность ЛС.

Частные статьи ГФ X нормируют растворимость в различных растворителях. Присутствие примесей в ЛВ может повлиять на его растворимость, снижая или повышая ее в зависимости от природы примеси.

Важным критерием доброкачественности целого ряда ЛС является содержание в них воды (определение влажности). Изменение этого показателя (особенно при хранении) может изменить концентрацию действующего вещества, а, следовательно, и фармакологическую активность и сделать ЛС не пригодным к применению.

2. Оптические методы анализа используют для установления подлинности и количественного анализа ЛС: Показатель преломления луча света в растворе испытуемого вещества (рефрактометрия); удельное вращение, обусловленное способностью ряда веществ или их растворов вращать плоскость поляризации при прохождении через них света (поляриметрия); измерение количества света, поглощаемого раствором окрашенного вещества – фотометрия (включает колометрию, фотоколометрию и спектрофотометрию — ультрафиолетовая, инфракрасная; эмиссионная и атомно-абсорбционная спектрометрия, флуориметрия, спектроскопия ядерного магнитного резонанса, масс-спектрометрия);

3. Электрохимические методы, которые включают потенциометрическое определение рН, потенциометрическое титрование, амперометрическое титрование и др. Например, потенциометрическое титрование дает возможность точно установить эквивалентную точку конца титрования по изменению электродного потенциала, возникающим между раствором и погруженным в него электродом.

4. Хроматография (физико-химический метод) — адсорбционная, распределительная, ионообменная, газовая, высокоэффективная жидкостная; Электрофорез (фронтальный, зональный, капиллярный) - способность перемещения заряженных частиц в электрическом поле и их регистрация.

5. Химические методы. Относятся качественные реакции и количественный анализ (расм. на ЛЗ) на подлинность, растворимость, определение летучих веществ и воды, реакции нейтрализации, осаждения, определение содержания азота в органических соединениях, гравиметрические (весовые) и титриметрические (объемные) методы, нитритометрия, кислотное число, число омыления, эфирное число, йодное число и др.

6. Биологические методы контроля качества ЛС весьма разнообразны. Среди них испытания на токсичность, стерильность, микробиологическую чистоту.

Идентификация неорганических лекарственных веществ — это установление подлинности, основанное на обнаружении с помощью химических реакций катионов и анионов, входящих в состав их молекул. Используют:

1. Реакции осаждения анионов и катионов с образованием нерастворимых в воде веществ, которые могут быть охарактеризованы по окраске, растворимости (в кислотах, щелочах, органических растворителях), способности образовывать растворимые в избытке реактивов комплексные соединения и т.д.

2. Окислительно-восстановительные реакции.

3. Реакции нейтрализации и разложения анионов (по запаху, выделению оксидов и диоксидов).

4. Изменение окраски бесцветного пламени.

5. Изменения, происходящие при нагревании и прокаливании препаратов.

Идентификация элементоорганических ЛВ. Элементный анализ используют для испытания веществ, содержащих в молекуле атомы серы, фосфора, галогенов, мышьяка, висмута, ртути и др. Поскольку атомы этих элементов в лекарственных веществах не ионизированы, необходимым условием испытания их подлинности является предварительная минерализация. В результате происходит разрушение органической части молекулы (превращение углерода, водорода и кислорода в диоксид углерода и воду), а атомы серы, фосфора, галогенов, мышьяка, висмута, ртути образуют соответствующие ионы. Последние идентифицируют с помощью осадочных реакций на неорганические ионы.

Химические реакции, применяемые для установления подлинности органических ЛВ, можно разделить на три основные группы:

- общие химические реакции ОС: реакции замещения (нитрование, галогенирование, конденсация карбонильных соединений); превращения заместителей (диазотирование и азосочетание, ацилирование, этерификация); окисления-восстановления и т.д.;

- реакции образования солей комплексных соединений;

- реакции, используемые для идентификации органических оснований и их солей.

Эти группы реакций основаны на использовании функционального анализа, который позволяет дать объективную оценку подлинности ЛВ с помощью реакций на ту или иную функциональную группу. При этом происходит образование растворимого или нерастворимого в воде продукта реакции, а использование цветореагентов дает окрашенные соединения. В качестве реактивов применяют как неорганические ионы и комплексные соединения, так и органические вещества различной химической структуры. Наиболее просты по выполнению цветные реакции, выполняемые при участии ионов и органических реагентов в водной среде. Их используют для испытания подлинности, а также в фотометрическом и спектрофотометрическом анализах.

**Техника безопасности в лаборатории.**

Правила техники безопасности в химической лаборатории

Многие из веществ, используемых в органической химии, являются в той или иной мере воспламеняющимися, или токсичными, или теми и другими одновременно. Поэтому при работе в лаборатории необходимо строго соблюдать основные правила техники безопасности независимо от того, какой выполняют эксперимент.

1. Категорически запрещается работать одному в лаборатории, так как в экстренном случае будет некому оказать пострадавшему первую помощь и ликвидировать последствия неудавшегося эксперимента. Работать следует только в отведенное время под контролем преподавателя или других сотрудников.

2. Необходимо соблюдать тишину, чистоту и порядок. Поспешность и неряшливость в работе часто приводят к несчастным случаям. Нельзя отвлекать от работы и отвлекать своих товарищей. Запрещается держать на лабораторном столе посторонние предметы (сумки, учебники и т.д.).

3. Категорически запрещается принимать и хранить пищу, пить водку и курить.

4. Каждый должен знать, где находятся средства индивидуальной защиты, аптечка, средства для тушения пожара. Кроме очков, в лаборатории должны быть защитные маски, респираторы и противогазы. Во всех лабораториях в легко доступных местах находятся средства для пожаротушения (ящики с песком и совком, огнетушители, противопожарные одеяла), а также аптечки, которые снабжены всеми медикаментами, необходимыми для оказания первой медицинской помощи (растворы борной кислоты, гидрокарбоната натрия, перманганата калия, танина, нашатырного спирта, а также вата, бинт, иодная настойка, активированный уголь, мазь от ожогов, склянка для промывания глаз).

5. В лаборатории необходимо находиться в застегнутом хлопчатобумажном халате. Это обеспечивает некоторую индивидуальную защиту и позволяет избежать загрязнения одежды.

6. Приступать к работе можно после усвоения всей техники ее выполнения. Если вы испытываете какие-либо сомнения в методике проведения эксперимента или в технике безопасности, прежде чем продолжить работу, проконсультируйтесь с преподавателем.

7. Нельзя проводить опыты в загрязненной посуде. Посуду следует мыть сразу после окончания эксперимента.

8. Категорически запрещается пробовать химические вещества на вкус. Нюхать вещества следует осторожно, не поднося сосуд близко к лицу, а лишь направляя к себе пары или газы легким движением руки, при этом не следует делать полный вдох. Жидкие органические вещества и их растворы запрещается набирать в пипетки ртом, для этого необходимо использовать резиновые груши и другие приспособления.

9. В процессе работы необходимо следить, чтобы вещества не попадали на кожу, так как многие из них вызывают раздражение и ожоги кожи и слизистых оболочек.

10. Все банки, в которых хранятся вещества, должны быть снабжены этикетками с соответствующими названиями.

11. Запрещается нагревать, смешивать и взбалтывать реактивы вблизи лица. При нагревании нельзя держать пробирку или колбу отверстием к себе или в направлении работающего товарища.

12. Необходимо пользоваться защитными очками в следующих случаях:

а) при работе с едкими веществами (с концентрированными растворами кислот и щелочей, при дроблении твердой щелочи и т.д.);

б) при перегонке жидкостей при пониженном давлении и работе с ваккум-приборами;

в) при работе со щелочными металлами;

г) при определении температуры плавления вещества в приборе с концентрированной серной кислотой;

д) при работе с ампулами и изготовлении стеклянных капилляров.

13. Запрещено выливать в раковину остатки кислот и щелочей, огнеопасных и взрывоопасных, а также сильно пахнущих веществ. Для слива этих веществ в вытяжном шкафу должны находиться специальные сосуды с плотно притертыми крышками и соответствующими этикетками («СЛИВ КИСЛОТ», «СЛИВ ЩЕЛОЧЕЙ», «СЛИВ ОРГАНИКИ»).

14. Не разрешается бросать в раковину стекла от разбитой посуды, бумагу и вату.

15. После завершения работы необходимо отключить газ, воду, вытяжные шкафы и электроэнергию.

**Порядок выполнения лабораторной работы**

1. Изучить инструкции по технике безопасности для студентов, работающих в лаборатории для анализа ЛС, правила работы при выполнении

2. Познакомиться с оборудованием лаборатории.

3. Ознакомиться с различными видами реагентов для проведения биофармацевтического анализа

**Контрольные вопросы для самоподготовки:**

1. Дайте общее понятие биофармацевтическому анализу?
2. История развития данной науки?
3. Цели и задачи биофармацевтического анализа как наука?
4. Укажите виды аналитического анализа?
5. Классификация биофармацевтического анализа?
6. Расскажите применение биофармацевтического анализа?
7. Укажите основные правила проведения в лаборатории анализа ЛС?
8. Термины характеризующие ЛС и ЛВ?
9. Классификация лекарственных форм?
10. Особенности количественного экспресс анализа?

**Домашняя задания:**

Современные общие методы анализа качества ЛС. Приемы анализа качества ЛС.

**СРС:**Анализ лекарственных смесей