

Лекция. Тема: *Методы фармакогностического анализа сырья.*

План.

1. Анализ лекарственного сырья.
2. Методы фармакогностического анализа.
3. Товароведческий анализ.
 - 3.1. Приемка лекарственного растительного сырья;
 - 3.2. Отбор проб на анализ;
 - 3.3. Анализ проб.

Лекарственное сырье, подлежащее исследованию, может поступать крупными или мелкими партиями. На базы, склады и заводы сырье доставляют вагонами, а в аптеки мелкими партиями в одной упаковке или в расфасованном виде.

Лекарственное растительное сырье не имеет государственного знака качества или сорта. По всем показателям сырье должно соответствовать требованиям нормативной документации (НД).

Качество сырья определяется с помощью анализа. Его результаты имеют государственную юридическую силу.

В аптечной сети нашей страны эту работу выполняют провизоры на базе контрольно-аналитических лабораторий и аналитических кабинетов и столов.

Фармакогностический анализ это комплекс методов анализа сырья растительного и животного происхождения, позволяющих определить подлинность и доброкачественность.

Под подлинностью или идентичностью сырья понимается соответствие исследуемого объекта наименованию, под которым он поступил для анализа. В понятие идентичности входит также принадлежность исследуемого сырья к соответствующему виду производящего растения.

При сборе сырья возможны ошибки. Например, сборщик сдает сырье под названием «Мать-и-мачехи обыкновенной листья»), а фактически это листья другого рода «Подбел». Часто ошибки происходит при сборе водяного перца, хвоща полевого, череды.

Подлинность сырья устанавливается по внешним признакам, анатомо-диагностическим признакам при микроскопическом исследовании и качественным реакциям в соответствии с требованиями НД.

Под доброкачественностью ЛРС понимают его соответствие требованиям нормативной документации.

Доброкачественность лекарственного растительного сырья определяется его чистотой, нормальной влажностью и зольностью, а также отсутствием плесени и амбарных вредителей и надлежащим количеством действующих веществ.

Так в листьях толокнянки по ГФ XIV допускается содержание влаги не выше 12%, арбутина не менее 8%.

Чистота лекарственного растительного сырья, в свою очередь, определяется по отсутствию недопустимых примесей и подмесей. Допустимые же примеси не должны превышать определенных норм. Содержание примесей выражается в процентах.

Например, согласно ГФ XIV в траве хвоща допускается других частей хвоща – 1%, органических примесей - 1%, минеральных – 0,5% и др.

Исследуемое сырье может быть: цельным (totum), резаным (concisum), дробленным (contusum), порошкованным (pulveratum).

Фарм. анализ нормативно регулируется ГФ X, XI, XIV Фарм.статьями, ГОСТами, ОСТами, ТУ (техническими условиями). Причем с одной стороны ГОСТ и соответствующие общие статьи ГФ, нормирующие правила приемки, методы отбора проб, методы определения подлинности и доброкачественности лекарственного растительного сырья, а с другой – ГОСТ, ФС, ФСП (фарм.статья предприятия), ОСТ, ТУ, определяющие требования к конкретному виду сырья.

Фармакогностический анализ складывается из ряда последовательно проводимых анализов – товароведческого, макроскопического, микроскопического и фитохимического. В некоторых случаях он дополняется определением действующих веществ биологическим путем (биологический метод фарм.анализа).

В аптеках чаще всего проводят макроскопический анализ. В аналитических лабораториях проводят микроскопический, биологический, фитохимический анализы.

Подлинность сырья устанавливается путем макроскопического и микроскопического анализов иногда и путем проведения качественных реакций на наличие в сырье тех или иных групп соединений.

Доброкачественность определяется на основе данных товароведческого и фитохимического анализов и, если необходимо, биологической стандартизации.

Макроскопический анализ состоит в определении морфологических (внешних) признаков испытуемого сырья визуально – невооруженным глазом или с помощью лупы (x10), измерением его частей, проведением органолептических проб – определение цвета, запаха, вкуса; вкус определяется только у неядовитых объектов.

Цвет определяют только при дневном освещении, запах – растирая сырье между пальцами или в ступке. Запах усиливается после смачивания сырья горячей водой.

Общие правила осуществления макроанализа для установления подлинности приведены в статьях ГФ «Листья», «Травы», «Цветки», «Плоды», «Семена», «Кора», «Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы».

Полученные в результате такого анализа данные сравнивают с данными, приведенными в разделе «Внешние признаки» НД на анализируемый вид сырья. Макроскопический анализ наиболее надежен при определении подлинности цельного сырья.

Как уже было сказано, подлинность устанавливается также на основании **микроскопического анализа**. Он применяется при анализе цельного, измельченного, порошкованного, резано-пресованного (гранулы), брикетированного сырья. Это вид анализа является основным методом в четырех последних случаях. Микроанализ основан на выявлении в сырье анатомо-диагностических признаков с помощью микроскопа. Техника микроскопического (включая люминесцентную микроскопию и гистохимические

реакции) исследования подробно изложена в общих статьях ГФ, перечисленных выше.

Практически во всех НД на отдельные виды сырья вы сможете найти данные, характеризующие анатомические диагностические признаки. В статьях ГФ они выделены в разделе «Микроскопия», в ГОСТах включены в раздел «Методы испытаний».

Метод **люминесцентной микроскопии** применяется (где это целесообразно) для определения подлинности лекарственного растительного сырья. Ценным преимуществом люминесцентной микроскопии является то, что этот метод можно применять для изучения толстых непрозрачных срезов сухого растительного материала.

Люминесцентная микроскопия дает возможность одновременного изучения анатомической структуры объекта и характера его люминесценции.

Содержащиеся в растениях активные вещества в анатомических препаратах дают в люминесцентном микроскопе яркую красочную флюоресценцию, причем различные химические вещества обладают различной характерной окраской. Например, тропановые алкалоиды дают желтую флюоресценцию; антрагликозиды – оранжевую различных оттенков в зависимости от вещества.

Люминесцентную микроскопию используют в основном для выявления мест локализации БАВ в тканях растений. Интенсивность флюоресценции ориентировочно указывает на большую или меньшую концентрацию этих веществ. Люминесцентная микроскопия отдельных органов детально описана в ГФ.

Фитохимический анализ используется для качественного и количественного определения наличия действующих веществ с помощью химических и фитохимических методов.

Качественные химические реакции на наличие различных веществ, используемых при определении подлинности сырья дополнительно к макроанализу – это в общем – то элементы фитохимического анализа.

Количественное определение. Количество действующих веществ в растении является главным показателем доброкачества сырья, поэтому в ГФ и ФС даются нормы допустимого минимума содержания веществ. Кроме весового (гравиметрического) и объемных (титрометрических) методов количественного анализа в настоящее время для анализа сырья применяются как наиболее точные и быстрые по выполнению физико-химические методы.

К ним относятся: электрохимические методы, где при анализе сырья наибольшее применение находят потенциометрическое титрование и полярография.

К оптическим методам относятся фотометрический анализ, спектрофотометрический анализ, флуориметрический анализ, поляриметрия.

Для использования новых растений, содержащих биологически активные вещества (алкалоиды, кумарины, хромоны и др.), которые требуют не только суммарного определения, но и разделения их на компоненты, применяют хроматографический метод. Его применяют также для очистки и идентификации соединений. Хроматографический метод впервые был разработан в 1903г ботаником М.Цветом для разделения пигментов растений.

По механизму разделения различают 3 основных вида хроматографии: адсорбционную, распределительную и ионообменную.

Большое значение при исследовании растений приобрела распределительная хроматография, которая в зависимости от способа получения хроматограмм разделяют на бумажную, колоночную и тонкослойную.

Пользуясь методами хроматографии можно разделить извлечения из растений на компоненты активных веществ, провести количественное определение компонентов, определить степень чистоты растительных препаратов.

Не найдены биологически активные вещества и не разработаны методики их определения в 94 видах лекарственного сырья. В таких случаях определяется сумма экстрактивных веществ.

Биологический метод анализа. Биологическая стандартизация проводится на некоторые виды сырья, например, сырье, содержащее сердечные гликозиды.

Этот метод основан на способности сердечных гликозидов вызывать в токсических дозах систолическую остановку сердца животных. Активность (т.е. силу действия) испытуемого лекарственного растительного сырья и препараты из него определяют на лягушках, кошках и голубях и выражают в единицах действия (ЕД). Методы биологической стандартизации подробно изложены в НД.

Товароведческий анализ производится для всестороннего определения качества сырья. Этот анализ комплексный и включает мак-, микроскопические, химические и др. исследования. Без данных товароведческого анализа сырье не может быть признано качественным и использоваться как лек. средство.

Товароведческий анализ в соответствии с ГФ проводится в 3 основных этапа:

1. Приемка лекарственного растительного сырья.
2. Отбор проб на анализ.
3. Анализ средней пробы в контрольно-аналитической лаборатории.

Приемка лекарственного растительного сырья и **отбор проб** для анализа. Это регламентируют нормативы ГОСТ «Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб», а также ОФС.1.1.0005.15 (ГФ XIV).

Настоящая ОФС устанавливает единые требования к отбору проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов с целью определения соответствия их качества требованиям нормативной документации.

В данной ОФС. Выучите основные термины и определения 1-4 стр.

Лекарственное растительное сырье (ЛРС) – свежие или высушенные растения или их части, используемые для производства лекарственных средств или изготовления лекарственных препаратов аптечными организациями, ветеринарными аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность.

Лекарственный растительный препарат (ЛРП) – лекарственный препарат, произведенный или изготовленный из одного вида лекарственного растительного

сырья или нескольких видов такого сырья и реализуемый в расфасованном виде во вторичной (потребительской) упаковке.

Нормативная документация – документ, содержащий перечень определяемых по результатам соответствующих экспертиз показателей качества лекарственного средства для медицинского применения, методов контроля его качества и установленный его производителем.

Загрязнение (контоминация) – процесс загрязнения лекарственных средств веществами синтетического или природного происхождения, в том числе микроорганизмами.

Приемку лекарственного растительного сырья производят партиями. **Партией** считают количество сырья массой не менее 50 кг цельного, обмолоченного, измельченного, прессованного, одного наименования, однородного по всем показателям и оформленного одним документом, удостоверяющим его качество. Документ должен содержать следующие данные: номер и дату выдачи документа; наименование и адрес отправителя; наименование сырья; номер партии; массу партии; год и месяц сбора или заготовки; район заготовки (для сырья от дикорастущих растений); результаты испытаний качества сырья (проводятся в лаборатории отправителя); наименование НД, регламентирующего качество сырья; подпись и должность лица, ответственного за качество.

Приемка сырья включает внешний осмотр каждой единицы продукции для установления соответствия упаковки и маркировки требованиям НД. Нужно обращать внимание на состояние тары (отсутствие подмочки, подтеков и др. повреждений). После внешнего осмотра упаковки всех единиц в партии приступают к отбору единиц продукции для анализа.

Единица продукции – это лекарственное растительное сырье, содержащееся в одной стандартной упаковке. Совокупность единиц продукции составляют партию лекарственного сырья. Единицы продукции берут из разных мест партии.

Как рассчитать выборку? От одной до пяти единиц продукции в партии – отбирают и вскрывают все. Если количество единиц продукции в партии от 6 до 50 – вскрывают 5 ед. продукции. Если в партии свыше 50 единиц продукции, то объем выборки составит 10% единиц продукции.

Отобранные единицы продукции вскрывают и путем внешнего осмотра определяют однородность сырья по способу подготовки (цельное, измельченное, прессованное и т.д.), цвету, запаху, засоренности; наличию плесени, гнили; устойчивого постороннего запаха, не исчезающего при проветривании; засоренности ядовитыми растениями и посторонними примесями (камни, стекло, помет). Одновременно невооруженным глазом или с помощью лупы (x5 –x10) определяют наличие амбарных вредителей.

При установлении неоднородности сырья, наличии плесени и гнили, засоренности посторонними растениями в количествах, превышающих допустимые, вся партия должна быть рассортирована поставщиком, после чего вторично предъявлена к приемке.

От каждой единицы продукции, составивших выборку, отбирают 3 точечные пробы: сверху, из середины и снизу на глубине не менее 10 см от края упаковки.

(слайд «схема 1») есть в ОФС.1.1.0005.15 (ГФ XIV).

Точечная проба небольшое количество лекарственного сырья, взятого от единицы продукции за один прием, рукой или щупом (если это семена или сыпучие мелкие плоды). По массе все точечные пробы должны быть примерно одинаковыми.

В зависимости от типа транспортной тары отбор точечных проб производят следующим образом: из мешков, тюков и кип отбирают сырье рукой сверху, затем после распарывания по шву из середины и снизу.

От сырья упакованного в ящики, точечные пробы отбирают рукой сначала из верхних слоев, затем из середины. После удаления сырья примерно из половины ящика пробы отбирают и со дна ящика, избегая при этом измельчения. Все

точечные пробы складывают на столе с бортиком, соединяя их в объединенную пробу.

Объединенная проба совокупность всех точечных проб, отобранных от партии лекарственного сырья и тщательно (но с осторожностью) перемешанных между собой. Масса объединенной пробы неопределенна и зависит от величины партии сырья, величины точечных проб и т.д.

Из объединенной пробы методом квартования выделяют следующие пробы в приведенной ниже последовательности:

– пробу для определения микробиологической чистоты массой 50 г, исключение составляют цельные корни и корневища – 100 г, чага – 200 г;

– пробу для определения степени зараженности вредителями запасов массой 500 г для мелких видов ЛРС и массой 1000 г для крупных видов ЛРС. Эту пробу помещают в плотно закрывающуюся банку, снабдив ее этикеткой;

– среднюю пробу (для выделения аналитических проб) в соответствии с указаниями табл. 3;

– пробу для проведения радиационного контроля в соответствии с указаниями табл. 5;

– пробу для определения содержания остаточных пестицидов, тяжелых металлов и мышьяка массой 50 г.

Суть метода квартования состоит в том, что сырье помещают на гладкую, чистую, ровную, сухую поверхность, предварительно обработанную дезинфицирующим средством, в виде квадрата по возможности тонким равномерным слоем и по диагонали делят на 4 треугольника. Два противоположных треугольника удаляют, а два оставшихся соединяют вместе и перемешивают. Эту операцию повторяют до тех пор, пока не останется количество сырья в двух противоположных треугольниках, соответствующее массе одной из заданных проб. Допустимые отклонения в массе каждой из проб не должны превышать $\pm 10\%$.

Перед квартованием каждой последующей объединенной пробы тщательно дезинфицируют руки, поверхности и инструмент для квартования.

Средняя проба – часть объединенной пробы, выделенная методом квартования для проведения полного товароведческого анализа. Масса средней пробы для каждого вида сырья указана в ГФ.

Например, масса средней пробы почек березы – 150г, корня солодки очищенного – 2500г.

Далее наступает III этап товароведческого анализа – **анализ средней пробы** в контрольно–аналитической лаборатории.

Среднюю пробу упаковывают в полиэтиленовый или многослойный бумажный мешок. К мешку прикрепляют этикетку, такую же этикетку вкладывают внутрь мешка. На этикетке указывают: наименование сырья, наименование поставщика, номер партии, массу партии, дату отбора пробы, фамилию и должность лица, отобравшего пробу.

Из средней пробы выделяют 3 аналитические пробы:

1. Определение подлинности, измельченности и содержания примесей.
2. Определение влажности. Аналитическую пробу для определения влажности отделяют из средней пробы первой и немедленно упаковывают герметически.
3. Содержание золы, действующих или экстрактивных веществ.

Аналитическая проба – часть анализируемой средней пробы, представителью отражающей качество сырья предложенной партии. Масса аналитической пробы регламентируется НД ныне действующим ГОСТом 24027.0-80, ГФ. Погрешность при взвешивании аналитических проб варьирует от 0,01г (при массе пробы до 50г) до 5,0г (при массе пробы более 1000г).

Определение подлинности вы найдете в ГФ. Подлинность сырья устанавливают по внешним признакам, анатомо-диагностическим признакам при микроскопическом исследовании и качественным реакциям в соответствии с требованиями нормативной документации. Микроскопическое исследование проводят при затруднении определения подлинности сырья по внешним признакам и качественным реакциям.

Методы определения подлинности приведены в соответствующих статьях («Листья», «Травы», «Кора», «Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы», «Цветки», «Плоды», «Семена»).

Определение измельченности в ГФ. Пробу сырья помещают на сито, указанное в соответствующей нормативной документации на лекарственное растительное сырье, и осторожно, плавными вращательными движениями просеивают, не допуская дополнительного измельчения. Просеивание измельченных частей считается законченным, если количество сырья, прошедшего сквозь сито при дополнительном просеве в течение 1 мин, составляет менее 1% сырья, оставшегося на сите.

Для цельного сырья частицы, прошедшие сквозь сито взвешивают и вычисляют их процентное содержание к массе аналитической пробы.

Для просеивания резаного, дробленого, порошоканного сырья берут два сита. Пробу сырья помещают на верхнее сито и просеивают. Затем отдельно взвешивают сырье оставшееся на верхнем сите и прошедшее сквозь нижнее сито, и вычисляют процентное содержание частиц, не прошедших сквозь верхнее сито, и содержание частиц, прошедших сквозь нижнее сито, к массе аналитической пробы. Взвешивание проводят с погрешность. $\pm 0,1$ г при массе аналитической пробы свыше 100г и $\pm 0,05$ г примасе аналитической пробы 100г.

Допустимая норма содержания измельченных частиц для каждого вида сырья указана в соответствующей нормативной документации.

Определение содержания примесей в ГФ. Оставшуюся часть аналитической пробы после отсева измельченных частиц (для цельного сырья) или сход с верхнего и нижнего сит (для резаного, дробленого и другого измельченного сырья) помещают на чистую гладкую поверхность и лопаточкой или пинцетом выделяют примеси, указанные в нормативной документации на лекарственное растительное сырье. Обычно к примесям относят:

- части сырья, утратившие окраску, присущую данному виду (побуревшие, почерневшие, выцветшие и т. д.);
- другие части этого растения, не соответствующие установленному описанию сырья;
- органическую примесь (части других неядовитых растений);
- минеральную примесь (земля, песок, камешки).

Одновременно обращают внимание на наличие амбарных вредителей.

Каждый вид примеси взвешивают отдельно с погрешностью $\pm 0,1$ г при массе аналитической пробы более 100 г и с погрешностью $\pm 0,05$ г при массе аналитической пробы 100 г и менее.

Содержание каждого-вида примеси в процентах (X) вычисляют по формуле (формула в ГФ).

Важным показателем для оценки качества сырья являются влажность и зольность.

Определение влажности лекарственного растительного сырья

Воздушно-сухое сырье содержит обычно 10—14% гигроскопической воды. Повышенное содержание влаги в сырье приводит к его порче: изменяется окраска сырья, появляется затхлый запах, плесень, разрушаются действующие вещества. Такое сырье нельзя использовать. Поэтому НД для каждого вида сырья устанавливает норму содержания влаги (влажность) не выше определенного значения.

Под влажностью сырья в товароведческом анализе понимают не только потерю в массе при высушивании за счет гигроскопической воды, но фактически и других летучих веществ.

Известны различные способы определения влажности. В частности, иногда в сырье определение влажности осуществляется методом отгонки, и в ряде фармакопей этот способ используется, для него разработаны специальные приборы (например, прибор Дина и Старка). Существуют химические методы, из которых наиболее известен метод Карла Фишера (Британская фармакопея). Кроме того, разработаны спектроскопические и электрометрические методы и соответствующие приборы, которые позволяют определять влажность с минимальными затратами времени.

Для определения влажности в лекарственном растительном сырье принят метод высушивания до постоянной массы при температуре 100—105°C.

Определение зольности. Лекарственное растительное сырье содержит не только органические вещества, но и минеральные. Кроме того, сырье, особенно

подземные части растений, бывает загрязнено посторонними минеральными примесями: кусочками земли, камешками, песком пылью на густоопушенных листьях и др. Нормирование их уровня в сырье является условием получения качественного сырья. С этой целью почти для всех видов сырья определяется содержание общей золы, а для сырья, используемого для приготовления настоев и отваров, - содержание золы, нерастворимой в 10%-ном растворе хлористоводородной кислоты.

Общая зола — это остаток несгораемых неорганических веществ, оставшийся после сжигания и прокаливания сырья. Этот остаток состоит из минеральных веществ, свойственных растению, и посторонних минеральных примесей (земля, песок, камешки, пыль).

Зола, нерастворимая в 10%-ном растворе хлористоводородной кислоты, состоит в основном из оксида кремния и характеризует загрязненность сырья посторонними минеральными примесями. Ее еще называют «песок» так как ее составляют минеральные примеси, в то время как природная зола растворима в воде.

Методы определения золы изложены в ГФ.

Определение содержания экстрактивных веществ. Под экстрактивными веществами понимают массу сухого остатка, полученного после упаривания вытяжки из лекарственного растительного сырья, полученной с помощью определенного растворителя, указанного в НД на данный вид сырья.

Определение экстрактивных веществ в сырье проводят в тех случаях, когда действует комплекс биологически активных веществ или не разработан метод количественного определения действующих веществ.

Содержание экстрактивных веществ, как и действующих веществ, зависит от соблюдения сроков, района заготовки сырья и должно быть не менее указанной в НД нормы.

Общая характеристика метода приведена в ГФ. Количественное определение количества экстрактивных веществ проводится методом экстракции определенным видом растворителя точной навески измельченного сырья при слабом кипении с

обратным холодильником в течение 2 ч после предварительного настаивания в течение 1 ч.

Нестандартное сырье, в зависимости от дефекта направляют на переработку; очистку от примесей; при чрезмерной измельченности объект можно отправить на галеновый завод. Сырье, не отвечающее требованиям стандарта уничтожают. Результаты анализа заносят в протокол и выводят заключение о доброкачественности сырья.

Сырье, поступающее от частных изготовителей, а также сырье, содержащее сердечные гликозиды и эфирные масла, полученное от АПК «Эфирлекраспром», подлежит полному анализу на соответствие НД. В остальных случаях сырье проверяется только на подлинность, измельченность и содержание примесей согласно требованиям ГФ.

Брикеты, кроме того, проверяются на прочность и распадаемость. Все количественные определения проводятся в точном соответствии с фармакопейными методиками, выявленные числовые показатели выражаются в процентах. На основании полного товароведческого анализа заполняется протокол, который отправляется аптеке - поставщику для исправления показателей качества лекарственного сырья до нормативного уровня. Только после данных полного товароведческого анализа растительное сырье может использоваться в качестве лекарственного средства и приобретает статус лекарственного растительного сырья. В связи с вышеизложенным становится понятно, чем обосновано действующее положение о запрете продажи сырья лекарственных растений частными лицами, так как сырье, не прошедшее полный товароведческий анализ, не может считаться лекарственным и отпуску не подлежит.

