Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России

Кафедра фармации с курсом ПО

Реферат

на тему

ИК-спектрометрия в фармацевтическом анализе.

Выполнил:

ординатор кафедры фармации с курсом ПО

специальности 33.08.03 Фармацевтическая химия и фармакогнозия

Кунц Роман Константинович

Красноярск

2023

Оглавление

[**1.** **Введение** 2](#_Toc135055681)

[**2.** **Общие теоретические положения** 5](#_Toc135055682)

[**3.** **Примеры подходов к вопросу использования ИК-спектрометрии в фармацевтическом анализе** 7](#_Toc135055683)

[**4.** **Заключение** 19](#_Toc135055684)

[**5.** **Список литературы** 20](#_Toc135055685)

# **Введение**

Спектрофотомерия имеет сегодня большое значение для фарманализа, потому как метод обладает высокой чувствительностью и воспроизводимостью. Особо важна высокая чувствительность этого метода потому как многие современные лекарственные средства крайне трудно проанализировать химическими методами, потому как содержат малые количества действующего вещества. Многие вещества не дают реакции идущие в стехеометрическом соотношении(рутин). Нет методик количественного определения химическими методами в лекарственных формах (комплексные витаминные препараты, содержащие пиродоксин, рибофлавин и никотоинамид)

Спектрофотомерия в видимой области главным образом применяется для количественного определения веществ и определения содержания примесей, а также при установлении подлинности. Немало важно отметить, что данный метод применяется в связи с другими методами, например, ВЭЖХ, где спектрофотометр применяется как детектор. [1] Такое сочетание методов позволяет проводить качественный и количественный анализ с высокой точностью, при наличии большого количества веществ в смеси с близкими физико-химическими свойствами. Этот момент особо важен потому, как сегодня имеется большое число комбинированных препаратов, а так же при фарманализе необходимо проводить качественное и количественное определение примесей, которые могут быть как допустимыми, так и недопустимыми.

Применение в количественном анализе основано на изменении интенсивности проходящего света при поглощении. Эта зависимость отображена в законе Бугера-Ламберта-Бера.

Селективность при качественном анализе обеспечивается избирательным поглощением монохроматического света.

В зависимости от используемого оборудования различают спектрофотометрические методы - анализ по поглощению монохроматического света и колориметрические методы - анализ по поглощению немонохроматическому свету. В свою очередь спектрофотометрические методы подразделяются по длине волны (волновым числам). В 14 ГФ предложенная следующая классификация: В зависимости от используемой аппаратуры в фармацевтическом анализе различают следующие методы анализа, основанные на поглощении электромагнитного излучения и испускании света:

* спектрофотометрия в ультрафиолетовой (УФ) и видимой областях;
* **спектрофотометрия в инфракрасной (ИК) области;**
* атомно-эмиссионная и атомно-абсорбционная спектроскопия (АЭС и ААС);
* флуориметрия;
* спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

 Метод ИК-спектроскопии (ИКС) основан на поглощении электромагнитного излучения инфракрасного диапазона молекулами изучаемого вещества, при котором происходит возбуждение колебательных и вращательных состояний. ИКС является фундаментальным методом исследования структуры химических соединений. ИК-спектры поглощения, отражения или рассеяния несут чрезвычайно богатую информацию о составе и свойствах пробы.

Сопоставляя ИК-спектр исследуемого «неизвестного» образца со спектрами известных, можно идентифицировать исследуемый, определить основной состав пищевых продуктов, обнаружить примеси, провести фракционный или структурно-групповой анализ. Методом корреляционного анализа по ИК-спектру пробы также можно определить его физико-химические или биологические характеристики, например, всхожесть семян, калорийность пищевых продуктов, химический состав, размер гранул, плотность и т.д.

В настоящее время имеются доступные базы ИК-спектров технических и пищевых добавок, лекарственных препаратов, поли- и мономеров, ПАВ, пластификаторов, ядохимикатов, растворителей, нефтепродуктов, токсичных веществ, стероидов и других соединений, имеющих, в основном, однокомпонентный состав. Однако отсутствует достоверная, полная и доступная база ИК-спектров пищевых продуктов и лекарственного растительного сырья (ЛРС), имеющих многокомпонентный состав, необходимая для решения конкретных практических задач. [2 – 5]

# **Общие теоретические положения**

Инфракрасные спектры (колебательные спектры) (ИК-спектры) возникают вследствие поглощения энергии электромагнитного излучения при колебаниях ядер атомов в молекулах или ионах, которые сопровождаются изменением дипольных моментов, и представляют собой зависимость пропускания или поглощения от длины волны (λ) или частоты колебаний (ν)[6].

Под инфракрасной областью (ИК-область) подразумевают электромагнитное излучение в области длин волн от 0,78 до 400 мкм. Область от 780 до 2500 нм (от 0,78 до 2,5 мкм) рассматривается как ближняя ИК-область, область от 2,5 до 25 мкм (от 4000 до 400 см-1) относится к средней ИК-области спектра и область от 25 до 400 мкм относится к дальней ИК-области. Наиболее часто используется средняя ИК-область.

Длину волны (λ) в ИК-спектрах обычно измеряют в микрометрах (микронах), мкм.

Поскольку частота колебаний в ИК-спектрах имеет большие числовые значения, обычно используют не частоты (ν), а волновые числа (k), которые измеряются в см-1 и связаны с частотой (ν) уравнением:

k = ν / c

Волновое число (k) связано с длиной волны (λ, мкм) соотношением:

k = 104/λ.

Все молекулы состоят из химически связанных между собой атомов.

Движение этих атомов напоминает колебание шариков, связанных пружинами. Аналогично системе шариков, амплитуды колебаний связей увеличиваются при воздействии на них, в частности, электромагнитных волн (инфракрасных лучей). Различие между молекулой и шариками на пружинах заключается в том, что колебательные энергетические уровни молекулы квантованы и молекулой поглощаются только те частоты ИК излучения, энергия которых точно соответствует разностям между двумя уровнями энергии связи; амплитуда данного колебания возрастает скачком. Поэтому при облучении образца ИК светом с непрерывно меняющейся частотой определенные участки спектры излучения поглощаются молекулой, а луч проходящий через вещество ослабляется в области поглощения. Регистрируя интенсивность прошедшего излучения в зависимости от длин волн (или волновых чисел), получают кривую, на которой видны полосы поглощения. Это и есть ИК-спектр.

Явление взаимодействия веществ с ИК -излучением было открыто У.Эбни и И.Фестингом в 1861 г. В настоящие время ИК –спектрофотометрия стала одним из основных методов исследования веществ различной химической природы, в том число и лекарственных соединений.

Впервые метод стал фармакопейным с 1968 г (ГФ X), где он рекомендовался для контроля качества трех лекарственных веществ: фторотана, оксациллина и метициллина натриевых солей, а в разделе "Общие методы физико-химического, химического и биологического исследования" фармакопеи помещен материал, касающийся некоторых практических вопросов ИК-спектрофотометрии[7,8].

# **Примеры подходов к вопросу использования ИК-спектрометрии в фармацевтическом анализе**

Метод инфракрасной (ИК) спектроскопии находит применение в оценке качества фармацевтических субстанций, лекарственных препаратов синтетического и природного происхождения, лекарственного растительного сырья. ИК-спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения (ИК-НПВО) является наиболее современным вариантом ИК-спектроскопии. Практика применения ИК-спектроскопии в оценке подлинности лекарственного растительного сырья, на сегодняшний день, не нашла широкого распространения, несмотря на все достоинства метода. Грудной сбор №2 - многокомпонентный лекарственный растительный препарат отхаркивающего действия. Компонентами грудного сбора №2 являются листья мать-и-мачехи обыкновенной, листья подорожника большого и корни солодки. Несмотря на то, что данные виды ЛРС являются фармакопейными и имеют богатую практику применения в медицине, данные об их ИК-спектрах в научной литературе отсутствуют[9].

Цель работы московских исследователей была следующая: определение характеристик подлинности грудного сбора №2 и его компонентов методом инфракрасной спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения.

Объектом исследования являлись образцы ГС №2 и его компоненты промышленного изготовления. Сухие образцы измельчали в ступке до порошкообразного состояния.

Колебательные спектры образцов получали методом ИК-НПВО (нарушенного полного внутреннего отражения) на Фурье-спектрометре.

Результаты. В диапазоне 3700-3020 см-1 обнаружены колебания, характерные для OH-групп, межмолекулярных водородных связей полимеров и NH-групп. Выявлены колебания CHn-групп в диапазонах 3000-2770 см-1, 1460-1300 см-1, 900 см-1. Выявлены колебания С=О групп пептидов в 1650 см-1. В области «отпечатков пальцев» обнаружены колебания NH-групп и CN-групп пептидов, сложноэфирной группы липидов, OH-групп полисахаридов, O=C-N группы пептидов.

Полученные учеными данные могут свидетельствовать о наличии в образцах фенольных соединений, полисахаридов, липидов и пептидов. Таким образом, методом ИК-спектроскопии определены характеристики подлинности грудного сбора №2, листьев мать-и-мачехи обыкновенной, листьев подорожника большого и корней солодки.

В настоящее время известно более 200 жирных кислот, отличающихся по степени и характеру разветвления углеродной цепи, числу и положению двойных связей, природе и количеству функциональных групп, длине углеродной цепи.[10]

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в области синтеза и изучения свойств, строения жирных кислот, интерес к этим биологически важным соединениям возрастает.

Наряду с другими физико-химическими методами для идентификации состава сложных смесей природных соединений, в т.ч. и смесей жирных кислот, широко применяется инфракрасная (ИК) спектроскопия.

В Каспийском море произрастает 187 видов водорослей — макрофитов, жирнокислотный состав липидов которых до настоящего времени не изучен. Биологическая активность липидов водорослей определяется их жирнокислотным составом и строением.

Цель научного исследования ученых — определение строения углеродного скелета жирных кислот липидов 4 красных и 2 зеленых водорослей Каспийского моря методом ИК спектроскопии.

ИК спектры высших жирных кислот липидов водорослей Каспийского моря ученые получили на спектрофотометре в широком интервале частот 4000-650 см-1.

Объекты для исследования приготовлены в виде тонкой капиллярной пленки. Толщина пленки образцов подобрана таким образом, чтобы максимум полос поглощения находился между 20 и 80% пропускания.

В качестве вывода авторы статьи приводят следующее:

1. В результате взаимодействия валентных колебаний С=О и О-Н жирные кислоты липидов образуют ассоциированные макромолекулы.

2. С увеличением количества С=С связей частота валентных колебаний карбонильной группы понижается, а интенсивность полосы повышается, и эта полоса расширяется по сравнению с полосами жирных кислот, в которых отсутствует двойная связь.

3. Полученные результаты по составу и строению жирных кислот липидов водорослей могут позволить создать высокоэффективные и рациональные лекарственные средства на их основе.

В настоящее время фармацевтический рынок характеризуется широким ассортиментом лекарственных препаратов, в связи с чем повышаются требования к их качеству и полному соответствию международным стандартам.[11]

Диклофенак - нестероидный препарат, обладающий противовоспалительным, жаропонижающим и обезболивающим действием. по своей химической природе фармацевтическое средство относится к группе производных фенилуксусной кислоты. В лекарственных формах диклофенак используется в виде натриевой соли. Выпускается диклофенак в виде таблеток, капсул, геля, раствора для инъекций, свечей, капель. Данный препарат входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств,

Возникает необходимость в применении различных физико-химических методов исследования, которые успешно зарекомендовали себя в фармацевтическом анализе на этапе контроля лекарственных средств. В данной статье представлены результаты, полученные на основании сравнительного анализа инфракрасных (ИК) спектров лекарственного препарата «Диклофенак» трех различных производителей: ООО «Озон», Россия, Самарская обл., г. Жигулевск; ООО «Хемофарм», Россия, Калужская обл., г. Обнинск; ЗАО «Фармацевтическое предприятие «Оболенское», Московская обл., п. Оболенск.

Препарат тестировался авторами статьи с привлечением ИК спектроскопии на предмет подлинности. Анализ ИК спектров позволил определить наличие всех ожидаемых функциональных групп в составе производного фенилуксусной кислоты. Так в ИК спектрах анализируемых образцов в высокочастотной области 3251-3217 см-1 присутствуют полосы, отвечающие валентным колебаниям связи N - Н замещенной амино-группы. Карбонильная группа идентифицируется полосой в области 1750-1706 см-1. Интенсивные полосы поглощений в области 1653-1402 см-1 обусловлены асимметричными и симметричными колебаниями двух равноценных связей С-О в карбоксилат-ионе, в этой же области находятся полосы средней интенсивности, соответствующие скелетным колебаниям связей С-С замещенных ароматических колец. Полосы поглощений, характеризующие деформационные плоскостные и внеплоскостные колебания связей САr-Н зарегистрированы в области 1227-741 см-1.

Таким образом, авторами была осуществлена идентификация натриевой соли 2-[(2,6-Дихлорофенил)амино] - фенилуксусной кислоты в составе лекарственного средства «Диклофенак» методом ИК спектроскопии. Полученные данные свидетельствуют о подлинности препаратов.

В последние годы в исследовании качества пищевого и лекарственного сырья применяют новые методы спектроскопии [1]. Инфракрасная спектроскопия (ИКС), впервые введенная в Государственную фармакопею X издания для идентификации фторотана и натриевых солей полусинтетических пенициллинов, в последнее время все чаще применяется в анализе различных классов лекарственных веществ. Спектральные методы позволяют устанавливать структуру органических соединений с гораздо меньшими затратами времени по сравнению с традиционными химическими методами.[11]

В литературных источниках имеются ограниченные сведения о возможности использования ИКС в оценке подлинности лекарственного растительного сырья (ЛРС). Необходимым этапом исследования является интерпретация спектров, т.е. выделение определяющих положение полос в спектрах и их интенсивности. ИК-спектр ЛРС представляет собой суммарный спектр, в котором происходит наложение полос поглощения различных функциональных групп органических веществ, что делает его расшифровку весьма трудной задачей.

Цель настоящего исследования авторов статьи - изучение возможности применения ИК-спектроскопии для идентификации плодов облепихи крушиновидной и их сортовой принадлежности.

Объектом исследования являлись высушенные плоды облепихи крушиновидной различных сортов, произрастающие на европейской территории России, заготовленные в 2017 году на базе Ботанического сада биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, согласно правилам заготовки ЛРС различных морфологических групп. Сушку плодов производили при температуре 60 °С до остаточной влажности не более 14%.

ИК-спектры были получены без предварительной пробоподготовки (ЛРС измельчалось до размера частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 0,5 мм) на приборе ИК-Фурье спектрометр.

Анализ спектров показывает, что практически у всех исследуемых сортов плодов облепихи крушиновидной с различной степенью интенсивности присутствуют полосы поглощения в указанных диапазонах частот. Изучение полученных ИК-спектров показало также, что у каждого сорта имеются отличия в рисунке и степени интенсивности полос поглощения, что, по-видимому, определяется особенностями химического состава сырья. Выявленные в спектре специфические частоты можно считать характеристическими для определенного сорта и использовать их в качестве маркеров при определении подлинности и сортовой принадлежности высушенных плодов облепихи крушиновидной методом ИКС.

Авторы статьи пришли к следующим выводам:

1. Метод ИК-Фурье спектроскопии НПВО позволяет идентифицировать плоды облепихи крушиновидной. Полученные индивидуальные ИК-спектры и спектральные характеристики (интенсивность и положение полосы поглощения) являются строго специфичными для каждого сорта сырья и обусловлены, по-видимому, особенностями фитохимического состава.

2. Методом ИК-спектроскопии установлено образование водородных связей и их характер между молекулами БАВ в изучаемом ЛРС.

3. Выявленные в спектре специфические частоты можно считать характеристическими для определенного сорта и использовать их в качестве маркеров при определении подлинности и сортовой принадлежности высушенных плодов облепихи крушиновидной методом ИКС.

Одним из основных направлений развития фармацевтической науки и практики является совершенствование технологии экстрагирования лекарственного растительного сырья с целью увеличения выхода биологически активных веществ, используемых для создания эффективных и безопасных фитопрепаратов. В этом плане заслуживает внимания дубровник белый (Teucrium polium L.) - полукустарничек, ареал распространения которого располагается в европейской части России и на всей территории Кавказа [7].

Было обнаружено, что многие растения содержат фенольные соединения - наиболее многочисленный класс природных соединений, для которых характерно структурное многообразие, высокая и разносторонняя биологическая и фармакологическая активность и малая токсичность. Интерес к ним связан с тем обстоятельством, что они обусловливают антиоксидантные, ангиопротекторные, гепатопротекторные, желчегонные, диуретические, нейротропные, противоязвенные, капилляроукрепляющие и другие важнейшие фармакологические свойства. Преимуществом дубровника белого перед другими растениями является то, что его трава может быть доступным и дешевым сырьем.

Известно, что экстрагент и рациональная технология извлечения БАВ позволяют в полной мере реализовать терапевтический потенциал растения. В связи с этим актуальной проблемой является выбор экстрагента с целью максимально эффективного получения действующих веществ, что позволит повысить их фармакотерапевтическую активность и расширить спектр терапевтического действия.

В заключении к статье, авторы привели следующие выводы:

1. Определена подлинность и доброкачественность травы дубровника белого. Установлено, что по таким показателям, нормируемым в ГФ как влажность, зола общая, зола, не растворимая в 10%-ной соляной кислоте, и содержание экстрактивных веществ, данное сырье соответствует требованиям, предъявляемым в ГФ.

2. Получены извлечения из травы дубровника белого с использованием в качестве экстрагента воды очищенной, спирта с концентрацией 40, 70 и 96 %.

3. В данных извлечениях определено содержание дубильных веществ, флавоноидов и оценена их антиоксидантная активность. Установлено, что оптимальным экстрагентом для получения извлечения с высокой антиоксидантной активностью является 70 % спирт.

Дипразин (10-(2-Диметиламино-пропил)-фенотиазина гидрохлорид) является одним из препаратов, наиболее часто анализируемых в биологических объектах. Дипразин в водных растворах в зависимости от кислотности среды может существовать в трех различных формах: молекулярной, форме катиона и дикатиона. В литературе при описании ИК спектров, как правило, не акцентируют внимание на том, для какой из возможных форм вещества эти спектры получены. Так, например, данный вопрос не затрагивается при проведении экспертных исследований, направленных на идентификацию вещества и определение его количественного содержания в образце[12].

Цель исследования - компьютерное моделирование ИК спектров различных форм дипразина.

В результате проведенных исследований методом компьютерного моделирования позволяет выявить закономерности в изменении ИК спектров при переходе от одной формы дипразина к другой. В ряду молекулярная форма дипразина - форма катиона - форма дикатиона обнаружены следующие особенности.

1. Характеристическая полоса дипразина вблизи 750 см-1 смещается в область меньших длин волн, а полуширина полосы в спектре дикатиона значительно увеличивается.

2. Интенсивность характеристических полос в области 1200 - 1300 см-1 существенно уменьшается, эти полосы отсутствуют в спектре дикатиона.

3. В спектре катиона и дикатиона дипразина появляются полосы в области 1200 - 1300 см-1, отсутствующие для молекулярной формы.

4. Полосы в ИК спектре дикатиона дипразина значительно шире соответствующих полос молекулярной формы и формы катиона.

5. В спектрах катиона и дикатиона дипразина появляется интенсивное поглощение в области >3500 см-1, обусловленное валентными колебаниями N-H-связи.

На основе проведенного анализа ИК спектров можно сделать вывод, что полосы 758, 1259, 1287 см-1, приведенные в литературе как характеристические для дипразина соответствуют молекулярной форме.

# **Заключение**

ИК-спектроскопия в фармацевтическом анализе наиболее широко применяется с целью определения подлинности. Это объясняется большой специфичностью колебательного спектра. Идентификация лекарственного вещества может быть проведена путем сопоставления ИК-спектра исследуемого вещества с аналогичным спектром его стандартного образца или с рисунком стандартного спектра, приведенного в фармакопейной статье.

На практике при интерпретации спектров определяют положение полос поглощения и их интенсивность (сильная, средняя, слабая). Сопоставление ИК-спектров рекомендуется начинать с анализа характеристических полос, которые обычно хорошо проявляются на спектрах, и лишь при их совпадении сопоставляют низкочастотную область.

Таким образом в фармацевтическом анализе для целей количественного определения метод ИК-спектроскопии не нашел широкого применения из-за трудностей, не позволяющих добиться сопоставимой точности. К ним относятся необходимость измерения в очень узкой кювете, длину которой трудно воспроизвести; высокая вероятность перекрывания полос поглощения; небольшая ширина полосы поглощения в максимуме, что приводит к отклонениям от основного закона светопоглощения.

# **Список литературы**

[1] - Н.А. Платонова / Спектрофотометрия ультрафиолетовой и инфракрасной области при анализе лекарственных средств // ГОУ ВПО РязГМУ Минздравсоцразвития России. Рязань: РИО РязГМУ, 2010.

[2] - Казицына Л.А., Куплетская Н.Б. / Применение УФ-, ИК- и ЯМР- спектроскопии в органической химии. // Москва, «Высшая школа», 1971, 264 с.

[3] - Голубцова Ю.В. / Техника и технология пищевых производств. // 2017. Т. 45, № 2. С. 126 – 132

[4] - Отто М. / Современные методы аналитической химии. // Москва, Мир, 2003, С. 151 – 290

[5] - Казицына Л.А., Куплетская Н.Б. / Применение УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопии в органической химии. // М: Высшая школа; 1971.

[6] - ОФС.1.2.1.1.0002.15 Спектрометрия в инфракрасной области

[7] - Кросс А.Д. / «Введение в практическую инфракрасную спектроскопию» // Пер с англ. – М.: Иностранная литература, 1961 - 110 с.

[8] - Смит А. / «Прикладная ИК – спектроскопия» // Пер с англ. М.: Мир, 1982 – 327 с.

[9] - Чевидаев В. В., Боков Д. О., Самылина И. А. / ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОДЛИННОСТИ ГРУДНОГО СБОРА №2 И ЕГО КОМПОНЕНТОВ МЕТОДОМ ИНФРАКРАСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ НАРУШЕННОГО ПОЛНОГО ВНУТРЕННЕГО ОТРАЖЕНИЯ // Фармация. 2022. №2. С. 11 – 16

[10] - Текаев Ш.Д., Бердиев А.А., Болмаммедов Ы.Ч., Гурбанов И.Г. / ИЗУЧЕНИЕ ЛИПИДОВ И ЖИРНЫХ КИСЛОТ ВОДОРОСЛЕЙ ВОСТОЧНОГО ПОБЕРЕЖЬЯ КАСПИЙСКОГО МОРЯ // Academy. 2021. №8 (71). С. 64 – 67

[11] - Тринеева О. В., Рудая М. А., Сафонова Е. Ф., Сливкин А. И. / Изучение возможности применения ИК-спектроскопии для идентификации сорта плодов облепихи крушиновидной (нippophaes rhamnoides L. ) // Химия растительного сырья. 2019. №1. С. 301 – 308

[12] - Меркулова Ю. Д., Бутырская Е. В., Селеменев В. Ф. / Компьютерное моделирование ИК спектров различных форм дипразина // Известия ВУЗов. Химия и химическая технология. 2008. №11. C. 95 – 98