МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

ГОСУДАРСТВЕННАЯ ФАРМАКОПЕЯ СССР
ОДИННАДЦАТОЕ ИЗДАНИЕ

ВЫПУСК 1
ОБЩИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ
ГОСУДАРСТВЕННОЙ ФАРМАКОПЕИ СССР
XI ИЗДАНИЯ,
Утвержденная приказом Министерства
здравоохранения СССР
от 25.12.84 г. N 1455

БОБКОВ Ю.Г., БАБАЯН Э.А., МАШКОВСКИЙ М.Д.,
ОБОЙМАКОВА А.Н., БУЛАЕВ В.М., ГУСЬКОВА Л.С.,
ЛЕПАХИН В.К., ЛЮБИМОВ Б.И., НАТРАДЗЕ А.Г.,
СОКОЛОВ С.Д, ТЕНЦОВА А.И.

СОСТАВ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА
ТОМА I ГФ XI

БАБАЯН Э.А. - председатель
МАШКОВСКИЙ М.Д. - заместитель председателя
ОБОЙМАКОВА А.Н. - ответственный секретарь

ЧЛЕНЫ СОВЕТА:

ВЗОРОВА Л.Н., ЕГОРОВА Г.Г.,
ИВАНОВА С.Д., КУРАКИНА И.О., ЛЕТИНА В.С.,
СОКОЛОВ С.Д.

СОСТАВ
ФАРМАКОПЕЙНОГО КОМИТЕТА УПРАВЛЕНИЯ ПО ВНЕДРЕНИЮ НОВЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

Президиум комитета

Машковский М.Д.	- академик АМН СССР, профессор, доктор медицинских наук - председатель комитета
Булаев В.М.	- доктор медицинских наук - первый заместитель председателя
Соколов С.Д.	- доктор химических наук - первый заместитель председателя
Тенцова А.И.	- член - корреспондент АМН СССР, профессор, доктор фармацевтических наук - первый заместитель председателя
Любимов Б.И.	- доктор медицинских наук - заместитель председателя
Обоймакова А.Н.	- кандидат фармацевтических наук главный ученый секретарь
Рябцева И.М.	- кандидат фармацевтических наук ученый секретарь
Куракина И.О.	- кандидат химических наук - ученый секретарь

Члены президиума

Лепахин В.К.	- профессор, доктор медицинских наук
Федоров Н.Г.	- инженер
Шилов Ю.М.	- кандидат фармацевтических наук

Члены комитета

Анджапаридзе О.Г.	- академик АМН СССР, профессор, доктор медицинских наук
Андреенко Г.В.	- профессор, доктор биологических наук
Бочкарев В.В.	- профессор, доктор технических наук
Иванова С.Д.	- доцент, кандидат фармацевтических наук
Кулешова М.И.	- кандидат фармацевтических наук
Летина В.С.	- кандидат химических наук
Лакин К.М.	- член - корреспондент АМН СССР, профессор, доктор медицинских наук
Панков Ю.А.	- член - корреспондент АМН СССР, профессор, доктор биологических наук
Преображенская Т.П.	- доктор медицинских наук

В составе Фармакопейного комитета работают следующие специализированные экспертные комиссии:

- химическая,
- фармацевтическая,
- фармакогностическая,
- фармакологическая,
- микробиологическая,
- номенклатурная,
- по антибиотикам,
- по гормональным препаратам,
- по препаратам крови и кровезаменителям,
- по медицинским ферментным препаратам,
- по радиофармацевтическим препаратам,
- по медицинским иммунологическим препаратам,
- по рассмотрению материалов на упаковку лекарственных средств.

ВВЕДЕНИЕ

Государственная фармакопея Союза Советских Социалистических Республик является сборником обязательных общегосударственных стандартов и положений, нормирующих качество лекарственных средств.

Государственная фармакопея имеет законодательный характер. Требования фармакопеи, предъявляемые к лекарственным средствам, являются обязательными для всех предприятий и учреждений Советского Союза, изготовляющих, хранящих, контролирующих и применяющих лекарственные средства.

Государственная фармакопея основана на принципах советского здравоохранения и на современных достижениях медицины, фармации, химии и других смежных наук.

Ранее Государственная фармакопея издавалась в виде одного тома, включавшего частные и групповые фармакопейные статьи на лекарственные вещества и лекарственные формы, а также на лекарственное растительное сырье и общие статьи с изложением физических, физико - химических, химических и биологических методов анализа лекарственных средств, сведения о применяемых для этих целей реактивах и индикаторах. В приложениях был приведен ряд справочных таблиц.

После выпуска Государственной фармакопеи X издания была изменена система разработки и утверждения фармакопейных статей на лекарственные средства.

С целью более оперативного внедрения достижений науки и повышения требований к качеству лекарственных средств Управление по внедрению новых лекарственных средств и медицинской техники с 1971 г. стало утверждать на каждый препарат и общие методы контроля фармакопейные статьи, имеющие силу государственных стандартов.

В связи с этим возникла необходимость выпуска Государственной фармакопеи XI издания на новой основе.

В отличие от предыдущих изданий настоящее одиннадцатое издание Государственной фармакопеи (ГФ XI) предусмотрено издавать в двух частях, состоящих из отдельных томов, имеющих последовательный порядковый номер.

Издаваемые отдельные фармакопейные статьи и тома ГФ XI равнозначны в правовом отношении и имеют одинаковую юридическую силу.

Том I ГФ XI "Общие методы анализа" включает общие статьи на физические, физико - химические, химические методы анализа и методы анализа лекарственного растительного сырья - всего 54 статьи. Впервые вводится 9 статей: "Газовая хроматография" как раздел общей статьи "Хроматография", "Высокоэффективная жидкостная хроматография" как раздел общей статьи "Хроматография", "Метод определения степени белизны порошкообразных лекарственных средств", "Метод фазовой растворимости", "Спектроскопия ядерного магнитного резонанса", "Радиоактивность", "Электрофорез", "Эмиссионная и атомно - абсорбционная пламенная спектрометрия", "Люминесцентная микроскопия", "Определение примесей химических элементов в радиофармацевтических препаратах".

Статьи "Определение ацетильной группы" и "Число Рейхерта - Мейссля", содержавшиеся в ГФ X, не включены в ГФ XI. Все остальные статьи, содержавшиеся в ГФ X, переработаны и дополнены с учетом современных достижений науки в области анализа лекарственных средств.

Существенно переработана статья "Определение прозрачности и степени мутности жидкостей". Для определения этих показателей введены новые эталоны - взвеси, полученные из гидразина сульфата и гексаметилентетрамина. Приведена таблица приготовления эталонов и схема просмотра прозрачности и степени мутности жидкостей.

Переработана и дополнена статья "Комплексонометрическое титрование", в которую введен новый индикатор - кальконкарбоновая кислота, получившая за последнее время широкое распространение в фармацевтическом анализе. Комплексоны находят все большее применение в аналитической химии. Введены методики определения катионов алюминия, висмута, кальция, свинца, магния и цинка.

В статью "Метод сжигания в колбе с кислородом" включены методики определения хлора, брома, фтора, серы и фосфора, которые в настоящее время широко применяются при анализе.

Значительно дополнена статья "Общие реакции на подлинность". В нее введены новые разделы: "Железо окисное" и "Сульфиты"; включены новые методы идентификации в разделах "Йодиды", "Карбонаты", "Нитраты", "Цитраты".

В статью "Определения, основанные на измерении поглощения электромагнитного излучения" (раздел "Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях") введены дополнения относительно спектрофотометрического анализа многокомпонентных систем и включен метод дифференциальной спектрофотометрии.

Существенно переработана статья "Определение окраски жидкостей": введен способ приготовления 4 основных из 4 исходных растворов; добавлен раствор хлорида железа для приготовления одного из исходных растворов.

В статью "Определение вязкости жидкостей" добавлен раздел "Измерение вязкости на ротационных вискозиметрах". В разделе "Измерение вязкости на вискозиметре с падающим шариком" предусмотрено определение вязкости с помощью вискозиметра Гепплера.

Переработана и дополнена статья "Определение летучих веществ и воды": уточнены разделы "Метод высушивания" и "Определение воды". Раздел "Метод титрования реактивом К.Фишера" дополнен методикой определения конца титрования электрометрическим титрованием "до полного прекращения тока".

В статью "Определение температурных пределов перегонки" введен новый прибор типа ТПП, с помощью которого обеспечивается получение более точных и воспроизводимых результатов.

В статью "Определение температуры плавления" введен прибор ПТП с электрическим обогревом для определения температуры плавления с диапазоном измерений в пределах от 20 до 360 град. С.

Уточнены статьи: "Определение показателя преломления", "Флуориметрия", "Определение pH", "Полярография", "Растворимость", "Нитритометрия", "Йодное число".

В статью "Электрометрические методы титрования" в разделе "Амперометрическое титрование с двумя индикаторными электродами (метод титрования "до полного прекращения тока")" включено дополнение в измерительную схему, которое позволяет наряду с чувствительными микроамперметрами использовать промышленно выпускаемые pH-метры или ионометры.

В статье "Испытание на чистоту и допустимые пределы примесей" переработаны методики "Испытание на соли аммония" и "Испытание на соли тяжелых металлов".

Переработана и уточнена статья "Поляриметрия".

В статью "Определение азота в органических соединениях" внесено изменение в описание прибора для определения азота за счет усовершенствования "воронки для ввода щелочи".

В статье "Определение температуры затвердевания" дополнительно указаны вещества, способные переохлаждаться.

Статья "Статистический анализ результатов биологических испытаний" существенно переработана. Добавлен раздел "Статистическая обработка результатов химического эксперимента".

В раздел "Методы анализа лекарственного растительного сырья" включены 7 групповых статей, определяющих основные диагностические признаки для морфологических групп сырья: "Листья", "Травы", "Цветки", "Плоды", "Семена", "Кора", "Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы", в которые введены новые разделы "Люминесцентная микроскопия" и "Гистохимические реакции" (кроме статьи "Цветки"), а также учтена современная ботаническая терминология.

В статью "Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб для анализа" впервые включен раздел "Отбор проб фасованной продукции".

В статью "Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье" наряду с тремя методами, принятыми ГФ X, введен четвертый метод определения (метод Клевенджера в модификации).

Все остальные статьи переработаны и дополнены с учетом современных требований, предъявляемых к качеству лекарственного растительного сырья.

ПРАВИЛА ПОЛЬЗОВАНИЯ ФАРМАКОПЕЙНЫМИ СТАТЬЯМИ

ТЕМПЕРАТУРА. Если при обозначении плотности, растворимости и в других случаях, когда имеет значение температура, она не указана, то подразумевают температуру 20 град. С.

Под "холодной", "прохладной" подразумевают температуру от 12 до 15 град. С, под "теплой" - от 40 до 50 град. С, под "горячей" - от 80 до 90 град. С, под "комнатной" - от 18 до 20 град. С. Под температурой "водяной бани" подразумевают температуру от 98 до 100 град. С.

РАСТВОРИТЕЛИ. Если для растворов не указан растворитель, то подразумевают водные растворы.

Под названием "вода", если нет особых указаний, следует понимать дистиллированную воду.

Под названием "спирт", если нет особых указаний, следует понимать этиловый спирт, под названием "эфир" - диэтиловый эфир.

При определении спирта в лекарственных препаратах под процентом подразумевают объемный процент.

РАСТВОРЫ. Под принятым способом обозначения крепости растворов 1:10, 1:2 и т.д. следует подразумевать содержание весовой части вещества в указанном объеме раствора, т. е. при приготовлении раствора 1:10 следует брать 1 г вещества и растворителя до получения 10 мл раствора; при приготовлении раствора 1:2 следует брать 1 г вещества и растворителя до получения 2 мл раствора и т. д.

Если концентрация растворов при испытании подлинности и чистоты, при определении величины удельного вращения, удельного показателя поглощения и т. п. указана в процентах, следует подразумевать весообъемные проценты.

Под обозначением "ч" подразумевают массовые части.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ МАССА. Молекулярные массы описанных в фармакопее соединений рассчитаны по таблице относительных атомных масс 1975 г., принятой Международным союзом по теоретической и прикладной химии (IUPAC) и основанной на шкале углерода - 12.

Если молекулярная масса ниже 400, приводят два десятичных знака, если выше 400 - один десятичный знак.

ТОЧНАЯ НАВЕСКА. "Точная навеска" означает взвешивание на аналитических весах с точностью до 0,0002 г. Если не указано "точная навеска", то навеску следует брать с точностью до 0,01 г.

ПОСТОЯННАЯ МАССА. Термин "постоянная масса", используемый в связи с определением потери в массе при высушивании или при определении сульфатной золы, означает, что разница в массе между двумя последовательными взвешиваниями не превышает 0,0005 г; второе взвешивание производят после дополнительного высушивания или соответственно прокаливания в течение 1 ч.

ЗАПАХ. Испытание на отсутствие запаха в препарате производят сразу после вскрытия упаковки. 1-2 г препарата равномерно распределяют на часовом стекле диаметром 6-8 см и через 2 мин. определяют запах на расстоянии 4-6 см.

КАПЛЕМЕР. Для отсчета капель следует применять стандартный каплемер, дающий 20 капель воды в 1 мл при 20 град. С.

ПРЕДЕЛЫ СОДЕРЖАНИЯ. Если в разделе "Количественное определение" для индивидуальных веществ не указан верхний предел содержания, следует считать, что последний составляет не более 100,5% определяемого вещества.

В тех случаях, когда содержание вещества в препарате выражается в пересчете на сухое вещество, следует понимать, что потеря в массе при высушивании определена тем методом, который описан в соответствующей частной статье.

При определении действующих веществ в лекарственном растительном сырье расчет производят на абсолютно сухое вещество.

КОНТРОЛЬНЫЙ ОПЫТ. Под контрольным опытом подразумевают определение, проводимое с теми же количествами реактивов и в тех же условиях, но без испытуемого препарата.

ЕДИНИЦЫ ИЗМЕРЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ В ГОСУДАРСТВЕННОЙ ФАРМАКОПЕЕ СССР XI ИЗДАНИЯ

В ГФ XI использованы наименования и символы единиц измерения Международной системы единиц (СИ), принятой в 1960 г. XI Генеральной конференцией по мерам и весам (ГКМВ) и уточненной на последующих ГКМВ, а также внесистемные единицы, допускаемые к применению наравне с единицами СИ, и единицы, временно допускаемые к применению.

В ГФ XI используются следующие множительные приставки, которые указывают на десятичные кратные и дольные единицы СИ.

гига (Г)	10^{9}
мега (М)	10^{6}
кило (к)	10^{3}
гекто (г)	10^{2}
деци (д)	10^{-1}
санти (с)	10^{-2}
милли (м)	10^{-3}
микро (мк)	10^{-6}
нано (н)	10^{-9}
пико (п)	10^{-12}

Единицы массы

кг - килограмм
г - грамм
мг - миллиграмм
мкг - микрограмм
нг - нанограмм

Единицы длины

м - метр
см - сантиметр
мм - миллиметр
мкм - микрометр
нм - нанометр

Единицы времени

сут - сутки
ч - час
мин - минута
с - секунда
мс - миллисекунда
мкс - микросекунда

Единица объема (вместимости)

л - литр = 1000 куб. см
мл - миллилитр = 1 куб. см
мкл - микролитр = 0,001 куб. см

Единицы давления

кПа - килопаскаль
Па - паскаль
мм рт. ст. - миллиметр ртутного столба ~= прибл. 133 Па

Единицы температуры

К - Кельвин
град. С - градус Цельсия

Единицы радиоактивности

ГБк - гигабеккерель = 27,03 мКи

Единицы силы электрического тока

А - ампер
мА - миллиампер

МБк - мегабеккерель = 27,03 мкКи
Бк - беккерель = 27,03 пКи
Ки - кюри = 37 ГБк
мКи - милликюри = 37 МБк
мкКи - микрокюри = 38 кБк

нА - наноампер

Единицы электрического потенциала

В - вольт
мВ - милливольт

Единица электрического сопротивления

Ом - ом

М. м. - молекулярная масса
моль - количество вещества

ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ

Под температурой плавления вещества подразумевают интервал температуры между началом плавления - появлением первой капли жидкости и концом плавления - полным переходом вещества в жидкое состояние.

Приведенные в частных статьях фармакопеи интервалы температур плавления указывают на то, что наблюдаемая температура плавления данного препарата должна находиться в указанных пределах, при этом интервал между началом и концом плавления не должен превышать 2 град. С. Отдельные отклонения от этого интервала должны быть указаны в частных статьях.

В случаях нечеткого начала или конца плавления отдельных препаратов вместо интервала температуры плавления можно определять только конец плавления или только начало плавления. Тогда приведенный в частных статьях интервал температуры плавления указывает, что начало плавления (или конец плавления) должно укладываться в этих пределах.

Для веществ, неустойчивых при нагревании, определяют температуру разложения. Температурой разложения называют температуру, при которой происходит резкое изменение веществ (вспенивание).

В зависимости от физических свойств веществ следует применять один из нижеприведенных методов определения температуры плавления.

Методы 1 и 1а - для твердых веществ, легко превращаемых в порошок: устойчивых при нагревании (метод 1) и неустойчивых при нагревании (метод 1а).

Методы 2 и 3 - для веществ, не растирающихся в порошок, как жиры, воск, парафин, вазелин, смолы.

Для определения температуры плавления по методам 1, 1а и 2 допускаются два прибора.

I. "Прибор для определения температуры плавления с диапазоном измерений в пределах от 20 до 360 град. С" (ПТП) с электрическим обогревом. Прибор состоит из следующих частей:

1) основание со щитком управления и номограммой;

2) стеклянный блок - нагреватель, обогрев которого осуществляется константановой проволокой, навитой бифилярно;

3) оптическое приспособление (ГОСТ 7594-75);

4) приспособление для установки термометров;

5) приспособление для установки капилляров;

6) термометр укороченный с ценой деления 0,5 град. С;

7) источник нагрева (электрический обогрев);

8) капилляры длиной 20 см.

II. Второй прибор состоит из следующих частей:

1) круглодонная колба из термостойкого стекла вместимостью от 100 до 150 мл; длина горла колбы 20 см; диаметр горла от 3 до 4 см;

2) пробирка из термостойкого стекла, вставленная в колбу и отстоящая от дна колбы на расстоянии 1 см; диаметр пробирки от 2 до 2,5 см;

3) термометр ртутный стеклянный укороченный с ценой деления 0,5 град. С;

4) источник нагрева (газовая горелка, электрический обогрев);

5) капилляры.

Колбу наполняют на 3/4 объема шара соответствующей жидкостью;

1) вазелиновое масло (ГОСТ 3164-78) или жидкие силиконы;

2) концентрированная серная кислота (ГОСТ 4204-77) - для веществ с температурой плавления от 80 до 260 град. С;

3) раствор 3 частей калия сульфата (ГОСТ 4145-74) в 7 частях (массовых) концентрированной серной кислоты (ГОСТ 4204-77) - для веществ с температурой плавления выше 260 град. С;

4) дистиллированная вода - для веществ с температурой плавления ниже 80 град. С.

Примечания. 1. Стеклянные трубки, из которых вытягивают капилляры, должны быть вымыты и высушены. Капилляры сохраняют в эксикаторе.

2. При приготовлении раствора калия сульфата в концентрированной серной кислоте смесь ингредиентов кипятят в течение 5 мин при энергичном перемешивании. При недостаточном перемешивании могут образоваться два слоя, в результате чего может произойти закипание смеси, приводящее к взрыву.

Во время определения температуры плавления колба и пробирка должны быть открыты.

Методика определения. Метод 1 и 1а. Если в частных статьях нет других указаний, тонко измельченное вещество сушат при температуре от 100 до 105 град. С в течение 2 ч или в эксикаторе над серной кислотой в течение 24 ч. Любые другие условия должны быть указаны в частных статьях. Высушенное вещество помещают в капилляр, имеющий диаметр от 0,9 до 1 мм и толщину стенки от 0,1 до 0,15 мм, запаянный с одного конца.

При плавлении в приборе ПТП длина капилляра должна быть 20 см, в случае второго прибора - от 6 до 8 см. Для уплотнения вещества капилляр многократно бросают в стеклянную трубку высотой не менее 50 см, поставленную вертикально на стекло. Высота слоя вещества в капилляре должна быть около 3 мм. Капилляр с веществом сохраняют до начала определения в эксикаторе.

Во внутреннюю пробирку второго прибора помещают термометр так, чтобы конец его отстоял от дна пробирки на 1 см.

Нагревание в обоих приборах проводят сначала быстро, а затем регулируют его так, чтобы за 10 град. С до начала плавления была достигнута необходимая скорость подъема температуры, указанная ниже.

За 10 град. С до ожидаемого начала плавления капилляр с веществом вносят в приборы (первый или второй) таким образом, чтобы запаянный конец его находился на нижней части столика, расположенной на уровне середины ртутного шарика термометра. При плавлении во втором приборе капилляр должен быть расположен таким образом, чтобы запаянный его конец находился на середине ртутного шарика термометра. Продолжают нагревание со скоростью:

- для веществ, плавящихся по методу 1, при определении температуры плавления ниже 100 град. С - со скоростью от 0,5 до 1 град. С в 1 мин; при определении температуры плавления от 100 до 150 град. С - от 1 до 1,5 град. С в 1 мин; при определении температуры плавления выше 150 град. С - от 1,5 до 2 град. С в 1 мин;

- для веществ, плавящихся по методу 1а, - от 2,5 до 3,5 град. С в 1 мин.

Проводят не менее двух определений; за температуру плавления принимают среднее арифметическое значение нескольких определений, проведенных в одинаковых условиях и отличающихся друг от друга не более чем на 1 град. С.

В случае расхождений при определении температуры плавления на разных приборах в частной статье должна быть приведена температура плавления на каждом приборе.

Метод 2. а) Для мягких веществ: капилляр длиной 20 см при применении первого прибора и от 6 до 8 см - при применении второго прибора и внутренним диаметром от 1 до 2 мм, открытый с обоих концов, погружают в вещество так, чтобы оно заполнило нижнюю часть капилляра и образовало слой высотой около 10 мм.

б) Для твердых веществ: испытуемое вещество расплавляют на бане при возможно более низкой температуре, тщательно перемешивают, набирают его в капилляр, как указано выше (см. метод 2а), и оставляют при температуре 0 град. С в течение от 1 до 2 ч.

С заполненным тем или другим способом капилляром проводят определение температуры плавления по методу 1.

За температуру плавления принимают ту температуру, при которой столбик вещества становится жидким, поднимаясь в некоторых случаях по капилляру. Проводят не менее двух определений. За температуру плавления принимают среднее значение. Расхождение между двумя определениями не должно превышать 1 град. С.

Метод 3. При этом методе применяют термометр типа Убеллоде (ГОСТ 400-80 Е). Определение проводят следующим образом. Чашечку 1 (рис. 1) заполняют исследуемым веществом, избегая по возможности попадания пузырьков воздуха, и вставляют ее в нижнюю часть гильзы 2 до упора. Ртутный шарик термометра 3 при этом погружается в вещество, излишек которого выдавливается через боковые отверстия 4 гильзы. Последнюю тщательно протирают и

термометр помещают в пробирку 5 длиной от 19 до 21 см и диаметром от 4 до 4,5 см с помощью пробки с прорезом таким образом, чтобы нижняя часть чашечки отстояла от дна пробирки на 2,5 см. Пробирку укрепляют в вертикальном положении в стакане 6 так, чтобы она была погружена на 2/3 в воду и нижний ее конец при этом отстоял от дна стакана на 2,5 см. Начинают нагревать прибор при постоянном перемешивании жидкости с помощью мешалки 7. Когда температура будет на 15 - 20 град. С ниже ожидаемой, регулируют нагревание таким образом, чтобы температура поднималась на 1 град. С в 1 мин. За температуру плавления принимают температуру, при которой из отверстия 8 упадет первая капля расплавленного вещества.

<*> Рис. 1. Прибор для определения температуры плавления (объяснение в тексте). (Рисунок не приводится).

Проводят не менее двух определений; за температуру плавления принимают среднее значение. Расхождение между двумя определениями не должно превышать 1 град. С.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ЗАТВЕРДЕВАНИЯ

Температурой затвердевания называют наиболее высокую, остающуюся в течение короткого времени постоянной температуру во время перехода вещества из жидкого состояния в твердое.

Определение проводят в приборе (рис. 2), состоящем из толстостенной пробирки 1 с внутренним диаметром 20 +/- 1 мм, снабженной пробкой, в которой укреплены термометр 2 и мешалка 3. Рекомендуются укороченные термометры с ценой деления шкалы 0,5 град. С (ГОСТ 215-73Е). Мешалку можно применять стеклянную или из проволоки, согнутую на конце петлей под прямым углом.

Пробирку укрепляют на пробке во второй толстостенной наружной пробирке 4 (диаметром около 35 мм), служащей воздушной баней. Прибор помещают в сосуд 5 вместимостью 1000 мл, наполняемый водой или охладительной смесью таким образом, чтобы уровень жидкости в сосуде был выше вещества во внутренней пробирке. Температуру в сосуде измеряют с помощью второго термометра 6.

<*> Рис 2. Прибор для определения температуры затвердевания (объяснение в тексте). (Рисунок не приводится).

Вместо указанных выше пробирок (1, 4) можно использовать прибор Жукова (ГОСТ 4255-75).

Методика определения. 10 г испытуемого вещества, находящегося в жидком состоянии (твердое вещество предварительно расплавляют при возможно более низкой температуре), помещают во внутреннюю сухую пробирку прибора и укрепляют термометр таким образом, чтобы ртутный шарик находился посередине слоя испытуемого вещества.

Пробирку с веществом вставляют в наружную пробирку и укрепляют в сосуде, жидкость в котором должна иметь температуру на 5 град. С ниже ожидаемой температуры затвердевания.

При постоянном перемешивании испытуемого вещества отмечают температуру каждые 30 с. Вначале происходит постепенное понижение температуры, затем, при появлении твердой фазы, она остается некоторое время постоянной или повышается перед тем, как стать постоянной (в этот момент прекращают перемешивание), а затем снова падает. Отмечают наиболее высокую температуру, остающуюся короткое время постоянной с начала затвердевания вещества. Эту температуру и принимают за температуру затвердевания.

Если вещество остается жидким при ожидаемой температуре затвердевания, его охлаждают на 1-2 град. С ниже ожидаемой температуры и вызывают затвердевание внесением кристаллика испытуемого вещества. Для веществ, имеющих высокую температуру затвердевания, определение можно проводить по методу Жукова (ГОСТ 4255-75).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРНЫХ ПРЕДЕЛОВ ПЕРЕГОНКИ

Под температурными пределами перегонки подразумевают интервал между начальной и конечной температурой кипения при нормальном давлении 101,3 кПа (760 мм рт. ст.).

Начальной температурой кипения считают температуру, при которой в приемник перегнались первые 5 капель жидкости. Конечной температурой кипения считают температуру, при которой в приемник перешло 95% жидкости.

Определение производят в приборе, состоящем из следующих частей.

1. Колба для перегонки из термостойкого стекла вместимостью 100 мл с отводной трубкой, отходящей от середины горла под углом к его нижней части 75 +/- 2 град. (ГОСТ 10394-72).

Наружный диаметр шара, мм	65 +/- 2
Внутренний диаметр горла, мм	16 +/- 1

Общая высота колбы, мм	215 +/- 3
Высота горла, мм	150 +/- 3
Длина отводной трубки, мм	100 +/- 3

2. Холодильник из термостойкого стекла с вставной трубкой (ГОСТ 9499-70).

Общая длина вставной трубки, мм	530 +/- 15
Длина кожуха, мм	400 +/- 10
Длина воронки вставной трубки, мм	60 +/- 5
Внутренний диаметр воронки, мм	14,5 +/- 1
Наружный диаметр вставной трубки, мм	17 +/- 1
Угол среза вставной трубки	45 +/- 3 град.

Конец вставной трубки, входящий в приемник, должен быть изогнут; можно также пользоваться алонжем. При работе с жидкостями, кипящими при температуре ниже 150 град. С, применяют водяное охлаждение. Для жидкостей, кипящих при температуре выше 150 град. С, достаточно воздушного охлаждения.

3. Приемник, в качестве которого может служить цилиндр вместимостью 50 мл с ценой деления 1 мл (ГОСТ 1770-74 Е).

4. Термометр укороченный с ценой деления шкалы 0,5 град. С (ГОСТ 215-73).

5. Квадратный асбестовый картон (ГОСТ 12871-67) с длиной стороны не менее 12 см и толщиной не менее 3 мм, с круглым отверстием в центре диаметром от 2 до 3 см.

6. Источник нагрева: газовая горелка или другой источник, обеспечивающий необходимую температуру, безопасность и контроль за перегонкой.

7. Два штатива: один снабжен лапкой и кольцом для укрепления колбы, другой - лапкой для укрепления холодильника.

Методика определения. В горло колбы вставляют термометр с помощью хорошо подобранной корковой пробки таким образом, чтобы верхний край ртутного шарика находился на 1 см ниже нижнего края отводного отверстия, затем колбу укрепляют с помощью лапки на штативе так, чтобы она плотно закрывала отверстие асбестового картона, лежащего на кольце, прикрепленном к тому же штативу.

К отводной трубке колбы с помощью нормального шлифа или корковой пробки присоединяют холодильник (укрепленный на штативе лапкой) так, чтобы конец отводной трубки входил в трубку холодильника не менее чем на 3-4 см, но не достигал суженной части. Собранный таким образом прибор в целях безопасности устанавливают на противне с песком.

Отмеривают 50 мл исследуемой жидкости цилиндром, используемым в качестве приемника, и переливают в колбу, пользуясь воронкой, чтобы жидкость не попадала на стенки колбы и в особенности в отводную трубку. В колбу опускают несколько тонких запаянных с одного конца капилляров. Приемник помещают так, чтобы изогнутый конец холодильника входил в него на 2,5 см.

Начинают нагревание колбы и отмечают начальную температуру кипения; затем приемник придвигают к концу холодильника так, чтобы последний касался его стенки, и продолжают нагревание таким образом, чтобы в минуту перегонялось от 3 до 4 мл жидкости. Перегоняют требуемый объем жидкости, отмечая конечную температуру кипения.

Наблюдаемые температурные пределы перегонки (Т испр) приводят к нормальному давлению 101,3 кПа (760 мм рт.,ст.) по следующей формуле:

$$T_{испр} = T + K(P - P1),$$

где Т - наблюдаемая температура; Р - нормальное барометрическое давление (101,3 кПа); Р1 - барометрическое давление во время опыта, наблюдаемое по ртутному барометру или анероиду с учетом поправок, указанных в поверочном свидетельстве и в инструкции по эксплуатации; К - инкремент температуры кипения на миллиметр давления. Значение К зависит от температуры кипения перегоняемой жидкости.

Наблюдаемая температура кипения, град. С	Значения К
Ниже 100	0,04
От 100 до 140	0,045
" 141 " 190	0,05
" 191 " 240	0,055
Выше 240	0,06

Примечания. 1. Если во время опыта давление измерялось ртутным барометром, то после внесения поправок, указанных в поверочном свидетельстве и в инструкции по эксплуатации, оно должно быть приведено к показаниям при температуре 0 град. С, для чего вычитают из показаний барометра: 0,27 кПа (2 мм рт. ст.) при температуре окружающей среды от 13 до 20 град. С; 0,4 кПа (3 мм рт. ст.) при температуре окружающей среды от 21 до 28 град. С; 0,53 кПа (4 мм рт. ст.) при температуре окружающей среды от 29 до 35 град. С.

2. Перегонку эфира следует проводить на предварительно нагретой водяной бане при температуре от 54 до 58 град. С. Колбу помещают на асбестовом картоне таким образом, чтобы дно ее полностью закрывало отверстие в картоне и было погружено в воду.

Допустимое расхождение между результатами двух параллельных определений 1 град. С.

Для определения температурных пределов перегонки жидкостей возможно применение прибора для определения температурных пределов перегонки (ТПП), изготовляемого Клинским заводом "Лаборприбор" (рис. 3) <*>.

<*> Рис. 3. Прибор типа ТПП (схема). (Рисунок не приводится).

Для идентификации вещества можно применить микрометод определения температуры кипения.

В тонкостенную стеклянную запаянную с одного конца трубочку диаметром 3 мм и длиной около 8 см помещают несколько капель исследуемой жидкости, чтобы образовался слой от 1 до 1,5 см высоты. В трубочку вставляют открытым концом вниз запаянный с одного конца капилляр длиной около 10 см и диаметром около 1 мм. Трубочку прикрепляют с помощью резинового колечка или тонкой проволоки к укороченному термометру так, чтобы нижний конец трубочки приходился на уровне середины ртутного шарика, и термометр помещают в прибор для определения температуры плавления. Нагревание ведут таким образом, чтобы температура поднималась на 2-3 град. С в минуту до того момента, когда из капилляра на смену отдельным воздушным пузырькам начнет выделяться непрерывная цепочка пузырьков пара. Тогда прекращают или уменьшают нагрев. Момент, когда прекратится выделение пузырьков и жидкость начнет подниматься в капилляр, принимают за температуру кипения.

Наблюдаемую температуру кипения приводят к показаниям при нормальном давлении ртутного барометра, как указано выше.

Примечание. Если при определении температурных пределов перегонки применяют неукороченный термометр, то следует вносить поправку на выступающий столбик ртути. Для этого употребляют вспомогательный термометр, помещаемый у выступающей части основного термометра так, чтобы шарик вспомогательного термометра находился посередине между верхней поверхностью пробки и концом столбика ртути. Исправленную температуру вычисляют по формуле:

$$T_{испр} = T + 0{,}00016(T - t)N,$$

где T - показание основного термометра;

t - показание вспомогательного термометра;

0,00016 - видимый коэффициент расширения ртути в стекле;

N - высота столбика ртути выступающей части основного термометра, выраженная в градусах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПЛОТНОСТИ

Плотностью называют массу единицы объема вещества:

$$"ро" = \frac{m}{V}$$

Если массу m измерить в граммах, а объем V в кубических сантиметрах, то плотность представляет собой массу 1 куб. см вещества: "ро" г/куб. см.

Определение плотности проводят с помощью пикнометра или ареометра.

Методика определения. Метод 1. Применяют в случае определения плотности жидкостей с точностью до 0,001. Чистый сухой пикнометр взвешивают с точностью до 0,0002 г, заполняют с помощью маленькой воронки дистиллированной водой немного выше метки, закрывают пробкой и выдерживают в течение 20 мин в термостате, в котором поддерживают постоянную температуру

воды 20 град. С с точностью до 0,1 град. С. При этой температуре уровень воды в пикнометре доводят до метки, быстро отбирая излишек воды при помощи пипетки или свернутой в трубку полоски фильтровальной бумаги. Пикнометр снова закрывают пробкой и выдерживают в термостате еще 10 мин, проверяя положение мениска по отношению к метке. Затем пикнометр вынимают из термостата, фильтровальной бумагой вытирают внутреннюю поверхность горлышка пикнометра, а также весь пикнометр снаружи, оставляют под стеклом аналитических весов в течение 10 мин и взвешивают с той же точностью.

Пикнометр освобождают от воды, высушивают, споласкивая последовательно спиртом и эфиром (сушить пикнометр путем нагревания не допускается), удаляют остатки эфира продуванием воздуха, заполняют пикнометр испытуемой жидкостью и затем производят те же операции, что и с дистиллированной водой.

Плотность "ро20" (г/куб. см) вычисляют по формуле:

$$"ро20" = \frac{(m2 - m)\ 0{,}99703}{m1 - m} + 0{,}0012,$$

где m - масса пустого пикнометра в граммах; m1 - масса пикнометра с дистиллированной водой в граммах; m2 - масса пикнометра с испытуемой жидкостью в граммах; 0,99703 - значение плотности воды при 20 град. С (в г/ куб. см с учетом плотности воздуха); 0,0012 - плотность воздуха при 20 град. С и барометрическом давлении 1011 гПа (760 мм рт. ст.).

Метод 2. Применяют в случае определения плотности жидкостей с точностью до 0,01. Испытуемую жидкость помещают в цилиндр и при температуре жидкости 20 град. С осторожно опускают в нее чистый сухой ареометр, на шкале которого предусмотрена ожидаемая величина плотности. Ареометр не выпускают из рук до тех пор, пока не станет очевидным, что он плавает; при этом необходимо следить, чтобы ареометр не касался стенок и дна цилиндра. Отсчет производят через 3-4 мин после погружения по делению на шкале ареометра, соответствующему нижнему мениску жидкости (при отсчете глаз должен быть на уровне мениска).

Примечания. 1. Определение плотности сильнолетучих веществ ареометром не допускается.

2. В случае определения темноокрашенных жидкостей отсчет производят по верхнему мениску.

Метод 3. Применяют для определения плотности твердых жиров и воска. Точно взвешивают пустой пикнометр, затем взвешивают тот же пикнометр, наполненный дистиллированной водой, температура которой 20 град. С. После этого воду удаляют и пикнометр высушивают. Все операции проводят, соблюдая условия, указанные в методе 1.

В пикнометр вливают при помощи пипетки или небольшой воронки с тонкооттянутым концом расплавленный жир или воск в таком количестве, чтобы он занимал 1/3 - 1/2 объема пикнометра. Пикнометр ставят на один час без пробки в горячую воду, затем охлаждают до 20 град. С и взвешивают; доводят до метки дистиллированной водой при 20 град. С, вытирают насухо и вновь взвешивают. В обеих фазах и на поверхности их раздела не должно быть пузырьков воздуха.

Величину плотности вычисляют по следующей формуле:

$$"ро20" = \frac{(m2 - m)\ 0{,}99703}{(m1 + m2) - (m + m3)} + 0{,}0012,$$

где m - масса пустого пикнометра в граммах; m1 - масса пикнометра с дистиллированной водой в граммах; m2 - масса пикнометра с жиром в граммах; m3 - масса пикнометра с жиром и водой в граммах.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПИРТА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

В круглодонную колбу вместимостью 200-250 мл отмеривают точное количество жидкости. При содержании спирта в жидкости до 20% для определения берут 75 мл жидкости, если жидкость содержит от 20 до 50% - 50 мл, от 50% и выше - 25 мл; жидкость перед перегонкой разбавляют водой до 75 мл.

Для равномерного кипения в колбу с жидкостью помещают капилляры, пемзу или кусочки прокаленного фарфора. Если жидкость при перегонке сильно пенится, то добавляют фосфорную или серную кислоту (2-3 мл), хлорид кальция, парафин или воск (2-3 г).

Приемник (мерную колбу вместимостью 50 мл) помещают в сосуд с холодной водой, собирают около 48 мл отгона, доводят его температуру до 20 град. С и добавляют воды до метки. Отгон должен быть прозрачным или слегка мутным.

Плотность отгона определяют пикнометром и по алкоголеметрическим таблицам находят соответствующее содержание спирта в процентах по объему <*>.

<*> См. с. 303.

Содержание спирта в препарате (X) в процентах по объему вычисляют по формуле:

$$X = \frac{50a}{б}$$

где 50 - объем отгона в миллилитрах; а - содержание спирта в процентах по объему; б - объем исследуемого препарата, взятый для отгона, в миллилитрах.

Если испытуемая жидкость содержит летучие вещества - эфир, эфирные масла, хлороформ, камфору, летучие кислоты или основания, свободный йод и др., ее предварительно обрабатывают.

При содержании в жидкости эфира, эфирных масел, хлороформа, камфоры к ней добавляют в делительной воронке равный объем насыщенного раствора натрия хлорида и такой же объем петролейного эфира. Смесь взбалтывают в течение 3 мин. После разделения слоев спиртоводный слой сливают в другую делительную воронку и обрабатывают таким же образом половинным количеством петролейного эфира. Спиртоводный слой сливают в колбу для отгона, а соединенные эфирные жидкости взбалтывают с половинным количеством насыщенного раствора натрия хлорида, потом присоединяют к жидкости, находящейся в колбе для отгона.

Если жидкость содержит менее 30% спирта, то высаливание производят не раствором, а 10 г сухого натрия хлорида.

При содержании летучих кислот их нейтрализуют раствором щелочи, при содержании летучих оснований - фосфорной или серной кислотой.

Жидкости, содержащие свободный йод, перед дистилляцией обрабатывают цинковой пылью или рассчитанным количеством сухого натрия тиосульфата до обесцвечивания. Для связывания летучих сернистых соединений прибавляют несколько капель раствора едкого натра.

Определение содержания спирта в настойках проводят также по температуре кипения.

Прибор для количественного определения спирта в настойках состоит из сосуда для кипячения 1, трубки 2 с боковым отростком, холодильника 3 и ртутного термометра 4 с ценой деления 0,1 град. С и пределом шкалы от 50 до 100 град. С (рис. 4) <*>.

<*> Рис. 4. Прибор для количественного определения спирта в настойках (объяснение в тексте). (Рисунок не приводится).

В сосуд для кипячения наливают 40 мл настойки и для равномерного кипения помещают капилляры, пемзу или кусочки прокаленного фарфора. Термометр помещают в приборе таким образом, чтобы ртутный шарик выступал над уровнем жидкости на 2-3 мм.

Нагревают на сетке с помощью электроплитки мощностью 200 Вт или газовой горелки. Когда жидкость в колбе начнет закипать, с помощью реостата в 2 раза уменьшают напряжение, подаваемое на плитку. Через 5 мин после начала кипения, когда температура становится постоянной или ее отклонение не превышает +/- 0,1 град. С, снимают показания термометра. Полученный результат приводят к нормальному давлению. Если показания барометра отличаются от 1011 гПа (760 мм рт. ст.), вносят поправку на разность между наблюдаемым и нормальным давлением 0,04 град. С на 1,3 гПа (1 мм рт. ст.). При давлении ниже 1011 гПа поправку прибавляют к установленной температуре, при давлении выше 1011 гПа поправку вычитают.

Содержание спирта в настойке определяют при помощи таблицы.

Пример. Температура кипения настойки пустырника 80,9 град. С, атмосферное давление 1000 гПа (752 мм рт. ст.), разность давлений 1011 - 1000 = 11 гПа (760 - 752 = 8 мм рт. ст.). Поправка составляет: 0,04 град. С x 8 = 0,32 град. С. К найденной температуре кипения прибавляют поправку: (80,9 + 0,32) град. С. По таблице этой температуре кипения соответствует 66% спирта.

Определение концентрации спирта в водно - спиртовых смесях
по температуре кипения при давлении 1011 гПа
(760 мм рт. ст.)

Температура кипения, град. С	% спирта по объему	Температура кипения, град. С	% спирта по объему	Температура кипения, град. С	% спирта по объему
99,3	1	86,4	28	82,3	55
98,3	2	86,1	29	82,2	56
97,4	3	85,9	30	82,1	57
96,6	4	85,6	31	82,0	58
96,0	5	85,4	32	81,9	59
95,1	6	85,2	33	81,8	60
94,3	7	85,0	34	81,7	61
93,7	8	84,9	35	81,6	62
93,0	9	84,6	36	81,5	63
92,5	10	84,4	37	81,4	64
92,0	11	84,3	38	81,3	65
91,5	12	84,2	39	81,2	66
91,1	13	84,1	40	81,1	67
90,7	14	83,9	41	81,0	68
90,5	15	83,8	42	80,9	69
90,0	16	83,7	43	80,8	70
89,5	17	83,5	44	80,7	71
89,1	18	83,3	45	80,6	72
88,8	19	83,2	46	80,5	73
88,5	20	83,1	47	80,4	74
88,1	21	83,0	48	80,3	75
87,8	22	82,9	49	80,2	76
87,5	23	82,8	50	80,1	77
87,2	24	82,7	51	80,0	78
87,1	25	82,6	52	79,9	79
86,8	26	82,5	53	79,8	80
86,6	27	82,4	54	79,7	81
79,6	82	79,3	86	78,85	90
79,5	83	79,2	87	78,8	91
79,45	84	79,1	88	78,7	92
79,4	85	79,0	89		

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЯ ПРЕЛОМЛЕНИЯ (РЕФРАКТОМЕТРИЯ)

Показателем преломления (n) называют отношение скорости распространения света в вакууме к скорости распространения света в испытуемом веществе. Это абсолютный показатель преломления. На практике определяют так называемый относительный показатель преломления, т.е. отношение скорости распространения света в воздухе к скорости распространения света в испытуемом веществе.

Показатель преломления зависит от температуры и длины волны света, при которой проводят определение. В растворах показатель преломления зависит также от концентрации вещества и природы растворителя.

Рефрактометрия применяется для установления подлинности и чистоты вещества. Метод применяют также для определения концентрации вещества в растворе, которую находят по графику зависимости показателя преломления от концентрации. На графике выбирают интервал концентраций, в котором соблюдается линейная зависимость между коэффициентом преломления и концентрацией. В этом интервале концентрацию можно вычислить по формуле:

$$X = \frac{n - n0}{F},$$

где X - концентрация раствора; n - показатель преломления раствора; n0 - показатель преломления растворителя при той же температуре; F - фактор, равный величине прироста

показателя преломления при увеличении концентрации на 1% (устанавливается экспериментально).

Приборы, применяемые для определения показателя преломления, называются рефрактометрами. Определение проводится при температуре (20 +/- 0,3) град. С и длине волны линии D спектра натрия (589,3 нм). Показатель преломления, определенный при таких условиях, обозначается индексом n_D^{20}.

Современные приборы откалиброваны таким образом, что отсчеты, полученные по их шкалам, соответствуют показателям преломления для D линии натрия, поэтому при проведении измерений следует соблюдать указания в отношении соответствующего источника света, приведенные в инструкции к приборам.

Обычно измерения показателя преломления проводят на рефрактометрах типа Аббе, в основу которых положено явление полного внутреннего отражения при прохождении светом границы раздела двух сред с разными показателями преломления.

Диапазон измеряемых показателей преломления при измерении в проходящем свете 1,3-1,7.

Точность измерения показателя преломления должна быть не ниже $\pm 2 \times 10^{-4}$.

Могут быть использованы рефрактометры других типов с такой же или большей точностью.

Рефрактометры юстируют по эталонным жидкостям, прилагаемым к приборам, или дистиллированной воде, для которой $n_D^{20} = 1,3330$.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИЧЕСКОГО ВРАЩЕНИЯ (ПОЛЯРИМЕТРИЯ)

Оптическое вращение - это способность вещества вращать плоскость поляризации при прохождении через него поляризованного света.

В зависимости от природы оптически активного вещества вращение плоскости поляризации может иметь различное направление и величину. Если от наблюдателя, к которому направлен свет, проходящий через оптически активное вещество, плоскость поляризации вращается по часовой стрелке, то вещество называют правовращающим и перед его названием ставят знак "+", если же плоскость поляризации вращается против часовой стрелки, то вещество называют левовращающим и перед его названием ставят знак "-".

Величину отклонения плоскости поляризации от начального положения, выраженную в угловых градусах, называют углом вращения и обозначают греческой буквой "альфа". Величина угла вращения зависит от природы оптически активного вещества, длины пути поляризованного света в оптически активной среде (чистом веществе или растворе) и длины волны света. Для растворов величина угла вращения зависит от природы растворителя и концентрации оптически активного вещества. Величина угла вращения прямо пропорциональна длине пути света в оптически активной среде, т.е. толщине слоя оптически активного вещества или его раствора. Влияние температуры в большинстве случаев незначительно.

Для сравнительной оценки способности различных веществ вращать плоскость поляризации света вычисляют величину удельного вращения ["альфа"]. Удельное вращение - это константа оптически активного вещества. Удельное вращение ["альфа"] определяют расчетным путем как угол поворота плоскости поляризации монохроматического света на пути длиной в 1 дм в среде, содержащей оптически активное вещество, при условном приведении концентрации этого вещества к значению, равному 1 г/мл.

Если нет специальных указаний, определение оптического вращения проводят при температуре 20 град. С и при длине волны линии D спектра натрия (589,3 нм). Соответствующую величину удельного вращения обозначают $[\alpha]_D^{20}$. Иногда для измерения используют зеленую линию спектра ртути с длиной волны 546,1 нм.

При определении ["альфа"] в растворах оптически активного вещества необходимо иметь в виду, что найденная величина может зависеть от природы растворителя и концентрации оптически активного вещества. Замена растворителя может привести к изменению ["альфа"] не только по

величине, но и по знаку. Поэтому, приводя величину удельного вращения, необходимо указывать растворитель и выбранную для измерения концентрацию раствора.

Величину удельного вращения рассчитывают по одной из следующих формул.

Для веществ, находящихся в растворе:

$$["альфа"] = \frac{"альфа"\ 100}{lc}, \qquad (1)$$

где "альфа" - измеренный угол вращения в градусах; l - толщина слоя в дециметрах; c - концентрация раствора, выраженная в граммах вещества на 100 мл раствора.

Для жидких веществ:

$$["альфа"] = \frac{"альфа"}{l"ро"}, \qquad (2)$$

где "альфа" - измеренный угол вращения в градусах; l - толщина слоя в дециметрах; "ро" - плотность жидкого вещества в граммах на 1 мл.

Удельное вращение определяют либо в пересчете на сухое вещество, либо из высушенной навески, о чем в частных статьях должно быть соответствующее указание.

Измерение величины угла вращения проводят либо для оценки чистоты оптически активного вещества, либо для определения его концентрации в растворе. Для оценки чистоты вещества по уравнению (1) или (2) рассчитывают величину его удельного вращения ["альфа"]. Концентрацию оптически активного вещества в растворе находят по формуле:

$$c = \frac{"альфа"100}{["альфа"]l}. \qquad (3)$$

Поскольку величина ["альфа"] постоянна только в определенном интервале концентраций, возможность использования формулы (3) ограничивается этим интервалом.

Измерение угла вращения проводят на поляриметре, позволяющем определить величину угла вращения с точностью +/- 0,02 град.

Предназначенные для измерения угла вращения растворы или жидкие вещества должны быть прозрачными. При измерении прежде всего следует установить нулевую точку прибора или определить величину поправки с трубкой, заполненной чистым растворителем (при работе с растворами) или с пустой трубкой (при работе с жидкими веществами). После установки прибора на нулевую точку или определения величины поправки проводят основное измерение, которое повторяют не менее 3 раз.

Для получения величины угла вращения "альфа" показания прибора, полученные при измерениях, алгебраически суммируют с ранее найденной величиной поправки.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ, ОСНОВАННЫЕ НА ИЗМЕРЕНИИ ПОГЛОЩЕНИЯ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Фотометрические методы анализа основаны на избирательном поглощении электромагнитного излучения анализируемым веществом и служат для исследования строения, идентификации и количественного анализа светопоглощающих соединений. В зависимости от используемой аппаратуры в фотометрическом анализе различают спектрофотометрические методы - анализ по поглощению веществами монохроматического излучения; колориметрические и фотоколориметрические - анализ по поглощению веществами немонохроматического излучения.

Определения, связанные с измерением поглощения электромагнитного излучения, основаны на двух законах. Закон Бугера - Ламберта связывает поглощение с толщиной слоя поглощающего вещества и выражается соотношением <*>:

<*> Приведенные обозначения соответствуют ГОСТу 7601-78.

$$\frac{J}{J0} = 10^{-kb}; \qquad (1)$$

$$\lg \frac{J0}{J} = kb, \qquad (2)$$

где J0 - интенсивность излучения, падающего на вещество; J - интенсивность излучения, прошедшего через вещество; b - толщина слоя вещества в сантиметрах; k - показатель поглощения <*> - величина, обратная той толщине слоя, проходя через который поток излучения ослабляется в 10 раз.

<*> В литературе эта величина часто называется коэффициентом погашения или коэффициентом экстинкции.

Закон Бера связывает поглощение с концентрацией поглощающего вещества и обычно применяется для растворов:

$$k = \text{"каппа"}c, \qquad (3)$$

где с - концентрация раствора; "каппа" - показатель поглощения раствора, концентрация которого равна единице.

На практике обычно используется объединенный закон Бугера - Ламберта - Бера в виде:

$$\lg \frac{J0}{J} = \text{"каппа"}cb. \qquad (4)$$

Величина $\lg \frac{J0}{J}$ носит название оптической плотности и обозначается буквой D.

Величина "каппа" является специфической физической константой для каждого вещества и может быть использована для целей идентификации. Знание величины "каппа" позволяет определить содержание данного вещества в растворах неизвестной концентрации на основе измерения оптической плотности D.

Объединенный закон Бугера - Ламберта - Бера вполне справедлив только для монохроматического излучения, поэтому строгим является его применение в спектрофотометрии. В фотоколориметрии, где измерения проводятся с помощью светофильтров, выделяющих сравнительно узкий интервал длин волн, этот закон применим лишь с большим или меньшим приближением в зависимости от степени постоянства величины D в данном интервале длин волн.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ

Спектрофотометрия используется для идентификации соединений, исследования состава, строения и количественного анализа индивидуальных веществ и многокомпонентных систем. Кривая зависимости поглощения (функция поглощения) от длины волны или волнового числа называется спектром поглощения вещества и является специфической характеристикой данного вещества.

В спектрофотометрических методах применяют спектрофотометры - приборы, позволяющие проводить анализ как окрашенных, так и бесцветных соединений по избирательному поглощению монохроматического излучения в видимой, ультрафиолетовой и инфракрасной областях спектра. Природа полос поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях спектра связана с различными электронными переходами в поглощающих молекулах и ионах (электронные спектры); в инфракрасной области она связана с колебательными переходами и изменением колебательных состояний ядер, входящих в молекулу поглощающего вещества (колебательные спектры).

Распространенная в настоящее время аппаратура позволяет измерять ультрафиолетовые спектры в области от 190 до 380 нм, видимые - от 380 до 780 нм, инфракрасные спектры - от 780 до 40000 нм (40 мкм).

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В УЛЬТРАФИОЛЕТОВОЙ И ВИДИМОЙ ОБЛАСТЯХ

Спектрофотометрические измерения в ультрафиолетовой и видимой областях чаще всего проводят для растворов, хотя такие измерения могут быть проведены и для веществ, находящихся в парообразном, жидком и твердом состоянии.

Образец анализируемого вещества при спектрофотометрических определениях обычно растворяют в соответствующем растворителе. Для этих областей пригодны многие растворители, в том числе вода, спирты, хлороформ, низшие углеводороды, эфиры, разведенные растворы аммиака, едкого натра <*>, хлористоводородной или серной кислоты. Следует использовать растворители, не содержащие примесей, поглощающих в данной спектральной области; для спектрофотометрии выпускаются специальные растворители, гарантирующие отсутствие примесей.

<*> Согласно принятой в стране терминологии (Химический энциклопедический словарь, изд. Советская энциклопедия, М., 1983), едкий натр называется гидроксид натрия, а едкое кали - гидроксид калия.

Спектрофотометрический анализ по непосредственному измерению оптической плотности может быть проведен для веществ, обладающих лишь определенными особенностями строения (ароматические соединения, соединения с сопряженными кратными связями, соединения ряда металлов и др.).

Некоторые анализируемые вещества необходимо предварительно перевести в соединение, поглощающее излучение.

Для определения концентрации растворов спектрофотометрическим путем используется закон Бугера - Ламберта - Бера в форме:

$$c = \frac{1}{\text{"каппа"}b} D. \qquad (5)$$

В ряде случаев даже при использовании монохроматического излучения могут наблюдаться отклонения от закона Бугера - Ламберта - Бера, обусловленные процессами диссоциации, ассоциации и комплексообразования. При наличии таких отклонений следует пользоваться не формулой (5), а экспериментально найденной зависимостью оптической плотности от концентрации.

Измерения оптической плотности D в ультрафиолетовой и видимой области проводятся на фотоэлектрических спектрофотометрах. Основными частями этих приборов являются: источник излучения (лампа накаливания для видимой области, газоразрядная водородная или дейтериевая лампа ультрафиолетовой области), монохроматор, диспергирующая система которого основана на использовании кварцевой призмы или дифракционной решетки, кюветное отделение, в котором располагаются кюветы с исследуемыми веществами, приемное и фотометрическое устройство для сравнительной оценки интенсивности световых потоков J0 и J, основанное на использовании фотоэлементов.

Измерительная шкала спектрофотометра проградуирована в процентах пропускания T (т.е. $\frac{J}{J0}$ 100) и в величинах оптической плотности D (т.е. $\lg \frac{J0}{J}$), а шкала длин волн или волновых чисел - в нанометрах или в $см^{-1}$ соответственно.

В процессе измерения на пути выходящего из монохроматора пучка излучения определенной длины волны поочередно устанавливается нулевой раствор (растворитель или раствор, содержащий те же вещества, что и исследуемый, за исключением анализируемого компонента), для которого T = 100%, D = 0 и исследуемый раствор.

Для снижения величины ошибки при определении D концентрация раствора и толщина слоя его подбираются такими, чтобы D в исследуемой спектральной области находилось в пределах от 0,2 до 0,7. В зависимости от способности вещества к поглощению это обычно достигается при использовании концентраций от 0,01 до 0,00001% (кюветы с толщиной слоя 10 мм).

Показатель поглощения "каппа" вычисляют на основании измеренной оптической плотности D для растворов с известной концентрацией по формуле:

$$\text{"каппа"} = \frac{1}{cb} D. \qquad (6)$$

Концентрация "с" может быть выражена в молях на 1 л или в граммах на 100 мл раствора. В зависимости от этого по формуле (6) вычисляют молярный показатель поглощения или удельный показатель поглощения.

Молярный показатель поглощения ("эпсилон") представляет собой оптическую плотность одномолярного раствора вещества при толщине слоя 10 мм; удельный показатель поглощения ($E^{1\%}_{1\ см}$) - оптическую плотность раствора, содержащего 1 г вещества в 100 мл раствора при той же толщине слоя. Переход от удельного показателя поглощения к молярному осуществляется по формуле:

$$"эпсилон" = E^{1\%}_{1\ см} \frac{M}{10}, \qquad (7)$$

где M - молекулярная масса.

Если известно значение "каппа" (в форме "эпсилон" или $E^{1\%}_{1\ см}$), определяютко нцентрацию исследуемых растворов по величине оптической плотности D, пользуясь формулой (5) (при условии подчинения закону Бера).

Для идентификации веществ в ультрафиолетовой области спектра рекомендуется применять регистрирующие спектрофотометры.

При измерениях на разных спектрофотометрах значения характерных длин волн могут отличаться на +/-2 нм. Если отличие превышает указанный предел, то необходимо провести калибровку шкалы длин волн.

При количественных определениях целесообразно использовать такие полосы поглощения, которые отвечают следующим условиям:

1) данная полоса должна быть по возможности свободна от наложения полос поглощения других компонентов анализируемой системы;

2) выбранная полоса должна обладать достаточно высоким показателем поглощения ("каппа") для индивидуального соединения.

Такие полосы называются аналитическими.

При анализе используют максимум или минимум полосы поглощения и не следует производить измерения на участках крутого спада или подъема кривой.

Для многокомпонентных систем выделение аналитических полос для каждого отдельного компонента становится затруднительным, тогда количественные определения могут быть произведены путем измерения оптической плотности при нескольких значениях длин волн и решения системы линейных уравнений, связывающих суммарную величину оптической плотности смеси при данной длине волны с величиной оптической плотности для каждого индивидуального компонента.

Например, для системы двух окрашенных веществ, спектры поглощения которых накладываются друг на друга, определение концентраций c1 и c2 раствора ведется при двух длинах волн по уравнениям:

$$D_{"лямбда1"} = "эпсилон1"_{"лямбда1"} c1b + "эпсилон2"_{"лямбда1"} c2b;$$

$$D_{"лямбда2"} = "эпсилон1"_{"лямбда2"} c1b + "эпсилон2"_{"лямбда2"} c2b; \qquad (8)$$

где $D_{"лямбда1"}$ и $D_{"лямбда2"}$ - измеренные экспериментально оптические плотности смеси двух веществ при длинах волн "лямбда1" и "лямбда2"; $"эпсилон1"_{"лямбда1"}$ и $"эпсилон1"_{"лямбда2"}$ - молярные коэффициенты поглощения одного вещества при длинах волн "лямбда1" и "лямбда2"; $"эпсилон2"_{"лямбда1"}$ и $"эпсилон2"_{"лямбда2"}$ - молярные коэффициенты поглощения второго вещества при длинах волн "лямбда1" и "лямбда2"; b - толщина слоя вещества в сантиметрах.

Значения молярных коэффициентов поглощения определяют экспериментально, измеряя оптические плотности стандартных растворов каждого вещества при "лямбда1" и "лямбда2". Систему уравнений (8) решают относительно двух неизвестных концентраций c1 и c2.

Относительная ошибка спектрофотометрических определений индивидуальных соединений обычно не превышает 2%, при анализе смесей ошибка определения возрастает.

В ряде случаев для идентификации и количественного определения веществ методом спектрофотометрии требуется сравнение с химическими стандартными образцами.

Для проверки пропускания шкалы спектрофотометров используют стандартный образец бихромата калия. Ниже приводятся допустимые значения оптической плотности раствора стандартного образца бихромата калия, содержащего 60,06 мг в 1000 мл раствора серной кислоты (0,005 моль/л), при толщине слоя 10 мм.

Длина волны ("лямбда"), нм	235	257	313	350
Оптическая плотность	0,748	0,845	0,292	0,640

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ В ИНФРАКРАСНОЙ ОБЛАСТИ

Поглощением в инфракрасной области обладают молекулы, дипольные моменты которых изменяются при возбуждении колебательных движений ядер. Инфракрасные спектры могут быть получены в различных агрегатных состояниях веществ и используются для идентификации, количественного анализа, а также для исследования строения молекул.

Измерения проводят на однолучевых и двухлучевых инфракрасных спектрофотометрах, снабженных диспергирующими системами в виде призм и диффракционных решеток.

Наиболее часто используется спектральная область от 2,5 до 20 мкм (4000 - 500 $см^{-1}$).

Каждый инфракрасный спектр характеризуется серией полос поглощения, максимумы которых определяются волновым числом "эпсилон" или длиной волны "лямбда" и интенсивностью максимумов поглощения.

Волновое число "ни", измеряемое в обратных сантиметрах ($см^{-1}$), определяется из соотношения $"ни" = \frac{10^4}{"лямбда"}$, где "лямбда" - длина волны в микрометрах (мкм).

Обычно при записи спектра на оси абсцисс откладывается в линейной шкале значение волнового числа "ни" (в $см^{-1}$), на оси ординат - величина пропускания T (в %).

Подготовку образцов к снятию инфракрасных спектров проводят по следующим методикам.

1. Для твердых веществ. а) Пасты: тщательно смешивают 10-20 мг твердого вещества с 1-2 каплями иммерсионной жидкости (вазелиновое масло, полифторуглеводород, гексахлорбутадиен и др.), приготовленную пасту сдавливают между двумя пластинками из NaCl (или KBr) и помещают в спектрофотометр для измерения. Во второй канал прибора помещают слой иммерсионной жидкости между пластинками NaCl (или KBr).

б) Диски с KBr: навеску твердого вещества (1-3 мг) тщательно смешивают в вибромельнице или в ступке со спектроскопически чистым бромидом калия (150-200 мг) и смесь прессуют при давлении 7,5-10 т/кв. см в течение 2-5 мин. под вакуумом 2-3 мм рт. ст.

Спектр полученного образца снимают относительно воздуха или относительно диска, приготовленного из чистого KBr, помещенного во второй канал прибора.

2. Для жидких веществ. Тонкую пленку жидкости зажимают между пластинками из NaCl (или KBr) или используют кюветы с малой толщиной слоя (0,01-0,05 мм). Во второй канал прибора помещают чистую пластинку NaCl (или KBr) удвоенной толщины или соответствующие пустые кюветы.

3. Растворы. Раствор исследуемого образца (жидкого или твердого) в подходящем органическом растворителе (обычно используемые концентрации приблизительно 0,5-1,5%) вводят в кювету с толщиной слоя 0,1-1 мм. Спектр раствора снимают относительно чистого растворителя.

В качестве растворителей наиболее часто применяют четыреххлористый углерод и хлороформ.

Применение инфракрасных спектров для исследования строения веществ основано главным образом на использовании характеристических полос поглощения (полосы, связанные с колебаниями функциональных групп или связей в молекулах). Такими характеристическими полосами поглощения обладают группы -OH, -NH2,

-NO2, =C=O, -C≡N и др.

Идентификация лекарственного вещества может быть проведена путем сопоставления ИК-спектра исследуемого вещества с аналогичным спектром его стандартного образца или с его стандартным спектром. В первом случае ИК-спектры снимают последовательно на одном и том же приборе в одинаковых условиях (агрегатное состояние образца, концентрация вещества, скорость регистрации и т.п.).

Во втором случае следует строго руководствоваться условиями, приведенными для стандартного спектра (концентрация вещества, степень пропускания для основных полос и т.п.).

Обычно используют ИК-спектры, снятые с таблетками бромида калия или с пастами (суспензиями) в вазелиновом масле.

Сопоставление ИК-спектров рекомендуется начинать с анализа характеристических полос, которые обычно хорошо проявляются на спектрах, и лишь при их совпадении сопоставляют низкочастотную область.

Для низкочастотного интервала 1350-400 $см^{-1}$ характерен специфический набор полос, который называют областью "отпечатков пальцев".

Полное совпадение полос поглощения в ИК-спектрах свидетельствует об идентичности вещества. Полиморфные модификации одного и того же вещества могут давать различные спектры. В этом случае для проверки идентичности сопоставляют спектры их растворов или, растворив каждое вещество в одном и том же растворителе, упаривают растворитель досуха и сравнивают спектры твердых остатков.

Наряду с положением полос поглощения существенной характеристикой веществ является интенсивность полос поглощения, которая может быть охарактеризована в спектрах величиной показателя поглощения ("каппа") или величиной интегральной интенсивности поглощения (A), равной площади огибаемой кривой поглощения.

Интенсивности поглощения могут быть использованы для установления строения вещества и для количественного анализа.

Колориметрия

Колориметрический метод основан на визуальном сравнении интенсивностей окрасок растворов разных концентраций при помощи несложных приборов: колориметрических пробирок, цилиндров с кранами, колориметров и фотометров. В колориметрии не требуется соблюдение закона Бера. Измерения проводят посредством следующих операций:

а) окрашенную пробу и стандарт разбавляют в сосудах одинакового диаметра до совпадения окрасок (метод уравнивания);

б) уравнивают окраски исследуемого окрашенного раствора с раствором, содержащим все вещества, за исключением анализируемого, добавляя к нему раствор этого вещества в известной концентрации (колориметрическое титрование);

в) готовят набор стандартов с различной концентрацией вещества и подбирают совпадение окрасок пробы и одного из стандартов (метод стандартных серий).

Фотоколориметрия

Фотоколориметрический метод основан на измерении степени поглощения немонохроматического света испытуемым веществом с помощью фотоэлектроколориметров. Для определения концентраций растворов фотоколориметрическим методом пользуются формулой (5).

Величину "каппа" и "каппа"b определяют путем проведения серии предварительных измерений для растворов с известной концентрацией исследуемого вещества.

При отсутствии линейной зависимости между "c" и D для определения "c" следует пользоваться калибровочными графиками, построенными для каждого определяемого вещества.

Наиболее распространенными являются две принципиальные схемы фотоэлектроколориметров:

1) схема прямого действия с одним фотоэлементом, предусматривающая измерение оптической плотности по силе фототока, регистрируемой гальванометром;

2) дифференциальная схема с двумя фотоэлементами, рассчитанная на попадание пучков света, проходящих соответственно через испытуемый и нулевой растворы, на два разных фотоэлемента. Фототоки уравнивают с помощью потенциометра (электрическая компенсация) или диафрагмы, уменьшающей интенсивность одного из световых пучков (оптическая компенсация).

По шкале потенциометра или диафрагмы отсчитывают оптическую плотность в момент равенства фототоков, когда стрелка регистрирующего гальванометра находится на нуле.

Относительная ошибка фотоколориметрических методов обычно не превышает 3%, колориметрических - 5%.

Дифференциальная спектрофотометрия и фотоколориметрия

Дифференциальный метод анализа используют для повышения точности спектрофотометрических и фотоколориметрических измерений при определении высоких концентраций веществ (от 10 до 100%). Сущность метода заключается в измерении светопоглощения анализируемого раствора относительно раствора сравнения, содержащего определенное количество испытуемого вещества; это приводит к изменению рабочей области шкалы прибора и снижению относительной ошибки анализа до 0,5-1%.

Если рассматривать прохождение лучей света одинаковой интенсивности через три кюветы, которые содержат растворитель c0 и растворы с различной концентрацией испытуемого вещества c1 и c2, причем c1 < c2, то интенсивность излучения прошедшего через раствор поглощающего вещества с концентрацией c1, относительно раствора сравнения может быть записана выражением

$$J1 = J0 \times 10^{-kbc1}, \qquad (9)$$

а для раствора с концентрацией c2:

$$J2 = J0 \times 10^{-kbc2}. \qquad (10)$$

Отношение интенсивности света, прошедшего через растворы концентрации c2 и c1, именуемое "относительной пропускаемостью", будет равно:

$$\frac{J2}{J1} = \frac{J0 \times 10^{-kbc2}}{J0 \times 10^{-kbc1}} = 10^{-kb(c2 - c1)} = 10^{-kb"ДЕЛЬТА"c}; \qquad (11)$$

$$\lg \frac{J1}{J2} = D = kb"ДЕЛЬТА"c. \qquad (12)$$

Относительная пропускаемость определяется разницей в концентрациях вещества в анализируемых растворах ("ДЕЛЬТА"c).

Выбор оптимальных условий анализа проводится различными способами: наиболее простой из них - предварительное построение серии калибровочных графиков. Концентрации препаратов в растворах сравнения подбирают таким образом, чтобы оптическая плотность отличалась на 0,2 - 0,4. На каждом из построенных графиков устанавливают величину относительной погрешности, используя анализируемые растворы с относительной оптической плотностью 0,4 - 0,5. Оптимальными считают те концентрации раствора сравнения и анализируемого раствора, с помощью которых достигнута наименьшая относительная ошибка определений.

Для анализа готовят раствор сравнения с известным количеством испытуемого вещества и при помощи двух кювет, заполненных раствором сравнения, устанавливают на нуль шкалу оптической плотности прибора. Затем одну из кювет заполняют анализируемым раствором и измеряют оптическую плотность по отношению к раствору сравнения.

Интенсивность светового потока на спектрофотометре регулируют только шириной щели, а на фотоколориметре - световым клином.

Концентрацию анализируемого вещества находят либо по калибровочному графику, либо расчетным путем с помощью фактора пересчета F по формуле:

$$c_x = c_0 + D_x \bar{F}, \qquad (13)$$

где c_0 - концентрация вещества в растворе сравнения; D_x - относительная оптическая плотность анализируемого раствора; $\bar{F}$ - среднее значение фактора F, рассчитанного из нескольких стандартных растворов и представляющего собой отношение разности концентраций двух стандартных растворов к величине относительной оптической плотности.

ЭМИССИОННАЯ И АТОМНО - АБСОРБЦИОННАЯ ПЛАМЕННАЯ СПЕКТРОМЕТРИЯ

Эмиссионная и атомно - абсорбционная пламенная спектрометрия применяется для качественного и количественного определения химических элементов в различных объектах: лекарственных средствах, реактивах, воде, биологических жидкостях и др.

В основе эмиссионной пламенной спектрометрии лежит использование спектров испускания возбужденных атомов или молекул определяемых элементов. При создании атомного облака в пламени некоторые атомы возбуждаются и переходят на более высокие энергетические уровни. Когда эти атомы возвращаются на нижние (основные) энергетические уровни, то энергия, полученная атомами, испускается (спектр испускания).

Принцип эмиссионной пламенной спектрометрии заключается в следующем: анализируемый раствор распыляется в виде аэрозоля в пламени горелки, работающей на горючем газе. При воздействии температуры пламени происходит ряд сложных физических и химических процессов: испарение растворителя из капель аэрозоля, испарение твердых частиц, диссоциация молекул, возбуждение атомов и возникновение характеристического излучения атомов.

Излучение определяемого элемента отделяется от постороннего с помощью светофильтра или монохроматора, попадает на фотоэлемент и вызывает фототок, который измеряется с помощью гальванометра, электронного потенциометра и других приборов. Количественное определение элемента по методу эмиссионной пламенной спектрометрии основано на функциональной зависимости интенсивности спектральной линии (I) и концентрации элемента в растворе (c). Прямая пропорциональность между I и "c" имеет место лишь в определенной для данного элемента области концентрации. При этом линейную зависимость I от "c" может нарушать самопоглощение, ионизация, образование газообразных или трудно диссоциирующих в пламени соединений.

Принцип атомно - абсорбционной спектрометрии заключается в следующем: резонансное излучение от лампы с полым катодом проходит через пламя, в которое распыляется анализируемый раствор пробы. Излучение попадает на входную щель монохроматора, установленного таким образом, что выделяется из спектра только резонансная линия определяемого элемента, интенсивность которой измеряется фотоэлектрическим способом. Измеряют уменьшение интенсивности резонансной линии вследствие поглощения ее атомами определяемого элемента, принимая интенсивность ослабленной линии за 100%. Величина поглощения резонансного излучения пропорциональна числу атомов, находящихся в поглощающем слое. Зависимость между ослаблением интенсивности излучения источника света (I) и концентрацией вещества (c) может быть выражена уравнением:

$$I = I_0 l^{-kcl},$$

где I0 - интенсивность резонансного излучения; I - интенсивность излучения, прошедшего поглощающий слой; k - коэффициент поглощения света в центре линии поглощения; c - концентрация поглощающего компонента; l - толщина поглощающего слоя.

Погрешность определения элемента в методе атомно - абсорбционной пламенной спектрометрии могут вызывать: ионизация исследуемых атомов при температуре пламени, образование стойких химических соединений в пламени, неселективное поглощение света и другие факторы.

Число возбужденных атомов увеличивается с ростом температуры, которая зависит в основном от теплотворной способности создающего пламя газа. В используемых фотометрических методах применяется в основном пламя следующих газовых смесей.

Состав газовой смеси	Температура, град. С
Светильный газ + воздух	1840
Ацетилен + воздух	2250
Ацетилен + кислород	3050
Водород + кислород	2680
Ацетилен + закись азота	2955

Чувствительность определения может быть повышена при применении более горячего пламени или других более эффективных способов атомизации проб, например использование графитовой кюветы, лазеров и т. д.

Измерение интенсивности излучения спектральных линий определяемых элементов можно проводить на отечественных пламенных фотометрах, например типа ПФЛ-1, ПФМ, ПАЖ-1 или Flapho-4 (ГДР) и др., а поглощение резонансных линий - на атомно - абсорбционных спектрофотометрах, например типа "Спектр-1" и "Сатурн" (СССР), AAS-1 (ГДР) и др. В качестве регистрирующих систем могут использоваться вольтметры и потенциометры, снабженные цифровыми или печатающими устройствами. Точность методов пламенной фотометрии и атомной абсорбции в зависимости от концентрации вещества составляет 1-4%; чувствительность определяется свойствами аналитической линии, составом пробы, классом аппаратуры и может достигать 0,001 мкг/мл.

Для определения концентрации вещества в анализируемых объектах используются в основном следующие методы: градуировочной кривой, стандартных добавок, сравнения и ограничивающих растворов.

Реактивы и эталонные растворы. Вода должна быть деионизированной на ионообменных смолах и продистиллированной непосредственно перед употреблением.

Ниже приведены растворы солей, катионы которых обозначены названиями элементов.

Кальций. 1,001 г кальция карбоната, высушенного до постоянной массы при температуре 105 град. С, растворяют в 25 мл хлористоводородной кислоты (1 моль/л) и доводят объем раствора водой до 1000 мл. Раствор кальция содержит 400 мкг ионов Ca в 1 мл.

Срок годности раствора 1 мес, хранение при комнатной температуре.

Калий. 1,1440 г калия хлорида, высушенного до постоянной массы при температуре 130 град. С, растворяют в небольшом количестве воды и доводят объем раствора водой до 1000 мл. Раствор калия содержит 600 мкг ионов K в 1 мл.

Срок годности раствора 2 мес, хранение при комнатной температуре.

Натрий. 0,5084 г натрия хлорида, высушенного до постоянной массы при температуре 130 град. С, растворяют в небольшом количестве воды и доводят объем раствора водой до 1000 мл. Раствор натрия содержит 200 мкг ионов Na в 1 мл.

Срок годности раствора 2 мес, хранение при комнатной температуре.

Цинк. 2,5 г гранулированного цинка растворяют в 20 мл хлористоводородной кислоты (5 моль/л) и доводят объем раствора водой до 500 мл. Раствор цинка содержит 5 мг ионов Zn в 1 мл.

Срок годности раствора 2 мес, хранение при комнатной температуре.

Свинец. 0,1600 г свинца нитрата растворяют в 5 мл азотной кислоты и доводят объем раствора водой до 1000 мл. Раствор свинца содержит 100 мг ионов Pb в 1 мл.

Срок годности раствора 1 мес, хранение при комнатной температуре.

Медь. 1,000 г меди электролитической растворяют в небольшом объеме 50% азотной кислоты и доводят объем раствора 1% азотной кислотой до 1000 мл. Раствор меди содержит 1 мг ионов Cu в 1 мл.

Срок годности раствора 1 мес, хранение при комнатной температуре.

При составлении эталонного раствора расчет количества соединения химического элемента (X) в граммах проводят по уравнению:

$$X = ab \frac{M}{nA},$$

где a - масса (в граммах) вводимого в раствор элемента на 1 г готового эталонного раствора; b - масса готового эталонного раствора в граммах; M - молекулярная масса соединения, в которое входит вводимый в эталонный раствор элемент; n - число атомов вводимого элемента в используемом для приготовления эталонного раствора соединении; A - атомная масса вводимого в эталонный раствор элемента.

Эталонные, а также приготовленные на их основе рабочие растворы хранят в посуде из плавленого кварца, из чистого полиэтилена ГОСТ 16337-77 Е или из тефлона. Чашки и тигли для озоления проб должны быть изготовлены из кварца.

ФЛУОРИМЕТРИЯ

Флуориметрия - метод фотометрического анализа, основанный на измерении интенсивности флюоресценции испытуемых веществ. Интенсивность флюоресценции в разбавленных растворах может быть определена следующим уравнением:

F = J02,3"эпсилон"cb"фи",

где F - общая интенсивность флюоресценции, квант/с; J0 - интенсивность возбуждающего света, квант/с; с - концентрация раствора, моль/л; "эпсилон" - молярный коэффициент поглощения; b - толщина флюоресцирующего слоя, см; "фи" - квантовый выход флюоресценции, зависящий от природы вещества.

Это уравнение может быть использовано для растворов с оптической плотностью D, не превышающей 0,05 при длине волны возбуждения (при D = 0,05 ошибка в определении интенсивности флюоресценции составляет около 5%; влияние эффекта внутреннего фильтра).

Практически флюоресценцию определяют в растворах с концентрацией $10^{-5} - 10^{-6}$ моль/л и меньше, когда между интенсивностью флюоресценции и концентрацией вещества наблюдается прямолинейная зависимость: при более высоких концентрациях линейность нарушается, а затем наблюдается концентрационное тушение флюоресценции.

Интенсивность флюоресценции в значительной степени зависит от длины волны возбуждающего света, величины pH испытуемого раствора, характера растворителей и присутствия в растворе посторонних веществ, поглощающих некоторую долю возбуждающей энергии (экранирующий эффект) или дезактивирующих возбужденные молекулы. Так, прибавление хлорида натрия снижает выход флюоресценции хинина, прибавление веществ с фенольными или гидроксильными группами тушит флюоресценцию рибофлавина, прибавление хлористоводородной кислоты тушит флюоресценцию тиохрома, прибавление едкого натра тушит флюоресценцию птеринов и т. д.

Во флюоресцентных исследованиях часто важно регулирование температуры и удаление кислорода, являющегося сильным тушителем флюоресценции. При одновременном определении испытуемого и стандартного образцов необходимость термостатирования и удаления кислорода, как правило, отпадает, для этого измерение надо проводить достаточно быстро, чтобы не произошло нагревания образца от источника облучения.

Спектр флюоресценции находится по сравнению со спектром поглощения в более длинноволновой области (на 50 - 100 нм) и дает широкие полосы излучения в пределах от 100 до 200 нм.

Характер спектра флюоресценции, а также цвет излучаемого света специфичны для флюоресцирующих веществ (флуорохромов), поэтому флюоресценция может быть применена как для качественного, так и для количественного анализа.

Для выполнения флуориметрического анализа используют спектрофлуориметры, принцип работы которых заключается в следующем: свет от ртутно - кварцевой лампы через первичный светофильтр и конденсор падает на кювету с раствором испытуемого вещества; последнее начинает флюоресцировать. Кванты возбужденного света проходят через вторичные светофильтры и падают на фотоэлемент, соединенный с чувствительным гальванометром, отмечающим количество поступающего на фотоэлемент света.

Для проведения количественного анализа в качестве раствора сравнения применяют раствор стандартного образца флюоресцирующего вещества известной концентрации. Расчет производят по формуле:

$$X = \frac{(n1 - n2)c}{n - n2},$$

где n1-n2 - показания спектрофлуориметра для испытуемого раствора за вычетом поправки на контрольный опыт; n - n2 - то же для раствора стандартного образца за вычетом поправки на контрольный опыт; с - концентрация раствора стандартного образца в выбранных единицах измерения.

Расчет производят с помощью калибровочного графика или шкалы стандартных растворов.

Так как интенсивность флюоресценции пропорциональна концентрации вещества обычно в очень узкой области, соотношение $\left[\frac{Jx - J0}{Jc - J0}\right]$ (Jx, J0, Jc - соответственно интенсивности флюоресценции испытуемого раствора, растворителя и стандартного раствора) должно быть не менее 0,40 и не более 2,50.

Относительная ошибка флуориметрического метода составляет не более 5%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ БЕЛИЗНЫ ПОРОШКООБРАЗНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

В случае твердых субстанций оценка степени белизны (оттенка) может быть проведена инструментальным методом, исходя из спектральной характеристики света, отраженного от образца. В простейшем случае оценку степени белизны можно получить, исходя из коэффициентов отражения, измеренных при освещении образца белым светом (источник со спектральным распределением, соответствующим спектральному распределению источника типа А по ГОСТу 7721-76), а также белым светом, пропущенным через красный или синий фильтр с эффективными максимумами пропускания соответственно при 614 и 459 нм. Коэффициент отражения белого света (rб) при оценке степени белизны может быть заменен коэффициентом отражения света, пропущенного через зеленый светофильтр с максимумом пропускания при 522 нм.

Коэффициент отражения представляет собой отношение величины отраженного светового потока к величине падающего светового потока.

Измерение коэффициентов отражения осуществляют на приборах типа лейкометра или спектрального фотометра "Specol-10" (фирмы "Carl Zeiss Jena", ГДР). Измеренные относительно эталона с коэффициентом отражения в видимой области спектра ~=0,85, значения коэффициентов отражения образцов лекарственного вещества (r) позволяют определить наличие или отсутствие у них цветового или сероватого оттенка соответственно по величинам степени белизны ("альфа") и степени яркости ("бета"). Величину степени белизны "альфа" определяют для лекарственных веществ с желтоватым, кремоватым или розоватым оттенками как отношение $\frac{r459}{r614}$, а для лекарственных веществ с голубоватым оттенком - как отношение $\frac{r614}{r459}$. Степень яркости "бета" характеризуют величиной r522 или rб. (В индексах r указана длина волны максимума пропускания светофильтров).

Для белых и белых с сероватым оттенком лекарственных веществ величина "альфа" теоретически равна 1. Если "альфа" < 1, то лекарственное вещество имеет оттенок. Лекарственные вещества, для которых "бета" < 0,85 и "альфа" находится в интервале 0,95-1,00, имеют сероватый оттенок.

Уточненная оценка белизны лекарственных веществ с указанием интенсивности цветовых и сероватого оттенков может быть проведена с использованием абсолютных коэффициентов отражения (R), определяемых с помощью спектрофотометров отражения, снабженных интегрирующей сферой, например СФ-18 ("ЛОМО", СССР). Настройка прибора в этом случае осуществляется по эталону с коэффициентом отражения в видимой области ~= 1.

При этом интенсивность цветового и сероватого оттенков оценивают по величинам степени белизны (альфа') и степени яркости (бета') соответственно. Величину степени белизны альфа' определяют для лекарственных веществ с желтоватым, кремоватым и розоватым оттенками как отношение $\frac{R459}{R614}$, а для лекарственных веществ с голубоватым оттенком - как отношение $\frac{R614}{R459}$. Степень яркости (бета') характеризуют величиной максимального коэффициента отражения образца лекарственного вещества в видимой области Rmax.

Оценка интенсивности цветового и сероватого оттенков проводится в соответствии с табл. 1 и 2.

Таблица 1

Оценка интенсивности цветового оттенка
по величине степени белизны альфа'

N п/п	Пределы значений альфа'	Оценка интенсивности цветового оттенка
1	1,00 - 0,96	Отсутствует оттенок
2	0,96 - 0,94	Едва заметный оттенок
3	0,94 - 0,90	Слабый оттенок
4	0,90 - 0,86	Отчетливый оттенок

Примечание. При величине (альфа') < 0,86 лекарственное вещество не следует рассматривать как имеющее белый цвет.

Значения степени белизны ("альфа" и альфа') и степени яркости ("бета" и бета') являются объективными характеристиками качества белых и белых с оттенками лекарственных веществ. Пределы их допустимых значений могут быть регламентированы в частных статьях.

Методика определения. Подготовка пробы. В зависимости от поставленной задачи определение степени белизны и степени яркости может производиться на образцах порошкообразных лекарственных веществ без предварительной обработки или после их измельчения в течение 2 мин на лабораторной электрической мельнице ЭМ-3А (ГОСТ 5.692-70). Масса пробы, необходимая для проведения измерений, составляет 2-3 г.

Таблица 2

Оценка интенсивности сероватого оттенка
по величине степени яркости бета'

N п/п	Пределы значений бета'	Оценка интенсивности сероватого оттенка
1	1,00 - 0,98	Отсутствие оттенка
2	0,98 - 0,97	Едва заметный оттенок
3	0,97 - 0,95	Слабый оттенок
4	0,95 - 0,92	Отчетливый оттенок

Примечание. При величине (бета') < 0,92 лекарственное вещество не следует рассматривать как имеющее белый цвет.

Порошок лекарственного вещества помещают в кювету и легкими ударами по дну последней уплотняют пробу. После этого стеклянным матированным плоским пестиком прижимают поверхность порошка, избегая горизонтальных перемещений пестика относительно поверхности пробы. Затем при необходимости кювету накрывают бесцветным плоским стеклом (лучше кварцевым).

Измерение на приборах типа лейкометра. Измерение коэффициентов отражения проб проводят в соответствии с инструкцией по пользованию прибором при белом свете (без светофильтра) и при красном, синем и зеленом светофильтрах или настройке монохроматора соответственно на длины волн 614, 459 и 522 нм. Перед каждым измерением прибор настраивают по эталону, имеющему коэффициенты отражения в видимой области ~= 0,85. Каждое измерение повторяют не менее 2 раз.

Результаты измерений коэффициентов отражения представляют в виде среднего арифметического $\bar{r}x$ и вычисляют значение "альфа". Принимают "бета" = rб или "бета" = r522.

Лекарственное вещество	Показания лейкометра						"альфа"	"бета"
	rб	$\overline{r}$б	r459	$\overline{r}$459	r614	$\overline{r}$614		
Этазол	92,10 92,35 92,15	92,20	91,49 91,28 91,43	91,39	92,87 93,11 92,93	92,97	0,98	0,92

Поскольку "альфа" < 1, а "бета" > 0,85, этазол имеет цветовой оттенок и не имеет сероватого оттенка.

Измерение на спектрофотометре с интегрирующей сферой. Измерение коэффициентов отражения проводят в соответствии с инструкцией по пользованию спектрофотометром, в следующем порядке. В правую и левую кюветы помещают эталон белизны бария сульфат квалификации "для отражательной спектрофотометрии" и настраивают прибор. Регистрируют спектр отражения исследуемого лекарственного вещества. Исходя из полученной спектрограммы определяют значения R459, R614 и Rmax.

Каждое измерение повторяют не менее 2 раз. Результаты измерений коэффициентов отражения представляют в виде средних арифметических $\overline{R}459$, $\overline{R}614$, $\overline{R}max$. По получении указанных коэффициентов отражения рассчитывают значение (альфа'); величину бета' принимают равной $\overline{R}max$.

Пример:

Лекарственное вещество	Показания спектрофотометра						альфа'	бета'
	R459	$\overline{R}$459	R614	$\overline{R}$614	Rmax	$\overline{R}$max		
Этазол	0,802 0,798	0,800	0,853 0,853	0,853	0,980 0,980	0,980	0,93	0,98

Найденное значение (альфа') находится в пределах 0,94 - 0,90, следовательно, образец имеет слабый цветовой оттенок (см. табл. 1). Найденное значение (бета') составляет 0,98, следовательно, у образца отсутствует сероватый оттенок (см. табл. 2).

СПЕКТРОСКОПИЯ ЯДЕРНОГО МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР - спектроскопия) - физический метод, основанный на регистрации индуцированных радиочастотным полем переходов между ядерными магнитными энергетическими уровнями молекул вещества, помещенного в постоянное магнитное поле. Переходы между ядерными магнитными уровнями возможны для ядер, обладающих магнитным моментом, т.е. имеющих спиновое квантовое число 1, не равное нулю. Такими свойствами обладают ядра ^{1}H, ^{13}C, ^{19}F, ^{31}P, у которых 1 = 1/2, и др. Совокупность сигналов переходов между энергетическими уровнями ядер молекул составляет спектр ЯМР. Каждый отдельный спектр ЯМР регистрируется для одного типа ядер. Спектр ЯМР специфичен для каждого вещества. Наибольшее распространение в исследовании органических лекарственных веществ имеет спектроскопия протонного магнитного резонанса (ПМР) и ЯМР ^{13}C.

Основные характеристики спектра ЯМР

Основными характеристиками спектров ЯМР являются химический сдвиг, мультиплетность, константа спин - спинового взаимодействия и площадь сигнала резонанса. Эти характеристики зависят от химического окружения данного ядра или группы ядер, от числа соседних ядер, обладающих магнитным моментом, от их относительного расположения, а также от числа анализируемых ядер в различных структурных фрагментах молекулы.

Химический сдвиг ("дельта") определяет положение сигнала резонанса в спектре ЯМР и зависит от химического окружения данного ядра или группы ядер. Химический сдвиг выражается в миллионных долях (м.д.) и измеряется относительно сигнала резонанса эталонного соединения (эталона измерения химического сдвига), добавляемого к анализируемым растворам (менее 1%). Для растворов в органических растворителях в качестве эталона используют тетраметилсилан (ТМС), химические сдвиги сигналов ЯМР ^{1}H и ^{13}C которого приняты за начало отсчета, "дельта$_{ТМС}$" (^{1}H, ^{13}C) = 0,00 ("дельта" - шкала химических сдвигов). Для водных растворов в качестве эталона измерения химических сдвигов ЯМР ^{1}H используют 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфонат натрия (ДСС) с химическим сдвигом метильных протонов "дельта$_{ДСС}$" (^{1}H) = 0,015, а для измерения сдвигов ЯМР ^{13}C - диоксан (ДО), "дельта$_{ДО}$" (^{13}C) = 67,4. Химические сдвиги могут быть измерены относительно сигналов резонанса других эталонов и пересчитаны в "дельта" - шкалу по формуле:

$$\text{"дельта"} = \text{"дельта}_{x}\text{"} + \text{"дельта}_{ст}\text{"},$$

где "дельта" - химический сдвиг сигнала анализируемого вещества в "дельта" - шкале; "дельта$_{x}$" - химический сдвиг сигнала анализируемого вещества относительно сигнала используемого эталона X; "дельта$_{ст}$" - химический сдвиг сигнала эталона в "дельта" - шкале.

Для большинства органических веществ сигналы ПМР регистрируются в диапазоне от "дельта" = 0,0 до "дельта" = 14,0. Значения химических сдвигов отсчитывают по оси абсцисс спектра справа налево.

Мультиплетность сигнала резонанса (М) определяется числом компонент сверхтонкой структуры сигнала, на которые он расщепляется под влиянием соседних ядер, обладающих спиновым квантовым числом 1, не равным нулю. Мультиплетность сигнала ПМР (для протона 1 = 1/2) в спектрах первого порядка определяется по формуле:

$$M = n + 1,$$

где n - число протонов в соседней группе.

Спектрами первого порядка являются спектры, в которых разность химических сдвигов мультиплетных сигналов резонанса взаимодействующих ядер, выраженная в герцах, значительно превышает константу спин - спинового взаимодействия ("ДЕЛЬТАдельта" "ни" / J > 10, где "ДЕЛЬТАдельта" - разность химических сдвигов, м.д.; "ни" - рабочая частота спектрометра, МГц; J - константа спин - спинового взаимодействия в герцах) и каждая из групп ядер магнитно эквивалентна.

В случае магнитной неэквивалентности ядер соседних групп мультиплетность сигнала определяется по формуле $M = 2^{n}$.

В спектрах высших порядков, для которых разность химических сдвигов сигналов взаимодействующих ядер незначительно превышает константу спин - спинового взаимодействия, определение мультиплетности в ряде случаев затруднено. Интенсивности компонент в мультиплетах спектров первого порядка пропорциональны биномиальным коэффициентам. Для дублетных сигналов отношение интенсивностей компонент составляет 1:1, для триплетных - 1:2:1, для квартетных 1:3:3:1 и т. д. В близко расположенных мультиплетах взаимодействующих ядер, когда разность химических сдвигов незначительно превышает константу спин - спинового взаимодействия, наблюдается отклонение от указанной пропорциональности. Это проявляется в увеличении интенсивности компонент, ближайших к соседнему мультиплету, за счет уменьшения интенсивности более удаленных компонент.

Константа спин - спинового взаимодействия (J) выражается в герцах и определяется расстоянием между компонентами мультиплетов спектров первого порядка. В спектрах высших порядков определение констант спин - спинового взаимодействия в ряде случаев затруднено и требует привлечения специальных расчетов с использованием ЭВМ. Значения констант спин - спинового взаимодействия зависят в основном от электроотрицательности заместителей и взаимного пространственного расположения групп взаимодействующих ядер, в частности от числа химических связей, отделяющих эти ядра, и от углов между химическими связями. Для большинства органических веществ константы протон - протонного спин - спинового взаимодействия имеют значения от 0 до 16 Гц.

Площадь сигнала резонанса (S) спектра ЯМР пропорциональна числу ядер, обусловливающих данный сигнал. Площади сигналов спектров ПМР используют для определения числа протонов в соответствующих группах молекул для измерения концентраций анализируемых соединений или примесей.

Приборы и методы эксперимента

Спектры ЯМР высокого разрешения регистрируют для легкоподвижных жидкостей или растворов твердых веществ в определенных растворителях. Выбор растворителя определяется растворимостью анализируемого вещества и наиболее полным разделением сигналов резонанса вещества и растворителя, если последний содержит ядра, по которым проводится регистрация спектра ЯМР. Для уменьшения интенсивности сигналов растворителей в спектрах ПМР используют дейтерированные, или апротонные, растворители. Химические сдвиги сигналов остаточных протонов используемых дейтерированных растворителей: хлороформ - d1 ("дельта" = 7,26), бензол -- d6 ("дельта" = 7,16), вода - d2 ("дельта" = 4,7 <*>), метанол - d4 ("дельта" = 3,35; 4,8 <*>), диметилсульфоксид - d6 ("дельта" = 2,50; 3,7 <**>), уксусная кислота - d4 ("дельта" = 2,05; 8,5 <*>), ацетон - d6 ("дельта" = 2,05).

<*> Химический сдвиг зависит от pH и температуры раствора.

<**> Сигнал протонов примеси воды.

Для регистрации спектров ПМР используют спектрометры с рабочими частотами 60 МГц и более. Спектрометр ЯМР состоит из следующих основных функциональных узлов: магнита с системой стабилизации и коррекции магнитного поля, которые обеспечивают заданное значение напряженности и высокой однородности постоянного магнитного поля в объеме анализируемого образца, системы генерации радиочастотного электромагнитного облучения образца и системы регистрации спектра.

Перед проведением анализов необходим контроль чувствительности, разрешающей способности и стабильности работы прибора, соответствия этих параметров требованиям, оговоренным в технической документации. Раствор анализируемого вещества готовят, как указано в частной статье. Раствор переносят в спектральную ампулу и проводят регистрацию заданной области спектра на бланке. Усиление подбирают таким, чтобы высота наиболее интенсивного сигнала анализируемого вещества почти достигала верхнего края диаграммного бланка, т.е. составляла около 90% по высоте.

Области применения

Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C представляют обширную информацию о молекулярной структуре анализируемого вещества. Положение сигналов резонанса в спектре, их тонкая структура и площади позволяют определять число атомов водорода и углерода в отдельных группах, ближайшее химическое окружение, сочленение отдельных структурных фрагментов молекулы, наличие примесей.

Многообразие структурной информации спектров ПМР практически исключает совпадение спектров разных соединений. В связи с этим метод спектроскопии ЯМР применяется для идентификации лекарственных веществ. Для этого используют наиболее полный набор спектральных параметров, характеризующих структуру вещества. Если вследствие сложности спектра ЯМР его полная интерпретация затруднена, ограничиваются лишь характерными сигналами спектра анализируемого вещества, по которым и судят о структуре данного соединения или о наличии возможной примеси. В отдельных случаях для подтверждения подлинности лекарственного вещества (примеси) к анализируемому раствору после первичной регистрации спектра добавляют определенное количество стандартного образца исследуемого вещества (примеси) и проводят повторную запись спектра в аналогичных условиях. Полное совпадение спектров указывает на идентичность анализируемого вещества и стандартного образца.

Спектры ЯМР могут быть использованы для количественного определения относительного или абсолютного содержания лекарственного вещества (примеси) в анализируемом лекарственном средстве. При определении относительного содержания вещества (примеси) измеряют площади сигналов резонанса анализируемого вещества (примеси) и вещества, по отношению к которому проводится количественное определение. Относительное мольное процентное (А) или относительное весовое процентное (Б) содержание отдельных веществ (примеси) в анализируемых лекарственных средствах вычисляют по формулам:

$$A = \frac{100 S_i/n_i}{\sum_{i=1}^{i=k} (S_i/n_i)},$$

$$Б = \frac{100 S_i M_i/n_i}{\sum_{i=1}^{i=k} (S_i/n_i)},$$

где Si - площади сигналов резонанса веществ (примеси); i, ni - число ядер в структурных фрагментах молекул веществ (примеси), которые обусловливают сигналы резонанса с площадями Si; Mi - молекулярные массы вещества (примеси) i.

Для определения абсолютного содержания лекарственного вещества (примеси) анализируемые образцы готовят количественно. К навеске анализируемого вещества добавляют точно взвешенное количество вещества, играющего роль внутреннего стандарта количественных измерений. Дальнейшая процедура приготовления анализируемого раствора и регистрация спектра проводится, как было описано выше. По спектру измеряют площади сигналов анализируемого соединения (примеси) и стандарта. Абсолютное процентное весовое содержание вещества (примеси) в лекарственном средстве вычисляют по формуле:

$$B = 100 (S_a/S_{ст}) (M_a n_{ст} m_{ст}/M_{ст} n_a m_a),$$

где Sa/Sст - отношение площадей сигналов анализируемого вещества (примеси) и стандарта; M - молекулярные массы; n - число ядер в структурных фрагментах молекул веществ, обусловливающих сигналы резонанса с соответствующими площадями; m - навески анализируемого вещества и стандарта.

Эталон количественных измерений должен удовлетворять следующим требованиям: растворяться в используемом растворителе при концентрациях, соответствующих приблизительному равенству площадей сигналов Sa и Sст; не взаимодействовать с растворителем и анализируемым веществом; иметь постоянный состав, описываемый химической формулой. Сигнал резонанса стандарта количественных измерений должен регистрироваться в виде пика, не перекрывающегося другими сигналами. Значения химических сдвигов характерных сигналов веществ, используемых в качестве стандартов количественных измерений по спектрам ПМР: малеиновая кислота (2CH, "дельта" = 6,60), бензилбензоат (CH2, "дельта" = 5,30), малоновая кислота (CH2, "дельта" = 3,30), сукцинимид (2CH2, "дельта" = 2,77), ацетанилид (CH3, "дельта" = 2,12), трет - бутанол (3CH3, "дельта" = 1,30), гексаметилциклотрисилоксан (6CH3, "дельта" = 0,15). Относительная точность количественных измерений методом ЯМР в основном определяется точностью измерений отношения площадей резонансных сигналов и в общем случае составляет +/- (2 - 5%).

РАДИОАКТИВНОСТЬ

Радиоактивные препараты применяются при лечении и диагностике различных заболеваний. Они требуют особой техники в обращении и в работе для того, чтобы получить правильные результаты и снизить до минимума опасность для персонала и пациента. Все операции должны выполняться в соответствии с действующими санитарными правилами работы с радиоактивными веществами и источниками ионизирующих излучений и нормами радиационной безопасности персоналом, специально обученным работе с радиоактивными препаратами.

Радиоактивные, в том числе радиофармацевтические, препараты (РФП) предоставляются для использования учреждениям, располагающим необходимыми условиями для правильной и безопасной работы с ними, с разрешения органов саннадзора и органов внутренних дел.

Термины и определения

Радиоактивность - свойство некоторых нуклидов испускать ионизирующее излучение при спонтанных ядерных превращениях.

Нуклид - вид атомов с данными числами протонов и нейтронов в ядре (и, следовательно, характеризуется его атомным номером и массовым числом).

Радионуклид - нуклид, обладающий радиоактивностью.

Изотопы - нуклиды с одинаковым числом протонов, свойственным данному элементу, но отличающиеся числом нейтронов в их ядре.

Радиоизотопы - изотопы, обладающие радиоактивностью.

Ядерный изомер - нуклид, ядро которого находится в определенном (возбужденном) энергетическом состоянии, отличном от основного. Такое состояние с относительно продолжительным временем жизни называют метастабильным.

Ядерными изомерами, широко используемыми в радиофармацевтике, являются, например, ^{99m}Tc, ^{113m}In.

Активность радионуклида в препарате (образце) - отношение числа dN спонтанных превращений из определенного ядерно - энергетического состояния радионуклида, происходящих в данном препарате (образце) за интервал времени dt, к этому интервалу

$$A = \frac{dN}{dt}. \qquad (1)$$

Удельная активность (Am) - отношение активности радионуклида в препарате (образце) к массе препарата (образца) или к массе элемента (соединения).

Молярная активность (Amol) - отношение активности радионуклида в препарате (образце) к количеству содержащегося в нем радиоактивного вещества (соединения), выраженному в молях.

Объемная активность (Av) - отношение активности радионуклида в препарате (образце) к объему препарата (образца).

Период полураспада. Периодом полураспада, обозначаемым T1/2, называют время, в течение которого активность радионуклида уменьшается в 2 раза.

Постоянная радиоактивного распада. Основной закон радиоактивного распада связывает активность A с количеством N атомов радионуклида или ядерного изомера соотношением:

$$A = \text{"лямбда"}N. \qquad (2)$$

Коэффициент пропорциональности "лямбда" называют "постоянной радиоактивного распада". Он связан с периодом полураспада соотношением:

$$\text{"лямбда"} = \frac{In2}{T1/2} \approx \frac{0,693}{T1/2}. \qquad (3)$$

Активность радионуклида убывает со временем по экспоненциальному закону:

$$At = A0\ e^{-\text{"лямбда"}t} = A0\ e^{-\frac{0,693t}{T1/2}}, \qquad (4)$$

где At и A0 - активности в момент времени t и 0 соответственно.

Радионуклидный анализ - исследование радионуклидного состава радиоактивного препарата с целью обнаружения и количественного определения различных радионуклидов.

Радионуклидная чистота препарата - отношение активности основного радионуклида к общей активности препарата, выраженное в процентах, не является постоянной характеристикой данного препарата, а изменяется с течением времени.

Радионуклидные примеси - примеси других радиоактивных нуклидов (как того же, так и других элементов). Величину радионуклидных примесей выражают в процентах к активности основного нуклида на определенную дату.

Дочерние радионуклиды, образующиеся в результате радиоактивного распада материнского (основного) радионуклида, не считаются радионуклидными примесями: например, ксенон - $131m$ не рассматривается как радионуклидная примесь к ^{131}I.

Радиохимическая чистота - это отношение активности радионуклида в основном химическом веществе, составляющем препарат, к общей активности радионуклида в этом препарате, выраженное в процентах.

Радиохимические примеси - примеси химических соединений, отличных от основного вещества, составляющего препарат, но содержащих тот же радионуклид. Величину радиохимических примесей, т.е. активность содержащегося в них радионуклида, выражают в процентах к общей активности радионуклида в препарате.

Препарат радионуклида без носителя - препарат, не содержащий стабильных изотопов элемента, к которому принадлежит данный радионуклид. Однако препараты, называемые препаратами радионуклида без носителя, иногда содержат незначительные количества стабильных изотопов того же элемента или его химического аналога. Источником их могут быть побочные ядерные реакции, примеси химических элементов, содержащиеся в реактивах, применяемых при химических операциях, и т. д.

Радиоактивный препарат, в котором имеются как радиоактивные, так и стабильные изотопы данного элемента или химического аналога, называется препаратом с носителем.

Единицы активности и энергии

По Международной системе единиц (СИ) активность нуклида в препарате выражается числом распадов в 1 с. Единицей активности является беккерель. Беккерель (Бк) - активность нуклида, равная одному ядерному превращению в 1 с. Размерность беккереля - $с^{-1}$. Для выражения активности лечебно - диагностических препаратов используются кратные десятичные единицы мегабеккерель (МБк) и гигабеккерель (ГБк): 1 МБк=10^6 Бк; 1 ГБк=10^9 Бк.

В течение длительного времени до введения системы СИ применялась и разрешена к применению в переходный период специальная единица активности кюри (Ки) и ее кратные и дольные единицы. Для характеристики радиофармацевтических препаратов наиболее употребительной дольной единицей активности является милликюри (мКи). 1 Ки = $3,7 \times 10^{10}$ Бк; 1 Бк = $2,703 \times 10^{-11}$ Ки; 1 мКи = 37 МБк. Единицей измерения энергии ионизирующих излучений, как и любого вида энергии, в Международной системе (СИ) является джоуль (Дж).

Для энергии отдельных частиц и фотонов применяется внесистемная единица электронвольт и десятичные кратные ей единицы. 1 эВ = $1,60219 \times 10^{-19}$ Дж (приближенно)~= 0,16 аДж. Соответственно 1 кэВ ~= $1,6 \times 10^{-16}$ Дж = 0,16 фДж; 1 МэВ ~= $1,6 \times 10^{-13}$ Дж = 0,16 пДж.

Основные ядерно - физические характеристики радионуклидов

Возможные при распаде радионуклида ядерные переходы, характеристики основных и возбужденных состояний, характеристики испускаемых ионизирующих излучений и их интенсивности обычно представляют в виде диаграммы, называемой схемой распада. Численные данные, характеризующие ядерные состояния, распад радионуклида и энергетическую разрядку ядра - продукта, называют соответственно схемными данными. Не все схемные данные нужны при работе с радиофармацевтическими препаратами, а лишь часть из них, которые ниже называются основными. К ним относятся период полураспада, вид, энергетическая характеристика и интенсивность всех компонентов ионизирующего излучения, возникающего как при распаде радионуклида, так и при энергетической разрядке ядра - продукта. Кроме того, для ядерной медицины важны и характеристики рентгеновского излучения атома, образующегося в результате распада радионуклида.

Указанные основные ядерно - физические характеристики и характеристики сопровождающего распад рентгеновского излучения для радионуклидов, входящих в РФП, а также используемых в составе образцовых радиоактивных растворов и источников, применяемых для аттестации РФП, приведены в прилагаемой "Таблице физических характеристик некоторых радионуклидов". При этом бета - излучение характеризуется граничной энергией, средней энергией и интенсивностью, моноэнергетические излучения - энергией и интенсивностью отдельных линий. Интенсивность каждого компонента излучения выражена числом частиц или фотонов, приходящихся на 100 актов распада.

В целях унификации используемых на практике схемных данных и обеспечения единства измерений в частных фармакопейных статьях, посвященных конкретным РФП, и в другой нормативно - методической документации, связанной с выпуском этих препаратов, следует использовать значения физических параметров радионуклидов, приведенные в таблице, прилагаемой к настоящей фармакопейной статье.

При отсутствии в ФС "Радиоактивность" сведений о том или ином радионуклиде данные о его схеме распада (период полураспада, вид, энергия, относительная интенсивность излучения) и сопровождающему рентгеновскому излучению следует приводить на основе оценки отечественных и зарубежных справочных данных последних лет.

Защита от излучений

При работе с радиоактивными препаратами необходима соответствующая защита от излучения этих препаратов. Защита имеет своей целью предохранение людей от вредного воздействия радиации, а также снижение фоновых показаний измерительных приборов, регистрирующих ионизирующее излучение.

Защита от внешнего альфа- и бета - излучения радиоактивных препаратов осуществляется сравнительно просто вследствие малой проникающей способности этих излучений. Альфа и бета - излучение характеризуется определенной величиной пробега альфа- и бета - частиц, т. е. расстоянием, на которое они могут проникать в вещество. Пробег альфа - частиц в воздухе не превышает нескольких сантиметров. Альфа - частицы поглощаются резиновыми перчатками, одеждой, стенками стеклянной ампулы и т. п. Пробег бета - частиц в воздухе в зависимости от их энергии составляет величину от сантиметров до нескольких метров. Для защиты от бета - излучения применяют материалы с малым атомным номером, например специальные экраны из плексигласа, контейнеры из алюминия и пластмасс и т. п. Однако при работе с высокоактивными препаратами следует принимать меры для защиты от тормозного излучения - вторичного излучения, возникающего при прохождении бета - частиц через вещество. По своей природе тормозное излучение является фотонным ионизирующим излучением. Поэтому при работе с высокоактивными бета - препаратами применяют комбинированную защиту, в которой внутренний слой (со стороны источника) делается из вещества с малым атомным номером для поглощения бета - излучения, а внешний - из вещества с большим атомным номером для ослабления тормозного излучения.

Гамма - излучение в отличие от альфа- и бета - излучения не характеризуется определенным пробегом в веществе - оно поглощается по мере прохождения через вещество по экспоненциальному закону. Наиболее эффективно поглощают гамма - излучение вещества с большим атомным номером, например свинец. Гамма - излучение определенной энергии можно характеризовать толщиной слоя половинного ослабления в веществе. Это та толщина защитного материала, которая ослабляет первоначальную интенсивность излучения в 2 раза. Через защитный материал, толщина которого равна 7 слоям половинного ослабления, проходит около 1% излучения незащищенного источника.

Защита от гамма - излучения радиоактивных препаратов достигается не только применением поглощающих экранов, но также и путем увеличения расстояния от препарата.

Проверка радионуклидов на подлинность

Каждый радионуклид и ядерный изомер характеризуются своим периодом полураспада и специфическими, присущими только ему спектрами ионизирующих излучений. К ним относятся спектры альфа-, бета-, гамма - излучения, конверсионных и Оже - электронов, тормозного излучения, характеристического рентгеновского излучения.

Форму и количественные характеристики каждого спектра, а также значение T1/2 используют для проверки подлинности радионуклида.

Индивидуальными характеристиками радионуклидов могут служить также аппаратурные спектры, снимаемые в строго воспроизводимых условиях; их используют для определения подлинности радионуклидов в РФП во всех подходящих случаях.

Подлинность радионуклида в препарате считают подтвержденной, если аппаратурный спектр ионизирующего излучения, снятый с источником, приготовленным из данного РФП, идентичен спектру, полученному с образцовым источником или источником, приготовленным из образцового раствора с тем же радионуклидом, и снятому в тех же условиях. Естественно, предполагается, что спектр должен быть исправлен на вклад от радионуклидных примесей, если они имеются в РФП.

Если отсутствует аппаратура для снятия нужных спектров, для целей идентификации радионуклида можно использовать методики, позволяющие получать отдельные характеристики спектров ионизирующих излучений.

Так, для идентификации чистых бета - излучателей рекомендуется определять граничные энергии бета - спектров или зависящие от них параметры. Например, идентификацию проводят с помощью кривых поглощения бета - излучения в алюминии по величине слоя половинного ослабления следующим образом. Используя установку с торцовым счетчиком в строго определенных экспериментальных условиях, находят зависимость скорости счета от толщины слоя d алюминиевого поглотителя, помещаемого между источником и окном счетчика, в непосредственной близости к счетчику. Толщину слоя поглотителя принято выражать массой, приходящейся на единицу поверхности поглощающего слоя, в мг/кв. см.

Кривая поглощения, представляющая собой зависимость логарифма скорости счета $\log_a n$ от толщины d поглотителя, имеет прямолинейный участок. По нему с помощью формулы (5) определяют величину слоя половинного ослабления d1/2 в мг/кв. см:

$$d_{1/2} = \frac{\log_a 2}{B}, \qquad (5)$$

где B - коэффициент при d в формуле $\log_a n = C - Bd$, определяющей прямолинейный участок.

Для определения подлинного значения d1/2 для данного радионуклида аналогичные измерения проводят с источником тех же размеров, формы и толщины и примерно той же активности, приготовленным из образцового раствора с этим радионуклидом.

При отсутствии образцовых источников и растворов с требуемым радионуклидом для установления подлинности радионуклида в РФП следует определять конкретные значения энергий отдельных линий спектра ионизирующего излучения и их интенсивностей, граничных энергий спектров бета - излучения, периодов полураспада и сравнивать их со справочными данными. При этом предпочтение отдается данным, представленным в прилагаемой к статье таблице для всех перечисленных в ней нуклидов.

Для определения периода полураспада измеряют величину активности (или любой пропорциональной ей величины, например скорости счета, площади участка спектра и т. д.) в зависимости от времени. Детектор выбирают в зависимости от вида излучения, испускаемого анализируемым нуклидом. Измерения проводят при строго фиксированном расположении источника относительно детектора излучения при условии регулярного контроля за стабильностью показаний применяемой аппаратуры с помощью источника с долгоживущим радионуклидом. Длительность и число измерений определяют для каждого конкретного случая.

Измерение активности

Измерение активности радионуклидов в радиофармацевтических

препаратах проводят по бета- или гамма - излучению, а также рентгеновскому излучению в зависимости от типа излучения, испускаемого данным нуклидом. Для нуклидов, распад которых сопровождается испусканием гамма - излучения (например, ^{51}Cr, ^{67}Ga, ^{99m}Tc, ^{113m}In, ^{131}I и др.), измерения проводят по гамма - излучению. Для нуклидов, распад которых не сопровождается испусканием гамма - излучения или испускаемое ими гамма - излучение малоинтенсивно (например, ^{32}P, ^{90}Y и др.), измерения проводят по бета - излучению.

Измерения выполняют относительным методом путем сопоставления показаний применяемого прибора при измерении источника, приготовленного из анализируемого препарата, и образцового источника, или с использованием градуировочных коэффициентов, устанавливаемых периодически для данной аппаратуры с помощью образцовых источников и растворов.

В большинстве случаев образцовый источник с указанным радионуклидом используется не при повседневных измерениях, а при градуировке измерительной установки. Полученное в процессе градуировки значение градуировочного коэффициента "хранится" с помощью контрольного источника с долгоживущим радионуклидом. Повторная переградуировка установки проводится 1 - 2 раза в год.

Во всех случаях активность источников для измерений должна быть оптимальной для используемой аппаратуры. Это значит, что источники нужно приготавливать столь большой активности, чтобы иметь многократное превышение над фоном, но в то же время активность их не должна быть велика настолько, чтобы требовалось вводить значительную поправку на разрешающее время используемой установки.

Для того чтобы получать достаточно точно значения больших поправок, необходимо проверить, к какому типу относится мертвое время используемой установки: постоянному, продлевающемуся, зависящему от загрузки, амплитуды выходного импульса с детектора и т.д. В общем случае можно рекомендовать определение мертвого времени в зависимости от загрузки с помощью короткоживущего радионуклида. При постоянном мертвом времени или в случае малых поправок поправку следует вводить по формуле:

$$N_и = N \frac{1}{1 - \frac{N_t}{t} \tau_{мертв}}, \qquad (6)$$

где $N_и$ - истинное число импульсов от детектора ионизирующих излучений, попадающих в выбранный интервал амплитуд, за время t; N - число импульсов, зарегистрированных в этом интервале амплитуд (например, интеграл под выбранным пиком) за время t; N_t - полное число импульсов, зарегистрированных во всем спектре амплитуд, поступающем с детектора за время t; t - время измерения в секундах; "тау" - мертвое время в секундах.

Если измерение активности проводят с помощью ионизационной камеры, то верхний предел активности источника ограничивается условиями достижения насыщения и рабочим диапазоном измерителя тока.

Три следующих типа источников могут быть использованы в качестве образцовых в зависимости от типа применяемого детектора и свойств анализируемого препарата:

1) образцовые спектрометрические гамма - источники - ОСГИ, ТУ-17-03-82 (для гамма - спектрометров и радиометрических установок со счетчиками) <*>;

<*> ОСГИ и ОРР удовлетворяют ГОСТу 8.315 - 78 "Стандартные образцы. Основные положения".

2) аттестованные в установленном порядке образцовые источники с ^{226}Ra, ^{137}Cs или ^{60}Co (для ионизационных камер);

3) источники, приготавливаемые на месте из образцового радиоактивного раствора - ОРР, ТУ - И-170-71, путем отбора определенного количества ОРР и внесения его в нужную емкость (пробирку, флакон и т.д.) или нанесения на нужную подложку с последующим высушиванием при необходимости.

Рекомендуется следующая последовательность операций при измерении активности.

1. Определяют, с помощью какой аппаратуры (радиометрическая установка, ионизационная камера, спектрометр) будут проводить измерения активности данного нуклида в данном препарате (при этом учитывают ядерно - физическую характеристику радионуклида, наличие радионуклидных примесей, летучесть препарата и другие факторы).

2. Выбирают образцовый источник с тем же радионуклидом.

3. Выбирают (или приготавливают) контрольный источник с долгоживущим радионуклидом.

4. Если измерение проводят не в 4пи- или 2пи-геометрии, то подбирают такое расстояние источника до детектора, чтобы получить возможно большую скорость счета с образцовым источником, но такую, чтобы поправкой на просчеты можно было пренебречь.

5. С помощью образцового источника проводят градуировку установки, определяя коэффициент, связывающий активность нуклида и показания регистрирующей аппаратуры (площадь фотопика, скорость счета или показания электрометра); полученный коэффициент соотносят с показаниями этой же аппаратуры при измерении выбранного контрольного источника с долгоживущим радионуклидом, используемого в дальнейшем для "хранения" градуировочного коэффициента.

5.1. Проводят измерения образцового и контрольного источников в соответствии с правилами работы на используемой аппаратуре.

5.2. Проводят измерения фона до и после измерений источников.

5.3. Градуировочный коэффициент К вычисляют по формуле:

$$K = \frac{A_{обр}}{A_к} \times \frac{N_к}{N_{обр}}, \qquad (7)$$

где Аобр - активность образцового источника с данным нуклидом на дату градуировки; Ак - активность контрольного источника с долгоживущим нуклидом на дату градуировки; Nк, Nобр - показания прибора при измерении контрольного и образцового источников соответственно.

6. Из анализируемого препарата приготавливают мерные источники такой активности, чтобы показания прибора при измерении препарата и образцового источника были близки по величине.

7. Проводят измерения анализируемых и контрольного источников в соответствии с правилами работы на используемой аппаратуре.

8. Проводят измерения фона до и после измерений источников.

9. При необходимости учитывают поправку на распад радионуклида в анализируемом и образцовом источниках за время измерений. Если продолжительность измерений сравнима с периодом полураспада радионуклида, то истинную скорость счета (или площадь фотопика) nи в импульсах в секунду находят по формуле:

$$n_и = \frac{Nt\,\lambda}{1 - e^{-\lambda t}} = \frac{0{,}693\,Nt}{T_{1/2}\left(1 - e^{-\left[\frac{0{,}693}{T_{1/2}} t\right]}\right)},$$

где Nt - полное зарегистрированное число импульсов, сосчитанное на время t; t - продолжительность измерения в секундах.

Если время измерения меньше, чем 1,5% от Т 1/2, то поправка на распад за время измерений составит менее 0,5%.

10. Определяют удельную активность Am по формуле:

$$A_m = \frac{A}{m} = \frac{A_v}{c}, \qquad (9)$$

где А - активность радионуклида в препарате; m - масса препарата; Av - объемная активность; с - концентрация препарата в растворе.

11. Определяют объемную активность Av по одной из нижеприведенных формул (10) - (13) соответственно применяемой методике измерений.

Отклонение объемной или удельной активности от величины, указанной в сопроводительной документации на препарат, не должно превышать +/- 10%, если для частной фармакопейной статьи не утверждена иная цифра.

Удельную, молярную и объемную активность, так же как и полную активность радионуклида в препарате, указывают на определенную дату, а для препаратов, содержащих радионуклид с периодом полураспада менее 10 сут, также и на определенный час. Для препаратов, содержащих радионуклид с периодом полураспада менее 1 сут, активность указывают с учетом минут.

При использовании радиоактивного препарата расчет активности производят с учетом распада радионуклида по формуле (4) или по таблицам, составленным на основе формулы (4) для конкретного радионуклида. Если время выражать не в сутках или часах и т. п., а в единицах, кратных периоду полураспада, то кривая распада получается универсальной и годится для любого радионуклида (рис.5) <*>.

<*> Рис. 5. Зависимость активности препарата, выраженной в процентах от начальной активности $\frac{At}{A0}$ (ось ординат), от времени, выраженного в периодах полураспада радионуклида $\frac{t}{T1/2}$ - (ось абсцисс). (Рисунок не приводится).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПО ГАММА - И РЕНТГЕНОВСКОМУ ИЗЛУЧЕНИЮ

Измерение активности по гамма - и (или) рентгеновскому излучению выполняют с помощью ионизационной камеры, радиометрической установки или спектрометра энергии.

В тех случаях, когда суммарная толщина стенок детектора излучения и упаковки (флакон, пробирка и т.д.) не обеспечивает полного поглощения бета - излучения измеряемого радионуклида, между источником и детектором помещают дополнительный фильтр из вещества с малым атомным номером, например из алюминия или плексигласа. Источник, приготовленный из анализируемого препарата, должен иметь такую же форму и размер, как и образцовый источник; при использовании детекторов с 4пи-геометрией или, наоборот, при достаточно малом телесном угле допустимы различия формы и размеров измеряемого и образцового источников.

При измерении с помощью ионизационной камеры или радиометрической установки объемную активность препарата Av в беккерелях на 1 мл <*> в общем случае рассчитывают по формуле:

$$Av = Aк \frac{N}{Nк} \frac{K}{Vпр}, \qquad (10)$$

где Ак - активность контрольного источника в беккерелях <*>; Nк, N - показания прибора при измерениях контрольного источника и источника, изготовленного из анализируемого препарата, соответственно; Vпр - объем препарата, взятый для приготовления измеряемого источника, в миллилитрах; К - градуировочный коэффициент для применяемой установки, учитывающий ее эффективность к излучению соответствующих нуклидов (т.е. измеряемого и контрольного) и их схемы распада, определяемый экспериментально. Если используют образцовый источник с тем же радионуклидом, то К = 1.

<*> Здесь и далее Av может быть выражено также в мегабеккерелях (МБк) и других кратных единицах на 1 мл.

Разновидностью ионизационной камеры является прибор, известный как "дозкалибратор" или "калибратор радионуклидов". Измерение активности с помощью дозкалибратора проводят с использованием программы для данного радионуклида, введенной в калибратор при его изготовлении и градуировке. Таким образом, прибор не требует градуировки при его эксплуатации. Стабильность работы приборов проверяют с помощью источника излучения с долгоживущим радионуклидом.

При определении активности с помощью спектрометра энергий сравнивают площадь пика полного поглощения в спектре источника, приготовленного из анализируемого препарата, с площадью пика полного поглощения в спектре образцового источника. Если спектр гамма - излучения анализируемого препарата сложный, то определение активности проводят по тому пику, который наиболее четко выражен. Площади обоих сравниваемых пиков должны быть отнесены к единице времени набора спектра.

Расчет объемной активности проводят по формуле:

$$Av = A_{обр} \frac{\text{"эпсилон}_{обр}\text{"}\, p_{обр}}{\text{"эпсилон"}\, p} \frac{S}{S_{обр}} \frac{1}{V_{пр}}, \qquad (11)$$

где Аобр - активность образцового источника в беккерелях; S - площадь пика в спектре препарата (энергия этого пика Е указывается в частной фармакопейной статье); Sобр - площадь пика в спектре образцового источника с энергией Еобр; "эпсилон", "эпсилон$_{обр}$" - эффективность регистрации гамма - квантов с энергиями Е и Еобр соответственно. Их определяют по кривой эффективности, построенной для применяемого детектора и конкретной используемой геометрии на основе измерений с набором ОСГИ; р, р$_{обр}$ - выходы гамма - квантов для радионуклидов, входящих в измеряемый препарат и образцовый источник соответственно; Vпр - объем препарата, содержащийся в измеряемой пробе (с учетом разбавления), в миллилитрах.

Величины Аобр и р$_{обр}$ приведены в свидетельствах на ОСГИ.

Градуировку спектрометра по эффективности проводят следующим образом. В строго фиксированной геометрии измеряют гамма - спектр для каждого источника из набора ОСГИ. В каждом спектре определяют площадь пика полного поглощения для тех энергий гамма - излучения E_0, для которых в свидетельстве на ОСГИ приведен выход гамма - квантов. Все площади относят к единице времени. Для каждой i-й гамма - линии с энергией E_{0i}, рассчитывают эффективность регистрации "эпсилон$_{0i}$", равную отношению площади пика полного поглощения к числу гамма - квантов с энергией E_{0i}, испускаемых данным источником в 1 с. Число гамма - квантов должно быть взято из свидетельства на ОСГИ и пересчитано по формуле (4) на дату проведения градуировки спектрометра. По полученным результатам находят зависимость эффективности регистрации от энергии излучения.

Общую активность А нуклида в препарате измеряют с помощью ионизационной камеры или определяют по расчету на основе измерений объемной активности Av и объема V препарата:

$$A = AvV. \qquad (12)$$

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПО БЕТА - ИЗЛУЧЕНИЮ

Активность нуклидов в препаратах измеряют по бета - излучению на счетной установке с детектором бета - излучения относительным методом путем сравнения скоростей счета от источников, приготовленных из анализируемого препарата и из образцового радиоактивного раствора с тем же радионуклидом.

Для того чтобы обеспечить большую точность измерения, самопоглощение бета - излучения и скорости счета должны быть по возможности одинаковыми в источниках, приготовленных из исследуемого препарата и образцового раствора. Для этого препарат и образцовый раствор должны иметь близкие величины объемных активностей и одинаковое количество растворенного вещества в 1 мл, что достигается соответствующим разбавлением или добавлением носителя до нужной концентрации. Измерение скоростей счета для обоих препаратов проводят в идентичных геометрических условиях с источниками одинаковых размеров. Объемную активность радионуклида в измеряемом препарате Av в беккерелях на 1 мл рассчитывают по формуле:

$$Av = Av_{,обр} \frac{n}{} \frac{k}{}, \qquad (13)$$

$n_{обр}$ $k_{обр}$

где $Av,обр$ - объемная активность образцового раствора в беккерелях на 1 мл; n, $n_{обр}$ - скорости счета от источников, приготовленных из анализируемого и образцового раствора соответственно; k, $k_{обр}$ - коэффициенты, учитывающие разбавление анализируемого и образцового растворов, соответственно.

Допускается также проводить определение активности на установке, предварительно проградуированной с помощью образцового раствора. При этом градуировочный коэффициент "хранят" с помощью контрольного источника с долгоживущим радионуклидом ^{14}C, ^{137}Cs или $^{90}Si + {}^{90}Y$, а расчет активности проводят по формуле (10) с учетом разбавления.

Общую активность А радионуклида в препарате определяют по расчету на основе измерений объемной активности Av и объема препарата V (формула 12).

ПОГРЕШНОСТЬ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ

Известно, что процесс радиоактивного распада радионуклидов и процессы, обусловливающие регистрацию испускаемых при этом заряженных частиц или фотонов соответствующими детекторами, подчиняются законам статистики. При этом число распадов Np, происходящих за заданный интервал времени t, при условии "лямбда"t << 1, распределено по закону Пауссона, и среднее квадратическое отклонение "сигма $_{Np}$" = $\sqrt{Np}$.

Относительная флюктуация числа Np = "эта $_{Np}$" = $\frac{100}{\sqrt{Np}}$ %.

Очевидно, что "эта $_{Np}$" тем меньше, чем больше распадов произошло за время измерения t, и ее можно сделать достаточно малой путем соответствующего увеличения t. Сказанное относится также к обусловленному статистическим характером радиоактивного распада среднему квадратическому отклонению и относительной флюктуации числа отсчетов N детектора ядерного излучения за время t.

Результаты измерений активности А радионуклидов в препаратах связаны с погрешностями как случайного характера (возникающими не только за счет статистической природы распада, но и по ряду других причин), так и с систематическими погрешностями. Статистическую обработку результатов наблюдений следует проводить в соответствии с ГОСТом 8.207 - 76. При статистической обработке группы из n результатов наблюдений {Ni} прежде всего исключают систематические ошибки (фон, просчеты за счет мертвого времени и др.), рассчитывают для каждого случая группу значений активности {Ai}, находят результат измерений $\tilde{A}$ по формуле:

$$\tilde{A} = \frac{\sum_{i=1}^{n} Ai}{n}. \qquad (14)$$

Затем вычисляют оценку среднего квадратического отклонения S по формуле:

$$\tilde{S}(A) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (A_i - \tilde{A})^2}{n(n-1)}}. \qquad (15)$$

Доверительные границы "эпсилон $_p$" случайной погрешности результата измерений находят по формуле:

$$\text{"эпсилон}_p\text{"} = t_{0,95}\, \tilde{S}(A), \qquad (16)$$

где $t_{0,95}$ - коэффициент Стьюдента для доверительной вероятности P = 0,95.

Границы "ТЕТА" неисключенной систематической погрешности результата измерений находят по формуле:

$$\text{"ТЕТА"} = 1{,}1 \sqrt{\sum_{j=1}^{m} \text{"ТЕТА}_j\text{"}^2}, \qquad (17)$$

где "ТЕТА $_j$" - граница j-й неисключенной систематической ошибки, m - число суммируемых погрешностей.

Далее следует найти отношение $\frac{\text{"ТЕТА"}}{\tilde{S}(A)}$. Если это отношение меньше 0,8, то систематическими погрешностями пренебрегают и принимают, что граница погрешности "ДЕЛЬТА" результата равна "эпсилон". Если оно больше 8, пренебрегают случайной погрешностью и принимают "ДЕЛЬТА" = "ТЕТА".

Когда ни одной из указанных погрешностей пренебречь нельзя, границы погрешности результата измерений находят по формуле:

$$\text{"ДЕЛЬТА"} = K\,\text{"}S_{\text{СИГМА}}\text{"} \qquad (18)$$

$$\text{где } K = \frac{\text{"эпсилон"} + \text{"ТЕТА"}}{\tilde{S}(A) + \sqrt{\frac{1}{3}\sum_{j=1}^{m} \text{"ТЕТА}_j\text{"}^2}};$$

$$\text{"}S_{\text{СИГМА}}\text{"} = \sqrt{\frac{1}{3}\sum_{j=1}^{m} \text{"ТЕТА}_j\text{"}^2 + \tilde{S}^2(A)}.$$

Погрешность может быть выражена как в единицах измеряемой величины (абсолютная погрешность), так и в долях или процентах от измеренного значения активности (относительная погрешность).

При этом результат записывают в виде:

$$\tilde{A} \pm \text{"ДЕЛЬТА"};\ 0{,}95$$

или

$$\tilde{A}\left(1 \pm \frac{\text{"ДЕЛЬТА"}}{}\right);\ 0{,}95$$

~
А

ОСОБЕННОСТИ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ИСТОЧНИКОВ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЙ

В ряде случаев при приготовлении источников для измерений оказывается необходимо провести разбавление радиоактивного препарата, чтобы получить раствор с меньшей объемной активностью. Однако иногда при этом масса радионуклида в растворе оказывается так мала, что возникают явления, с которыми не приходится сталкиваться при использовании растворов обычных концентраций: радионуклид может быть частично потерян из раствора вследствие адсорбции на стенках химической посуды, а также вследствие образования, а затем коагуляции коллоидов. Существует ряд приемов, позволяющих избежать потери радионуклида в разбавленных растворах. Например, в некоторых случаях повышение кислотности раствора или прибавление неактивного носителя позволяет предотвратить потери из-за адсорбции. Во избежание образования коллоидов необходимо использовать только свежеперегнанную дистиллированную воду; в некоторые растворы прибавляют вещества, образующие растворимые комплексы с радионуклидом, что предотвращает коллоидообразование.

В частной фармакопейной статье указывают, каким растворителем следует разбавлять препарат при приготовлении источников. Если же фармакопейная статья не содержит таких указаний, то разбавление проводят дистиллированной водой.

Определение радионуклидной чистоты и радионуклидных примесей

Определение радионуклидной чистоты радиоактивных препаратов проводят методом ядерной спектроскопии и радиометрии с применением при необходимости различных методов количественного химического выделения примесей.

Химическое отделение примесей от основного радионуклида значительно повышает эффективность анализа. Однако в ряде случаев анализ может быть проведен и без химического отделения примесей. При этом следует иметь в виду, что в настоящее время не существует прямых методов, позволяющих непосредственно определять радионуклидную чистоту препарата. Фактически проводят определение радионуклидных примесей и по их активности делают вывод о радионуклидной чистоте препарата.

Радионуклидный анализ включает в себя следующие этапы: обнаружение радионуклидных примесей, их идентификацию и определение активности. Для обнаружения примесей в общем случае измеряют энергии бета- и гамма - излучения и периоды полураспада для анализируемого препарата и для отдельных компонентов его, отделенных химическими методами от основного радионуклида. По совокупности полученных данных с помощью справочных таблиц, содержащих периоды полураспада, энергии и интенсивности излучения, проводят идентификацию обнаруженных примесей. Измерение активности идентифицированных примесей проводят аналогично тому, как описано в разделе "Измерение активности", с помощью подходящих радиометрических установок с бета - и гамма - счетчиками, спектрометров, установок для измерения активности методом совпадений и другой аппаратуры. Конкретные методики анализа на отдельные радионуклидные примеси приведены в соответствующих частных фармакопейных статьях для тех случаев, когда анализ может быть выполнен в течение срока годности препарата. Детальный анализ радионуклидной чистоты препаратов производится только изготовителем.

Активность обнаруженной примеси приводится в процентах по отношению к активности основного радионуклида в препарате на определенную дату.

Радионуклидная чистота РФП, как правило, должна быть не ниже 99,5%, т. е. допустимая суммарная величина радионуклидных примесей не должна превышать 0,5% в течение срока годности.

Радионуклидные примеси, активность которых составляет не более 0,01% от активности основного радионуклида в течение всего срока годности, в частных фармакопейных статьях не приводятся, кроме особых случаев, но указание о пределе суммарной примеси в частной фармакопейной статье обязательно.

В тех случаях, когда примесь не обнаружена, должен быть указан нижний предел обнаружения примененным методом анализа.

Определение радиохимической чистоты и радиохимических примесей

Радиохимическая чистота препаратов может быть исследована различными методами, но наиболее распространенными являются методы хроматографии и электрофореза.

Для анализа используют такое количество препарата, чтобы скорость счета от него, измеренная с помощью соответствующей измерительной установки, обеспечила бы получение статистически достоверных результатов измерения для тех примесей, активность которых составит не менее 0,5% от нанесенного количества. В то же время активность анализируемой пробы должна быть такой, чтобы поправка на просчеты, обусловленная мертвым временем регистрирующей установки, не превышала 1-2%. При этом массы разделенных веществ не должны превышать допустимую для указанных методов.

Для обнаружения мест нахождения радиоактивных компонентов на хроматограммах (электрофореграммах) используют авторадиографию, радиометрию (в том числе сканирование) или проводят хроматографирование (электрофорез) со "свидетелем" - неактивным аналогом определяемого вещества. Измерения скоростей счета должны проводиться на радиометрической установке с соответствующим детектором, выбор которого зависит от типа и энергии излучения радионуклида. При работе с препаратами, испускающими достаточно интенсивное гамма - излучение, измерения следует проводить по гамма - излучению. В этом случае удобен, например, сцинтилляционный гамма - счетчик с колодцем. Измеряют скорости счета от участков хроматограммы (электрофореграммы), содержащих основное вещество или определенную радиохимическую примесь, относят их к скорости счета от всей хроматограммы (электрофореграммы) и результат выражают в процентах. Радиохимическая чистота РФП может изменяться со временем под действием различных факторов (радиационное разложение, окисление, воздействие света, температуры и т.д.). Значения радиохимической чистоты, приводимые в фармакопейных статьях на конкретные препараты, указывают на конец срока годности данного РФП.

Срок годности

Срок годности радиофармацевтического препарата определяется совокупностью следующих факторов: 1) стабильностью химического и радиохимического состава препарата; 2) уменьшением активности препарата с течением времени по закону радиоактивного распада; 3) возрастанием относительного содержания долгоживущих радионуклидных примесей, имеющих периоды полураспада большие, чем основной радионуклид. Срок годности каждого препарата приводится в соответствующей частной фармакопейной статье.

Хранение

Радиофармацевтические препараты хранят в соответствии с действующими "Основными санитарными правилами работы с радиоактивными веществами и источниками ионизирующих излучений", утвержденными Министерством здравоохранения СССР, а также специальными требованиями, если таковые предусмотрены фармакопейными статьями на конкретные препараты. Условия хранения должны обеспечивать снижение мощности дозы излучения до допустимого уровня.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ОСНОВНЫЕ ФИЗИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НЕКОТОРЫХ РАДИОНУКЛИДОВ

Радионуклид и его Т 1/2	Тип распада, энергия частиц, кэВ	Интенсивность, %	Вид и энергия фотонов, кэВ	Интенсивность, %
$^{3}_{1}H$ 12,34 года	β^- E_0 18,6 $\bar{E}$ 5,7	100		
$^{11}_{6}C^{*}$ 20,38 мин	β^+ E_0 960 $\bar{E}$ 385 Э.З.	99,76 0,24	гамма +/- 511,00	199,52
13 *	+		гамма +/- 511,00	199,62

N 7 6 9,97 мин	бета E0 1199 $\bar{E}$ 492 Э.З.	99,81 0,19		
14 C 6 8 5710 лет	β^- бета E0 156,5 $\bar{E}$ 49,4	100		
15 * O 8 7 123 с	β^+ бета E0 1738 $\bar{E}$ 738 Э.З.	99,9 0,1	гамма +/- 511,00	199,8
18 F * 9 9 109,8 мин	β^+ бета E0 633,5 $\bar{E}$ 249,7 Э.З.	96,7 3,3	гамма +/- 511,00	193,4
22 Na 11 11 2,60 года	β^+ бета E0 545,8 $\bar{E}$ 215,2 Э.З.	90,5 9,5	гамма +/- 511,00 гамма 1274,6 **	181 100
24 Na 11 13 15,03 ч	β^- бета1 E0 277 $\bar{E}$ 91 β^- бета2 E0 1390 $\bar{E}$ 558	0,06 99,91	гамма1 1368,6 гамма2 2754,0 гамма3 3867	100 99,84 0,06
30 P 15 15 2,50 мин	β^+ бета E0 3205 $\bar{E}$ 1410	99,94	гамма +/- 511,00	200,0
32 P 15 17 14,31 сут	β^- бета E0 1709 $\bar{E}$ 695	100		
35 S 16 19 87,4 сут	β^- бета E0 167,5 $\bar{E}$ 49,8	100		
42 K * 19 23 12,36 ч	β^- бета1 E0 1996 $\bar{E}$ 823 β^- бета2 E0 3521 $\bar{E}$ 1563	18,3 81,2	гамма 1525	18,7
43 K *	β^- бета1 E0 440		гамма1 221 гамма2 372,8	4,3 87,3

19 24 22,2 ч	$\bar{E}$ 150 $-$ бета2 E0 827 $\bar{E}$ 296 $-$ бета3 E0 1224 $\bar{E}$ 469 $-$ бета4 E0 1830 $\bar{E}$ 720	2,4 92,2 3,6 1,4	гамма3 396,9 гамма4 593,4 гамма5 617,5 гамма6 1022	11,5 11,1 80,4 2
45 Ca 20 25 162,6 сут	$-$ бета E0 257 $\bar{E}$ 77,3	100		
47 Ca *** 20 27 4,537 сут	$-$ бета1 E0 690 $\bar{E}$ 241 $-$ бета2 E0 1988 $\bar{E}$ 820	81,9 18	гамма1 489,2 гамма2 807,9 гамма3 1297,1	6,7 6,9 75
47 Sc 21 26 3,351 сут	$-$ бета1 E0 441 $\bar{E}$ 143 $-$ бета2 E0 601 $\bar{E}$ 204	68 32	гамма 159,4	68
51 Cr 24 27 27,70 сут	Э.З.	100	X 4,95 гамма 320,1	19,7 9,83
52 Fe *** * 26 26 8,26 ч	$+$ бета E0 804 $\bar{E}$ 340 Э.З.	56 44	гамма +/- 511,00 гамма 168,9	112 99,2
52m Mn 25 27 21,2 мин	$+$ бета E0 2633 $\bar{E}$ 1174 Э.З.	96,4 3,4	гамма +/- 511,00 гамма1 377,7 гамма2 1434,1	193,2 1,7 98,2
52 Mn 25 27 5,591 сут	$+$ бета E0 574 $\bar{E}$ 243 Э.З.	27,9 72,1	X1 5,4 X2 6,0 гамма +/- 511,00 гамма1 744,2 гамма2 848,2 гамма3 935,5 гамма4 1246,3 гамма5 1333,7 гамма6 1434,4	15,5 2,1 54,5 87 3,3 94 4,7 5,2 100

54 Mn 25 29 312,2 сут	Э.З.	100	X 5,5 гамма 834,9 **	25,1 100
55 Fe 26 29 2,72 года	Э.З.	100	X 6,0	27,7
57 Co 27 30 271,5 сут	Э.З. КЭ1 7,3 КЭ2 13,7 КЭ3 114,9 КЭ4 129,4	100 70 7,9 1,9 1,4	X 6,5 гамма1 14,4 гамма2 122,1 гамма3 136,5	56,3 9,6 85,4 10,7
58 Co 27 31 70,79 сут	β^+ E0 475 $\bar{E}$ 201 Э.З.	15,0 85,0	гамма +/- 511,00 гамма1 810,8 гамма2 864,0 гамма3 1674,7	30,0 99,5 0,7 0,5
59 Fe 26 33 44,52 сут	β^-1 E0 130 $\bar{E}$ 36 β^-2 E0 273 $\bar{E}$ 81 β^-3 E0 465 $\bar{E}$ 149	1,2 45,3 53,2	гамма1 142,7 гамма2 192,3 гамма3 1099,2 гамма4 1291,6	1,0 2,8 56,4 43,3
60 Co 27 33 5,273 года	β^-1 E0 318 $\bar{E}$ 96,5 β^-2 E0 1491 $\bar{E}$ 584	99,9 0,1	гамма1 1173,2 ** гамма2 1332,5 **	99,9 100
65 Zn 30 35 243,9 сут	β^+ E0 330 $\bar{E}$ 144 Э.З.	1,5 98,5	гамма +/- 511,00 гамма 1115,6 ** X1 8,0 X2 8,9	3,0 50,8 33,5 4,6
67 Ga 31 36 78,26 ч	Э.З.	100	X1 8,6 * X2 9,6 * гамма1 91,3 гамма2 93,3 гамма3 184,6 гамма4 208,9 гамма5 300,2 гамма6 393,5	49,0 * 6,8 3,0 37,0 20,7 2,3 16,6 4,6
68 Ge *** 32 36 288 сут	Э.З.	100	X1 9,2 X2 10,3	36 5,1

68 Ga 31 37 68 мин.	Э.З. + бета1 E0 822 $\bar{E}$ 353 * + бета2 E0 1899 $\bar{E}$ 836 *	10,9 1,1 88	 X1 8,6 X2 9,6 гамма +/- 511,00 гамма 1077,4	 4,1 0,56 178 3,2
75 Se 34 41 119,8 сут	Э.З. ОЭк 9,1 КЭ1 12,5 КЭ2 84,9 КЭ3 124,1	100 44,8 4,3 2,2 1,5	X1 10,5 X2 11,7 гамма1 66,1 гамма2 96,7 гамма3 121,1 гамма4 136,0 гамма5 198,6 гамма6 264,7 гамма7 279,5 гамма8 303,9 гамма9 400,6	46,7 7,1 1,0 3,14 16,5 56,0 1,4 58,5 24,8 1,3 11,4
77 Br * 35 42 57,04 ч	Э.З. + бета E0 343 $\bar{E}$ 152	99,25 0,75	X1 11,2 X2 12,5 гамма +/- 511,00 гамма1 87,6 гамма2 161,8 гамма3 200,4 гамма4 239,0 гамма5 249,8 гамма6 281,7 гамма7 297,2 гамма8 303,8 гамма9 439,5 гамма10 484,6 гамма11 520,7 гамма12 574,6 гамма13 578,9 гамма14 585,5 гамма15 755,4 гамма16 817,8	45 7 1,5 1,5 1,1 1,2 23,0 3,1 2,4 4,3 1,2 1,6 1,0 23,2 1,2 3,1 1,6 1,7 2,1
77m Se * 34 43 17,4 с	И.П.	100	X1 11,2 X2 12,5 гамма 161,8	 52,5
81 Rb * 37 44 4,58 ч	Э.З. + бета1 E0 604 $\bar{E}$ 302 + бета2 E0 1050 $\bar{E}$ 506 КЭ1 177 КЭ2 188	69,7 2,1 28 25,8 1,4	X1 12,6 X2 14,1 гамма +/- 511,00 гамма1 190,3 гамма2 446,7 гамма3 456,7 гамма4 510,2 гамма5 537,6	47,6 6,8 60 64,6 23,5 2,9 4,1 3,1
81m Kr * 36 45 13 с	И.П. КЭ1 176 КЭ2 188	100 26,8 4,6	X1 12,6 X2 14,1 гамма 190,3	14,7 2,1 67,1

82 Br * 35 47 35,32 ч	- бета1 E0 264,2 $\bar{E}$ 85,0 - бета2 E0 444 $\bar{E}$ 163	1,4 98,0	гамма1 221,5 гамма2 554,3 гамма3 606,5 гамма4 619,1 гамма5 698,4 гамма6 776,7 гамма7 827,8 гамма8 1008 гамма9 1044 гамма10 1317,4 гамма11 1474,9	2,3 70,8 1,2 43,3 28,5 83,5 24,0 1,3 27,2 26,6 16,4
82 *** * Sr 38 44 25,0 сут	Э.З. ОЭ1 11,4 ОЭ2 13	100 21,1 5,9	X1 13,4 X2 15,0	49,2 8,5
82 Rb 37 45 1,25 мин	+ бета1 E0 3356 $\bar{E}$ 1500 + бета2 E0 2580 $\bar{E}$ 1160 Э.З.	82,7 12,5 4	X1 12,6 X2 14,1 гамма +/- 511,00 гамма1 776,5	192 13,6
85 Sr 38 47 64,84 сут	Э.З. ОЭ1 * 11,4 ОЭ2 15	100 28,1 1,7	X1 13,4 X2 15,0 гамма 514,0	50,4 8,7 99,3
86 Rb 37 49 18,8 сут	- бета1 E0 698 $\bar{E}$ 257 - бета2 E0 1774 $\bar{E}$ 708	8,8 91,2	гамма 1076,8	8,8
87m Sr 38 49 2,82 ч	И.П. Э.З. ОЭ1 12 ОЭ2 14 КЭ1 372 КЭ2 386	99,3 0,7 3,4 1,2 14,9 2,2	X1 14,1 X2 15,8 гамма 388,4	8,6 1,5 81,8
87 Y 39 48 80,3 ч	+ бета1 E0 451 $\bar{E}$ * 187 Э.З. ОЭ1 12 ОЭ2 14 ОЭ3 16 КЭ1 372 КЭ2 386 КЭ3 388	0,16 99,84 22,6 8,1 2,9 15,4 2,3 0,8	X1 14,1 X2 15,8 гамма +/- 511,00 гамма1 388,4 гамма2 484,9	60,0 10,7 0,32 84,7 92,0
88 Y 39 49	+ бета E0 760 _	0,20	X1 14,2 X2 15,9 гамма +/- 511,00	51,6 9,3 0,45

106,6 сут	E 357 Э.З. ОЭ 12,1	99,80 25,8	гамма1 898,05 гамма2 1836,11 гамма3 2734,1	94,0 99,4 0,62
90 Sr *** 38 52 28,7 года	- бета E0 546 $\bar{E}$ 196	 100		
90 Y 39 51 64,26 ч	- бета E0 2274 $\bar{E}$ 928	 99,98		
91 Y 39 52 58,51 сут	- бета E0 1544 $\bar{E}$ 607	 99,7	гамма 1204,7	0,30
99 Mo 42 57 66,02 ч	- бета1 E0 443 $\bar{E}$ 136 - бета2 E0 855 $\bar{E}$ 292 - бета3 E0 1221 $\bar{E}$ 444 ОЭ 15,5 КЭ1 19,5 КЭ2 119,5 КЭ3 137,5	 16,8 * 1,2 * 81,8 * 3,2 4,4 9,3 1,2	X1 18,3 X2 20,8 гамма1 40,58 гамма2 140,5 гамма3 181,1 гамма4 366,4 гамма5 739,5 гамма6 778,2	9,8 2,0 1,2 91,0 6,1 1,2 12,3 4,4
99m Tc 42 57 6,01 ч	И.П. КЭ1 119,5 КЭ2 137,5	100 8,7 1,0	X1 18,3 X2 20,7 гамма 140,5	6,0 1,0 89,2
103 Ru 44 59 39,36 сут	- бета1 E0 113 $\bar{E}$ 30 - бета2 E0 226 $\bar{E}$ 63 - бета3 E0 723 $\bar{E}$ 239 КЭ1 16,5 КЭ2 36,7 КЭ3 39,3 КЭ4 39,7	 6,2 90 3,5 9,7 73,1 14,7 2,4	X1 20,2 X2 22,8 гамма1 497,1 гамма2 610,4	7,2 1,4 88,2 5,5
103m Rh 45 58 56,12 мин	И.П. КЭ1 16,5 КЭ2 36,7 КЭ3 39,3 КЭ4 39,7	100 9,7 73,1 14,7 2,4	X1 20,2 X2 22,8	6,2 1,0

103 Pd 46 57 16,96 сут	Э.З. КЭ1 16,5 КЭ2 36,7 КЭ3 39,1 КЭ4 39,7	100 9,7 73,1 14,7 2,4	X1 20,2 X2 22,8	61,9 12,7
109 Cd * 48 61 463,1 сут	Э.З. ОЭ ~= 20 КЭ1 62,5 КЭ2 84,2 КЭ3 87,3	100 24 41,5 44,6 10,1	X1 22,0 X2 24,9 X3 25,5 гамма 88,0	85,3 14,3 2,4 3,7
111 In * 49 62 2,805 сут	Э.З. ОЭ ~= 20 КЭ1 144,6 КЭ2 218,6	100 16 8,4 5,0	X1 23,0 X2 26,0 X3 26,6 гамма1 171,3 гамма2 245,4	68,2 12,3 2,2 90,3 94,0
113 Sn 50 63 115,1 сут	Э.З. КЭ1 363,8 КЭ2 387,5 КЭ3 390,9	100 28,2 5,6 1,1	X1 24,1 X2 27,4 гамма1 255,1 гамма2 391,7 **	79,1 17,3 2,08 64,9
113m In 49 64 99,51 мин	И.П. Э.З. КЭ1 363,8 КЭ2 387,5 КЭ3 390,9	99,93 0,07 28,2 5,4 1,5	X1 24,1 X2 27,2 гамма 391,7	19,7 4,3 64,9
123 I 53 70 13,31 ч	Э.З. ОЭ1 21,8 ОЭ2 25,9 КЭ1 127,2 КЭ2 154,0	100 8,3 3,5 13,6 1,7	X1 27,4 X2 30,9 X3 31,7 гамма1 159,0 гамма2 528,9	70,5 12,6 2,5 83,4 1,39
123m Te * 52 71 119,7 сут	И.П. КЭ1 56,6 КЭ2 83,5 КЭ3 87,5 КЭ4 88,3 КЭ5 127,2	100 41,9 45,0 10,8 2,2 13,7	X1 27,3 X2 30,8 X3 31,7 гамма 159,0	39,8 7,0 1,4 84,0
125 I 53 72 60,04 сут	Э.З. ОЭ1 * 22,0 ОЭ2 * 26,0 КЭ1 3,7 КЭ2 30,6 КЭ3 34,9	100 13,7 6,2 80,0 10,5 2,1	X1 27,2 X2 27,5 X3 * 31,0 X4 * 31,7 гамма 35,5	40,2 75,0 20,0 4,0 6,67
126 I 53 73 13,01 сут	β^-1 E_0 371 $\bar{E}$ 109,4 β^-2 E_0 862 $\bar{E}$ 289,6 β^-3 E_0 1251 $\bar{E}$ 459,1 β^+ E_0 1134 $\bar{E}$	 3,6 37,1 10,0	X1 27,2 X2 27,5 X3 31,1 гамма +/- 511,00 гамма1 388,6 гамма2 491,2 гамма3 666,3 гамма4 753,7 гамма5 1420	14,4 26,8 9,3 2,84 33,6 2,8 30,9 3,9 0,3

	Е 515,0 Э.З.	1,1 48		
129 Cs * 55 74 32,06 ч	Э.З.	100	Х1 29,4 Х2 29,8 Х3 33,6 Х4 34,4 гамма1 39,6 гамма2 278,0 гамма3 317,9 гамма4 371,9 гамма5 411,3 гамма6 549,3	30 55 16 3,5 3 1,4 2,5 31,7 21,9 3,3
131 I 53 78 8,054 сут	бета1 E_0 248 $\bar{E}$ 70 бета2 E_0 334 $\bar{E}$ 97 бета3 E_0 606 $\bar{E}$ 191 КЭ1 45,6 КЭ2 329,9	2,1 7,3 89,5 3,6 1,5	Х1 29,4 Х2 29,8 гамма1 80,2 гамма2 284,3 гамма3 364,5 гамма4 637,0 гамма5 722,9	1,5 2,8 2,6 6,0 80,6 7,21 1,8
131 Cs 55 76 9,688 сут	Э.З. ОЭ1 23,5 ОЭ2 28,0	100 6,4 3,0	Х1 29,5 Х2 29,8 Х3 33,6 Х4 34,4	20,9 38,7 11,0 2,2
131m Xe 54 77 11,97 сут	И.П. ОЭ1 23,5 ОЭ2 27,9 КЭ1 129,4 КЭ2 158,8 КЭ3 163,0 КЭ4 163,8	100 4,5 2,0 61,5 28,9 6,3 1,3	Х1 28,4 Х2 29,8 Х3 33,6 - 34,4 гамма 163,9	15,6 28,8 10,3 1,9
132 I 53 79 2,30 ч	бета1 E_0 740 $\bar{E}$ 243 бета2 E_0 910 $\bar{E}$ 310 бета3 E_0 980 $\bar{E}$ 333 бета4 E_0 1180 $\bar{E}$ 422 бета5 E_0 1460 $\bar{E}$ 545 бета6 E_0 1617	14,4 3,6 14,3 21,4 13,8	гамма1 262,7 гамма2 505,9 гамма3 522,65 гамма4 547,1 гамма5 621,0 гамма6 630,2 гамма7 650,6 гамма8 667,7 гамма9 669,8 гамма10 671,6 гамма11 727,0 гамма12 727,1 гамма13 729,5 гамма14 772,6 гамма15 780,2 гамма16 809,8 гамма17 812 гамма18 876 гамма19 954,5 гамма20 1136,1 гамма21 1143,4 гамма22 1173,2	1,4 5,0 16,1 1,25 1,6 13,7 2,7 98,8 4,9 5,2 2,2 4,3 1,1 76,2 1,23 2,9 5,6 1,08 18,1 3,0 1,4 1,1

	$\bar{E}$ 614	12,5	гамма23 1290,7	1,14
	-		гамма24 1295,3	2,0
	бета7 E0 2140		гамма25 1298,2	0,9
			гамма26 1372,1	2,5
			гамма27 1398,6	7,1
	$\bar{E}$ 850	17,1	гамма28 1442,6	1,4
			гамма29 1921,1	1,18
			гамма30 2002,3	1,1
133	-		X1 30,6	13,5
Xe	бета E0 346		X2 31,0	25,0
54 79			X3 35,1	9,0
5,247 сут	$\bar{E}$ 101	99,1	гамма 81,0	36,3
	ОЭ1 25	3,7		
	ОЭ2 30	1,7		
	КЭ1 45,0	52,6		
	КЭ2 75,3	6,8		
	КЭ3 75,6	1,0		
	КЭ4 79,8	1,6		
137	-		X1 31,8	1,9
Cs	бета1 E0 512		X2 32,2	3,8
55 82			X3 36,5	1,3
30,18 года	$\bar{E}$ 174	94,8	гамма 661,662 **	85,3
	-			
	бета2 E0 1173			
	$\bar{E}$ 272	5,2		
	КЭ1 624,2	7,8		
	КЭ2 655,7	1,2		
139	Э.З.	100	X1 33,0	22,6
Ce	ОЭ1 26,2	5,3	X2 33,4	41,5
58 81	ОЭ2 31,3	2,5	X3 38,1	15,3
137,6 сут	КЭ1 127	17,1	гамма 165,86 **	80
	КЭ2 160	2,3		
147	-			
Pm	бета E0 225			
61 86				
2,623 года	$\bar{E}$ 62	100		
152	-		X1 39,5	20,2
Eu *	бета1 E0 176		X2 40,1	36,7
63 89			X3 45,3	11,4
13,6 года	$\bar{E}$ 47,8	1,8	X4 46,6	3,3
	-		гамма1 121,8	28,4
	бета2 E0 384		гамма2 244,7	7,51
			гамма3 344,3	26,5
	$\bar{E}$ 112	2,4	гамма4 411,1	2,24
	-		гамма5 444,0	3,12
	бета3 E0 695		гамма6 778,9	13,0
			гамма7 867,4	4,1
	$\bar{E}$ 222	13,5	гамма8 964,0	14,6
	-		гамма9 1085,9	10,2
	бета4 E0 1474		гамма10 1090	1,7
			гамма11 1112,1	13,6
	$\bar{E}$ 533	8,6	гамма12 1212,9	1,4
	КЭ1 74,9	19,2	гамма13 1299,2	1,6
	КЭ2 114,0	10,7	гамма14 1408,0	20,8
	КЭ3 120,0	2,5		
167	Э.З.	100	X1 48,2	26,8
Tm	КЭ1 47,3	7,3	X2 49,1	47,6

69 98 9,25 сут	КЭ2 47,8 КЭ3 48,7 КЭ4 55,3 КЭ5 56,6 КЭ6 150,3 КЭ7 198,1 КЭ8 198,5 КЭ9 199,4 КЭ10 206,0 КЭ11 207,4	5,6 5,8 4,4 1,1 19,7 2,0 16,6 10,0 7,7 2,0	Х3 55,9 гамма1 57,1 гамма2 207,8 гамма3 531,6	19,4 4,5 41,0 1,6
169 Yb 70 99 32,0 сут	Э.З. КЭ1 3,7 КЭ2 6,6 КЭ3 11,1 КЭ4 18,7 КЭ5 34,2 КЭ6 50,4 КЭ7 53 КЭ8 58,8 КЭ9 61 КЭ10 71,1 КЭ11 84 КЭ12 100 КЭ13 107,9 КЭ14 109,1 КЭ15 117,8 КЭ16 120 КЭ17 129 КЭ18 138,6 КЭ19 168 КЭ20 188	100 38,8 95,2 7,4 1,7 8,0 35,4 7,1 1,4 1,9 6,0 1,6 5,7 1,8 1,4 10,4 5,2 1,6 12,9 1,9 2,1	Х1 49,8 Х2 50,7 Х3 57,5 гамма1 63,1 гамма2 93,6 гамма3 109,8 гамма4 118,2 гамма5 130,5 гамма6 177,2 гамма7 198,0 гамма8 261,1 гамма9 307,7	52 92 38 43,6 2,5 17,6 1,9 11,0 21,6 35,2 1,7 10,2
197 Hg * 80 117 64,1 ч	Э.З. ОЭ1 7,4-11,9 ОЭ2 52-81 КЭ1 63,0 КЭ2 73,9	100 90,1 2,7 61,8 19	Х1 ~= 11 Х2 66,9 Х3 68,8 Х4 77,6 Х5 77,9 Х6 80,2 гамма1 77,4 гамма2 191,4	51 20,9 35,7 4,2 8,1 3,3 19,2 0,7
197m *** * Hg 80 117 23,8 ч	И.П. ОЭ1 9 КЭ1 50,8 КЭ2 82 КЭ3 116 КЭ4 119 КЭ5 127 КЭ6 130 КЭ7 150 КЭ8 161 КЭ9 198	100 80 14,3 20,5 4,9 33,1 1,7 11,5 51 21 1,5	Х1 12 Х2 67,0 Х3 68,9 Х4 70,8 Х5 78 Х6 80 Х7 82,7 гамма1 134,0 гамма2 279,0	44 1,9 12,8 16 1,1 5,8 1,6 34,1 4,9
198 Au 79 119 2,695 сут	бета1 $\bar{E}$0 287 $\bar{E}$ 79,8 бета2 $\bar{E}$0 963 $\bar{E}$ 315 КЭ1 328,7 КЭ2 398,6	1,28 98,7 2,9 1,0	Х1 ~= 12 Х2 70,8 гамма1 411,8 гамма2 675,9	1,3 1,4 95,5 1,1

199 Au 79 120 3,139 сут	β^- бета1 E0 245 $\bar{E}$ 67,3 β^- бета2 E0294,6 $\bar{E}$ 82,4 β^- бета3 E0453,0 $\bar{E}$ 132,9 КЭ1 35,1 КЭ2 75,3 КЭ3 125,1 КЭ4 144,8 КЭ5 155,5 КЭ6 157,6 КЭ7 193,6	18,9 66,4 14,7 2,8 10,9 5,6 17,0 4,4 1,2 1,1	X1 ~= 10 X2 68,9 X3 70,8 X4 80,3 гамма1 158,38 гамма2 208,2	13 4,6 7,8 3,5 36,8 8,6
201 Tl 81 120 72,92 ч	Э.З. ОЭ 53,7-70,8 КЭ1 15,8 КЭ2 17,4 КЭ3 23,5 КЭ4 27,1 КЭ5 30,6 КЭ6 52,2 КЭ7 84,3 КЭ8 120,6 КЭ9 152,6 КЭ10 164,0	100 3,3 8,0 6,8 1,6 1,8 1,0 7,3 15,0 1,2 2,6 0,8	X1 ~= 11 X2 68,9 X3 70,8 X4 79,8 X5 82,4 гамма1 135,3 гамма2 167,4	47 27,2 46,4 16,2 4,7 2,65 10,0
203 Hg 80 123 46,73 сут	β^- бета E0 212 $\bar{E}$ 58 КЭ1 193,6 КЭ2 264,5	100 13,5 3,9	X1 70,8 X2 72,9 X3 82,5 гамма 279,2 **	3,8 6,4 2,8 81,6
203 Pb 82 121 52,0 ч	Э.З. КЭ1 193,7 КЭ2 263,9 КЭ3 264,5	100 13,2 2,0 1,3	X1 10-15 X2 70,8 X3 72,9 X4 83,0 гамма1 279,2 гамма2 401,3 гамма3 680,5	34,1 26,1 44,2 19,6 80,9 3,7 0,7
204 Tl 81 123 3,784 л	β^- бета E0 763 $\bar{E}$ 243 Э.З.	97,7 2,3	X1 68,9 X2 70,8 X3 80,7	0,4 0,7 0,7
241 Am 95 146 432,1 л	альфа1 5485,7 альфа2 5443,0 альфа3 5388,4 КЭ1 21-27 КЭ2 38-42 КЭ3 54-58	85,2 12,7 1,5 13 31 10,5	X1 11,9 X2 13,9 X3 17,8 X4 20,8 гамма1 26,4 гамма2 59,5 **	0,9 13,3 19,4 4,9 2,4 35,8

Примечания. 1. В таблице приняты следующие обозначения:

T1/2 - период полураспада;
И.П. - изомерный переход;
Э.З. - электронный захват;
альфа - альфа - излучение;
β^- - бета - излучение;
β^+ - позитронное излучение;
E0 - граничная энергия парциального бета - спектра;
$\bar{E}$ - средняя энергия парциального бета - спектра;
КЭ - конверсионные электроны;
ОЭ - электроны Оже;
гамма - гамма - излучение;
гамма +/- - аннигиляционное гамма - излучение;
X - характеристическое рентгеновское излучение.

2. Все нуклиды расположены в порядке возрастания массового числа.

3. Как правило, не приведены рентгеновские и гамма - линии, а также парциальные спектры с интенсивностью менее 1%.

4. Во всех случаях, когда при распаде радионуклида ядро - продукт образуется в метастабильном состоянии, приведенные в таблице интенсивности относятся к состоянию равновесия.

5. Случаи, когда после распада дочерний нуклид радиоактивен, отмечены знаками ***.

6. При составлении таблицы использована следующая литература:

1) таблицы стандартных справочных данных ГСССД 14-80 (использованные данные отмечены знаком **);

2) таблицы значений, рекомендованных ГСССД:

- Хольнов Ю. В. и др. Характеристики излучений радиоактивных нуклидов, применяемых в народном хозяйстве: Справочник. - М.: Атомиздат, 1980;
- Хольнов Ю. В. и др. Оцененные значения ядерно - физических характеристик радиоактивных нуклидов, применяемых в народном хозяйстве: Справочник. - М.: Энергоатомиздат, 1982;
- Хольнов Ю. В. и др. Оцененные значения ядерно - физических характеристик радиоактивных нуклидов, применяемых в технике и медицине: Справочник. - М.: Энергоиздат, 1984;

3) для нуклидов, не вошедших в указанные в пп. 1) и 2) таблицы ядерно - физические характеристики выбраны на основе анализа данных, приведенных в указанных ниже изданиях (в этом случае использованные данные отмечены знаком *):

- Lagoutine F, Coursol N., Legrand J. Table de radionuclides Commissariat a l'Energie Atomique. - Paris, 1983;
- Martin M.J., Blichert-Toft P.H. Nuclear Data Tables - October, 1970, vol. 8, N 1-2;
- Lederer C.M., Shirly V. S. Table of Isotopes. Ed. 7, 1978;
- Helmer R.G., etc. Standards for gamma - ray energy calibration. - Atomic Data and Nuclear Data Tables, 1979, vol.24, p. 39-48;
- Nuclear Data Sheets, 1973, vol. 10, N. 4-1982, vol.36, N 4.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЯЗКОСТИ ЖИДКОСТЕЙ

Основные положения

Вязкость (внутреннее трение) - свойство текучих тел оказывать сопротивление перемещению одной их части относительно другой.

Реология жидкостей изучает их деформационные свойства, способы исследования этих свойств, а также физико - химическую природу жидкостей. Основными кинематическими переменными для жидкостей служат деформация и ее скорость. Поэтому для изучения реологических характеристик жидких сред устанавливают связь между приложенными внешними нагрузками и кинематическими параметрами.

Важнейшей характеристикой простых жидкостей и растворов является вязкость "эта", которая определяется отношением напряжения сдвига "тау" к скорости сдвига G:

$$\text{"эта"} = \frac{\text{"тау"}}{G}.$$

Жидкости, для которых "эта" зависит только от концентрации и температуры, называются ньютоновскими, а все другие жидкости называются неньютоновскими.

Различают динамическую, кинематическую, относительную, удельную, приведенную и характеристическую вязкости.

Динамическую вязкость "эта" обычно выражают в пуазах (пз) или сантипуазах (1 спз = 0,01 пз). Жидкость имеет вязкость 1 пз, если напряжение сдвига 1 дин/кв. см создает скорость сдвига 1 $с^{-1}$. В системе СИ динамическая вязкость выражается в паскалях за 1 с (Па х с), имеющих размерности (Н х с)/кв. м.

Когда плотность исследуемой жидкости "ро" включена непосредственно в измерение вязкости, то в этом случае получают кинематическую вязкость "ни":

$$"ни" = \frac{"эта"}{"ро"}.$$

Выражается она в стоксах (ст) или сантистоксах (1 сст = 0,01 ст), в системе СИ - в единицах $м^2 с^{-1}$.

В ряде случаев требуется определить вязкость одной жидкости относительно другой - относительную вязкость "эта$_{отн}$".

Часто вязкость выражают как удельную вязкость "эта$_{уд}$", которая показывает, какая часть вязкости раствора обусловлена присутствием в нем растворенного вещества:

$$"эта_{уд}" = \frac{"эта" - "эта0"}{"эта0"} = \frac{"эта"}{"эта0"} - 1 = "эта_{отн}" - 1,$$

где "эта" - вязкость раствора; "эта0" - вязкость растворителя.

Удельная вязкость, отнесенная к единице концентрации раствора, называется приведенной вязкостью "эта$_{прив}$":

$$"эта_{прив}" = \frac{"эта_{уд}"}{с},$$

где с - концентрация раствора.

Для растворов полимеров вязкость является функцией молекулярных масс, формы, размеров и гибкости макромолекул. Чтобы определить структурные характеристики полимеров, приведенную вязкость экстраполируют к нулевой концентрации. В этом случае вводится понятие характеристической вязкости ["эта"]:

$$\lim_{с \to 0} ["эта"] = \lim_{с \to 0} "эта_{при}" = \lim \frac{"эта_{уд}"}{с}.$$

Характеристическая вязкость выражается в единицах, обратных единицам концентрации.

Методы определения вязкости жидкостей

Измерение вязкости на капиллярных вискозиметрах

Для измерения кинематической вязкости применяются капиллярные вискозиметры типа Оствальда и Уббелоде с различными модификациями. Если известна плотность исследуемой жидкости "ро", то, зная "ни", можно вычислить динамическую вязкость "эта". Следует отметить, что

капиллярные вискозиметры обычно используются для определения вязкости при одном значении скорости сдвига. Поэтому такие вискозиметры применяются в основном для исследования ньютоновских жидкостей. Капиллярные вискозиметры просты и удобны в обращении.

Стеклянные капиллярные вискозиметры, соответствующие ГОСТу 10028-81, предназначены: 1) серии ВПЖ и ВПЖТ - для определения вязкости прозрачных жидкостей, 2) серии ВПЖМ и ВПЖТМ - для определения вязкости малых объемов прозрачных жидкостей, 3) серии ВНЖ и ВНЖТ - для определения вязкости непрозрачных жидкостей.

На рис. 6 <*> представлен общий вид вискозиметра серии ВПЖ. Вискозиметр состоит из капилляра с радиусом R и длиной L, через который под действием силы тяжести протекает жидкость объема V. Измерения проводят следующим образом. В колено 2 вискозиметра наливают измеренный объем жидкости и вискозиметр помещают в термостат. Когда жидкость в вискозиметре примет заданную температуру (с точностью +/-0,01 град. С), производят подсасывание через отверстие 1 до тех пор, пока жидкость не поднимется выше отметки М1. Тогда подсасывание прекращают, и жидкость опускается. Время t, которое требуется, чтобы мениск прошел расстояние между отметками М1 и М2, замеряют. Если Н - средняя высота жидкости, g - ускорение силы тяжести, то:

$$"ни" = \frac{"эта"}{"ро"} = \frac{"пи"R^4 gH}{8LV} t = Kt,$$

где $K = \frac{"пи"R^4 gH}{8LV}$ - постоянная прибора, обычно выражаемая в кв. мм x $с^{-2}$ (при этом поправками на концевые эффекты и кинетическую энергию пренебрегают).

<*> Рис. 6. Вискозиметр стеклянный капиллярный серии ВПЖ. 1 - трубка; 2 - трубка; 3 - измерительный резервуар; М1, М2 - отметки измерительного резервуара. (Рисунок не приводится).

Для определения вязкости в каждом конкретном случае капиллярные вискозиметры выбирают в соответствии с таблицей ГОСТ 10028-81 по известным значениям К и V в зависимости от характера изучаемой жидкости, ее объема и значения вязкости.

Измерения времени t проводят не менее 5-7 раз. При этом разность между наибольшим и наименьшим временем истечения жидкости между отметками не должна превышать 0,3% среднего его значения.

Для определения относительной вязкости жидкости измеряют время tocp истечения между верхней и нижней меткой мениска той жидкости, относительно которой проводят измерения "эта $_{отн}$". Затем в том же чистом и сухом вискозиметре при тех же условиях определяют время истечения tcp исследуемой жидкости. Одновременно измеряют плотности изучаемых жидкостей пикнометром ПЖ по ГОСТу 22524-77 - "ро $_0$" и "ро" и рассчитывают относительную вязкость по формуле:

$$"эта_{отн}" = \frac{tcp\ "ро"}{tocp\ "ро_0"}.$$

Для измерения характеристической вязкости готовят не менее пяти различных концентраций исследуемого раствора. При этом должно выполняться условие возможности линейной экстраполяции приведенной вязкости к нулевой концентрации, т.е. концентрации раствора следует выбирать минимальными в пределах чувствительности и точности метода измерения. Для каждой концентрации раствора определяют tcp и рассчитывают приведенную вязкость. Затем строят зависимость "эта $_{прив}$" от концентрации "с" и графически или линейным методом наименьших квадратов экстраполируют приведенную

вязкость к нулевой концентрации, т.е. находят характеристическую вязкость.

ИЗМЕРЕНИЕ ВЯЗКОСТИ НА РОТАЦИОННЫХ ВИСКОЗИМЕТРАХ

Ротационные вискозиметры обычно используют для измерения динамической вязкости. Они представляют собой системы с жесткими соосно расположенными цилиндрами, конусами или дисками, в которых осуществляется сдвиговое течение (рис. 7). <*> Ротационные вискозиметры позволяют определять реологические свойства жидкостей в широком диапазоне скоростей сдвига, что особенно важно для неньютоновских жидкостей.

<*> Рис. 7. Геометрия ротационных вискозиметров.

а: М - момент сопротивления; R - радиус внутреннего цилиндра; "дельта" - внешний цилиндр; L - высота исследуемой жидкости; "ОМЕГА" - угловая скорость вращения внешнего цилиндра; б: М - момент сопротивления: R - радиус внутреннего конуса; "фи" - угол внутреннего конуса; L - высота цилиндрической части внутреннего конуса; "дельта" - внешний цилиндр; "ОМЕГА" - угловая скорость вращения внешнего цилиндра. (Рисунок не приводится).

Для экспресс - анализов вязкости ньютоновских и неньютоновских жидкостей в диапазонах вязкости от 5×10^{-4} до 2 Па х с и от $2 \cdot 10^{4}$ Па х с предназначен ротационный погружной вискозиметр "Полимер РПЭ-1" (технические условия - 5И2.842.018 Ту от 01.01.84 г.). Он обеспечивает измерение вязкости при восьми скоростях сдвига и выпускается в двух модификациях - "Полимер РПЭ-1.1" и "Полимер РПЭ-1.2.". Вискозиметр имеет диапазон рабочих температур от 20 до 200 град. С.

Ротационные вискозиметры серии ВИР (микрореометры, микроэлектрореометры) относятся к классу В, группе 2 по ГОСТу 20790-75, ГОСТу 13368-73 и ГОСТу 22968-78. Они предназначены для определения реологических характеристик жидких сред в широком диапазоне скоростей сдвига от 0,197 до 156 $с^{-1}$. Эти вискозиметры выпускаются в различных модификациях - ВИР-75МБ, ВИР-72, ВИР-77МЭ, ВИР-78МЭ. Для иллюстрации на рис. 8 <*> представлена кинематическая схема микрореометра ВИР-75МБ.

<*> Рис. 8. Кинематическая схема микрореометра ВИР-75МБ.

1 - торсионный элемент; 2 - воспринимающий цилиндр; 3 - стрелка прибора; 4 - шкала прибора; 5 - синхронный двигатель; 6 - внешний цилиндр; 7 - редуктор. (Рисунок не приводится).

Для измерения внешний цилиндр заполняют исследуемой жидкостью. Замеры начинают при наименьшей скорости вращения внешнего цилиндра. В качестве датчика используется гальванометр. Вязкость ньютоновской жидкости определяется по формуле:

"эта" = m"альфа",

где "эта" - измеряемая вязкость; m - число делений, отсчитываемое по шкале гальванометра; "альфа" - цена деления для данного диапазона измерений.

При исследованиях неньютоновских жидкостей по шкале гальванометра определяется величина момента сопротивления, обусловленного вязкостью среды. Эффективное значение динамической вязкости находится как отношение тангенциального напряжения сдвига к скорости сдвига. Задавая различные скорости вращения внешнего цилиндра, можно построить кривые зависимости вязкости от скорости сдвига и напряжения сдвига от скорости сдвига.

ИЗМЕРЕНИЕ ВЯЗКОСТИ НА ВИСКОЗИМЕТРЕ С ПАДАЮЩИМ ШАРИКОМ

Вискозиметры Гепплера с падающим шариком выпускаются фирмой "Прюфгерете - Верк Мединген" (ГДР) - ASMW - VM-168-76. Измерение вязкости на этих приборах основано на определении скорости падения шарика в жидкости.

На рис. 9 <*> показан общий вид вискозиметра с падающим

шариком. В комплект вискозиметра входят шарики с диаметром от 10,00 до 15,80 мм, что обеспечивает измерение динамической вязкости градуировочных жидкостей в диапазоне от 0,6 до 8×10^4 мПа х с.

<*> Рис. 9. Вискозиметр с падающим шариком.

1 - калибровочные отметки; 2 - шарик. (Рисунок не приводится).

Для измерения вязкости исследуемую жидкость заливают в трубку, опускают шарик и вискозиметр термостатируют при необходимой температуре в течение примерно 30 мин с точностью +/-0,02 град. С. Далее шарик ставят в исходное положение и включают секундомер, когда нижняя часть шарика коснется верхней метки, и останавливают, когда шарик достигнет нижней метки. Время движения шарика измеряют не менее пяти - семи раз. При этом разность между наибольшим и наименьшим значениями времени движения шарика не должна превышать 0,3% среднего его значения.

Динамическую вязкость исследуемой жидкости вычисляют по формуле:

$$\text{"эта"} = K(\text{"ро "}_{ш} - \text{"ро "}_{ж})t_{ср},$$

где "эта" - динамическая вязкость; К - постоянная вискозиметра; "ро "$_ш$ и "ро"$_ж$ - плотности шарика и жидкости соответственно; $t_{ср}$ - среднее время движения шарика между крайними метками.

Постоянная вискозиметра К определяется по формуле:

$$K = \frac{\text{"эта0"}}{(\text{"ро "}_{ш} - \text{"ро "}_{0ж})t_{0ср}},$$

где "эта0" - динамическая вязкость градуировочной жидкости; "ро "$_ш$ и "ро "$_{0ж}$ - плотности шарика и градуировочной жидкости соответственно; $t_{0ср}$ - среднее значение времени движения данного шарика в градуировочной жидкости.

Число постоянных вискозиметра соответствует числу шариков, входящих в комплект вискозиметра.

При необходимости постоянные прибора могут быть проверены по вышеуказанной формуле с помощью градуировочных жидкостей с известными значениями динамической вязкости (РД 50-366-82).

Плотность шариков "ро"$_ш$ вычисляют по формуле:

$$\text{"ро "}_{ш} = \frac{6m}{\text{"пи"}D^3},$$

где m - масса шарика, определяемая взвешиванием; D - диаметр шарика, измеряемый скобой типа СР по ГОСТу 11098-75.

Перед проведением измерений вискозиметр следует тщательно промыть и высушить. Проверку вискозиметра производят в соответствии с методическими указаниями (РД 50-366-82).

ФИЗИКО - ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

ХРОМАТОГРАФИЯ

Хроматографией называется процесс разделения смесей веществ, основанный на количественных различиях в поведении разделяемых компонентов при их непрерывном

перераспределении между двумя контактирующими фазами, одна из которых неподвижна, а другая имеет постоянное направление движения.

По механизму, лежащему в основе разделения, различают адсорбционную, распределительную, ионообменную и некоторые другие виды хроматографии.

Адсорбционная хроматография

В основе адсорбционной хроматографии лежит непрерывный обмен хроматографируемым веществом между неподвижной (твердой или жидкой) и подвижной фазами, обусловленный существованием на поверхности раздела фаз динамического равновесия между процессами адсорбции и десорбции хроматографируемого вещества, растворенного в подвижной фазе.

Для эффективного разделения решающее значение имеет подбор комбинации подвижной и неподвижной фаз. Чаще всего для целей адсорбционной хроматографии в качестве неподвижной фазы используют твердые сорбенты: диатомит, кремниевую кислоту, кизельгур, силикагель, окись алюминия, активированный уголь, молекулярные сита и различные полимеры.

При подборе жидкой подвижной фазы руководствуются элюотропным рядом растворителей по Шталю: гексан, гептан, циклогексан, четыреххлористый углерод, бензол, хлороформ, эфир, этилацетат, пиридин, ацетон, этанол, метанол, вода. Растворители в элюотропном ряду расположены в порядке возрастания полярности (диэлектрической проницаемости).

Распределительная хроматография

В основе распределительной хроматографии лежит процесс непрерывного перераспределения хроматографируемых веществ между двумя фазами (подвижной и неподвижной), причем эти вещества растворимы в каждой из фаз.

Отношение равновесных концентраций растворенного вещества в каждой из находящихся в контакте фаз в статистических условиях при данной температуре является постоянной величиной и называется коэффициентом распределения.

Применительно к хроматографическим процессам коэффициент распределения высчитывается как отношение концентрации хроматографируемого вещества в более полярной фазе к его концентрации в менее полярной фазе.

Если более полярной является неподвижная фаза, возрастание коэффициента распределения приводит к уменьшению хроматографической подвижности вещества.

Ионообменная хроматография

В основе ионообменной хроматографии лежит обратимая хемосорбция ионов анализируемого раствора ионогенными группами сорбента. Обратимый обмен ионами в системе сорбент - растворитель протекает в этом случае с соблюдением стехиометрических отношений.

В зависимости от характера ионогенных групп ионообменные сорбенты (иониты) разделяются на катионообменные (катиониты) и анионообменные (аниониты).

Макромолекулы катионитов содержат кислотные группы различной силы, такие как сульфогруппы, карбоксильные и оксифенильные группы.

Макромолекулы анионитов, наоборот, имеют в своем составе основные группы, например алифатические или ароматические аминогруппы различной степени замещенности (вплоть до четвертичных).

В Н-форме катиониты и в ОН-форме аниониты соответственно содержат в способном к обмену состоянии только ионы водорода или гидроксила. В солевых формах ионы водорода заменены катионами металлов или органических оснований, а анионы гидроксила - анионами кислот.

Применение ионитов для цели хроматографического анализа возможно как в солевых, так и в Н- и ОН-формах.

В практике наиболее часто используют сильнокислые катиониты КУ-2, СДВ-3; слабокислые катиониты КБ-4, КБ-4П-2; сильноосновные аниониты АВ-16, АВ-17 и слабоосновные аниониты АН-2Ф, ТМ.

Способы хроматографического разделения

Хроматографическое разделение при использовании жидкой подвижной фазы проводят на колонках, бумаге и в тонких слоях сорбентов. Хроматографическое разделение с использованием газообразной подвижной фазы проводят на колонках.

ХРОМАТОГРАФИЯ НА КОЛОНКАХ

Процесс хроматографирования, протекающий с использованием сорбента (или твердого носителя), помещенного в цилиндрическую колонку, получил название хроматографии на колонках. На колонках может быть реализован любой из описанных выше механизмов хроматографического разделения.

Хроматографическая колонка представляет собой стеклянную трубку, снабженную на выходе краном.

Анализируемый препарат в виде раствора или смеси с небольшим количеством сорбента помещают в хроматографическую колонку сверху. После этого через колонку с определенной скоростью (около 20 капель в 1 мин) пропускают подвижную фазу, что должно приводить к разделению хроматографируемой смеси по длине колонки на более или менее отдаленные друг от друга зоны, содержащие индивидуальные вещества. Эти зоны перемещаются по сорбенту со скоростью, меньшей скорости течения подвижной фазы. Это позволяет для выделения отдельных компонентов анализируемой смеси использовать элюентный метод, т.е. пропускать подвижную фазу через колонку до тех пор, пока разделенные вещества не будут элюированы из нее. Последовательность элюирования отдельных веществ зависит от их хроматографической подвижности в данных условиях. Элюат собирают по фракциям. При необходимости в ходе элюирования можно менять состав подвижной фазы, увеличивая ее полярность. Вещества, содержащиеся в различных фракциях элюата, могут быть выделены и определены качественно и количественно обычными препаративными и аналитическими методами. Применение элюентного метода делает возможным многократное использование хроматографических колонок.

Хроматографирование на колонках чаще всего используется при проведении ионообменной хроматографии.

Для проведения ионообменной хроматографии колонку заполняют заранее подготовленной ионообменной смолой. Если в частной статье не указано иначе, 5-10 г ионита (с размером частиц 0,2-0,5 мм) помещают в стакан, 2-3 раза промывают водой. Заливают разведенной хлористоводородной кислотой и выдерживают при периодическом перемешивании 12 ч, после чего отмывают водой до отрицательной реакции на хлориды.

В случае работы с анионитом его для перевода в основную форму после отмывки от хлористоводородной кислоты водой заливают 5% раствором карбоната натрия или 2% раствором едкого натра на 2 ч (во время выдержки необходимо периодическое перемешивание). Эту операцию повторяют до получения отрицательной реакции сливаемого раствора на хлориды. Обработку раствором щелочи следует производить в условиях, исключающих поглощение углекислого газа из воздуха.

Подготовленные иониты промывают водой и сливают в колонку, заполненную на 3/4 водой. Избыток воды сливают из колонки через кран. Из слоя ионита пузырьки воздуха удаляют осторожным встряхиванием колонки или обратным током воды. Заполненную колонку промывают до нейтральной реакции, следя за тем, чтобы сорбент постоянно находился под слоем жидкости. Если ионит всплывает, над его слоем необходимо поместить тампон из стеклянной ваты.

Хроматографирование проводят, пропуская анализируемый раствор через колонку. Процесс завершается промыванием колонки.

Количество продуктов ионного обмена, содержащееся в смеси прошедшего через колонку анализируемого раствора и промывочной жидкости, эквивалентно количеству адсорбированных на колонке катионов или анионов анализируемого раствора. Это позволяет проводить количественные определения прямым титрованием продуктов ионного обмена. В случае хроматографирования на ионите, находящиеся в Н- или ОН-форме, продукты ионного обмена титруют соответственно основными или кислыми титрантами.

Как правило, возможно многократное использование ионообменной хроматографической колонки. Если в частной статье не указано иначе, регенерацию катионитов и анионитов после проведения ряда определений осуществляют, пропуская через колонку соответственно 4% раствор хлористоводородной кислоты или 5% раствор карбоната натрия (2% раствор едкого натра). По окончании процесса, когда концентрации регенерирующего раствора на входе и выходе из колонки становятся равными, ее промывают водой до нейтральной реакции.

ХРОМАТОГРАФИЯ НА БУМАГЕ

Хроматографический процесс, протекающий на листе фильтровальной бумаги при перемещении по ее капиллярам и поверхности подвижной жидкой фазы, называется хроматографией на бумаге.

Неподвижной фазой является либо сама бумага, либо вещества, предварительно нанесенные на ее волокна. Механизм хроматографии на бумаге бывает распределительным или адсорбционным. Перемещение подвижной фазы осуществляется либо исключительно под

действием капиллярных сил (восходящая хроматография), либо под действием капиллярных сил и силы тяжести (нисходящая хроматография).

При хроматографировании анализируемые вещества образуют на бумаге круглые или овальные пятна (зоны). Совокупность пятен, полученных при хроматографировании данного анализируемого образца, называется хроматограммой.

Подвижности вещества при хроматографировании характеризуются величиной Rf, представляющей собой отношение средних скоростей перемещения вещества и подвижной фазы за время получения хроматограммы. На экспериментально определяемые значения Rf заметно влияют условия хроматографирования. Более точной оценкой хроматографической подвижности, мало чувствительной к влиянию случайных отклонений в условиях проведения эксперимента, является величина Rs, представляющая собой отношение величины Rf одного вещества к величине Rf другого вещества, принятого за стандарт. Обычно выбор стандарта осуществляют так, чтобы величины Rs лежали в пределах 0,5-2. Величины Rf и Rs используют для ориентировочной идентификации веществ. Подлинность определяется при одновременном хроматографировании на одном листе бумаги анализируемого и аутентичного образца одного и того же вещества. Если образцы идентичны, соответствующие им пятна на хроматограммах имеют одинаковый вид и равные значения Rf. Для цели идентификации иногда целесообразно хроматографировать смесь равных количеств анализируемого и аутентичного образцов данного вещества. На хроматограмме должно наблюдаться одно пятно. Условия хроматографирования следует подбирать так, чтобы значения Rf были отличны от 0 и 1.

При испытаниях на чистоту примеси и основное вещество в условиях хроматографирования должны иметь разные значения Rf. При этом условии можно судить о степени чистоты анализируемого вещества по величине и интенсивности окраски обнаруживаемых на хроматограмме пятен примесей. Содержание примесей может быть определено полуколичественно. Для этого на одном листе бумаги одновременно получают хроматограмму определенного количества анализируемого вещества и несколько хроматограмм образца определяемой примеси (свидетеля), взятого в различных, точно отмеренных количествах. Содержание примеси в анализируемом образце оценивают, сравнивая ее пятно на хроматограмме по совокупности величины и интенсивности окраски с пятнами свидетеля. При достаточном сходстве пятен примеси по форме и окраске с пятнами основного вещества, взятого в том же количестве, допускается использование соответствующих количеств основного вещества в качестве свидетелей при хроматографировании. Количественное определение веществ после хроматографического разделения проводится денситометрически непосредственно на хроматограмме либо после элюирования. В последнем случае пятна вырезают и после измельчения извлекают определяемое вещество из бумаги каким-либо подходящим растворителем. Содержание анализируемого вещества в извлечении или сухом остатке, после отгонки растворителя находят любым методом, пригодным для определения малых количеств (спектрофотометрия, полярография и т.д.).

Оборудование

Для проведения хроматографии на бумаге используют герметизированные камеры, изготовленные из инертного материала. Часто в качестве камер используют стеклянные банки, закрывающиеся пришлифованной крышкой. Внутри камеры в верхней или нижней ее части помещают сосуд для подвижной фазы (лодочку).

Лодочка должна вмещать объем подвижной фазы, достаточный для проведения однократного хроматографирования. Длина лодочки должна превышать ширину листа хроматографической бумаги. Камера должна быть снабжена устройствами для закрепления листа хроматографической бумаги в рабочем положении и для ввода в лодочку подвижной фазы.

Внутренние стенки камеры обкладывают фильтровальной бумагой, что способствует более быстрому и полному ее насыщению парами растворителей, применяемых при хроматографировании.

Подготовка фаз и бумаги

При приготовлении несмешивающихся систем растворителей, совместно используемых при хроматографии в качестве подвижной и неподвижной фаз, необходимо обеспечить их взаимное насыщение, например, путем встряхивания в делительной воронке.

Фильтровальную бумагу нужной плотности квалификации "для хроматографии" разрезают в направлении, перпендикулярном или параллельном волокнам, на листы (полосы), длина которых приблизительно равна высоте камеры. Ширина этих полос может быть приближенно определена по формуле: $A = 3(K + 1)$, где A - ширина полосы (см), K - количество хроматограмм на полосе.

На каждой полосе бумаги для обозначения места нанесения хроматографируемых веществ графитовым карандашом проводят прямую линию, называемую линией старта. Расстояние от конца полосы бумаги до линии старта выбирается так, чтобы при погружении бумаги в лодочку исключалось непосредственное соприкосновение нанесенных на линию старта веществ с жидкостью, находящейся в лодочке.

На приготовленные таким образом листы хроматографической бумаги, если указано в частной статье, наносят неподвижную фазу. Для этого соответствующие труднолетучие растворители (формамид, пропиленгликоль и т.п.) смешивают с легколетучими растворителями (обычно с метиловым спиртом) и в полученную смесь на 1-2 с погружают подлежащие обработке листы бумаги. Избыток смеси с поверхности листов снимают, обжимая их между двумя слоями фильтровальной бумаги, после чего летучий компонент смеси удаляют высушиванием на воздухе в течение 15-20 мин.

Если в качестве неподвижной фазы рекомендован водный раствор нелетучих веществ, то бумагу обрабатывают этим раствором, высушивают, как указано выше, а перед хроматографированием выдерживают в камере, содержащей пары воды. Нанесение на бумагу легколетучих компонентов неподвижных фаз осуществляется путем выдерживания ее в парах фазы в камере непосредственно перед хроматографированием.

Методика хроматографического разделения

Нисходящая хроматография

На дно хроматографической камеры помещают неподвижную или подвижную фазу в количестве, достаточном для образования слоя глубиной 2,5 см. Камеру закрывают и оставляют для насыщения на 24 ч при постоянной температуре. В отдельных случаях, при использовании достаточно летучих растворителей, это время может быть сокращено.

Растворы веществ наносят на линию старта микропипеткой или микрошприцем так, чтобы расстояние между точками нанесения отдельных проб было не менее 3 см. Если минимально необходимое для проведения хроматографирования количество анализируемого раствора может образовывать на бумаге пятно, превышающее в диаметре 10 мм, нанесение проводят в несколько приемов, предотвращая путем подсушивания чрезмерное растекание пятна на линии старта. После нанесения растворов анализируемых веществ и высыхания образовавшихся при этом пятен полосу бумаги закрепляют в рабочем положении в камере и оставляют на 1,5 ч. В рабочем положении полоса хроматографической бумаги должна висеть вертикально так, чтобы между ее верхним концом, погруженным в лодочку, и линией старта был лишь один, по возможности плавный, перегиб. По окончании выдержки начинают хроматографирование, для чего в лодочку вливают подвижную фазу. Хроматографирование обычно заканчивают при приближении фронта подвижной фазы к нижнему концу полосы бумаги. Если в частной статье нет специальных указаний, полосу вынимают из камеры и высушивают на воздухе, отметив графитовым карандашом конечное положение подвижной фазы. Пятна открывают как указано в частной статье.

Восходящая хроматография

Для проведения восходящей хроматографии на бумаге используют камеры, в которых сосуд (лодочка) с подвижной фазой располагается в нижней части или на дне. Полоса хроматографической бумаги закрепляется в верхней части камеры так, чтобы обеспечить возможность погружения нижнего конца полосы в лодочку с подвижной фазой. В рабочем положении полосы линия старта должна отстоять от поверхности подвижной фазы на 2-3 см. В остальном приемы работы при проведении восходящей хроматографии на бумаге не отличаются от описанных выше.

Обработка хроматограмм

По окончании хроматографирования пятна веществ на хроматограммах открывают при просмотре в видимом или ультрафиолетовом свете. При необходимости хроматограмму предварительно обрабатывают (погружением или опрыскиванием) раствором реактива, дающего цветные реакции с хроматографируемыми веществами.

В отдельных случаях пятна обнаруживают путем установления факта угнетения или стимулирования роста бактерий в непосредственной близости от пятна при помещении хроматограммы на инокулированную среду.

Для обнаруженных пятен вычисляют величину Rf по уравнению:

$$Rf = \frac{a}{b},$$

где a - расстояние от линии старта до центра пятна; b - расстояние от линии старта до фронта подвижной фазы.

ХРОМАТОГРАФИЯ В ТОНКОМ СЛОЕ СОРБЕНТА

Хроматографический процесс, протекающий при движении подвижной фазы в тонком слое сорбента (носителя), нанесенном на инертную поверхность, называется хроматографией в тонком слое сорбента.

Неподвижной фазой в данном случае являются сам твердый сорбент либо вещества, предварительно на него нанесенные. Механизм хроматографического разделения может быть различным, но чаще всего он является адсорбционным. Перемещение подвижной фазы в слое сорбента с целью упрощения аппаратурного оформления процесса хроматографирования, как правило, осуществляется восходящим методом, т.е. под действием капиллярных сил.

По сравнению с хроматографией на бумаге хроматография в тонком слое сорбента имеет ряд преимуществ, основными из которых являются: высокая скорость процесса хроматографирования, возможность использования в качестве неподвижных фаз (носителей) разнообразных сорбентов, а также сильнокислых, щелочных или иных взаимодействующих с бумагой подвижных фаз и жестких методов открытия пятен путем обработки хроматограмм агрессивными веществами при повышенных температурах.

Для хроматографирования могут использоваться готовые пластинки с закрепленным слоем сорбента, выпускаемые промышленностью, и пластинки со специально приготовленным тонким слоем сорбента.

Приготовление пластинок с тонким слоем сорбента

Обычно слой сорбента (чаще всего силикагеля или окиси алюминия квалификации "для хроматографии") с размером частиц 150-200 меш (сито N 61; ГОСТ 4403-67) наносят на стеклянные матовые пластинки подходящего размера. Для закрепления слоя применяют добавки сульфата кальция $CaSO_4 \times 1/2H_2O$ (гипса) или крахмала. Нанесение слоя может осуществляться следующими способами.

Способ 1. Для получения закрепленного слоя сорбента толщиной около 200-300 мкм с площадью 100 кв. см 2 г силикагеля или окиси алюминия (150-200 меш) и 0,1 г гипса растирают с 5 мл воды в фарфоровой ступке до образования однородной жидкой массы, которую немедленно выливают на горизонтально расположенные, тщательно вымытые стеклянные пластинки выбранного размера. Массу разравнивают шпателем и полученный таким образом слой сушат при комнатной температуре, предохраняя от возможных механических и химических загрязнений. Если в частной статье не указано иначе, пластинки активируют в сушильном шкафу при 120 град. С в течение 1 ч. Готовые пластинки с тонким слоем сорбента хранят в эксикаторе над силикагелем или хлоридом кальция.

Примечание. Для получения слоя толщиной около 100-150 мкм нанесение указанного выше количества массы проводят на пластинки с общей площадью 200 кв. см.

Способ 2. Для получения закрепленного слоя сорбента толщиной в несколько десятков микрон 2-3 г гипса растирают в ступке в 40 мл метилового спирта. В суспензию гипса, продолжая растирание, добавляют 40 г силикагеля или окиси алюминия (200-400 меш) и 140 мл хлороформа. Полученную суспензию сорбента из расчета 4,5 мл на 100 кв. см поверхности выливают на тщательно вымытые сухие стеклянные пластинки, расположенные горизонтально. Пластинки, если в частной статье не указано иначе, сушат на воздухе в течение 10-15 мин.

Суспензии сорбентов сохраняют в колбах с притертой пробкой, тщательно взбалтывая перед употреблением.

Способ 3. Для приготовления незакрепленного слоя сорбента последний насыпают на горизонтально расположенное матовое стекло и разравнивают до получения слоя толщиной 1-2 мм валиком из нержавеющей стали диаметром 6-8 мм с цилиндрическими утолщениями на обоих концах. Диаметр утолщения должен превышать на 2-4 мм диаметр валика (соответственно предполагаемой толщине слоя). Длина средней части валика должна быть на 20-30 мм меньше ширины стекла, на которое наносится слой сорбента. Вместо металлического валика можно использовать стеклянную палочку с надетыми на концы кусками резиновой или полиэтиленовой трубки, имеющей подходящую толщину стенки и диаметр.

Методика хроматографического разделения

Для разделения веществ методом хроматографии в тонком слое сорбента используют хроматографические камеры подходящего размера. На дно камеры наливают подвижную фазу в количестве, достаточном для образования слоя глубиной 0,5 см, камеру закрывают и выдерживают для насыщения парами растворителей 30-60 мин. Стенки камеры для полноты насыщения можно обкладывать фильтровальной бумагой. Анализируемый раствор наносят микропипеткой или микрошприцем на линию старта, проведенную на расстоянии 2-3 см от нижнего края пластинки, так, чтобы пятна образцов отстояли друг от друга и от краев слоя сорбента не менее чем на 2 см. Нежелательное растекание пятен анализируемых проб при нанесении предотвращают путем периодического подсушивания.

После окончательного высыхания нанесенных на линию старта пятен пластинку вносят в камеру. Нижний край пластинки при этом должен погрузиться в подвижную фазу на 0,5-1 см.

Пластинки с закрепленным слоем сорбента располагают под углом 60-90 град., а пластинки с незакрепленным слоем сорбента - под углом 15-20 град. к поверхности жидкости. Когда фронт растворителя пройдет 10-15 см, пластинку вынимают, отмечают положение фронта и открывают пятна хроматографировавшихся веществ, как указано в соответствующей частной статье. Опрыскивание незакрепленного слоя сорбента проводят немедленно после завершения процесса хроматографирования, не допуская высыхания хроматограммы. Результаты хроматографирования оценивают, как описано в разделе "Хроматография на бумаге" настоящей статьи.

СПЕЦИАЛЬНЫЕ ПРИЕМЫ ХРОМАТОГРАФИИ НА БУМАГЕ И В ТОНКОМ СЛОЕ СОРБЕНТА

При необходимости достигнуть лучшего разделения анализируемых смесей веществ методами хроматографии на бумаге и в тонком слое сорбента можно применять специальные приемы хроматографирования - повторное и двухмерное.

Повторное хроматографирование заключается в том, что после завершения первого хроматографирования пластинку или бумагу высушивают и подвергают повторному пропусканию той же или иной подвижной фазы в том же направлении.

При двухмерном хроматографировании повторное пропускание той же или иной подвижной фазы осуществляют в направлении, перпендикулярном направлению первоначального движения. Двухмерное хроматографирование целесообразно осуществлять на квадратных пластинках или листах бумаги. Анализируемая проба при этом наносится на диагональ квадрата вблизи одного из его углов.

Двухмерную хроматографию с использованием одной и той же подвижной фазы часто применяют для проверки устойчивости веществ в условиях хроматографирования. Устойчивые вещества образуют пятна, лежащие только на диагонали пластинки или листа бумаги.

Газовая хроматография

Газовая хроматография - это хроматография, в которой подвижная фаза находится в состоянии газа или пара. В фармацевтическом анализе находит применение как газожидкостная, так и газоадсорбционная хроматография. В газожидкостной хроматографии неподвижной фазой служит жидкость, нанесенная на твердый носитель, в газоадсорбционной хроматографии неподвижной фазой служит твердый адсорбент. В дальнейшем твердый носитель с нанесенной на него жидкой фазой и адсорбент будут обозначаться термином "сорбент". Анализируемые вещества вводятся в поток газа-носителя, испаряются и в парообразном состоянии проходят через колонку с сорбентом, распределяясь в результате многократного повторения актов сорбции и десорбции между газовой и жидкой или газовой и твердой фазами. Отношение количества вещества в неподвижной фазе к количеству вещества в подвижной фазе представляет собой коэффициент распределения, который, в частности, зависит от природы растворенного вещества и количества неподвижной фазы.

Разделенные вещества элюируются из хроматографической колонки потоком газа-носителя, регистрируются детектором и фиксируются на хроматограмме в виде пиков. Полученная хроматограмма служит основой для качественного и количественного анализа смеси веществ. Метод газовой хроматографии применяется для анализа летучих веществ либо веществ, которые могут быть переведены в летучие с помощью специальных приемов и устройств в парообразное состояние.

Газовый хроматограф состоит из систем: измерения и регулирования скорости потока газа - носителя и вспомогательных газов (для детектора); ввода пробы анализируемого образца; газохроматографических колонок, а также систем детектирования, регистрации (и обработки) хроматографической информации; термостатирования и контроля температуры колонок, детектора и системы ввода проб.

Газ - носитель поступает в хроматограф из баллона через редуктор. Обычно в качестве газа - носителя применяют гелий, азот, аргон. При работе с детектором по теплопроводности предпочтительнее гелий, так как он обеспечивает максимальную чувствительность детектора благодаря высокой теплопроводности по сравнению с большинством органических соединений.

Система ввода пробы анализируемого образца обычно состоит из испарителя и мембраны из термостойкой резины, которая прокалывается при вводе пробы. Некоторые хроматографы снабжены также специальными дозаторами для ввода газообразных и твердых веществ. Анализируемые вещества поступают в колонку в парообразном состоянии, поэтому температура испарителя должна обеспечить возможно быстрое испарение компонентов пробы. Жидкие пробы вводят в хроматограф микрошприцем. Объем вводимой пробы зависит от типа детектора, количества неподвижной жидкой фазы и диаметра колонки. Обычно для насадочной аналитической колонки объем пробы жидкости составляет 0,1-1 мкл, а газа - от 0,5 до 5 мл.

Газохроматографическая колонка представляет собой прямую, спиральную или U-образную трубку, обычно изготовленную из нержавеющей стали или стекла с внутренним диаметром от 0,6 до 5 мм. Наиболее часто используются колонки длиной 1-3 м.

Эффективность газохроматографической колонки n, характеризующая степень расширения зоны определяемого вещества на выходе газохроматографической колонки, определяется по формуле:

$$n = 5{,}545 \left[\frac{l}{\text{"ми}_{0,5}\text{"}}\right]^2,$$

где l - время удерживания вещества, выраженное в единицах длины диаграммной ленты (например, мм); "ми$_{0,5}$" - ширина хроматографического пика, измеренная на половине его высоты и выраженная в тех же единицах, что и расстояние удерживания.

Степень газохроматографического разделения веществ R определяют по формуле:

$$R = \frac{\text{"ДЕЛЬТА"}l}{\text{"ми}_{0,5}(1)\text{"} + \text{"ми}_{0,5}(2)\text{"}},$$

где "ДЕЛЬТА"l - разность расстояний времен удерживания разделяемых веществ 1 и 2.

Температура колонки должна обеспечивать оптимальное разделение компонентов смеси при достаточно коротком времени анализа.

Для анализа смесей с широким диапазоном температур кипения компонентов целесообразно применять газовую хроматографию с программированием температуры либо газовую хроматографию с программированием расхода газа - носителя, либо сочетание этих видов газовой хроматографии.

Твердый носитель служит для удержания тонкой равномерной пленки неподвижной жидкой фазы, его поверхность должна обеспечивать достаточное разделение. Он должен иметь достаточную механическую прочность и быть инертным как по отношению к анализируемым веществам, так и к жидкой фазе. В качестве твердых носителей применяют материалы на основе кремнезема - диатомита или кизельгура (например, сферохромы, хроматоны, хезосорбы, целиты); фторуглеродных полимеров (например, тефлон, полихром); полистирола и сополимеров стирола и дивинилбензола (полисорбы). В отдельных случаях в качестве твердых носителей могут использоваться кристаллы некоторых солей (например, хлорида натрия), стеклянные шарики и графитированная сажа (карбохром). Наиболее часто используемый размер частиц твердого носителя от 0,1 до 0,5 мм. В зависимости от задач анализа свойства носителей можно изменять обработкой их кислотами или щелочами, а также силанизированием.

Неподвижная жидкая фаза представляет собой, как правило, высококипящую жидкость. В качестве жидкой фазы обычно применяют: индивидуальные углеводороды или их смеси, например вазелиновое масло, апиезоны; силоксановые полимеры без функциональных групп; сложные эфиры и полиэфиры; простые эфиры; полифенилы; амиды; силоксановые полимеры с привитыми нитрильными или галогеналкильными группами; одно- и многоатомные спирты; полигликоли; амины; жирные кислоты и т. д.

Перед работой с новой колонкой ее следует кондиционировать при температуре, как правило, на 10-30 град. С превышающей рабочую температуру, в токе газа-носителя в течение

нескольких часов. Важно следить за тем, чтобы температура термостата колонки не превышала температурного предела применения данной фазы.

Как правило, неподвижная жидкая фаза наносится на твердый носитель в количестве 1-20% от его массы, наиболее часто используются колонки с содержанием жидкой фазы до 5-10% от массы твердого носителя. Нанесение жидкой фазы на носитель осуществляется из ее раствора в подходящем растворителе. Существует несколько методов нанесения жидкой фазы, из которых предпочтительнее пользоваться наиболее воспроизводимыми методами упаривания раствора при перемешивании в фарфоровой чашке или удаления растворителя в ротационном вакуумном испарителе.

Для обеспечения высокой эффективности разделения применяют капиллярную газовую хроматографию, в которой неподвижная жидкая фаза нанесена в виде тонкой пленки непосредственно на внутреннюю поверхность капилляра. Длина капиллярных колонок обычно составляет от 10 до 100 м, внутренний диаметр - от 0,1 до 0,6 мм.

Автоматическая система измерения, регистрации и обработки хроматографической информации включает в себя детектор, электронные устройства усиления, самопишущий измерительный прибор и интегратор.

Наиболее часто применяют детектор по теплопроводности и пламенно - ионизационный. Действие детектора по теплопроводности основано на изменении теплопроводности газа - носителя в присутствии других веществ. Он характеризуется большой универсальностью, так как чувствителен практически ко всем летучим органическим соединениям. Действие более чувствительного пламенно - ионизационного детектора основано на измерении тока насыщения ионизированной газовой смеси в зависимости от ее состава. Детектор чувствителен к органическим соединениям и нечувствителен к парам воды. Кроме этих двух детекторов, в газохроматографическом анализе лекарственных веществ, особенно если требуется повышенная чувствительность определения, можно использовать селективные детекторы, такие, как термоионный и электронозахватный.

Системы термостатирования и контроля температуры колонок, детектора, узла ввода пробы предназначены для обеспечения необходимых температурных режимов анализа.

Качественный анализ. Наиболее часто используемыми методами качественного анализа, применяемыми для идентификации лекарственных веществ, являются метод веществ - свидетелей и метод относительных удерживаний.

Метод веществ - свидетелей заключается в том, что непосредственно после анализа исследуемого образца в идентичных условиях проводят хроматографирование веществ, присутствие которых в исследуемой пробе вероятно. Совпадение времен удерживания любого из компонентов анализируемой пробы и вещества - свидетеля может служить доказательством идентичности обоих веществ. Можно ввести вещество - свидетель прямо в анализируемый образец. В этом случае критерием идентичности служит увеличение соответствующего пика на хроматограмме. Поскольку соединения различной структуры могут иметь совпадающие времена удерживания (удерживаемые объемы), для большей достоверности проводимой идентификации хроматограммы анализируемого образца и веществ - свидетелей должны быть сняты минимум на двух колонках с неподвижными жидкими фазами, отличающимися по полярности.

Для идентификации веществ по методу относительных удерживаний проводят анализ образца в условиях, указанных в конкретной методике, причем предварительно к пробе прибавляют определенное количество указанного в методике вещества сравнения. Относительное удерживание (ч) определяется по формуле:

$$ч = \frac{t_R - t_0}{t_{Rср} - t_0},$$

где t_R - время газохроматографического удерживания анализируемого вещества; $t_{Rср}$ - время удерживания веществ сравнения; t_0 - время удерживания несорбирующегося вещества.

Количественный анализ. Количественный анализ проводят с учетом измерения параметров пиков веществ на хроматограммах. Практически используют два параметра пиков: площадь или высоту. Наиболее часто применяемым параметром является площадь пика.

Площади пиков на хроматограмме определяют одним из следующих способов: умножением высоты пика (h) на его ширину ("ми "),

0,5

измеренную на половине его высоты; планиметрированием; с помощью интегратора. В связи с тем что, чувствительность детекторов по отношению к разделяемым веществам, как правило, неодинакова, в необходимых случаях количественному определению предшествует градуировка прибора.

Существует три основных метода количественного анализа: метод абсолютной градуировки, метод внутренней нормализации и метод внутреннего стандарта.

Метод абсолютной градуировки основан на предварительном определении зависимости между количеством введенного вещества и площадью или высотой пика на хроматограммах. В хроматограф вводят известное количество градуировочной смеси и определяют площади или высоты полученных пиков. Строят график зависимости площади или высоты пика от количества введенного вещества. Анализируют исследуемый образец, измеряют площадь или высоту пика определяемого компонента и на основании градуировочного графика рассчитывают его количество.

Метод внутренней нормализации основан на приведении к 100% суммы площадей пиков на хроматограмме.

Метод внутреннего стандарта основан на сравнении выбранного определяющего параметра пика анализируемого вещества с тем же параметром вещества для сравнения, введенного в пробу в известном количестве. В исследуемую пробу вводят известное количество такого вещества для сравнения, пик которого достаточно хорошо разделяется с компонентами исследуемой смеси. Проводят анализ пробы с веществом сравнения и рассчитывают количество определяемого вещества.

Последние два метода требуют введения поправочных коэффициентов, характеризующих чувствительность используемых типов детекторов к анализируемым веществам. Для разных типов детекторов и разных веществ коэффициент чувствительности определяется экспериментально.

УСЛОВИЯ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

В методике рекомендуется приводить следующие условия анализа: размеры газохроматографической колонки; тип неподвижной жидкости фазы и ее количество; тип твердого носителя; температуры колонки, испарителя и детектора; газ - носитель и его расход; тип детектора.

В случае необходимости в частных статьях могут быть приведены дополнительные условия проведения хроматографического анализа.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (жидкостная хроматография высокого давления)

Высокоэффективная жидкостная хроматография (жидкостная хроматография высокого давления) является вариантом колоночной жидкостной хроматографии, в которой подвижная фаза - элюент - проходит через заполняющий колонку сорбент с большей скоростью за счет значительного давления на входе в хроматографическую колонку.

Высокоэффективная жидкостная хроматография является удобным способом разделения, препаративного выделения и проведения количественного и качественного анализа нелетучих термолабильных соединений как с малой, так и с большой молекулярной массой.

Основными узлами современного жидкостного хроматографа являются: насос высокого давления, дозатор, высокоэффективная колонка, детектор с регистрирующим устройством.

Современные жидкостные хроматографы могут быть снабжены микропроцессором и устройствами, с помощью которых можно автоматически производить ввод пробы, поддерживать условие хроматографического процесса по заданной программе, автоматически оптимизировать условия разделения, проводить расчет количественного состава анализируемой смеси по одной или нескольким программам и проводить качественный анализ.

Насос высокого давления (до 200-500 атм) обеспечивает подачу элюента в колонку с заданной постоянной скоростью. В некоторых микроколоночных хроматографах применяются насосы сравнительно низкого давления (до 10-20 атм).

Хроматографические колонки из нержавеющей стали (или из стекла) длиной 10-25 см с внутренним диаметром 0,3-0,8 см (чаще 0,4-0,5 см) заполняются адсорбентом с диаметром частиц 5-10 мкм сферической или неправильной формы с помощью суспензионного метода, что дает возможность получить более равномерную и плотную упаковку частиц сорбента в колонке. Заполнение колонки проводится при больших давлениях, чем рабочее давление в хроматографе. В микроколоночных хроматографах используются колонки меньшей длины и меньшего внутреннего диаметра (0,1-0,2 см и меньше).

Частицы адсорбента не должны разрушаться при заполнении колонки под большим давлением.

Плотная упаковка частиц адсорбента малого диаметра (5-10 мкм) в колонке позволяет получить высокоэффективное хроматографическое разделение компонентов смеси. Температура хроматографических колонок может поддерживаться с точностью +/-0,1 град.С в интервале, ограниченном температурой замерзания и кипения элюента. Чаще всего разделение проводят в интервале температур 20-50 град.С.

В качестве детекторов в жидкостной хроматографии обычно используют спектрофотометрический детектор с переменной (190-900 нм) или фиксированной (чаще при 254 нм) длиной волны, рефрактометрический или флуориметрический детекторы. Могут быть использованы и другие детекторы, например ионизационно - пламенный, электрохимические, масс - спектрометрический и т. д.

В качестве адсорбентов чаще всего применяют силикагель с гидроксилированной поверхностью и силикагель с привитыми к поверхности различными функциональными группами, реже используются окись алюминия и полимерные адсорбенты. На практике обычно применяют готовые колонки.

При работе с колонками, заполненными силикагелем, в качестве элюента используют углеводороды, иногда с добавлением небольшого количества спирта или других растворителей. В обращеннофазной хроматографии применяют колонки, заполненные силикагелем с привитыми гидрофобными группами, и в качестве элюента - водные растворы, содержащие низшие спирты или ацетонитрил. Во многих случаях не требуется дополнительная очистка растворителей, но иногда тщательная очистка растворителей необходима.

Для разделения органических соединений в виде солей, а также кислот и оснований применяют ион - парную хроматографию. В этом случае применяют адсорбенты с привитыми гидрофобными группами, а в элюент, обычно водно - спиртовой или водно - ацетонитрильный, добавляют ионные соединения, анион или катион которых содержит гидрофобную группу.

Для разделения органических катионов или анионов применяют ионнообменную жидкостную хроматографию. В этом случае разделение проводят на адсорбентах с сульфо- или карбоксильными группами и замещенными или незамещенными аминогруппами различной основности, а в качестве элюента - водные буферные растворы с соответствующими pH и ионной силой.

Для разделения веществ, способных образовывать комплексы с катионами металлов, в частности для разделения оптических изомеров аминокислот, используют лигандообменную хроматографию, в которой разделение основано на различии в способности анализируемых веществ образовывать координационные связи в координационной сфере присутствующего в системе комплексообразующего иона металла. В этом случае применяют адсорбенты, на поверхности которых имеются группы, способные образовывать комплексы с ионами металлов и разделяемым веществом.

Для характеристики и разделения высокомолекулярных соединений (молекулярная масса выше 10^3) применяют эксклюзионную (ситовую) хроматографию, которая обеспечивает разделение веществ в соответствии с размерами их молекул. В качестве адсорбентов используют гидроксилированные силикагели с различным диаметром пор или аналогичные силикагели с привитыми диольными и другими группами, а также различные гели.

Степень разделения веществ в колонке определяется расстоянием между максимумами двух соседних пиков и шириной хроматографической полосы. Расстояние между максимумами зависит от селективности адсорбента по отношению к разделяемым веществам, а ширина полосы - от эффективности колонки, которая определяется характером упаковки частиц адсорбента, вязкостью элюента, размыванием в соединительных узлах и детекторе. Высокоэффективная колонка способна разделять вещества и при малой селективности адсорбента.

Для определения содержания каждого компонента в смеси необходимо провести количественную оценку хроматограммы с использованием методов абсолютной калибровки или внутреннего стандарта (см. раздел "Газовая хроматография").

Если примеси близки по строению, то качественно их содержание можно оценить по соотношению пиков на хроматограмме. Однако если чувствительность детектора по отношению к примесям разная, то такую оценку делать нельзя.

Метод жидкостной хроматографии обеспечивает достоверные данные по содержанию интересующего компонента в смеси. Время выхода компонента из колонки при одних и тех же условиях разделения будет всегда постоянно и может служить характеристикой данного компонента (качественный анализ), а площадь пика - пропорциональна количеству данного компонента в пробе (количественный анализ).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ pH

Водородным показателем (pH) называется отрицательный десятичный логарифм активности ионов водорода.

$$pH = - \lg a_{H^+}.$$

Измерение pH заключается в сравнении потенциала индикаторного электрода, погруженного в испытуемый раствор, с потенциалом того же электрода в стандартном буферном растворе с известным значением pH.

При калибровке pH-метров пользуются шкалой стандартных буферных растворов.

Таблица 1

N п/п	Наименование раствора	pH раствора при температуре						Буферная емкость
		0 град. С	10 град. С	20 град. С	25 град. С	30 град. С	40 град. С	
1	Тетраоксалат калия, 0,05 моль/л	1,67	1,67	1,68	1,68	1,69	1,70	0,070
2	Гидротартрат калия, насыщенный при 25 град.С	-	-	-	3,56	3,55	3,54	0,027
3	Гидрофталат калия, 0,05 моль/л	4,01	4,00	4,00	4,01	4,01	4,03	0,016
4	Однозамещенный фосфат калия + двузамещенный фосфат натрия по 0,025 моль/л	6,98	6,92	6,88	6,86	6,84	6,84	0,029
5	Бура, 0,01 моль/л	9,46	9,33	9,22	9,18	9,14	9,07	0,020
6	Гидроокись кальция, насыщенный при 25 град.С	-	-	-	12,45	12,30	11,99	0,09

В табл. 1 приведены растворы веществ, применяемые в качестве стандартных буферных растворов для проверки pH-метров и зависимость их pH от температуры. Для приготовления таких растворов могут быть использованы фиксаналы по ГОСТ 8-135-74.

Примечания. 1. Буферной емкостью ("бета") называют выраженное в грамм - эквивалентах количество сильного основания (B), прибавление которого к 1 л буферного раствора вызывает возрастание величины pH этого раствора на единицу

$$\left[\text{"бета"} = \frac{dB}{dpH} \sim = \frac{\text{"ДЕЛЬТА"}B}{\text{"ДЕЛЬТА"}pH} \right].$$

2. Дистиллированная вода, применяемая для приготовления буферных растворов, а также для приготовления контролируемых растворов, должна иметь pH 5,8-7,0. Дистиллированная вода должна быть освобождена от углекислого газа, для чего ее необходимо прокипятить перед употреблением. Если pH дистиллированной воды после кипячения не соответствует указанным пределам, то необходима дополнительная очистка, например с помощью ионообменных колонок.

Потенциометрический метод измерения pH. Потенциометрическое определение pH заключается в измерении ЭДС элемента, состоящего из двух электродов: индикаторного, потенциал которого зависит от активности ионов водорода, и электрода сравнения - стандартного электрода с известной величиной потенциала.

В качестве индикаторных электродов для измерения pH на практике применяют стеклянный и хингидронный электроды. В отдельных случаях в качестве индикаторного электрода можно использовать водородный электрод.

Для измерения pH применяют высокоомные потенциометры различных систем или pH-метры, шкала которых градуирована в милливольтах или непосредственно в единицах pH.

Подготовка pH-метра и электродной системы производится согласно инструкциям, прилагаемым к прибору.

Калибровка и проверка pH-метров проводится по стандартным буферным растворам, приведенным в табл. 1.

Различие между показанием прибора и номинальным значением pH буферного раствора не должно превышать 0,04 единицы pH.

Если pH контролируемого раствора отличается менее чем на единицу от pH стандартного буферного раствора, то достаточна проверка прибора по одному буферному раствору, величина pH которого лежит в том же диапазоне измерения, что и значения pH контролируемого раствора.

Если pH контролируемых растворов находятся в широких пределах, то проверку pH-метра следует производить по двум стандартным буферным растворам в соответствии с инструкцией.

При измерении pH контролируемых растворов отсчет величины pH по шкале прибора производят после того, как показания прибора примут установившееся значение. Время установления показаний определяется буферными свойствами и температурой раствора (обычно время установления показаний не превышает 2 мин).

Определение pH проводят при 25 +/-2 град.С, в противном случае необходимо сделать соответствующие поправки.

При измерении pH сильнокислых и сильнощелочных растворов при температурах, близких к 0 град.С, или при измерении pH растворов с очень малой буферной емкостью (например, дистиллированной воды) время установления показаний может достигать нескольких минут.

При измерении pH в неводных и смешанных растворителях, а также в некоторых коллоидных системах следует иметь в виду, что полученные значения pH являют условными.

Колориметрический метод измерения pH. Колориметрический метод определения pH основан на свойстве индикаторов изменять свою окраску в зависимости от активности ионов водорода в определенном интервале pH. Колориметрическое определение pH производят при помощи индикаторов (табл. 2) и стандартных буферных растворов.

Сначала определяют приблизительную величину pH испытуемого раствора с помощью универсального индикатора (см. "Индикаторы", применяемые при объемных определениях), для чего 2 мл испытуемого раствора смешивают в маленькой фарфоровой чашке с 5 каплями универсального индикатора и полученную окраску сравнивают с цветной шкалой.

После приближенного определения pH испытуемого раствора выбирают 5-6 буферных растворов, пригодных для данной области pH и отличающихся друг от друга на 0,2. В одну из пробирок наливают 10 мл испытуемого раствора, в другие - выбранные буферные растворы. Во все пробирки прибавляют по 2-3 капли раствора индикатора и сравнивают окраску испытуемого раствора с окрасками буферных растворов.

pH испытуемого раствора равен pH буферного раствора, окраска которого совпадает с окраской испытуемого раствора.

Индикатор следует выбирать таким образом, чтобы предполагаемая величина pH попала в центральную часть интервала перехода окраски индикатора. Концентрация индикатора в испытуемом и буферном растворах должна быть одинаковой.

Потенциометрический метод имеет преимущества по сравнению с колориметрическим, он более точен и имеет меньше ограничений, связанных с присутствием в растворе окислителей или восстановителей, с белковой или солевой ошибками. Потенциометрический метод в отличие от колориметрического может применяться для определения pH в окрашенных, мутных или гелеобразных растворах.

Приготовление исходных веществ и буферных растворов, представленных в табл. 1 и 2. Буферные растворы, приведенные в табл. 1, приготавливают из реактивов квалификации "Для pH-метрии" по ГОСТу 8.135-74.

Для приготовления буферных растворов, приведенных в табл. 1 и 2, могут использоваться также реактивы квалификации х.ч. и ч.д.а. В случае применения реактивов квалификации х.ч. и ч.д.а. поступают, как указано ниже.

Таблица 2

Область pH 1,2-2,2

pH	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0	2,2

Раствор KCl (0,2 моль/л), мл	50	50	50	50	50	50
Раствор HCl (0,2 моль/л), мл	64,50	41,50	26,30	16,60	10,60	6,70
Вода	До 200 мл					

Область pH 2,2-3,8

pH	2,2	2,4	2,6	2,8	3,0	3,2	3,4	3,6	3,8
Раствор гидрофталата калия (0,2 моль/л), мл	50	50	50	50	50	50	50	50	50
Раствор HCl (0,2 моль/л), мл	46,70	39,60	32,95	26,42	20,32	14,70	9,90	5,97	2,62
Вода	До 200 мл								

Область pH 4,0-6,2

pH	4,0	4,2	4,4	4,6	4,8	5,0	5,2	5,4
Раствор гидрофталата калия (0,2 моль/л), мл	50	50	50	50	50	50	50	50
Раствор NaOH (0,2 моль/л), мл	0,40	3,70	7,50	12,15	17,70	23,85	29,95	35,45
Вода	До 200 мл							

pH	5,6	5,8	6,0	6,2
Раствор гидрофталата калия (0,2 моль/л), мл	50	50	50	50
Раствор NaOH (0,2 моль/л), мл	39,85	43,0	45,45	47,00
Вода	До 200 мл			

Область pH 5,8-8,0

pH	5,8	6,0	6,2	6,4	6,6	6,8	7,0	7,2
Раствор однозамещенного фосфата калия (0,2 моль/л), мл	50	50	50	50	50	50	50	50
Раствор NaOH (0,2 моль/л), мл	3,72	5,70	8,60	12,60	17,80	23,65	29,63	35,00
Вода	До 200 мл							

pH	7,4	7,6	7,8	8,0
Раствор однозамещенного фосфата калия (0,2 моль/л), мл	50	50	50	50
Раствор NaOH (0,2 моль/л), мл	39,50	42,80	45,20	46,80
Вода	До 200 мл			

Область pH 7,8-10,0

pH	7,8	8,0	8,2	8,4	8,6	8,8	9,0	9,2
Раствор борной кислоты (0,2 моль/л), мл	50	50	50	50	50	50	50	50
Раствор NaOH (0,2 моль/л), мл	2,61	3,97	5,90	8,50	12,00	16,30	21,30	26,70
Вода	До 200 мл							

pH	9,4	9,6	9,8	10,00
Раствор борной кислоты (0,2 моль/л), мл	50	50	50	50
Раствор NaOH (0,2 моль/л), мл	32,00	36,85	40,80	43,90
Вода	До 200 мл			

Область pH 10,0-11,4

pH	10,0	10,2	10,4	10,6	10,8	11,0	11,2	11,4
Раствор буры (0,05 моль/л), мл	119,2	112,4	108,0	104,6	102,4	100,4	98,8	97,4
Раствор NaOH (0,2 моль/л), мл	40,40	43,80	46,00	47,70	48,80	49,80	50,60	51,30
Вода	До 200 мл							

Примечание. Приведенные в табл. 2 значения pH воспроизводимы с точностью pH до +/- 0,05 при 25 град. С.

1. Раствор тетраоксалата калия $KH_3(C_2O_4)_2 \times 2H_2O$ (0,05 моль/л). Тетраоксалат калия (х.ч., ч.д.а.) дважды перекристаллизовывают из воды и сушат на воздухе при температуре не выше 50 град.С в течение суток. 12,709 г перекристаллизованного тетраоксалата калия растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1 л.

2. Насыщенный при 25 град. С раствор гидротартрата калия $KHC_4H_4O_6$ (около 0,034 моль/л). Гидротартрат калия (ч.д.а.) по ГОСТу 3654-79 перекристаллизовывают из воды и сушат при температуре 105 град. С до постоянной массы. Перекристаллизованный гидротартрат калия встряхивают с дистиллированной водой в течение получаса при 25 град. С. Нерастворившуюся часть отфильтровывают.

3. Раствор гидрофталата калия $KHC_8H_4O_4$ (0,05 моль/л). Гидрофталат калия (ч.д.а.) перекристаллизовывают из воды, сушат при температуре не выше 125 град. С до постоянной массы. 10,211 г перекристаллизованного гидрофталата калия растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1 л.

4. Раствор гидрофталата калия $KHC_8H_4O_4$ (0,2 моль/л). 40,846 г гидрофталата калия, перекристаллизованного, как указано выше, растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1 л.

5. Раствор однозамещенного фосфата калия KH_2PO_4 (х.ч., ч.д.а.) (0,025 моль/л) по ГОСТу 4198-75 и раствор двузамещенного фосфата натрия Na_2HPO_4 (0,025 моль/л) по ГОСТу 4172-76 (х.ч., ч.д.а.). Указанные соли очищают трехкратной перекристаллизацией из воды. Однозамещенный фосфат калия высушивают при 110 град. С, двузамещенный фосфат натрия - при 130 град. С до постоянной массы. 3,402 г безводного однозамещенного фосфата калия и 3,548 г безводного двузамещенного фосфата натрия растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1 л.

6. Раствор однозамещенного фосфата калия KH_2PO_4 (0,2 моль/л). 27,218 г очищенного, как указано выше, безводного однозамещенного фосфата калия растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1 л.

7. Раствор тетрабората натрия (буры) $Na_2B_4O_7 \times 10 H_2O$ (0,01 моль/л). Буру (х.ч., ч.д.а.) по ГОСТу 4199-76 дважды перекристаллизовывают из воды, растворяя при температуре не выше 60 град. С. Кристаллы отсасывают на воронке Бюхнера, промывают небольшим количеством холодной воды, затем сушат на воздухе в течение 2-3 дней. 3,814 г перекристаллизованной буры растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1 л.

8. Раствор борной кислоты H_3BO_3 с хлоридом калия KCl (0,2 моль/л). Борную кислоту (х.ч., ч.д.а.) по ГОСТу 9656-75 дважды перекристаллизовывают из воды и сушат в сушильном шкафу при температуре не выше 70 град. С до постоянной массы. 12,365 г перекристаллизованной борной кислоты и 14,911 г хлорида калия (х.ч.) по ГОСТу 4234-77 растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1 л.

9. Раствор хлорида калия KCl (0,2 моль/л). 14,911 г хлорида калия (х.ч.) по ГОСТу 4234-77 растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1 л.

10. Насыщенный при 25 град. С раствор гидроокиси кальция $Ca(OH)_2$. Гидроокись кальция (х.ч.) по ГОСТу 9262-77 встряхивают в течение часа с дистиллированной водой при 25 град. С и после отстаивания фильтруют.

11. Раствор хлористоводородной кислоты HCl (0,2 моль/л) и раствор едкого натра NaOH (0,2 моль/л). Готовят из растворов 1 моль/л.

12. Раствор гидрокарбоната натрия $NaHCO_3$ (0,025 моль/л) и раствор карбоната натрия Na_2CO_3 (0,025 моль/л). Гидрокарбонат натрия (х.ч.) по ГОСТу 4201-79 сушат в эксикаторе над силикагелем, предварительно проактивированном при 120 град. С в течение часа, до постоянной массы. Карбонат натрия (х.ч.) по ГОСТу 83-79 сушат при 300 град. С до постоянной массы. 2,100 г гидрокарбоната и 2,649 г карбоната натрия растворяют в достаточном количестве воды и доводят объем раствора водой до 1 л.

13. Раствор буры $Na_2B_4O_7 \times 10 H_2O$ (0,05 моль/л). 19,068 г перекристаллизованной буры (см. п. 7) растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 1 л.

Примечание. Буферные растворы хранят в хорошо закрытых склянках нейтрального стекла в течение 3 мес. При образовании осадков и видимых изменений буферные растворы не применяются.

ЭЛЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ТИТРОВАНИЯ

Потенциометрическое титрование

Потенциометрическим титрованием называется способ определения эквивалентного объема титранта путем измерения в процессе титрования электродвижущей силы (э.д.с.) специально подобранной электродной пары.

Электродная пара состоит из индикаторного электрода и электрода сравнения.

Индикаторный электрод выбирают таким образом, чтобы его потенциал зависел от концентрации ионов, принимающих участие или образующихся в процессе титрования. Потенциал электрода сравнения во время титрования должен сохранять постоянную величину.

Как правило, электродную пару при титровании погружают в анализируемый раствор. Однако в тех случаях, когда ионы, диффундирующие из электрода сравнения, могут помешать проведению титрования, контакт электрода сравнения с анализируемым раствором осуществляется через электролитический мост.

Последний представляет собой П-образную трубку, заполненную раствором электролита, ионы которого не мешают проведению титрования. Один конец трубки, снабженный пришлифованной пробкой или пористой мембраной, погружают в анализируемый раствор, а другой в стакан с насыщенным водным раствором хлорида калия, в который погружен электрод сравнения. При проведении потенциометрического титрования в неводных средах электролитический мост или электрод сравнения заполняют растворами хлоридов калия или лития в соответствующих неводных растворителях.

При проведении анализа титрованный раствор прибавляют из бюретки равными объемами при постоянном перемешивании. Вблизи точки эквивалентности прибавляют по 0,1 или 0,05 мл и после каждого прибавления измеряют э.д.с.

Измерение э.д.с., возникающей за счет разности потенциалов между индикаторным электродом и электродом сравнения, осуществляется с помощью высокоомных потенциометров (pH-метров).

Величина э.д.с. особенно сильно изменяется вблизи точки эквивалентности, абсолютное значение отношения изменения э.д.с. ("ДЕЛЬТА"E) к приращению объема прибавляемого титранта ("ДЕЛЬТА"V) в этой точке будет максимальным.

Результаты титрования могут быть представлены графически, а полученная кривая использована для определения точки эквивалентности методом касательных, как показано на рис. 10 <*>.

<*> Рис. 10. Кривая потенциометрического титрования.

V, экв - эквивалентный объем титранта; V, мл - объем титранта в миллилитрах. На оси ординат - электродвижущая сила (мВ); на оси абсцисс - объем титранта (мл). (Рисунок не приводится).

Точка эквивалентности может быть также определена расчетным путем по максимальному значению $\frac{\text{"ДЕЛЬТА"E}}{\text{"ДЕЛЬТА"V}}$ и соответственно "ДЕЛЬТА" $\left[\frac{\text{"ДЕЛЬТА"E}}{\text{"ДЕЛЬТА"V}}\right]$, как указано в табл. 1 и формуле расчета.

Эквивалентный объем титранта (Vэкв) вычисляют по формуле:

$$V_{экв} = V1 + (V2 - V1)\frac{AV1}{AV1 - AV2},$$

где V1 - объем титранта, соответствующий последнему положительному (отрицательному) значению величины AV; V2 - объем титранта, соответствующий первому отрицательному (положительному) значению величины AV.

Таблица 1

V, мл	"ДЕЛЬТА"V	E мВ	"ДЕЛЬТА"E	$\frac{\text{"ДЕЛЬТА"E}}{\text{"ДЕЛЬТА"V}}$	"ДЕЛЬТА" $\left[\frac{\text{"ДЕЛЬТА"E}}{\text{"ДЕЛЬТА"V}}\right]$ = AV
5,00		250			
	0,1		13	130	
5,10		263			+ 150
	0,1		28	280	
5,20		291			+ 720
	0,1		100	1000	
5,30		391			- 450
	0,1		55	550	
5,40		446			- 330
	0,1		22	220	
5,50		468			- 120
	0,1		10	100	
5,60		478			

Пример:

$$V_{экв} = 5{,}20 + (5{,}30 - 5{,}20)\frac{720}{720 - (-450)} = 5{,}26 \text{ мл.}$$

Потенциометрическое титрование может быть использовано для индикации точки эквивалентности при количественном определении методами нейтрализации, осаждения, комплексообразования, окисления - восстановления и т.п. При этом выбор электродной системы зависит от типа аналитической реакции (табл. 2).

Метод потенциометрического титрования может быть применен также в случае титрования окрашенных и мутных растворов.

Таблица 2

Характеристика электродных систем
различных методов титрования

Метод титрования	Индикаторный электрод	Электрод сравнения	Примечание
Кислотно - основной	Стеклянный	Каломельный или хлор-серебряный	Титрование кислот, оснований и солей
Осаждения	Серебряный	Каломель-ный, хлор-серебряный, стеклянный	Титрование галогенидов, роданидов, цианидов и сульфидов
Комплексоно - метрический	Ртутный, ион - селективные	Каломель-ный, хлор-серебряный, стеклянный	Титрование различных катионов, металлов (Mg^{2+}, Ca^{2+}, Al^{3+}, Bi^{3+})
Окислительно - восстановите-льный	Платиновый	Каломель-ный, хлор-серебряный, стеклянный	Титрование восстановителей броматом, бихроматом, перманганатом, йодом и церием (IV) Титрование окислителей арсенитом, тиосульфатом и нитритом

Амперометрическое титрование
с двумя индикаторными электродами
(метод титрования "до полного прекращения тока")

Метод основан на использовании пары идентичных инертных электродов (Pt, Au), находящихся под небольшим напряжением. При этом через ячейку протекает ток, если в растворе имеется обратимая окислительно - восстановительная пара (например, $J_2/2J^-$), концентрации компонентов которой достаточны для реализации как катодного, так и анодного процессов при условии энергичного перемешивания раствора:

$$ox + e^- \rightleftarrows red \text{ (на катоде);}$$

$$red - e^- \rightleftarrows ox \text{ (на аноде).}$$

Для определения конечной точки титрования платиновые электроды, находящиеся в ячейке, подключают к электрической схеме, представленной на рис. 11 <*>. Схема состоит из потенциометра, подключенного к источнику постоянного напряжения. С потенциометра

напряжение, необходимое для титрования (обычно 0,05-0,25 В), подают на электроды через чувствительный микроамперметр. Схема может быть модифицирована путем введения в схему дополнительного сопротивления, показанного на схеме пунктиром. При этом измерение тока через схему заменяют измерением падения напряжения на ячейке или дополнительном сопротивлении с помощью высокоомного вольтметра или соответствующей электронной схемы.

<*> Рис. 11. Электрическая схема амперометрического титрования с двумя индикаторными электродами. (Рисунок не приводится).

Точку эквивалентности при амперометрическом титровании с двумя индикаторными электродами находят по значительному увеличению тока через ячейку, продолжающемуся не менее 30 с после добавления последней порции реагента. Кроме того, точку эквивалентности можно находить графически по зависимости силы тока, протекающего через ячейку, от объема добавленного реагента. В этом случае методика расчета совпадает с методикой нахождения точки эквивалентности по зависимости э.д.с. электродной системы от объема реагента, изложенной выше в разделе "Потенциометрическое титрование".

Амперометрическое титрование с двумя индикаторными электродами в фармакопейном анализе наиболее часто применяется при проведении йодометрического и нитритометрического титрования, а также при определении воды по методу К. Фишера.

Примечание. Платиновые электроды нуждаются в периодической очистке, для чего их опускают на 30 мин в кипящую концентрированную азотную кислоту, содержащую небольшое количество хлористого железа, после чего промывают водой.

ТИТРОВАНИЕ В НЕВОДНЫХ РАСТВОРИТЕЛЯХ

Метод кислотно - основного титрования в неводных растворителях применяется для количественного определения веществ, представляющих собой кислоты, основания или соли, титрование которых в воде затруднено или невозможно из-за слабых кислотно - основных свойств или малой растворимости.

В неводных растворителях резко меняются кислотно - основные свойства различных веществ. В зависимости от растворителя одно и то же вещество может быть кислотой, основанием или вообще не проявлять кислотно - основных свойств.

Возможность и точность кислотно - основного титрования индивидуальных веществ в данном растворителе определяются величиной константы титрования (K_T), которая зависит от ионного произведения среды (Ki), в которой проходит титрование, и константы диссоциации титруемого вещества в этой среде (K_A) (отщепление протона). Для случая титрования кислот $K_T = Ki / K_A$, для случая титрования оснований $K_T = K_A$. При раздельном титровании смесей двух кислот или двух оснований константы титрования соответственно выражаются уравнениями: $K_{T(2)} = K_{A(2)} / K_{A(1)}$, или $K_{T(1)} = K_{A(1)} / K_{A(2)}$, где индексы 1 и 2 обозначают порядок нейтрализации.

Во всех четырех случаях условия титрования тем лучше, чем меньше величина K_T, что и определяет выбор среды для титрования. Значения величины Ki для ряда растворителей и K_A для некоторых веществ приведены в табл. 2, 3, 4.

К соединениям, которые могут титроваться как кислоты (случай 1), относятся: карбоновые кислоты, фенолы, барбитураты, сульфонамиды, аминокислоты и др. К соединениям, которые могут титроваться как основания (случай 2), относятся: амины, азотсодержащие гетероциклические соединения, амиды, четвертичные аммониевые основания и др.

Наилучшие условия титрования для слабых кислот достигаются в основных неводных растворителях, таких, как пиридин, диметилформамид; для слабых оснований - в кислых неводных растворителях, таких, как уксусная кислота и уксусный ангидрид.

Соли органических и некоторых минеральных кислот могут быть определены так же, как основания титрованием в кислых растворителях.

В случае титрования солей галогеноводородных кислот перед титрованием прибавляют раствор ацетата окисной ртути для связывания ионов галогенов в малодиссоциирующие соединения. При использовании уксусного ангидрида в качестве растворителя возможно титрование солей галогеноводородных кислот, преимущественно хлоридов, без прибавления ацетата окисной ртути.

Для раздельного титрования смесей кислот или смесей оснований (случаи 3 и 4) используют дифференцирующие растворители, т.е. растворители с величиной pKi, преимущественно превышающей 15, не обладающие выраженными кислотно - основными свойствами, такие, как кетоны, нитрилы, нитрометан.

Таблица 1

Растворители	Индикаторы	Титранты
Кислые Уксусная и муравьиная кислоты, уксусный ангидрид и их смеси с другими растворителями	Кристаллический фиолетовый, судан III, тропеолин 00, метиловый фиолетовый, нейтральный красный, малахитовый зеленый, диметиламиноазобензол	Раствор хлорной кислоты в уксусной кислоте или в нитрометане
Основные Диметилформамид, пиридин, этилендиамин	Тимоловый синий, бромтимоловый синий, альфанафтолбензеин, ортонитроанилин	Растворы едкого натра, едкого кали, метилата натрия, метилата лития, гидроксид тетраэтиламмония в метиловом спирте или в смеси метилового спирта и бензола
Дифференцирующие Ацетон, диоксан, нитрометан, метилэтилкетон, метиловый спирт, изопропиловый спирт, третичный бутиловый спирт, диметилсульфоксид	Метиловый оранжевый, тимоловый синий, бромфеноловый синий, нейтральный красный, метиловый красный, бромтимоловый синий	Растворы хлористоводородной кислоты в метиловом спирте или в гликолевых смесях; растворы хлорной кислоты в нитрометане, в метиловом спирте или в гликолевых смесях; растворы, применяемые при титровании в основных растворителях

Примечание. При работе с уксусным ангидридом недопустимо смешивание его с водой и спиртом.

В ряде случаев для титрования применяют смеси неводных растворителей с апротонными растворителями: бензолом, хлороформом и др., присутствие которых уменьшает ионное произведение среды (Ki), что может способствовать улучшению условий титрования.

Титрование в неводных растворителях может быть проведено как с индикатором, так и потенциометрически с использованием в качестве индикаторного стеклянного или других обратимых к протону электродов.

При титровании в основных растворителях следует принимать меры для защиты титруемого раствора и титранта от двуокиси углерода, содержащейся в воздухе. Титрование лучше проводить в атмосфере инертного газа.

В табл. 1 приведены наиболее часто применяемые неводные растворители, индикаторы и титранты.

Таблица 2

Величины pKi различных растворителей (pKi = - lgKi)
при температуре 20-25 град. С

N п/п	Растворитель	pKi
1	Серная кислота	3,62
2	Муравьиная кислота	6,1
3	Уксусная кислота	14,4
4	Уксусный ангидрид	14,5
5	Этилендиамин	15,3
6	Этиленгликоль	15,6
7	Формамид	16,7
8	Метиловый спирт	16,7
9	Пропиленгликоль	16,8
10	Этиловый спирт	19,1
11	н-Бутиловый спирт	20,05
12	Изопропиловый спирт	22,0
13	Диметилацетамид	23,95
14	Нитрометан	24,0
15	Пиридин	24,2
16	Диметилформамид	25,3
17	Метилэтилкетон	25,7
18	Ацетон	25,9
19	Третичный бутиловый спирт	26,8
20	Ацетонитрил	32,2
21	Диметилсульфоксид	33,3

ПРИЛОЖЕНИЕ

Титрованные растворы
Раствор хлорной кислоты (0,1 моль/л)

$HClO_4$ М.м. 100,46

1 мл раствора содержит 0,01005 г хлорной кислоты.

Приготовление. 8,2 мл 72% или 11,7 мл 57% водного раствора хлорной кислоты смешивают с 500 мл ледяной уксусной кислоты в мерной колбе вместимостью 1 л. Колбу помещают в холодную воду и прибавляют постепенно при помешивании уксусный ангидрид в количестве 32 или 45 мл соответственно. После охлаждения объем раствора доводят ледяной уксусной кислотой до 1 л и оставляют на 24 ч. Содержание воды определяют по методу К. Фишера, если необходимо, прибавлять воду или уксусный ангидрид до получения содержания воды в количестве от 0,01 до 0,2% и оставляют на 24 ч.

Установка титра. Около 0,15 г (точная навеска) гидрофталата калия, предварительно тонко измельченного и высушенного при 120 град. С в течение 2 ч, растворяют в 20 мл ледяной уксусной кислоты и титруют приготовленным раствором хлорной кислоты в присутствии 2 капель раствора кристаллического фиолетового до перехода фиолетовой окраски в голубовато - зеленую.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Поправочный коэффициент вычисляют по первому способу, где T = 0,02042.

Примечание. Если раствор с поправочным коэффициентом, установленным при температуре t1, применяют при температуре t2, то вводят температурную поправку. Для этого измеренный объем раствора хлорной кислоты, израсходованный на титрование анализируемого раствора, приводят к температуре t1 путем умножения на [1 + + ("ДЕЛЬТА"t x 0,001)], где "ДЕЛЬТА"t = t2 - t1.

Раствор хлорной кислоты (0,05 моль/л)

1 мл раствора содержит 0,005025 г хлорной кислоты.

Приготовление. 50 мл раствора хлорной кислоты (0,1 моль/л) точно отмеривают из бюретки в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора ледяной уксусной кислотой до метки.

Установка титра - как описано при установке титра раствора 0,1 моль/л. Навеску гидрофталата калия берут около 0,08 г (точно навеска) Т = 0,01021.

Таблица 3

Величины pK_A кислот в различных растворителях ($pK_A = - lgK_A$)

Кислота	Растворитель									
	вода	метиловый спирт	этиловый спирт	бутиловый спирт	изопропиловый спирт	третичный бутиловый спирт	этиленгликоль	пропиленгликоль	ацетон	ацетон 90%
Хлорная						3,94			2,90	
Серная (I)		1,44		3,42						
Соляная	0,8	1,05	1,95		3,10	5,50			8,90	2,47
Азотная	0,2	3,17	3,75							
п-Толуолсульфоновая						3,81				
Бромистоводородная	0,2				2,0	5,0				
Уксусная	4,75	9,70	10,41	10,35	11,35	14,27	8,32	9,10	12,55	10,27
Монохлоруксусная	2,86	7,80	8,51	8,50	9,23	12,24	6,05		11,20	7,60
Дихлоруксусная	1,30	6,30	7,14	7,30	7,80	10,27	4,50		10,20	
Трихлоруксусная	0,70	4,90	5,70	6,30					8,20	
Фенилуксусная	4,31						8,06	8,78		
Муравьиная	3,75		9,15			8,82				
Бензойная	4,20	9,52	10,13	10,24		15,10	8,16	8,83	11,95	9,70
п-Нитробензойная	3,40	8,40	8,87	9,10	9,60	12,04			10,59	8,09
м-Нитробензойная	3,46	8,30	9,0	9,15		9,20			10,66	8,03
3,5-Динитробензойная	2,80				8,31	10,60			9,63	
Салициловая	2,89	7,90	8,60	7,73		9,53	6,55	7,20	9,53	7,22
Никотиновая	4,73								16,6	
Барбитуровая	4,01									
Винная (I)	3,03	7,40								
Лимонная (I)	3,10									
Фенол	9,89	14,2				19,08				
о-Нитрофенол	7,17								13,82	10,75
п-Нитрофенол	7,15	11,0	11,0		11,19	14,48			13,52	10,93
2,4-Динитрофенол	4,02	7,85	8,21	8,36		10,68			8,76	6,45
2,5-Динитрофенол	5,22	8,98								8,10
2,6-Динитрофенол	3,71	7,63								6,77
3,5-Динитрофенол	6,70				10,83	13,40				
Пикриновая кислота	0,8	4,80	3,93	4,50	3,70	3,65			3,17	2,18
Ацетилсалициловая кислота	3,50									
Барбитал	7,43	12,69				16,8				
Фенобарбитал	7,21								19,20	
Сульфадимезин	7,51								19,60	
Метилурацил	9,70									
Фторурацил	7,98									
Тиоурацил	7,82									
Рутин (I)	8,96	10,34							13,15	
Кверцетин (I)	8,21	9,18							14,41	
Ликуразид (I)	9,49	12,30							14,34	
Изосалупурпозид (I)	7,67	11,66							12,90	
Неодикумарин (I)	4,37	5,71							7,37	
Зоокумарин	4,70	9,63							7,81	

Продолжение таблицы

Кислота	Растворитель										
	метилэтилкетон	формамид	диметилформамид	диметилсульфоксид	Диметилацетамид	ацетонитрил	нитрометан	пиридин	уксусная кислота	муравьиная кислота	уксусный ангидрид

Хлорная	2,20					1,90		3,23	2,7	0,28	
Серная (I)	5,48		3,10			4,60	5,10		4,2	0,58	
Соляная	8,30		3,80			6,20	8,10	5,4	5,30	0,89	8,9
Азотная	4,46						8,80	4,30	5,10		
п-Толуолсуль-фоновая			1,55			5,30		2,68		0,34	
Бромистоводородная			1,80			5,51		4,36			4,90
Уксусная	16,6	6,91	13,50	12,60	12,60	22,30	20,50	11,44			
Монохлоруксусная	15,4	4,50	10,10	8,90	8,75	18,80	17,0				
Дихлоруксусная	10,26	2,85	7,20		6,10	15,80	14,10				
Трихлоруксусная	8,86	1,46	10,60								
Фенилуксусная		6,57	12,9	11,6			20,10				
Муравьиная	16,7	5,74	11,55					8,84			
Бензойная	16,6	6,36	12,20	11,10	11,0	20,70	19,50	9,80			
п-Нитробензойная		5,88	10,60	9,0		18,70	17,60	7,94			
м-Нитробензойная		5,40	10,82	9,20		19,29	17,60	8,16			
3,5-Динитробензой-ная	9,78		8,95	7,40		16,90					
Салициловая	13,0	4,73	8,30	6,80	6,90	16,70					
Никотиновая	15,0		10,80	9,60							
Барбитуровая								6,67			
Винная (I)			8,90								
Лимонная (I)	10,1		10,6								
Фенол	22,3		18,0	16,40		26,6	25,7	16,20			
о-Нитрофенол			12,14	11,0		22,0	21,4	10,03			
п-Нитрофенол		8,53	11,83	11,0		20,8	20,1	9,60			
2,4-Динитрофенол	9,31	4,52	6,36	5,20		16,0	15,90	4,38			
2,5-Динитрофенол		5,94	8,78			17,5	17,9	5,76			
2,6-Динитрофенол		4,17	6,18	4,90		16,8	16,0				
3,5-Динитрофенол			11,42	10,60		20,5	19,4				
Пикриновая кислота	3,70	1,33	3,65	1,0		11,0	10,5	3,65			
Ацетилсалициловая кислота	16,30		11,30								
Барбитал	19,0			13,0		23,4					
Фенобарбитал	18,30		13,40	10,98							
Сульфадимезин	18,70		13,0								
Метилурацил			15,30	13,0							
Фторурацил			12,40	10,10							
Тиоурацил			12,20	10,80							
Рутин (I)			11,12	12,10							
Кверцетин (I)			11,22	11,63							
Ликуразид (I)			13,15	13,23							
Изосалупурпозид (I)			11,83	12,20							
Неодикумарин (I)			5,75	6,23							
Зоокумарин			8,45	9,90							

Примечание. I - первая константа.

Таблица 4

Величины pK_A оснований в различных растворителях ($pK_A = pK_i - pK_B = pK_T$)

Наименование вещества	Растворитель						
	вода	метиловый спирт	95% этиловый спирт	этиленгликоль	пропиленгликоль	ацетон	метилэтилкетон
Тетраметилгуанидин	13,60						
Пиперидин	11,20	11,0	12,51	12,52	11,71	12,24	13,48
Диэтиламин	10,90						
Трибутиламин	9,85						
Триэтиламин	10,70			11,15	10,87	11,62	12,40
Диметиламин	10,60						
н-Бутиламин	10,60						
Дифенилгуанидин	10,10	13,60	15,26				
Аммиак	9,30						
Анилин	4,58	6,10	5,70	6,12	6,12	5,92	5,46
Диметиланилин	5,10	4,50	4,40			4,91	6,20
Диэтиланилин	6,52	6,85				6,26	7,20

п-Хлоранилин	4,00	4,90	4,66			5,34	
м-Хлоранилин	3,52	4,50	4,35			4,85	
о-Нитроанилин	0,29						
м-Нитроанилин	2,50		4,25			3,97	
п-Нитроанилин	1,02	1,29	1,01			3,52	
Пиридин	5,15	5,54	4,30	5,92	5,69	5,77	6,94
п-Толуидин	5,07	6,60	6,30			6,57	6,81
м-Толуидин	4,71	6,20	5,90			6,15	
альфа - Пиколин	5,95	6,24	5,54	6,38	6,09	6,64	
альфа - Нафтиламин	3,92	5,66	5,10			5,42	6,38
Дифениламин	0,9	3,18				3,87	
Ацетамид	0,48						
Ацетоксим	1,81						
Тиомочевина	0,96						
Эфедрин	9,70			11,29			13,71
Атропин	9,60						
Новокаин	8,80						
Промедол	8,40						14,4
Морфолин	8,70			10,14	9,19		
Тебаин	8,30						11,01
Димедрол	8,20						
Платифиллин	8,10						
Кодеин	8,0	8,60	11,40	9,38		9,62	11,18
Морфин	7,80	8,60		9,51		9,57	
Хинин	8,0			5,23			
Этилморфин	7,90						
Спазмолитин	7,70						13,60
Пилокарпин	6,80						
Резерпин	6,60						
Папаверин	5,90	6,92		7,25		8,03	
Тифен	6,30						13,40
Гексаметилентетрамин	4,90						9,80
Хинолин	4,80		4,58	5,39	5,27	5,41	
Амидопирин	4,80					9,30	6,20
Дибазол	4,20						
Теофиллин	2,60						
Фенацетин	2,20						3,20
Антипирин	1,51						6,04
Кофеин	0,60						
Теобромин	0,10						
Мочевина	0,20						

Продолжение таблицы

Наименование вещества	Растворитель							
	ацето-нитрил	форм-амид	диме-тилфор-мамид	диме-тил сульф-оксид	нитро-метан	мура-вьиная кисло-та	уксус-ная кисло-та	уксус-ный анги-дрид
Тетраметилгуанидин			13,65	13,20				
Пиперидин	18,92	11,08	10,40		18,22		10,10	
Диэтиламин			10,10	10,50	17,95	5,19	10,10	
Трибутиламин					17,77		10,10	
Триэтиламин	18,46	9,99	9,25	9,0	18,35		10,20	11,50
Диметиламин	18,73		10,40		17,96		10,0	
н-Бутиламин	18,26		10,50	11,10	16,86			
Дифенилгуанидин	17,90		8,90		17,20		10,0	
Аммиак	16,46		9,45	10,50	15,70		10,10	
Анилин	10,56	4,10	4,36	3,60	9,07	5,49	8,60	
Диметиланилин				2,51	11,04		9,93	9,50
Диэтиланилин							10,20	10,60
п-Хлоранилин		3,26			7,99		9,27	
м-Хлоранилин		2,75			7,74		9,25	
о-Нитроанилин							6,95	
м-Нитроанилин					6,62		6,70	
п-Нитроанилин					5,18			
Пиридин	12,33	4,48	3,30	3,40	12,16	5,50	10,0	9,90
п-Толуидин	11,25	5,81			9,80			

м-Толуидин					9,70			
альфа - Пиколин								
альфа - Нафтиламин						5,05	9,60	
Дифениламин					5,24		7,45	
Ацетамид							6,75	
Ацетоксим							8,42	
Тиомочевина							7,75	
Эфедрин			9,50					8,90
Атропин								11,30
Новокаин			8,60					11,30
Промедол			8,20					11,30
Морфолин	16,61				15,80			
Тебаин								
Димедрол			7,70					
Платифиллин								11,50
Кодеин			8,30			5,11		10,80
Морфин			8,30			5,08		
Хинин			8,75					11,50
Этилморфин								11,10
Спазмолитин			7,0					11,60
Пилокарпин								10,90
Резерпин								9,54
Папаверин			6,60					10,80
Тифен								11,30
Гексаметилентетрамин							9,70	7,0
Хинолин					11,40		9,86	
Амидопирин								9,13
Дибазол			6,40					9,0
Теофиллин								6,6
Фенацетин								6,0
Антипирин							8,35	9,6
Кофеин						5,17		6,30
Теобромин						5,26		6,10
Мочевина						4,67	7,65	

Примечание. Все данные, представленные в таблице, относятся к основаниям лекарственных веществ.

Раствор хлорной кислоты (0,02 моль/л)

1 мл раствора содержит 0,002009 г хлорной кислоты.

Приготовление. 20 мл раствора хлорной кислоты (0,1 моль/л) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора ледяной уксусной кислотой до метки.

Установка титра. Около 0,15 г гидрофталата калия (точная навеска), предварительно тонко измельченного и высушенного при 120 град. С в течение 2 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в ледяной уксусной кислоте и доводят объем раствора той же кислотой до метки.

К 10 мл полученного раствора прибавляют 15 мл ледяной уксусной кислоты и титруют, как в случае раствора 0,1 моль/л. Поправочный коэффициент с учетом разведения вычисляют по первому способу, где Т = 0,004084.

Раствор хлорной кислоты (0,01 моль/л)

1 мл раствора содержит 0,001005 г хлорной кислоты.

Приготовление. 10 мл раствора хлорной кислоты (0,1 моль/л) точно отмеривают из бюретки в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора ледяной уксусной кислотой до метки.

Установка титра. Около 0,15 г гидрофталата калия (точная навеска), предварительно тонко измельченного и высушенного при 120 град. С в течение 2 ч, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в ледяной уксусной кислоте и доводят объем раствора той же кислотой до метки. К 5 мл полученного раствора прибавляют 15 мл ледяной уксусной кислоты и титруют как в случае раствора (0,1 моль/л). Поправочный коэффициент с учетом разведения вычисляют по первому способу, где Т = 0,002042.

Раствор хлорной кислоты в нитрометане (0,1 моль/л)

1 мл раствора содержит 0,01005 г хлорной кислоты.

Приготовление. 8,2 мл 72% или 11,7 мл 57% водного раствора хлорной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем раствора нитрометаном до метки.

Установка титра. Около 0,15 г (точная навеска) гидрофталата калия растворяют в 20 мл ледяной уксусной кислоты и титруют приготовленным раствором хлорной кислоты в присутствии 2 капель раствора кристаллического фиолетового до перехода фиолетовой окраски в голубовато - зеленую.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Поправочный коэффициент вычисляют по первому способу, где Т = 0,02042.

Раствор хлорной кислоты в нитрометане (0,05 моль/л)

1 мл раствора содержит 0,005025 г хлорной кислоты.

Приготовление. 50 мл раствора хлорной кислоты (0,1 моль/л) в нитрометане точно отмеривают из бюретки в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора нитрометаном до метки.

Установка титра - как описано при установке титра раствора хлорной кислоты (0,1 моль/л) в нитрометане. Навеску гидрофталата калия берут около 0,08 г (точная навеска), где Т = 0,01021.

Раствор хлорной кислоты в метиловом спирте (0,1 моль/л)

1 мл раствора содержит 0,01005 г хлорной кислоты.

Приготовление. 8,2 мл 72% или 11,7 мл 57% водного раствора хлорной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем раствора метиловым спиртом до метки. При необходимости используют метиловый спирт, очищенный от карбонилсодержащих соединений.

Установка титра. Около 0,1 г (точная навеска) салицилата натрия, предварительно дважды перекристаллизованного из 95% спирта и высушенного до постоянной массы, растворяют в 10 мл метилового спирта, прибавляют равный объем ацетона, 2 капли раствора тимолового синего в метиловом спирте и титруют приготовленным раствором хлорной кислоты до перехода окраски от желтой к розовой.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Поправочный коэффициент вычисляют по первому способу, где Т = 0,01601.

Примечание. Допускается при установке титра растворов хлорной кислоты использовать в качестве установочного вещества дифенилгуанидин.

Раствор едкого натра в смеси метилового спирта
и бензола (0,1 моль/л)

1 мл раствора содержит 0,0040 г едкого натра.

Приготовление. 4,6 г едкого натра помещают в мерную колбу вместимостью 1 л и растворяют в 100 мл метилового спирта. Раствор доводят бензолом и метиловым спиртом до 1 л, прибавляя их попеременно при помешивании до образования прозрачного раствора. Соотношение метилового спирта и бензола при приготовлении раствора должно быть примерно 1:4.

Примечание. В случае получения непрозрачного раствора его оставляют на 12 ч, после чего прозрачную жидкость быстро сливают с осадка.

Установка титра. Около 0,1 г (точная навеска) бензойной кислоты растворяют в 20 мл диметилформамида, нейтрализованного непосредственно перед титрованием по тимоловому синему в диметилформамиде и титруют приготовленным раствором едкого натра в присутствии того же индикатора до перехода окраски от желтой к синей. Поправочный коэффициент вычисляют по первому способу, где Т = 0,01221. Титр раствора устанавливают каждый раз перед применением.

Примечание. Установку титра следует проводить в тщательно закрытых сосудах для титрования. Лучше титрование проводить в атмосфере инертного газа.

Раствор метилата натрия (0,1 моль/л)

1 мл раствора содержит 0,005402 г метилата натрия.

Приготовление. Около 2,5 г свежеочищенного от окисной пленки металлического натрия малыми порциями прибавляют к 150 мл метилового спирта в мерной колбе вместимостью 1 л.

Колбу с метиловым спиртом охлаждают в ледяной воде. После полного растворения металла объем раствора доводят бензолом или толуолом до метки, постепенно помешивая.

Установку титра проводят так же, как в случае раствора едкого натра (0,1 моль/л) в смеси метилового спирта и бензола. Титр раствора устанавливают каждый раз перед применением.

Примечание. Установку титра проводят в тщательно закрытых сосудах для титрования. Титрование лучше проводить в атмосфере инертного газа.

Раствор гидроокиси тетраэтиламмония (0,1 моль/л)

1 мл раствора содержит 0,014726 г гидроокиси тетраэтиламмония.

Приготовление. 30 г йодида тетраэтиламмония растворяют в 200 мл метилового спирта и встряхивают в течение часа с 25 г тонко измельченной окиси серебра в склянке с притертой пробкой. По окончании встряхивания центрифугируют несколько миллилитров смеси и раствор испытывают на присутствие йодид-ионов (проба с нитратом серебра в азотнокислой среде). В случае образования осадка йодида серебра к основному раствору прибавляют еще 5 г окиси серебра и снова встряхивают 30 мин. По окончании реакции осадок йодида серебра отфильтровывают через стеклянный фильтр N 4. Реакционную колбу споласкивают тремя порциями по 50 мл сухого бензола, бензольный раствор фильтруют через тот же фильтр и прибавляют к фильтрату. Затем фильтрат помещают в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем раствора бензолом до метки. Раствор хранят в склянке, снабженной поглотительной трубкой, заполненной натронной известью или аскаритом для предохранения раствора от влаги воздуха и углекислоты.

Установка титра. Около 0,1 г (точная навеска) бензойной кислоты растворяют в смеси 5 мл метилового спирта и 20 мл ацетона, нейтрализованных непосредственно перед титрованием по тимоловому синему в метиловом спирте, и титруют приготовленным раствором гидроокиси тетраэтиламмония до получения отчетливого синего окрашивания или потенциометрически со стеклянным электродом. Поправочный коэффициент вычисляют по первому способу, где Т = 0,01221.

Примечание. Установку титра проводят в тщательно закрытых сосудах для титрования. Титрование лучше проводить в атмосфере инертного газа.

Индикаторы

Диметиловый желтый
п-Диметиламиноазобензол (ч.д.а.)

$C_{14}H_{15}N_3$ М.м. 225,30

Желтый кристаллический порошок или желтые пластинки. Практически нерастворим в воде, растворим в 95% спирте, бензоле, хлороформе, эфире, разведенных минеральных кислотах.

Переход окраски от оранжево - красной к желтой в пределах pH от 2,9 до 4,0.

Раствор индикатора. 0,1 г растертого индикатора растворяют в 95% спирте и доводят объем раствора 95% спиртом до 100 мл.

Раствор индикатора в бензоле. 0,1 г индикатора растворяют в бензоле и доводят объем раствора бензолом до 100 мл.

Кристаллический фиолетовый
Гексаметил-п-розанилин - хлорид (ч.д.а.)

$C_{25}H_{30}ClN_3$ М.м. 408,0

Бронзовые блестящие кристаллы или кристаллический порошок темно - зеленого цвета. Растворим в воде, 95% спирте и ледяной уксусной кислоте.

Переход окраски при неводном титровании от фиолетовой (щелочная) через сине - зеленую (нейтральная) к желтовато - зеленой (кислая).

Раствор индикатора в ледяной уксусной кислоте. 0,1 г индикатора растворяют в ледяной уксусной кислоте и доводят объем раствора той же кислотой до 100 мл.

Метиловый красный
4-Диметиламино-2-карбоксиазобензол (ч.д.а.)

$C_{15}H_{15}N_3O_2$ М.м. 269,29

Блестящие красно - фиолетовые кристаллы или красно - бурый кристаллический порошок. Мало растворим в воде, трудно растворим в 95% спирте, легко - в кипящем 95% спирте, растворим в растворах едких и углекислых щелочей.

Переход окраски от красной к желтой в пределах pH от 4,2 до 6,3.

Растворы индикатора. 1. 0,1 г растертого индикатора растворяют в 60 мл 95% спирта и доводят объем тем же спиртом до 100 мл.

2. 0,1 г индикатора растворяют в ступке с 7,4 мл раствора едкого натра (0,05 моль/л) и после его растворения доводят объем раствора свежепрокипяченной и охлажденной водой до 250 мл.

Метиловый оранжевый
4-Диметиламиноазобензол-4'-сульфонат натрия

$C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$ М.м. 327,34

Кристаллический порошок оранжевого, иногда с коричневатым оттенком цвета. Трудно растворим в воде, легко - в горячей воде; практически нерастворим в 95% спирте.

Переход окраски от красной через оранжевую к желтой в пределах pH от 3,0 до 4,4.

Раствор индикатора. 0,1 г растертого индикатора растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 100 мл.

Насыщенный раствор индикатора в ацетоне. К 0,025 г индикатора прибавляют 100 мл ацетона и время от времени встряхивают, через один час фильтруют.

Метиловый фиолетовый
смесь тетра-, пента- и гексаметил-п-розанилин - хлоридов
с преобладанием пентаметил-п-розанилин - хлорида (ч.д.а.)

$C_{24}H_{28}ClN_3$ М.м. 393,96

Темно - зеленый порошок с металлическим блеском. Растворим в воде и 95% спирте.

Переход окраски от желтой к зеленой в пределах pH от 0,1 до 1,5 и от зеленой к фиолетовой в пределах pH от 1,5 до 3,2.

Раствор индикатора. 0,1 г индикатора растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 100 мл.

Раствор индикатора в ледяной уксусной кислоте. 0,1 г индикатора растворяют в ледяной уксусной кислоте и доводят объем раствора той же кислотой до 100 мл. Раствор применяют свежеприготовленным.

Тимоловый синий
Тимолосульфофталеин (ч.д.а.)

$C_{27}H_{30}O_5S$ М.м. 466,6

Коричневый кристаллический порошок. Трудно растворим в воде с образованием раствора, окрашенного в желтый цвет, переходящий при нагревании в красный. Растворим в 95% спирте, эфире и ледяной уксусной кислоте, легко растворим в разведенных растворах щелочей с образованием растворов темно - синего цвета.

Переход окраски от красной к желтой в пределах pH от 1,2 до 2,8 и от желтой к синей в пределах pH от 8,0 до 9,6.

Раствор индикатора. 0,1 г индикатора растирают в ступке с 4,3 мл раствора едкого натра (0,05 моль/л) и после его растворения доводят объем раствора свежепрокипяченной и охлажденной водой до 200 мл.

Раствор индикатора в метиловом спирте. 0,3 г индикатора растворяют в метиловом спирте и доводят объем раствора метиловым спиртом до 100 мл.

Раствор индикатора в диметилформамиде. 1 г тимолового синего растворяют в диметилформамиде и доводят объем раствора диметилформамидом до 100 мл.

Тропеолин 00
4-(Фениламино)-азобензол-4'-сульфонат калия (ч.д.а.)

$C_{18}H_{14}KN_3O_3S$ М.м. 391,50

Коричневато - желтый с золотистым оттенком кристаллический порошок. Растворим в воде и 95% спирте.

Переход окраски от красной к желтой в пределах pH от 1,3 до 3,2.

Раствор индикатора. 0,1 г растертого индикатора растворяют в воде при нагревании на водяной бане и после охлаждения доводят объем раствора водой до 100 мл.

Раствор индикатора в метиловом спирте. К 0,2 г индикатора прибавляют 100 мл метилового спирта и время от времени взбалтывают (около 1 ч), после чего фильтруют.

Бромтимоловый синий
Дибромтимолсульфофталеин (ч.д.а.)

$C_{27}H_{28}Br_2O_5$ М.м. 624,4

Белый мелкокристаллический порошок. Очень мало растворим в воде, легко - в 95% спирте, эфире, растворах едких и углекислых щелочей и растворе аммиака.

Переход окраски от желтой через зеленую к синей в пределах pH от 6,0 до 7,6.

Растворы индикатора. 1. 0,1 г растертого индикатора растворяют в 20 мл теплого 95% спирта и после охлаждения доводят объем раствора водой до 100 мл.

2. 0,1 г индикатора растирают в ступке с 3,2 мл раствора едкого натра (0,05 моль/л) и после его растворения доводят свежепрокипяченной охлажденной водой до 250 мл.

3. 1 г бромтимолового синего растворяют в диметилформамиде и доводят объем раствора диметилформамидом до 100 мл.

Нейтральный красный
2-Метил-3-амино-7-диметиламинофеназоний - хлорид (ч.д.а.)

$C_{15}H_{17}ClN_4$ М.м. 288,78

Блестящий черно - зеленый порошок. Легко растворим в воде.

Переход окраски от красной к желтой в пределах pH от 6,8 до 8,0.

Раствор индикатора. 0,1 г растертого индикатора растворяют в воде и доводят объем раствора водой до 100 мл.

Раствор индикатора в ледяной уксусной кислоте. 0,1 г индикатора растворяют в ледяной уксусной кислоте и доводят объем раствора той же кислотой до 100 мл.

Реактивы

Ацетон (ч.д.а.)

CH_3COCH_3 М.м. 58,08

Прозрачная бесцветная, легко воспламеняющаяся жидкость с характерным запахом. Содержание основного вещества не менее 99,5%. Температура кипения от 55,5 до 56,6 град. С. Максимальное содержание примесей 0,001%. Плотность от 0,7900 до 0,7915.

В колбу вместимостью 25 мл наливают 10 мл испытуемого ацетона и помещают в водяную баню с температурой 15 град. С. Когда температура ацетона станет равной 15 град. С, прибавляют 0,2 мл свежеприготовленного раствора перманганата калия (0,001 моль/л) и перемешивают. В течение 30 мин должно сохраниться розовое окрашивание.

Смесь 25 мл ацетона с 25 мл воды должна оставаться прозрачной в течение 30 мин.

Ацетон, применяемый в качестве среды при титровании раствором хлорной кислоты, должен отвечать следующим дополнительным требованиям: на титрование 30 мл ацетона должно расходоваться не более 0,1 мл раствора хлорной кислоты (0,1 моль/л). В случае титрования с метиловым оранжевым в присутствии ацетата окисной ртути после прибавления последней к ацетону не должно появляться желтое окрашивание.

Диметилсульфоксид (х.ч.)

$(CH_3)_2SO$ М.м. 78,13

Прозрачная бесцветная маслянистая жидкость, гигроскопична. Растворим в воде, 95% спирте, эфире, ацетоне. Температура кипения 189 град. С. Плотность от 1,100 до 1,103. Показатель преломления 1,4783. Температура затвердевания от 17 до 18,5 град. С.

Диметилформамид (х.ч.)

$HCON(CH_3)_2$ М.м. 73,10

Бесцветная прозрачная жидкость с характерным запахом. Смешивается с водой, 95% спиртом, бензолом, хлороформом. Содержание основного вещества не менее 99,9%. Температура кипения от 152,5 до 154 град. С. Плотность от 0,9470 до 0,9490. Содержание воды не более 0,05%. Диметиламина не более 0,002%. Муравьиной кислоты не более 0,002%. Нелетучий остаток не более 0,003%.

При титровании 10 мл диметилформамида переход окраски индикатора происходит от прибавления одной капли титранта.

2,4-Динитрофенилгидразин

$C_6H_3(NO_2)NH_2$ М.м. 198,14

Красный кристаллический порошок. Практически нерастворим в воде, мало растворим в 95% спирте, эфире, растворим в разбавленных кислотах. Температура плавления от 190 до 198 град. С.

Сульфатная зола не более 0,2%. Потеря в массе при высушивании не более 0,2%.

2,4-Динитрофенилгидразина раствор

1,5 г 2,4-динитрофенилгидразина растворяют в 20 мл 50% серной кислоты, разводят водой до 100 мл и фильтруют. Раствор должен быть свежеприготовленным.

Дифенилгуанидин

$(C_6H_5NH)_2C=NH$ М.м. 217,27

Бесцветные кристаллы, мало растворим в воде и эфире, растворим в бензоле. Температура плавления от 147 до 148 град. С.

Дихлорэтан (ч.д.а.)

$C_2H_4Cl_2$ М.м. 98,96

Прозрачная бесцветная жидкость, несмешивающаяся с водой. Температурные пределы при 760 мм рт. ст., в которых должно отгоняться 95% препарата, от 83 до 84 град. С. Плотность от 1,2520 до 1,2535. Нелетучий остаток не более 0,002%. Свободный хлор не более 0,001%.

В две пробирки из бесцветного стекла, предварительно промытые концентрированной серной кислотой, наливают по 5 мл той же серной кислоты. В одну пробирку прибавляют 5 мл испытуемого дихлорэтана и встряхивают. Полученная окраска не должна превышать окраску серной кислоты.

Дихлорэтан, применяемый для неводного титрования, проверяют на устойчивость к бихромату калия: смесь 5 мл дихлорэтана с 25 мл раствора бихромата калия (0,0167 моль/л) и 12,5 мл разведенной серной кислоты кипятят с обратным холодильником 15 мин. После охлаждения прибавляют 10 мл раствора йодида калия и выделившийся йод титруют раствором тиосульфата натрия (0,1 моль/л). На 5 мл дихлорэтана должно расходоваться не более 1 мл раствора тиосульфата натрия (0,1 моль/л).

Калия гидрофталат (ч.д.а.)

$KHC_6H_4(COO)_2$ М.м. 204,23

Бесцветные кристаллы или мелкокристаллический порошок. Растворим в воде, мало растворим в 95% спирте. Содержание калия гидрофталата от 99,8 до 100,2%. pH 5% водного раствора 4 +/-0,1.

Метилэтилкетон (ч.)

$CH_3COC_2H_5$ М.м. 72,11

Бесцветная прозрачная жидкость, растворима в воде, смешивается во всех соотношениях с 95% спиртом, эфиром, хлороформом, бензолом. Температура кипения от 79 до 80,5 град. С. Нелетучий остаток не более 0,002%.

Муравьиная кислота (ч.д.а.)

$HCOOH$ М.м. 46,03

Бесцветная прозрачная жидкость с резким запахом, смешивается с водой во всех соотношениях. Растворима в 95% спирте и эфире. Содержание основного вещества не менее 99,7%. Температура кипения от 100 до 101 град. С. Температура кристаллизации не ниже 7,5 град. С. Плотность от 1,22 до 1,221. Содержание уксусной кислоты не более 0,05% щавелевой - не более 0,005%. Нелетучий остаток не более 0,002 %.

Нитрометан (ч.)

CH_3NO_2 М.м. 61,04

Прозрачная бесцветная жидкость со своеобразным запахом, напоминающим горький миндаль. Смешивается с 95% спиртом и эфиром, мало растворим в воде. Температура кипения 101 град. С. Плотность от 1,130 до 1,132. Показатель преломления от 1,382 до 1,383. При нагревании нитрометана выше 100 град. С под давлением, особенно в присутствии окисляющих веществ, следует соблюдать осторожность, так как иногда при этом происходит взрыв.

Пиридин (ч.д.а.)

C_6H_5N М.м. 79,10

Бесцветная подвижная жидкость с характерным запахом, гигроскопична. Смешивается во всех соотношениях с водой, 95% спиртом, эфиром, хлороформом. Легко воспламеняется. Содержание пиридина 99,0%. Температура кипения от 114 до 116 град. С. Плотность от 0,982 до 0,985. Содержание воды не более 0,1%.

Высушивание пиридина проводят следующим образом. К 1 л пиридина прибавляют 50 г сульфата натрия, предварительно высушенного при температуре от 100 до 110 град. С и охлаждавшегося в эксикаторе. После 10-минутного встряхивания и настаивания фильтруют в перегонную колбу и перегоняют. Сохраняют в склянках с притертыми пробками в защищенном от света месте.

Ртути окисной ацетат (ч.д.а.)

$Hg(CH_3COO)_2$ М.м. 318,68

Бесцветные кристаллы, легко растворимые в воде, растворимые в 95% спирте и уксусной кислоте. Ядовит.

Содержание ртути окисной ацетата не менее 97,0%.

Около 0,5 г препарата (точная навеска) растворяют в 50 мл воды, прибавляют 5 мл разведенной азотной кислоты и титруют раствором роданида аммония (0,1 моль/л) до перехода светло - зеленого окрашивания в желтоватое (индикатор - железоаммониевые квасцы).

1 мл раствора роданида аммония (0,1 моль/л) соответствует 0,01593 г $Hg(CH_3COO)_2$.

Остаток после прокаливания не более 0,02%. Хлоридов не более 0,013%, сульфатов не более 0,005%. Железа не более 0,001%.

Ртути окисной ацетата раствор

5 г ацетата окисной ртути помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют в теплой ледяной уксусной кислоте. После охлаждения объем раствора доводят ледяной уксусной кислотой до метки. Сохраняют в склянках оранжевого стекла в защищенном от света месте.

Спирт метиловый, очищенный от карбонилсодержащих примесей

1 л метилового спирта нагревают три часа с 10 г 2,4-динитрофенилгидразина и 2 мл концентрированной хлористоводородной кислоты с обратным холодильником на кипящей водяной

бане. Затем метиловый спирт два раза перегоняют на колонке, собирая фракцию, кипящую при 64,5 град. С.

Примечание. Проверка на отсутствие альдегидов: к 25 мл метилового спирта в колбе вместимостью 300 мл прибавляют 75 мл раствора 2,4-динитрофенилгидразина, нагревают на водяной бане с обратным холодильником 24 ч, спирт отгоняют, разводят до 200 мл 2% раствором серной кислоты и оставляют на 24 ч. Не должны образовываться кристаллы.

Тетраэтиламмоний - йодид (ч.)

$(C_2H_5)_4NI$ М.м. 257,16

Белые прозрачные кристаллы без запаха. Легко растворим в воде, трудно растворим в 95% спирте. Водные растворы имеют нейтральную реакцию. Температура разложения 250 град. С.

Уксусная кислота ледяная (х.ч.)

CH_3COOH М.м. 60,05

Температура кипения от 118 до 119 град. С.

Содержание уксусной кислоты не менее 99,8%.

В коническую колбу вместимостью 100 мл с притертой пробкой наливают 10 мл воды, прибавляют около 2 г (точная навеска) испытуемой уксусной кислоты и титруют раствором едкого натра (1 моль/л) до слабо - розового окрашивания (индикатор - фенолфталеин).

1 мл раствора едкого натра (1 моль/л) соответствует 0,06005 г CH_3COOH.

Нелетучий остаток не более 0,001%. Хлоридов не более 0,0002%. Сульфатов не более 0,0003%. Тяжелых металлов не более 0,0002%. Железа не более 0,0002%.

2 мл испытуемой кислоты (с точностью до 0,1 мл) помещают в колбу, прибавляют 10 мл воды и 0,1 мл раствора перманганата калия (0,1 моль/л). Розовое окрашивание должно сохраняться в течение 30 мин.

Ледяная уксусная кислота, применяемая в качестве растворителя при неводном титровании, должна выдерживать следующее дополнительное испытание.

10 мл испытуемой кислоты (с точностью до 0,1 мл) помещают в колбу, прибавляют 10 мл концентрированной серной кислоты, смесь охлаждают до температуры 5 град. С, прибавляют 1 мл 5% раствора бихромата калия и перемешивают. Одновременно готовят контрольный раствор, для чего в колбу прибавляют 10 мл воды, 10 мл концентрированной серной кислоты, 1 мл 5% раствора бихромата калия и перемешивают. Испытуемый и контрольный растворы оставляют на 30 мин. Затем к обоим растворам прибавляют по 50 мл воды, перемешивают и охлаждают до комнатной температуры. По охлаждении к растворам прибавляют по 2 г йодида калия и выделившийся йод титруют раствором тиосульфата натрия (0,1 моль/л) до обесцвечивания раствора.

Разность между количеством тиосульфата натрия, пошедшего на титрование испытуемого и контрольного растворов, не должна быть более 0,4 мл.

Уксусный ангидрид (ч.д.а.)

$(CH_3CO)_2O$ М.м. 102,09

Бесцветная прозрачная жидкость с резким запахом. В водных растворах быстро гидролизуется, образуя уксусную кислоту. Содержание уксусного ангидрида не менее 99,0%. Температура кипения от 138 до 141 град. С. Плотность от 1,0790 до 1,0820. Хлоридов не более 0,0001%. Сульфатов не более 0,0005%. Тяжелых металлов не более 0,0001%. Нелетучий остаток не более 0,002%.

Хлорная кислота, 72% и 57% водные растворы (х.ч.)

$HClO_4$ М.м. 100,46

Бесцветная или со слабым желтоватым оттенком прозрачная жидкость. Плотность около 1,7 и 1,5 соответственно. Хлоридов не более 0,0002%. Сульфатов не более 0,001%. Железа не более 0,00015%. Окислителей не более 0,00025%. Тяжелых металлов не более 0,001%.

Около 2,5 г хлорной кислоты (точная навеска) растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора водой до метки. 10 мл полученного раствора разбавляют 100 мл воды и титруют раствором едкого натра (0,1 моль/л) (индикатор - метиловый - оранжевый).

1 мл раствора едкого натра (0,1 моль/л) соответствует 0,01005 г хлорной кислоты.
Сохраняют в склянках с притертыми пробками вдали от горючих веществ.

Серебра окись (ч.)

Ag_2O М.м. 231,74

Коричнево - черный тяжелый порошок без запаха. Практически нерастворим в воде, легко растворим в разведенной азотной кислоте и концентрированном растворе аммиака.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Электрофорез - метод анализа, основанный на способности заряженных частиц к передвижению во внешнем электрическом поле. Передвижение частиц при электрофорезе зависит от ряда факторов, основными из которых являются: напряженность электрического поля, величина электрического заряда, скорость и размер частицы, вязкость, pH и температура среды, а также продолжительность электрофореза. При электрофорезе на носителях (твердая среда) на подвижность и эффективность разделения дополнительное влияние оказывают: адсорбция, неоднородность вещества носителя и его ионообменные свойства, электроосмос и капиллярный эффект.

Электрофоретическая подвижность является величиной, характерной для данного вещества. Различают абсолютную и относительную электрофоретическую подвижность. Абсолютная электрофоретическая подвижность измеряется в сантиметрах в секунду под влиянием градиента потенциала 1 В на 1 см и выражается в кв. см x $В^{-1}с^{-1}$. Относительная электрофоретическая подвижность есть отношение подвижности исследуемого вещества к подвижности другого вещества, принятого за стандарт.

Существуют два различных метода электрофореза: фронтальный электрофорез, который проводят в свободной незакрепленной среде, и зональный электрофорез - в закрепленной среде (стабилизированная жидкость или носители). Они имеют единую аппаратурную схему: источник тока, камеру для электрофореза, два электрода, соединяющих камеру с источником тока, и аппаратуру для сбора и идентификации разделенных веществ. Для электрофореза используют как готовые наборы аппаратуры (универсальный прибор для иммуноэлектрофореза и электрофореза белков на бумаге и крахмале, набор для электрофореза в полиакриламидном геле венгерской фирмы "Реанал"), так и наборы, составляемые экспериментатором из отдельных приборов (универсальный источник питания УИП-1, двухлучевой регистрирующий микрофотометр ИФО-451 и др.).

Примерная схема проведения электрофореза:
- подготовка среды (носителя);
- нанесение веществ, подлежащих разделению;
- проведение электрофореза;
- обнаружение и количественная оценка разделенных веществ.

Фронтальный электрофорез

Электрофорез проводят в свободной незакрепленной среде в кювете, которая представляет собой разборный U-образный канал. В кювете создают четкую границу между исследуемой смесью веществ и буферным раствором. В процессе электрофореза первоначальная граница постепенно расходится на ряд границ по числу компонентов смеси.

Метод является единственным способом прямого определения абсолютной электрофоретической подвижности. Его применяют для веществ с высокой молекулярной массой, которые обладают слабой диффузией.

Зональный электрофорез

Зональный электрофорез проводят в закрепленной среде, роль которой состоит в стабилизации электрофоретических зон. В зависимости от среды и способа проведения зональный электрофорез имеет много вариантов.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ В СВОБОДНОЙ ЖИДКОСТИ

Электрофорез в градиенте плотности. В качестве среды используют жидкость, стабилизированную добавлением глицерина, гликолей или сахарозы, создающих градиент плотности. Этой жидкостью, более тяжелой, чем фракционируемый раствор, заполняют внутреннюю трубку стеклянной охлаждаемой колонки. Дно трубки закрыто пористой стеклянной пластинкой. К обоим концам колонки присоединяют два электродных сосуда и проводят электрофорез.

Изоэлектрическое фокусирование. В качестве среды используют жидкость, в которой создают объединенный градиент плотности и pH. Градиент pH достигают прибавлением амфолитов, представляющих собой готовую смесь алифатических полиаминополикарбоновых кислот, или экспериментально подобранных смесей, которые при приложении электрического напряжения концентрируются в узких зонах своих изоэлектрических точек (pI). В результате в колонке создается градиент pH от 1 до 11. При электрофоретическом разделении, например смеси белков, каждый из них перемещается, пока дойдет до зоны, соответствующей его pI.

Метод позволяет разделять вещества, различие в pI которых составляет до 0,02, а также определять их pI.

В обоих методах полностью исключена адсорбция, что позволяет обнаруживать и количественно оценивать вещества во фракциях непосредственно после электрофореза.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА КРУПНОПОРИСТЫХ НОСИТЕЛЯХ

В качестве крупнопористых носителей применяют фильтровальную бумагу, крахмал, целлюлозу, порошкообразную пластмассу, агар - агар, ацетилцеллюлозу, стеклянный порошок.

Электрофорез в блоке. В качестве носителя используют крахмал, который формируют в виде блока, помещают на лоток, соединенный с двумя электродными сосудами, заполненными буферным раствором. Раствор исследуемого препарата замешивают на сухом крахмале и вносят в узкую поперечную траншею, сделанную в середине блока. После прекращения электрофореза блок разрезают на поперечные доли из каждой элюируют и количественно определяют исследуемое вещество. Метод применяется для разделения веществ с молекулярной массой выше 30 000, так как вещества с меньшей молекулярной массой проникают и адсорбируются внутри крахмальных зерен.

Электрофорез на колонках. Колонку заполняют суспендированным в буфере носителем. Фракционируемую смесь отрицательно заряженных веществ (что имеет место для большинства биологических материалов) наносят в колонку сверху, а положительно заряженных - снизу. Сбор фракций после электрофореза осуществляют путем последовательного элюирования буферным раствором.

Электрофорез на проточных установках. Кювета проточной установки представляет собой полую стенку, которую заполняют носителем. Электрическое поле накладывают в поперечном направлении. В кювете создают равномерный ток буферного раствора сверху вниз. Наверх кюветы в одно и то же место непрерывно подают тонкую струйку фракционируемого раствора. Под совместным влиянием электрического и гравитационного полей исходная смесь по мере спускания разделяется на расходящиеся веером компоненты. Со дна кюветы фракции собирают в серию пробирок.

Вариант этого метода на бумаге известен под названием вертикального электрофореза.

Электрофорез на бумаге. Вещество, подлежащее фракционированию, наносят на пропитанную проводящей жидкостью полоску фильтровальной бумаги на расстоянии не менее 1 см от края и не менее 2,5 см друг от друга. Бумагу подсушивают, помещают в камеру, концы погружают в кюветы с проводящей жидкостью. После пропитывания бумаги жидкостью к ее концам подключают электрический ток. По окончании электрофореза бумагу подсушивают в токе воздуха и оценивают результаты в соответствии с указаниями в статьях.

Для электрофореза пригодны только лучшие сорта хроматографической бумаги, которые должны содержать не менее 96% альфа - целлюлозы. Бумагу предварительно подвергают хроматографической очистке подходящими растворителями. Вместо бумаги могут быть использованы полоски ацетатцеллюлозы.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ НА МЕЛКОПОРИСТЫХ НОСИТЕЛЯХ

На мелкопористых носителях разделение веществ на зоны идет не только в соответствии с их электрическими зарядами, но и в зависимости от молекулярной массы и формы молекул.

Электрофорез в тонком слое проводится в закрепленном толщиной 1-2 мм слое силикагеля, агара, агарозы, крахмала, полиакриламидного геля, сефадекса, целлюлозы, кизельгура, окиси алюминия, алебастра. Проводящую жидкость вводят в слой носителя или ею опрыскивают слой после его формирования. Раствор исследуемого вещества вносят на поверхность слоя или внутрь

отверстий, вырезанных в слое. Электрофоретический процесс можно проводить в устройствах, предназначенных для электрофореза на бумаге.

Электрофорез в крахмальном геле. Гель готовят из гидролизованного крахмала. Горячий гель заливают в кювету глубиной 5-6 мм, которую закрывают специальной крышкой, устроенной так, что в застывшем геле остается поперечный ряд узких щелей (0,3-0,7 мм). В щели вносят кусочки фильтровальной бумаги, смоченной раствором исследуемого вещества, и проводят одномерный или двухмерный электрофорез в горизонтальных или вертикальных установках. Преимущество горизонтального варианта - простота исполнения, вертикального - большая разрешающая сила.

Электрофорез в полиакриламидном геле. Полиакриламидный гель (ПАГ) представляет собой синтетический продукт сополимеризации акриламида и сшивающего агента, чаще всего N, N1-метиленбисакриламида. Благодаря образованию поперечных связей между растущими соседними полиакриламидными цепями, возникающими в результате полимеризации винильных групп, такой гель имеет структуру трехмерной сетки. В отличие от природного полимера крахмала синтетический гель прозрачен, химически стабилен, инертен, устойчив к изменениям pH и температуры, нерастворим в большинстве растворителей и, наконец, в нем практически отстутствуют адсорбция и электроосмос.

ПАГ готовят на буфере, в котором растворяют акриламид, сшивку и катализатор. Можно получить гель с концентрацией акриламида от 2 до 50%. Повышение концентрации геля понижает его пористость. Буферная система и состав геля определяются природой разделяемого вещества. Концентрацию (с) акриламида подбирают с учетом средней молекулярной массы (М. м.) фракционируемых веществ:

М. м.	с, %
$< 10 \times 10^3$	> 30,0
$10-30 \times 10^3$	15,0-30,0
$30-100 \times 10^3$	7,5-15,0
$> 100 \times 10^3$	< 7,5

Электрофорез выполняют в установках вертикального или горизонтального типа. В ходе электрофореза необходимо следить за тем, чтобы кювета не перегревалась во избежание возникновения конвекционных токов.

Диск - электрофорез представляет собой разновидность электрофореза в ПАГ. Метод имеет высокую разрешающую способность благодаря использованию двух физических явлений:

1) эффекта концентрирования анализируемой смеси в узкой стартовой зоне (бесконечность 10"ми"), который обусловлен автоматическим выравниванием скоростей движения ионов на границе Кольрауша;

2) эффекта молекулярного сита, т.е. разделения вещества по величине молекулярной массы и по форме молекул.

Диск - электрофорез обычно проводят в узких стеклянных трубках, содержащих два разнопористых геля. В ходе электрофореза в верхнем относительно более крупнопористом геле происходит концентрирование смеси, а в нижнем мелкопористом - ее разделение. Верхний и нижний гели готовят на различных буферных растворах, которые в свою очередь отличаются от буфера в электродных сосудах.

Схема проведения опыта: стеклянные трубки последовательно заполняют смесью реактивов, из которых вначале полимеризуется мелкопористый, а затем - крупнопористый гель, после чего трубки соединяют с электродными камерами, которые заполняют буферным раствором так, чтобы в него погрузились верхний и нижний концы трубок. Сверху под буфер в трубки вносят исследуемый образец. После электрофореза гель извлекают из трубок, фиксируют и определяют исследуемые вещества.

Изотахофорез представляет собой также разновидность электрофореза в ПАГ с использованием прерывистой буферной системы, в которой ведущий ион имеет высокую подвижность, а замыкающий - низкую, что обеспечивает высокую разрешающую способность метода.

КОМБИНИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ ЗОНАЛЬНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Иммуноэлектрофорез представляет собой сочетание электрофореза с реакцией преципитации. Сначала проводят электрофорез белков в тонком слое геля. После электрофореза в геле в направлении движения белков делают боковые углубления, которые заполняют соответствующей антисывороткой. Затем пластинки на 1-2 сут помещают во влажные камеры, где в результате диффузии антигены взаимодействуют с антителами и образуют изогнутые зоны преципитации. Метод позволяет выявлять индивидуальные белки.

Метод пептидных карт представляет собой сочетание бумажной и тонкослойной хроматографии с высоковольтным электрофорезом. В качестве носителей используют силикагель или порошок целлюлозы. Вначале проводят хроматографию, для чего пробу наносят в точку вблизи одной стороны бумаги или пластинки, а затем под углом 90 град. проводят высоковольтный электрофорез. Метод применяют для разделения смеси низкомолекулярных соединений.

МЕТОДЫ ОБНАРУЖЕНИЯ И РЕГИСТРАЦИИ РАЗДЕЛЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

В зависимости от варианта метода результаты электрофореза оцениваются разными способами:

- документирование (фотографирование или зарисовка);
- определение величины абсолютной или относительной электрофоретической подвижности;
- денситометрия;
- определение характерных химических, физико-химических или биологических показателей фракций.

Для окраски электрофореграмм наиболее часто применяют следующие красители: для белков - амидошварц 10 В, кумаси, бромфеноловый синий, азокармин В; для липидов и липопротеидов - жировой краситель 0, судан черный; для моносахаридов - водородно - анилино - фталатный реактив; для высших жирных кислот - краситель, состоящий из метилового красного и бромтимолового синего.

МЕТОД ФАЗОВОЙ РАСТВОРИМОСТИ

Метод фазовой растворимости - это количественное определение чистоты вещества путем точных измерений величины растворимости.

Практическое выполнение анализа данным методом заключается в определении величины растворимости исследуемого вещества в растворителе в условиях равновесия при постоянных температуре и давлении. Для этой цели прибавляют возрастающие количества образца к постоянному количеству растворителя, помещенному в одинаковые емкости. Системы, состоящие из вещества и растворителя, приводят в состояние равновесия длительным встряхиванием при постоянной температуре. Затем определяют содержание растворенного вещества в каждой системе.

Строят диаграмму (рис. 12) <*>, откладывая по оси ординат массу растворенного вещества на единицу массы растворителя (состав раствора) и по оси абсцисс - массу прибавленного вещества на единицу массы растворителя (состав системы).

<*> Рис. 12. Типичная диаграмма фазовой растворимости.

АВ - состав системы, соответствующей ненасыщенным истинным растворам; ВС - состав системы, соответствующей насыщенным растворам; СД - линия растворимости; ДЕ - состав системы, насыщенной всеми компонентами испытуемого вещества. (Рисунок не приводится).

При данной температуре в определенном количестве растворителя растворяется определенное количество чистого вещества. Полученный раствор насыщен определенным веществом, но этот же раствор остается ненасыщенным в отношении других веществ, даже если эти вещества могут быть близки по химическому строению и физическим свойствам к данному исследуемому веществу. Равные величины растворимости, полученные в каждой системе, указывают на то, что материал чист или свободен от посторонних веществ. Исключением является случай, когда процентный состав исследуемого вещества равен отношению величин растворимости соответствующих компонентов. Различие в значениях растворимости для каждой системы указывают на наличие примеси или примесей.

Метод фазовой растворимости применим ко всем видам соединений, которые образуют устойчивые истинные растворы.

Растворители. При выборе подходящего растворителя для метода фазовой растворимости пользуются следующими критериями.

1. Растворитель должен иметь такую летучесть, чтобы его можно было выпарить в условиях вакуума - 1 кгс/кв. см, но не настолько летучим, чтобы в процессе анализа происходили его потери. Обычно подходят растворители с точкой кипения от + 60 до + 150 град. С.

2. Растворитель не должен неблагоприятно влиять на образец. Нельзя использовать растворители, которые вызывают разложение образца или реагируют с ним. Следует избегать растворителей, образующих сольваты или соли, так как при высушивании подобных соединений возможно растрескивание кристаллов и как следствие этого - изменение массы высушенных остатков.

3. Степень чистоты и состав растворителя должны быть известны. Допускаются тщательно приготовленные смешанные растворители. Следовые количества примесей в растворителях могут существенно влиять на растворимость.

4. Оптимальной растворимостью испытуемого вещества в избранном растворителе является растворимость в пределах от 5 до 25 мг на 1 г растворителя.

Приборы. Используют термостат, способный поддерживать заданную температуру в пределах +/-0,1 град. С. Для удобства работы обычно выбирают температуру от +25 до +30 град. С. Термостат оборудуют подходящим вибратором, обеспечивающим 100-120 колебаний в секунду и имеющим приспособление с зажимами для ампул. Вместо этого термостат может быть снабжен горизонтальным устройством, способным вращаться со скоростью приблизительно 25 об/мин и имеющим зажимы для ампул.

Емкости, используемые в анализе. Используют любые ампулы вместимостью 15 мл. Можно использовать и другие емкости при условии, что они герметичны и подходят во всех других отношениях (рис. 13) <*>. Выпаривание растворителя проводят в колбочках, пригодных для лиофилизации, или в бюксах подходящей емкости.

<*> Рис. 13. Ампула (слева) и колбочки (справа), применяемые при анализе методом фазовой растворимости. (Рисунок не приводится).

Весы. Используют весы и метод взвешивания, обеспечивающие точность взвешивания в пределах +/- 10 мкг.

Методика. Описанная ниже методика является общепринятой. Однако в некоторых случаях можно предпочесть и другие условия (объем растворителя и т. д.).

Состав системы. Точно взвешивают не менее 7 помеченных, тщательно вымытых ампул и в каждой из них точно взвешивают постоянно увеличиваемые количества исследуемого вещества. Массу вещества подбирают таким образом, чтобы первая ампула содержала немного меньше вещества, чем будет растворяться в объеме выбранного растворителя, обычно в 5 мл, а вторая и последующие ампулы - несколько больше, чем указанная величина растворимости. В каждую из ампул пипеткой вносят 5 мл растворителя, охлаждают в смеси сухой лед - ацетон, если это необходимо, и запаивают с помощью двухструйной газовой горелки. Принимают меры предосторожности, чтобы сохранить все кусочки стекла. Дают ампулам вместе с их содержимым остыть до комнатной температуры и взвешивают отдельно каждую ампулу вместе с относящимися к ней кусочками стекла.

Рассчитывают состав системы в миллиграммах вещества на грамм растворителя для каждой ампулы по формуле:

$$1000(W2 - W1) / (W3 - W2),$$

где W1 - масса пустой ампулы; W2 - масса ампулы с исследуемым веществом; W3 - масса ампулы с исследуемым веществом, растворителем и кусочками стекла.

Равновесие. Время, необходимое для достижения состояния равновесия, зависит от вещества, метода перемешивания (вибрация или вращение) и температуры. Обычно с помощью вибрационного метода равновесие устанавливается быстрее (2-7 сут), чем с помощью ротационного метода (7-14 сут).

Убедиться в том, что состояние равновесия достигнуто, можно следующим образом. В одной из ампул - предпоследней в этой серии - получают пересыщенный раствор нагреванием при температуре на 10 град. С выше, чем температура термостата, принимая меры предосторожности, чтобы твердое вещество в ампуле не растворилось полностью. После этого с "пересыщенной" ампулой поступают так же, как с другими. Если величина растворимости, полученная для этой ампулы, будет находиться на одной прямой с другими величинами на графике, то это указывает на то, что состояние равновесия достигнуто. Однако, если величина растворимости из "пересыщенной" ампулы окажется вне прямой, на которой лежат другие значения растворимости, это не обязательно означает, что в других ампулах не достигнуто равновесие, так как в ряде случаев это может быть обусловлено тенденцией определенных веществ образовывать пересыщенные растворы. Для достижения состояния равновесия в таких случаях проводят ряд

определений методом фазовой растворимости, подбирая различные отрезки времени для достижения состояния равновесия: таким образом можно убедиться, что получены постоянные величины наклона кривой растворимости.

Состав раствора. После достижения состояния равновесия ампулы помещают вертикально в стойку в термостат и дают нерастворившемуся веществу осесть. Соблюдая все меры предосторожности для уменьшения потерь растворителя за счет испарения, открывают ампулы и берут пипеткой 2 мл из каждой ампулы. На кончик пипетки необходимо поместить комочек ваты или другого подходящего материала, служащего фильтром.

Удаляют вату, переносят прозрачный раствор из каждой ампулы в помеченную, предварительно взвешенную колбочку или бюкс и взвешивают каждую емкость вместе с раствором: таким образом, получают массу раствора. Охлаждают колбочки в смеси сухой лед - ацетон и затем выпаривают растворитель в вакууме. Постепенно увеличивают температуру вакуум - сушильного шкафа до 50-80 град. С, высушивают остаток до постоянной массы. Рассчитывают состав раствора в миллиграммах вещества на грамм растворителя по формуле:

$$1000(F3 - F1) / (F2 - F3),$$

где F1 - масса колбочки; F2 - масса колбочки вместе с раствором; F3 - масса колбочки с остатком.

Расчет. Для каждой части взятого исследуемого вещества на оси абсцисс откладывают состав системы и по оси ординат - состав раствора. Как показано на рис. 12, точки для тех ампул, в которых получены ненасыщенные истинные растворы, должны приближаться к прямой линии (АВ) с наклоном 1, проходящей через начало координат; точки, соответствующие насыщенным растворам, должны приближаться к другой прямой линии (ВС) с наклоном, который отражает содержание суммы примесей в исследуемом веществе. Если точки не приближаются к прямой линии, это означает, что состояние равновесия достигнуто не было, хотя это может быть также обусловлено образованием твердого раствора. Процентное содержание примесей в исследуемом веществе рассчитывают по формуле:

$$100 - 100 \times S.$$

Наклон (S) рассчитывают по уравнению: $S = (Y2 - Y1) / (X2 - X1)$, где Y2 и Y1 - составы растворов, X2 и X1 - составы систем, соответствующие точкам, взятым на второй прямой линии ВС. Кроме того, суммарное содержание примеси может быть вычислено статистически, например методом наименьших квадратов.

Значение растворимости основного компонента получают продлением линии растворимости ВС до оси Y. Точка пересечения на оси Y дает величину экстраполированной растворимости в миллиграммах на грамм и должна быть постоянной для данного вещества.

В идеальных условиях число примесей в исследуемом веществе соответствует числу изломов кривой растворимости выше точки насыщения (В), и значения растворимости соответствующих компонентов могут быть получены продлением соответствующих линий растворимости до пересечения с осью Y и вычитанием из общей величины растворимости соответствующих величин растворимости компонентов.

Между точками Д и Е на диаграмме раствор насыщен всеми компонентами испытуемого вещества и его состав остается постоянным.

Метод фазовой растворимости рекомендуется использовать для оценки качества стандартных образцов и серийных субстанций стероидных соединений, тетрациклинов, цефалоспоринов и некоторых пенициллинов.

ПОЛЯРОГРАФИЯ

Полярография - электрохимический метод анализа, основанный на измерении силы тока, возникающего при электролизе раствора анализируемого вещества на микроэлектроде.

При помощи полярографического метода обычно изучаются вещества, способные к электровосстановлению, реже - вещества, окисляющиеся при электролизе. Обычная область концентраций анализируемых веществ составляет 10^{-2} - 10^{-4} моль/л. Электролиз проводят в полярографической ячейке, состоящей из сосуда - электролизера и двух электродов. Микроэлектродом является ртуть, вытекающая каплями из тонкого стеклянного капилляра (ртутный капающий электрод), макроэлектродом служит либо слой ртути на дне электролизера, либо внешний стандартный электрод, чаще всего

насыщенный каломельный электрод. Обыкновенно микроэлектрод функционирует в качестве катода, на котором происходит электрохимическое восстановление анализируемого вещества.

При подаче на электроды постепенно возрастающего напряжения вначале через электролизер протекает очень слабый ток, называемый остаточным, который линейно зависит от величины приложенного напряжения. Когда достигается потенциал выделения, характерный для данного электроактивного вещества - деполяризатора, начинается электролиз и сила тока резко возрастает, при этом средняя концентрация деполяризатора у поверхности ртутного капающего электрода уменьшается, а скорость диффузии соответственно возрастает. При дальнейшем увеличении напряжения концентрация деполяризатора у поверхности электрода становится настолько малой по сравнению с концентрацией в основной части раствора, что разность концентраций по величине приближается к концентрации анализируемого вещества в растворе. При этом через систему будет протекать максимально возможный ток, который называют предельным диффузионным током.

В результате на графике зависимости силы тока от напряжения появляется так называемая полярографическая волна (рис. 14) <*>.

<*> Рис. 14. Вольтамперная кривая (полярографическая волна).

1 - предельный диффузионный ток; 2 - ток разряда полярографического фона; 3 - потенциал полуволны; 4 - потенциал выделения; 5 - остаточный ток. На оси ординат - величина среднего диффузного тока (мкА); на оси абсцисс - прилагаемое напряжение в вольтах. (Рисунок не приводится).

Величина диффузионного тока выражается уравнением Ильковича:

$$i_d = 607ncD^{1/2} m^{2/3} t^{1/6},$$

где i_d - величина среднего диффузионного тока в микроамперах (мкА); n - число электронов, расходуемых на электрохимическое превращение одной молекулы деполяризатора; c - концентрация определяемого вещества (ммоль/л); D - коэффициент диффузии деполяризатора (кв. см/с); m - масса ртути, вытекающей в секунду из капилляра (мг/с); t - период капания капающего электрода (с).

Уравнение Ильковича отражает линейную зависимость величины предельного диффузионного тока от концентрации вещества в растворе, а также указывает на зависимость диффузионного тока от характеристики применяемого в эксперименте капающего электрода ($m^{2/3} t^{1/6}$) и характера электроактивных частиц ($nD^{1/2}$). В водных растворах в интервале температур от 20 до 50 град. С коэффициенты диффузии с повышением температуры возрастают приблизительно на 3% на градус, а значения i_d на 1-2% на градус повышения температуры, поэтому температуру полярографической ячейки следует соблюдать с точностью до +/-0,5 град. С при стандартной температуре 25 град. С.

Величины m и t зависят от параметров ртутного капающего электрода и высоты столба ртути.

Ртутный капающий электрод представляет собой стеклянный капилляр с внешним диаметром 3-7 мм и внутренним 0,03-0,05 мм, длина капилляра 7-15 см. Высота ртутного столба (расстояние от конца капилляра до поверхности ртути в резервуаре) должна составлять 40-80 см.

Количество электричества, проходящее через испытуемый раствор за время регистрации полярограммы, очень мало, поэтому изменение концентрации деполяризатора в исследуемом растворе ничтожно, что позволяет многократно регистрировать полярограммы.

Для создания достаточной электропроводности к испытуемому раствору прибавляют избыток (в 50-100 раз) индифферентного электролита, так называемого полярографического фона, т. е. соли, ионы которой не принимают участия в электродной реакции, но участвуют в переносе электрических зарядов через раствор. Ток разряда электролита фона не должен мешать наблюдению тока восстановления или окисления анализируемого вещества.

Полярографический анализ может быть проведен как в водной среде, так и в смешанной водно - органической (водно - спиртовой, водно - ацетоновой, водно - диметилформамидной и др.) или неводных средах (спирт, ацетон, диметилформамид, диметилсульфоксид и т.д.).

Потенциал полуволны Е 1/2 (см. рис. 14) характеризует природу электроактивного вещества. Е 1/2 сильно зависит от состава и pH раствора, но обычно мало зависит от концентрации диполяризатора и характеристики капилляра, вследствие чего он может служить критерием при качественной идентификации определяемого вещества.

Количественный полярографический анализ основан на измерении предельного диффузионного тока определяемого вещества (высоты волны). Высота волны определяется графически либо проведением касательных по способу, представленному на рис. 15, а, <*> либо вычитанием остаточного тока фона (полярографируемого раствора, содержащего все реактивы в той же концентрации, в какой они содержатся в испытуемом растворе, но без определяемого вещества) в соответствии с рис. 15, б <*>.

<*> Рис. 15. Способы измерения высоты полярографической волны.

а - определение проведением касательных; б - определение вычитанием остаточного тока фона; 1 - полярограмма раствора определяемого вещества; 2 - полярограмма раствора фона. (Рисунок не приводится).

Второй способ пригоден в случае, если полярограмма имеет недостаточно четко выраженную площадку предельного диффузионного тока, к тому же позволяет проверить чистоту реактивов, используемых для приготовления исследуемого раствора.

Методика определения. Для аналитических целей обычно применяются электроды с величиной t = 2 - 3 с, m = 1 - 2 мг/с или электроды с принудительным отрывом капли, имеющие t = 0,2 - 0,5 с при тех же величинах m. Испытуемый раствор, приготовленный, как указано в соответствующей частной статье, помещают в полярографическую ячейку и снимают полярограмму. Перед снятием полярограммы для удаления растворенного кислорода из полярографируемого раствора через него пропускают инертный газ (аргон, очищенный азот) в течение 5-20 мин в зависимости от применяемого растворителя. В отдельных случаях кислород связывают химически (сульфитом натрия, метолом). Для предотвращения потерь растворителя за счет испарения инертный газ следует предварительно пропускать через раствор фона.

Для определения концентрации исследуемого вещества пользуются следующими методами.

Метод калибровочных кривых. Готовят ряд растворов с различной концентрацией стандартного образца, снимают их полярограммы и определяют высоты волн. По полученным данным строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс величины концентраций, а по оси ординат соответствующие значения диффузионного тока (высоты волн). Калибровочный график обычно представляет собой прямую линию, проходящую через начало координат. Затем снимают полярограмму испытуемого раствора и, пользуясь калибровочным графиком, находят искомую концентрацию.

Метод целесообразно применять при анализе большого количества серийных растворов. Этот метод наиболее точен.

Метод стандартных растворов. В случае анализа отдельных проб пользуются более простым методом стандартных растворов, заключающимся в том, что сначала полярографируют испытуемый раствор, а затем в тех же условиях 2-3 стандартных раствора, содержащих определяемое вещество в известной концентрации. Концентрация стандартных растворов подбирается с таким расчетом, чтобы полученная высота волны была примерно равна высоте волны неизвестного раствора.

Сопоставляя высоту волн стандартных растворов (Нст) с высотой волны испытуемого раствора (Нх), концентрацию вещества в испытуемом растворе (c_x) рассчитывают по формуле:

$$c_x = \frac{c_{ст} \times Н_x}{Н_{ст}},$$

где $c_{ст}$ - концентрация раствора стандартного образца.

Метод добавок. Снимают полярограмму испытуемого раствора, затем к нему прибавляют раствор с известной концентрацией определяемого вещества и снимают вторую полярограмму. Для обеспечения большей точности определения стандартный раствор добавляют в таком количестве, чтобы высота волны получалась примерно вдвое больше первоначальной.

Концентрацию вещества в испытуемом растворе (c_x) расчитывают

x

по формуле:

$$c_x = \frac{c_{ст}}{\frac{V_x + V_{ст}}{V_{ст}} \times \frac{H_{ст}}{H_x} - \frac{V_x}{V_{ст}}},$$

где $c_{ст}$ - концентрация раствора добавляемого стандартного образца; H_x - высота волны испытуемого раствора; $H_{ст}$ - высота волны, полученная после прибавления стандартного раствора; V_x - объем испытуемого раствора; $V_{ст}$ - объем прибавленного стандартного раствора.

Метод имеет особое значение при анализе растворов, в которых неизвестно точное содержание присутствующих в нем посторонних веществ.

Относительная ошибка воспроизводимости полярографического метода составляет 2-5%.

Примечание. Пары ртути ядовиты. Работу проводят в хорошо проветриваемом помещении. Полярографическую ячейку устанавливают в вытяжном шкафу. Пролитую ртуть немедленно собирают. Стеклянную посуду, загрязненную мельчайшими каплями ртути, моют концентрированной азотной кислотой.

ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

ОБЩИЕ РЕАКЦИИ НА ПОДЛИННОСТЬ

Амины ароматические первичные

0,05 г препарата растворяют в 1 мл разведенной хлористоводородной кислоты, если необходимо, нагревают, охлаждают во льду, прибавляют 2 мл 1% раствора нитрита натрия; полученный раствор прибавляют к 1 мл щелочного раствора бета - нафтола, содержащего 0,5 г ацетата натрия; образуется осадок от желто - оранжевого до оранжево - красного цвета.

АММОНИЙ

1 мл раствора соли аммония (0,002-0,006 г иона аммония) нагревают с 0,5 мл раствора едкого натра; выделяется аммиак, обнаруживаемый по запаху и по посинению влажной красной лакмусовой бумаги.

АЦЕТАТЫ

А. 2 мл раствора ацетата (0,02-0,06 г иона ацетата) нагревают с равным количеством концентрированной серной кислоты и 0,5 мл 95% спирта; ощущается запах этилацетата.

Б. К 2 мл нейтрального раствора ацетата (0,02-0,06 г иона ацетата) прибавляют 0,2 мл раствора хлорида окисного железа; появляется красно - бурое окрашивание, исчезающее при прибавлении разведенных минеральных кислот.

БЕНЗОАТЫ

К 2 мл нейтрального раствора бензоата (0,01-0,02 г иона бензоата) прибавляют 0,2 мл раствора хлорида окисного железа; образуется розовато - желтый осадок, растворимый в эфире.

БРОМИДЫ

А. К 1 мл раствора бромида (0,002-0,03 г иона бромида) прибавляют 1 мл разведенной хлористоводородной кислоты, 0,5 мл раствора хлорамина, 1 мл хлороформа и взбалтывают; хлороформный слой окрашивается в желто - бурый цвет.

Б. К 2 мл раствора бромида (0,002-0,01 г иона бромида) прибавляют 0,5 мл разведенной азотной кислоты и 0,5 мл раствора нитрата серебра; образуется желтоватый творожистый осадок, нерастворимый в разведенной азотной кислоте и трудно растворимый в растворе аммиака.

ВИСМУТ

А. Препараты висмута (около 0,05 г иона висмута) взбалтывают с 3 мл разведенной хлористоводородной кислоты и фильтруют. К фильтрату прибавляют 1 мл раствора сульфида натрия или сероводорода; образуется коричневато - черный осадок, растворимый при прибавлении равного объема концентрированной азотной кислоты.

Б. Препараты висмута (около 0,05 г иона висмута) взбалтывают с 5 мл разведенной серной кислоты и фильтруют. К фильтрату прибавляют 2 капли раствора йодида калия; образуется черный осадок, растворимый в избытке реактива с образованием раствора желтовато - оранжевого цвета.

ЖЕЛЕЗО ЗАКИСНОЕ

А. К 2 мл раствора соли закисного железа (около 0,02 г иона железа) прибавляют 0,5 мл разведенной хлористоводородной кислоты и 1 мл раствора феррицианида калия; образуется синий осадок.

Б. К раствору соли закисного железа (около 0,02 г иона железа) прибавляют раствор сульфида аммония; образуется черный осадок, растворимый в разведенных минеральных кислотах.

ЖЕЛЕЗО ОКИСНОЕ

А. К 2 мл раствора соли окисного железа (около 0,001 г иона железа) прибавляют 0,5 мл разведенной хлористоводородной кислоты и 1-2 капли раствора ферроцианида калия; образуется синий осадок.

Б. К 2 мл раствора соли окисного железа (около 0,001 г иона железа) прибавляют 0,5 мл разведенной хлористоводородной кислоты и 1-2 капли раствора роданида аммония; появляется красное окрашивание.

В. К раствору соли окисного железа (около 0,001 г иона железа) прибавляют раствор сульфида аммония; образуется черный осадок, растворимый в разведенных минеральных кислотах.

ЙОДИДЫ

А. К 2 мл раствора йодида (0,003-0,02 г иона йодида) прибавляют 0,2 мл разведенной серной кислоты, 0,2 мл раствора нитрита натрия или раствора хлорида окисного железа и 2 мл хлороформа; при взбалтывании хлороформный слой окрашивается в фиолетовый цвет.

Б. К 2 мл раствора йодида (0,002-0,01 г иона йодида) прибавляют 0,5 мл разведенной азотной кислоты и 0,5 мл раствора нитрата серебра; образуется желтый творожистый осадок, нерастворимый в разведенной азотной кислоте и растворе аммиака.

В. При нагревании 0,1 г препарата с 1 мл концентрированной серной кислоты выделяются фиолетовые пары йода.

КАЛИЙ

А. К 2 мл раствора соли калия (0,01-0,02 г иона калия) прибавляют 1 мл раствора винной кислоты, 1 мл раствора ацетата натрия, 0,5 мл 95% спирта и встряхивают; постепенно образуется белый кристаллический осадок, растворимый в разведенных минеральных кислотах и растворах едких щелочей.

Б. К 2 мл раствора соли калия (0,005-0,01 г иона калия), предварительно прокаленной для удаления солей аммония, прибавляют 0,5 мл разведенной уксусной кислоты и 0,5 мл раствора кобальтинитрита натрия; образуется желтый кристаллический осадок.

В. Соль калия, внесенная в бесцветное пламя, окрашивает его в фиолетовый цвет или при рассматривании через синее стекло - в пурпурно - красный.

КАЛЬЦИЙ

А. К 1 мл раствора соли кальция (0,002-0,02 г иона кальция) прибавляют 1 мл раствора оксалата аммония; образуется белый осадок, нерастворимый в разведенной уксусной кислоте и растворе аммиака, растворимый в разведенных минеральных кислотах.

Б. Соль кальция, смоченная хлористоводородной кислотой и внесенная в бесцветное пламя, окрашивает его в кирпично-красный цвет.

КАРБОНАТЫ (ГИДРОКАРБОНАТЫ)

А. К 0,2 г карбоната (гидрокарбоната) или к 2 мл раствора карбоната (гидрокарбоната) (1:10) прибавляют 0,5 мл разведенной кислоты; выделяется углекислый газ, который образует белый осадок при пропускании через известковую воду.

Б. К 2 мл раствора карбоната (1:10) прибавляют 5 капель насыщенного раствора сульфата магния; образуется белый осадок (гидрокарбонат образует осадок только при кипячении смеси).

В. Раствор карбоната (1:10) при прибавлении 1 капли раствора фенолфталеина окрашивается в красный цвет (отличие от гидрокарбонатов).

МАГНИЙ

К 1 мл раствора соли магния (0,002-0,005 г иона магния) прибавляют 1 мл раствора хлорида аммония, 1 мл раствора аммиака и 0,5 мл раствора фосфата натрия; образуется белый кристаллический осадок, растворимый в разведенных минеральных кислотах и уксусной кислоте.

МЫШЬЯК

1. Арсениты. А. К 0,3 мл раствора соли трехвалентного мышьяка (около 0,03 г иона арсенита) прибавляют 0,5 мл разведенной хлористоводородной кислоты и 2 капли раствора сульфида натрия или сероводорода; образуется желтый осадок, нерастворимый в концентрированной хлористоводородной кислоте, растворимый в растворе аммиака.

Б. К 0,3 мл раствора соли трехвалентного мышьяка (около 0,003 г иона арсенита) прибавляют 1-2 капли раствора нитрата серебра; образуется желтый осадок, растворимый в разведенной азотной кислоте и растворе аммиака.

2. Арсенаты. А. К 0,3 мл раствора соли пятивалентного мышьяка (около 0,03 г иона арсената) прибавляют 0,5 мл разведенной хлористоводородной кислоты, 2 капли раствора сульфида натрия или сероводорода и нагревают; образуется желтый осадок, нерастворимый в концентрированной хлористоводородной кислоте, растворимый в растворе аммиака.

Б. К 0,3 мл раствора соли пятивалентного мышьяка (около 0,001 г иона арсената) прибавляют 1-2 капли раствора нитрата серебра; образуется коричневый осадок, растворимый в разведенной азотной кислоте и растворе аммиака.

В. К 0,3 мл раствора соли пятивалентного мышьяка (около 0,001 г иона арсената) прибавляют по 1 мл растворов хлорида аммония, аммиака и сульфата магния; образуется белый кристаллический осадок, растворимый в разведенной хлористоводородной кислоте (отличие от арсенитов).

НАТРИЙ

А. 1 мл раствора соли натрия (0,01-0,03 г иона натрия) подкисляют разведенной уксусной кислотой, если необходимо, фильтруют, затем прибавляют 0,5 мл раствора цинк - уранилацетата; образуется желтый кристаллический осадок.

Б. Соль натрия, смоченная хлористоводородной кислотой и внесенная в бесцветное пламя, окрашивает его в желтый цвет.

НИТРАТЫ

А. К препарату (около 0,001 г иона нитрата) прибавляют 2 капли раствора дифениламина; появляется синее окрашивание.

Б. К препарату (0,002-0,005 г иона нитрата) прибавляют по 2-3 капли воды и концентрированной серной кислоты, кусочек металлической меди и нагревают; выделяются бурые пары двуокиси азота.

В. Нитраты (около 0,002 г иона нитрата) не обесцвечивают раствор перманганата калия, подкисленный разведенной серной кислотой (отличие от нитритов).

НИТРИТЫ

А. К препарату (около 0,001 г иона нитрита) прибавляют 2 капли раствора дифениламина; появляется синее окрашивание.

Б. К препарату (около 0,03 г иона нитрита) прибавляют 1 мл разведенной серной кислоты; выделяются желто - бурые пары (отличие от нитратов).

В. Несколько кристаллов антипирина растворяют в фарфоровой чашке в 2 каплях разведенной хлористоводородной кислоты, прибавляют 2 капли раствора нитрита (около 0,001 г иона нитрита); появляется зеленое окрашивание (отличие от нитратов).

РТУТЬ ОКИСНАЯ

А. К 2 мл раствора соли окисной ртути (около 0,05 г иона ртути) прибавляют 0,5 мл раствора едкого натра; образуется желтый осадок.

Б. К 1 мл раствора соли окисной ртути (0,01-0,03 г иона ртути) прибавляют осторожно по каплям раствор йодида калия; образуется красный осадок, растворимый в избытке реактива.

САЛИЦИЛАТЫ

К 2 мл нейтрального раствора салицилата (0,002-0,01 г иона салицилата) прибавляют 2 капли раствора хлорида окисного железа; появляется сине - фиолетовое или красно - фиолетовое окрашивание, которое сохраняется при прибавлении небольшого количества разведенной уксусной кислоты, но исчезает при прибавлении разведенной хлористоводородной кислоты. При этом образуется белый кристаллический осадок салициловой кислоты.

СУЛЬФАТЫ

К 2 мл раствора сульфата (0,005-0,05 г иона сульфата) прибавляют 0,5 мл раствора хлорида бария; образуется белый осадок, нерастворимый в разведенных минеральных кислотах.

СУЛЬФИТЫ

А. К 2 мл раствора сульфита (0,01-0,03 г иона сульфита) прибавляют 2 мл разведенной хлористоводородной кислоты и встряхивают; постепенно выделяется сернистый газ, обнаруживаемый по характерному резкому запаху.

Б. К 2 мл раствора сульфита (0,002-0,02 г иона сульфита) прибавляют 0,5 мл раствора хлорида бария; образуется белый осадок, растворимый в разведенной хлористоводородной кислоте (отличие от сульфатов).

В. При добавлении к раствору сульфита нескольких капель раствора йода (0,1 моль/л) реактив обесцвечивается.

ТАРТРАТЫ

А. К 1 мл раствора тартрата (около 0,02 г иона тартрата) прибавляют кристаллик хлорида калия, 0,5 мл 95% спирта; образуется белый кристаллический осадок, растворимый в разведенных минеральных кислотах и растворах едких щелочей.

Б. 0,25 мл раствора тартрата (около 0,005 г иона тартрата) нагревают с 1 мл концентрированной серной кислоты и несколькими кристаллами резорцина; через 15-30 с появляется вишнево - красное окрашивание.

ФОСФАТЫ

А. К 1 мл раствора фосфата (0,01-0,03 г иона фосфата), нейтрализованного до pH около 7,0, прибавляют несколько капель раствора нитрата серебра; образуется желтый осадок, растворимый в разведенной азотной кислоте и растворе аммиака.

Б. К 1 мл раствора фосфата (0,01-0,03 г иона фосфата) прибавляют 1 мл раствора хлорида аммония, 1 мл раствора аммиака и 0,5 мл раствора сульфата магния; образуется белый кристаллический осадок, растворимый в разведенных минеральных кислотах.

В. К 1 мл раствора фосфата (0,01-0,03 г иона фосфата) в разведенной азотной кислоте прибавляют 2 мл раствора молибдата аммония и нагревают; образуется желтый кристаллический осадок, растворимый в растворе аммиака.

ХЛОРИДЫ

К 2 мл раствора хлорида (0,002-0,01 г иона хлорида) прибавляют 0,5 мл разведенной азотной кислоты и 0,5 мл раствора нитрата серебра; образуется белый творожистый осадок, нерастворимый в разведенной азотной кислоте и растворимый в растворе аммиака. Для солей органических оснований испытание растворимости образовавшегося осадка хлорида серебра проводят после отфильтровывания и промывания осадка водой.

ЦИНК

А. К 2 мл нейтрального раствора соли цинка (0,005-0,02 г иона цинка) прибавляют 0,5 мл раствора сульфида натрия или сероводорода; образуется белый осадок, нерастворимый в разведенной уксусной кислоте и легко растворимый в разведенной хлористоводородной кислоте.

Б. К 2 мл раствора соли цинка (0,005-0,02 иона цинка) прибавляют 0,5 мл раствора ферроцианида калия; образуется белый осадок, нерастворимый в разведенной хлористоводородной кислоте.

ЦИТРАТЫ

А. К 1 мл нейтрального раствора цитрата (0,002-0,01 г иона цитрата) прибавляют 1 мл раствора хлорида кальция; раствор остается прозрачным; при кипячении образуется белый осадок, растворимый в разведенной хлористоводородной кислоте.

Б. К препарату (0,001-0,002 г иона цитрата) прибавляют 0,5 мл уксусного ангидрида и нагревают; через 20-40 с появляется красное окрашивание.

ИСПЫТАНИЯ НА ЧИСТОТУ И ДОПУСТИМЫЕ ПРЕДЕЛЫ ПРИМЕСЕЙ

Для определения примесей в препаратах и приблизительной оценки их количества вводятся сравнения (колориметрические или нефелометрические) с эталонными растворами, устанавливающими предел содержания данной примеси.

Общие замечания

1. Вода и все реактивы должны быть свободны от ионов, на содержание которых проводят испытания.
2. Пробирки, в которых проводят наблюдения, должны быть бесцветными и одинакового диаметра.
3. Навески для приготовления эталонных растворов отвешивают с точностью до 0,001 г.
4. Эталонные растворы Б и В готовят непосредственно перед применением.
5. Наблюдения мути и опалесценции растворов проводят в проходящем свете на темном фоне, а окраски - при дневном отраженном свете на матово - белом фоне.
6. Прибавление реактивов к испытуемому и эталонному растворам должно проводиться одновременно и в одинаковых количествах.
7. В случае, когда в соответствующей фармакопейной статье указано, что в данной концентрации раствора не должно обнаруживаться той или иной примеси, поступают следующим образом. К 10 мл испытуемого раствора прибавляют применяемые для каждой реакции реактивы, указанные в методике, кроме основного реактива, открывающего данную примесь. Затем раствор делят на две равные части: к одной из них прибавляют основной реактив и оба раствора сравнивают между собой. Между ними не должно быть заметной разницы.

Испытание на хлориды

Растворы хлоридов в зависимости от их концентрации образуют с раствором нитрата серебра белый творожистый осадок, белую муть или опалесценцию, не исчезающие от прибавления азотной кислоты и легко исчезающие от прибавления раствора аммиака.

Предельная чувствительность реакции - 0,0001 мг (0,1 мкг) хлор - иона в 1 мл раствора. 0,002 мг (2 мкг) хлор - иона в 1 мл раствора дают при этой реакции хорошо заметную опалесценцию.

Определение проводят следующим образом: к 10 мл раствора испытуемого препарата, приготовленного, как указано в соответствующей частной статье, прибавляют 0,5 мл азотной кислоты, 0,5 мл раствора нитрата серебра, перемешивают и через 5 мин сравнивают с эталоном, состоящим из 10 мл эталонного раствора Б и такого же количества реактивов, какое прибавлено к испытуемому раствору.

Опалесценция, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать эталон.

Эталонный раствор хлор - иона. 0,659 г прокаленного хлорида натрия растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 1 л и доводят объем раствора водой до метки (раствор А). 5 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем раствора водой до метки (раствор Б). Этот раствор содержит 0,002 мг (2 мкг) хлор - иона в 1 мл.

Испытание на сульфаты

Растворы сульфатов в зависимости от их концентрации образуют с растворами солей бария белый осадок или муть, не исчезающие от прибавления разведенной хлористоводородной кислоты.

Предельная чувствительность реакции 0,003 мг (3 мкг) сульфат - иона в 1 мл раствора. 0,01 мг (10 мкг) сульфат - иона в 1 мл раствора дает при этой реакции через 10 мин заметную муть.

Определение проводят следующим образом: к 10 мл раствора испытуемого препарата, приготовленного, как указано в соответствующей частной статье, прибавляют 0,5 мл разведенной хлористоводородной кислоты и 1 мл раствора хлорида бария, перемешивают и через 10 мин сравнивают с эталоном, состоящим из 10 мл эталонного раствора Б и такого же количества реактивов, какое прибавлено к испытуемому раствору.

Муть, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать эталон.

Эталонный раствор сульфат - иона. 1,814 г сульфата калия, высушенного при температуре от 100 до 105 град. С до постоянной массы, растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 1 л и доводят объем раствора водой до метки (раствор А). 10 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем раствора водой до метки (раствор Б). Этот раствор содержит 0,01 мг (10 мкг) сульфат - иона в 1 мл.

Испытание на соли аммония

МЕТОД I

Растворы солей аммония в зависимости от их концентрации образуют с реактивом Несслера желто - бурый осадок или желтое окрашивание.

Предельная чувствительность реакции 0,0003 мг (0,3 мкг) иона аммония в 1 мл раствора. 0,002 мг (2 мкг) иона аммония в 1 мл раствора дают при этой реакции ясное желтое окрашивание.

Определение проводят следующим образом: к 10 мл раствора испытуемого препарата, приготовленного, как указано в соответствующей частной статье, прибавляют 0,15 мл реактива Несслера, перемешивают и через 5 мин сравнивают с эталоном, состоящим из 10 мл эталонного раствора Б и такого же количества реактива, какое прибавлено к испытуемому раствору. Окраска, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать эталон.

В препаратах, содержащих щелочноземельные и тяжелые металлы, определение проводят следующим образом: испытуемое вещество растворяют в возможно меньшем количестве воды, прибавляют при охлаждении 2 мл раствора едкого натра и 2 мл раствора карбоната натрия.

Раствор разбавляют водой до требуемой концентрации, взбалтывают и фильтруют. В 10 мл фильтрата проводят определение, как указано выше.

В препаратах, содержащих более 0,03% примеси железа, определение проводят следующим образом: к 10 мл раствора испытуемого препарата прибавляют 2 капли раствора едкого натра и 3 мл 20% раствора тартрата натрия - калия. После тщательного перемешивания прибавляют 0,15 мл реактива Несслера и далее поступают, как указано выше.

Эталонный раствор аммоний - иона. 0,628 г хлорида аммония, высушенного в эксикаторе над серной кислотой до постоянной массы, растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 1 л и доводят объем раствора водой до метки (раствор А). 10 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем раствора водой до метки (раствор Б). Этот раствор содержит 0,002 мг (2 мкг) иона аммония в 1 мл.

МЕТОД II

Соли аммония при прибавлении едкого натра выделяют аммиак, который определяют по запаху или посинению смоченной водой красной лакмусовой бумаги.

Предельная чувствительность реакции 0,003 мг (3 мкг) иона аммония в 1 мл раствора.

Определение проводят следующим образом: 5 мл раствора испытуемого препарата, указанной в соответствующей частной статье концентрации, помещают в коническую колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл раствора едкого натра. Сверху колбы помещают смоченную водой красную лакмусовую бумагу и закрывают часовым стеклом. Колбу ставят на водяную баню.

Наблюдение проводят через 5 мин.

Испытание на соли кальция

Растворы солей кальция в зависимости от их концентрации дают с раствором оксалата аммония белый мелкокристаллический осадок или белую муть, не исчезающую от прибавления уксусной кислоты, но легко растворимые при прибавлении хлористоводородной или азотной кислоты.

Предельная чувствительность реакции 0,0035 мг (3,5 мкг) кальций - иона в 1 мл раствора. 0,03 мг (30 мкг) кальций - иона в 1 мл раствора дают при этой реакции хорошо заметную муть.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ В НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЯХ

К 10 мл раствора испытуемого препарата, приготовленного, как указано в соответствующей частной статье, прибавляют 1 мл раствора хлорида аммония, 1 мл раствора аммиака и 1 мл раствора оксалата аммония, перемешивают и через 10 мин сравнивают с эталоном, состоящим из 10 мл эталонного раствора Б и такого же количества реактивов, какое прибавлено к испытуемому раствору.

Муть, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать эталон.

Эталонный раствор кальций - иона. 0,749 г карбоната кальция, высушенного при температуре от 100 до 105 град. С до постоянной массы, взбалтывают в мерной колбе вместимостью 100 мл с 10 мл воды, прибавляют постепенно разведенную хлористоводородную кислоту до растворения и после удаления пузырьков углекислого газа доводят объем раствора водой до метки (раствор А).

10 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 1 л и доводят объем раствора водой до метки (раствор Б). Этот раствор содержит 0,03 мг (30 мкг) кальций - иона в 1 мл.

Испытание на соли железа

Растворы солей двух- и трехвалентного железа в зависимости от концентрации образуют с раствором сульфосалициловой кислоты в аммиачной среде коричнево - красные или желтые растворы феррилсульфосалицилатных комплексов.

Предельная чувствительность реакции 0,00005 мг (0,05 мкг) железо (II)- или (III)-иона в 1 мл раствора. 0,003 мг (3 мкг) железо (II)- или (III)-иона в 1 мл раствора дают при этой реакции ясное желтое окрашивание.

Определение проводят следующим образом: к 10 мл раствора испытуемого препарата, приготовленного, как указано в соответствующей частной статье, прибавляют 2 мл раствора сульфосалициловой кислоты и 1 мл раствора аммиака и через 5 мин сравнивают с эталоном, состоящим из 10 мл эталонного раствора В и такого же количества реактивов, какое прибавлено к испытуемому раствору.

Окраска, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать эталон.

Определение солей железа в соединениях магния. Поступают, как указано выше, но перед прибавлением раствора аммиака к раствору препарата прибавляют 0,5 мл раствора хлорида аммония.

Определение солей железа в соединениях алюминия. К раствору препарата, приготовленного, как указано в соответствующей частной статье, прибавляют 5 мл раствора сульфосалициловой кислоты и 2 мл раствора едкого натра. Полученную окраску сравнивают с эталоном, состоящим из 10 мл эталонного раствора В и такого же количества реактивов, какое прибавлено к испытуемому раствору.

Определение солей железа в органических соединениях. Зольный остаток после сжигания навески препарата с концентрированной серной кислотой обрабатывают 2 мл концентрированной хлористоводородной кислоты при нагревании на водяной бане и прибавляют 2 мл воды.

Содержимое тигля, если нужно, фильтруют в пробирку через фильтр небольшого диаметра, тигель и фильтр промывают 3 мл воды, присоединяя промывные воды к фильтрату. Раствор нейтрализуют концентрированным раствором аммиака и доводят объем раствора водой до 10 мл. Далее поступают, как указано выше.

Эталонный раствор железо (III)-иона. Определяют содержание железа в железоаммониевых квасцах методом, описанным для хлорида окисного железа. Около 2,5 г препарата (точная навеска) растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора водой до метки, 20 мл этого раствора переносят в колбу с притертой пробкой, прибавляют 10 мл хлористоводородной кислоты и 2 г йодида калия, смесь взбалтывают и оставляют в темном месте на 30 мин, затем прибавляют 50 мл воды и титруют раствором тиосульфата натрия (0,1 моль/л) (индикатор - крахмал). 1 мл раствора тиосульфата натрия соответствует 0,005585 г железа.

На основании полученных результатов готовят 0,1% раствор железо (III)-иона, для чего рассчитанное количество железоаммониевых квасцов растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл, прибавляют 1 мл хлористоводородной кислоты и доводят объем раствора водой до метки (раствор А).

15 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл и доводят объем раствора водой до метки (раствор Б). 10 мл раствора Б помещают в мерную колбу вместимостью

100 мл и доводят объем раствора водой до метки (раствор В). Этот раствор содержит 0,003 мг (3 мкг) железо (III)-иона в 1 мл. Раствор В пригоден только в день его приготовления.

Испытание на соли цинка

Растворы солей цинка в зависимости от концентрации образуют с раствором ферроцианида калия белый осадок или муть, нерастворимые в разведенных кислотах.

Предельная чувствительность реакции 0,001 мг (1 мкг) цинк - иона в 1 мл раствора. 0,005 мг (5 мкг) цинк - иона в 1 мл раствора дают при этой реакции хорошо заметную муть.

Определение проводят следующим образом: к 10 мл раствора испытуемого препарата, приготовленного, как указано в соответствующей частной статье, прибавляют 2 мл хлористоводородной кислоты, 5 капель раствора ферроцианида калия и через 10 мин сравнивают с эталоном, состоящим из 10 мл эталонного раствора Б и такого же количества реактивов, какое прибавлено к испытуемому раствору. Муть, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать эталон.

Примечание. В случае появления в испытуемом растворе синего окрашивания, мешающего нефелометрическому сравнению, следует предварительно отделить железо. Для этого к испытуемому раствору, нагретому до кипения, прибавляют раствор аммиака до отчетливого запаха и смесь фильтруют. В соответствующей части фильтрата определяют цинк.

Эталонный раствор цинк - иона. 0,625 г окиси цинка, предварительно прокаленной до постоянной массы, растворяют в 10 мл азотной кислоты, переносят в мерную колбу вместимостью 500 мл и доводят объем раствора водой до метки (раствор А). 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 4 капли азотной кислоты и доводят объем раствора водой до метки (раствор Б). Этот раствор содержит 0,005 мг (5 мкг) цинк - иона в 1 мл.

Испытание на соли тяжелых металлов

Растворы солей свинца в зависимости от концентрации образуют с растворами сульфида натрия или сероводорода черный осадок или бурое окрашивание раствора.

0,0005 мг (0,5 мкг) свинец - иона в 1 мл раствора дают при этой реакции при наблюдении в слое толщиной от 6 до 8 см заметное буроватое окрашивание (предел чувствительности).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В РАСТВОРАХ ПРЕПАРАТОВ

К 10 мл раствора испытуемого препарата, приготовленного, как указано в соответствующей частной статье, прибавляют 1 мл разведенной уксусной кислоты, 2 капли раствора сульфида натрия, перемешивают и через 1 мин сравнивают с эталоном, состоящим из 1 мл эталонного раствора Б, такого же количества реактивов, какое прибавлено к испытуемому раствору, и 9 мл воды.

Наблюдение окраски проводят по оси пробирок диаметром около 1,5 см, помещенных на белой поверхности.

В сравниваемых растворах допустима лишь слабая опалесценция от серы, выделяющейся из сульфида натрия.

Примечание. В препаратах, содержащих железо в количестве 0,05% и более, определение тяжелых металлов проводят после отделения железа, согласно указаниям в соответствующих частных статьях.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ЗОЛЬНОМ ОСТАТКЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Зольный остаток, полученный после сжигания 1 г органического вещества в присутствии серной кислоты, обрабатывают при нагревании на сетке 2 мл насыщенного раствора ацетата аммония, нейтрализованного раствором едкого натра (см. примечание 1), прибавляют 3 мл воды и фильтруют в пробирку через беззольный фильтр небольшого диаметра, предварительно промытый 1 % раствором уксусной кислоты, а затем горячей водой. Тигель и фильтр промывают 5 мл воды, пропуская ее через тот же фильтр в ту же пробирку. В полученном растворе тяжелые металлы определяют, как указано выше.

Для приготовления эталона в тигель помещают серную кислоту в количестве, взятом для сжигания препарата, и далее поступают, как с испытуемым препаратом, но промывание тигля и

фильтра производят лишь 3 мл воды, после чего к фильтрату прибавляют 2 мл эталонного раствора Б.

Примечания. 1. Насыщенный раствор ацетата аммония нейтрализуют следующим образом: сначала прибавляют 30% раствор едкого натра до розового окрашивания по фенолфталеину, а затем избыток едкого натра нейтрализуют насыщенным раствором ацетата аммония до слабо - розового окрашивания.

2. Определению тяжелых металлов из зольного остатка наличие солей железа в препаратах не мешает.

Эталонный раствор свинец - иона. 0,915 г свежеперекристаллизованного ацетата свинца растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 1 л, прибавляют 1 мл разведенной уксусной кислоты и доводят объем раствора водой до метки (раствор А). 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора водой до метки (раствор Б). Этот раствор содержит 0,005 мг (5 мкг) свинец - иона в 1 мл.

Раствор Б пригоден только в день его приготовления.

Испытание на мышьяк

Если в фармакопейной статье нет специального указания, то испытание следует проводить по методу I.

МЕТОД I

Соединения мышьяка под действием цинка и хлористоводородной или серной кислоты восстанавливаются в мышьяковистый водород, который, соприкасаясь с бумагой, пропитанной раствором дихлорида ртути, окрашивает ее в зависимости от количества мышьяка в оранжевый или желтый, а после обработки раствором йодида калия - в буровато - коричневый цвет.

Минимальное количество мышьяка, которое может быть открыто этим методом в реакционной смеси, равно 0,0005 мг (0,5 мкг).

Методика определения. В колбу (рис. 16) <*>, где находится соответствующим образом приготовленное вещество (см. ниже), прибавляют от 10 до 12 капель раствора дихлорида олова, 2 г гранулированного цинка (без мышьяка) и тотчас закрывают колбу пробкой со вставленной в нее верхней частью прибора. Содержимое колбы осторожно взбалтывают и оставляют на 1 ч. При этом температура реакционной смеси не должна превышать 40 град. С. Параллельно в другом таком же приборе проводят контрольный опыт со всеми реактивами и с прибавлением 0,5 мл эталонного раствора мышьяка. Через 1 ч полоску бумаги, пропитанную раствором дихлорида ртути, помещают в раствор йодида калия. Через 10 мин раствор йодида калия сливают, полоску бумаги тщательно промывают несколько раз водой декантацией в том же стакане и сушат между листами фильтровальной бумаги. Полоска бумаги, взятая из прибора с исследуемым веществом, не должна быть окрашенной или окраска ее не должна быть интенсивнее окраски полоски бумаги в контрольном опыте.

<*> Рис. 16. Прибор для испытания на мышьяк.

1 - колба; 2 - стеклянная трубка; 3 - тампон из ваты, пропитанной раствором ацетата свинца; 4 - стеклянная трубка; 5 - полоска бумаги, пропитанная раствором дихлорида ртути. (Рисунок не приводится).

Эталонный раствор мышьяка. 0,0132 г мышьяковистого ангидрида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 10 мл раствора едкого натра (0,1 моль/л), нейтрализуют раствором серной кислоты (0,05 моль/л) и доводят объем раствора свежепрокипяченной водой до метки (раствор А). 1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора свежепрокипяченной водой до метки (раствор Б). Этот раствор содержит 0,001 мг (1 мкг) мышьяка в 1 мл или 0,0005 мг (0,5 мкг) в 0,5 мл.

Раствор Б пригоден только в день его приготовления.

Подготовка препаратов для определения в них мышьяка. Неорганические препараты. а) Препараты, не содержащие азотной кислоты, нитратов и нитритов, не выделяющие в условиях проведения испытаний галогенов, сероводорода, сернистого ангидрида и фосфинов: навеску испытуемого препарата, указанную в соответствующей фармакопейной статье, помещают в колбу 1 прибора для испытания на мышьяк (см. рис. 16) и прибавляют 20 мл разведенной хлористоводородной кислоты.

б) Азотная кислота, нитраты, нитриты, а также соединения, выделяющие в условиях испытания галогены, сероводород, сернистый ангидрид и фосфины: навеску испытуемого

препарата, указанную в соответствующей фармакопейной статье, помещают в колбу 1 прибора для испытания на мышьяк, прибавляют туда же 10 мл концентрированной серной кислоты и кипятят 40 мин. Затем в горячий раствор прибавляют по стенке колбы 4 мл пергидроля, нагревают еще от 10 до 15 мин и по охлаждении прибавляют 20 мл воды, не допуская сильного разогревания.

Органические препараты. Навеску испытуемого препарата, указанную в соответствующей фармакопейной статье, помещают в колбу 1 прибора для испытания на мышьяк, прибавляют 10 мл концентрированной серной кислоты и кипятят до обугливания, но не менее 40 мин. Затем в горячий раствор прибавляют по стенке колбы пергидроль порциями по 4 мл до обесцвечивания раствора, нагревают еще от 10 до 15 мин и по охлаждении прибавляют 20 мл воды, не допуская сильного разогревания.

Примечание. Отдельные отклонения от вышеописанных методов предварительной обработки препаратов указаны в соответствующих фармакопейных статьях.

Подготовка цинка. Кусочки металлического цинка, не содержащего мышьяка, обрабатывают хлористоводородной кислотой для очистки его поверхности, промывают водой и сохраняют под водой.

Приготовление бумаги, пропитанной раствором дихлорида ртути. Беззольную фильтровальную бумагу смачивают насыщенным спиртовым раствором дихлорида ртути, дают спирту испариться, повторяют это 4-5 раз, после чего бумагу высушивают при комнатной температуре.

Сохраняют в хорошо закупоренных банках.

Приготовление ваты, пропитанной раствором ацетата свинца. Гигроскопическую вату хорошо пропитывают раствором ацетата свинца и высушивают при комнатной температуре. Сохраняют в хорошо закупоренных банках. Тампон из ваты в приборе меняют после каждого определения.

МЕТОД II

Метод II применяют в случае определения наряду с мышьяком селена и теллура, а также при определении мышьяка в препаратах сурьмы, висмута, ртути и серебра, препаратах, содержащих сульфиды и сульфиты, и в некоторых других случаях. Указания о применении метода II даются в соответствующих частных статьях.

Соединения мышьяка при нагревании с фосфорноватистой кислотой в присутствии хлористоводородной кислоты восстанавливаются до металлического мышьяка и в зависимости от концентрации дают бурый осадок или бурое окрашивание.

Предельная чувствительность реакции 0,01 мг мышьяка в 10 мл реакционной смеси. Если во взятой навеске препарата содержится 0,01 мг мышьяка, то при испытании по нижеописанному способу получается заметное темно - бурое окрашивание жидкости.

Методика определения. Навеску вещества после предварительной обработки, описанной в соответствующей частной статье, вносят в пробирку, прибавляют 5 мл раствора гипофосфита натрия, помещают в пробирку в кипящую водяную баню и нагревают в течение 15 мин.

В испытуемой жидкости не должно быть заметно ни побурения, ни образования бурого осадка.

В случае побурения или образования бурого осадка в пробирку после охлаждения прибавляют 3 мл воды, 5 мл эфира и тщательно взбалтывают. При наличии мышьяка на границе жидкостей образуется бурая пленка.

РАСТВОРИМОСТЬ

В фармакопее под растворимостью подразумевают свойство вещества растворяться в разных растворителях, принятых Государственной фармакопеей. Показатели растворимости в разных растворителях приведены в частных статьях. Если растворимость является показателем чистоты препарата, то в частной статье есть об этом специальное указание.

Для обозначения растворимости веществ в фармакопее приняты условные термины (в пересчете на 1 г), значения которых приведены в таблице.

В отдельных случаях приводятся конкретные соотношения веществ и растворителя.

Условные термины	Количество растворителя (мл), необходимое для растворения 1 г вещества
Очень легко растворим	До 1

Легко растворим	Более	1	До	10
Растворим	>>	10	>>	30
Умеренно растворим	>>	30	>>	100
Мало растворим	>>	100	>>	1000
Очень мало растворим	>>	1000	>>	10000
Практически нерастворим	>>	10000		

Методика определения растворимости. Навеску препарата вносят в отмеренное количество растворителя и непрерывно встряхивают в течение 10 мин при 20 +/-2 град. С. Предварительно препарат может быть растерт.

Для медленно растворимых препаратов, требующих для своего растворения более 10 мин, допускается также нагревание на водяной бане до 30 град. С. Наблюдение производят после охлаждения раствора до 20 +/-2 град. С и энергичного встряхивания в течение 1-2 мин.

Условия растворения медленно растворимых препаратов указываются в частных статьях.

Препарат считают растворившимся, если в растворе при наблюдении в проходящем свете не обнаруживаются частицы вещества. Для препаратов, образующих при растворении мутные растворы, соответствующее указание должно быть приведено в частной статье.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛЕТУЧИХ ВЕЩЕСТВ И ВОДЫ

Метод высушивания

Точную навеску вещества помещают в предварительно высушенный и взвешенный бюкс и сушат до постоянной массы (условия высушивания, температура и навеска приводятся в соответствующих частных статьях). Если высушивание проводилось при нагревании, открытый бюкс вместе с крышкой помещают в эксикатор для охлаждения на 50 мин, затем закрывают крышкой и взвешивают. Первое взвешивание проводят после сушки в течение 2 ч (если в частной статье не указано иное время). Последующие взвешивания проводят после каждого часа дальнейшего высушивания.

Определение воды

Определение проводят в приборе (ГОСТ 1594-69), состоящем из стеклянной круглодонной колбы 1 вместимостью от 250 до 500 мл, приемника 2, представляющего собой градуированную пробирку вместимостью 10 мл, и холодильника 3 (рис. 17) <*>. В колбу 1 отвешивают указанное в статье количество вещества (от 10 до 20 г), прибавляют 100 мл толуола (ГОСТ 5789-78) или ксилола, несколько кусочков пемзы или пористой пластинки. Колбу нагревают на электроплитке или песчаной бане до кипения. Кипячение ведут так, чтобы конденсирующийся растворитель не скапливался в холодильнике, а спокойно стекал навстречу поднимающимся парам жидкости со скоростью от 2 до 4 капель в секунду. Кипячение прекращают, когда объем воды в приемнике перестанет увеличиваться и верхний слой растворителя в приемнике станет прозрачным. Вся отогнанная вода должна собираться в нижней части приемника. После охлаждения жидкости в приемнике до комнатной температуры отмечают объем отогнанной воды.

<*> Рис. 17. Прибор для определения воды (объяснение в тексте). (Рисунок не приводится).

Метод титрования реактивом К. Фишера

Реактив К. Фишера представляет собой раствор двуокиси серы, йода и пиридина в метиловом спирте. Взаимодействие этого реактива с водой протекает в две стадии стехиометрически по уравнениям:

$$I_2 + SO_2 + H_2O + 3C_5H_5N \rightarrow 2C_5H_5N \times HI + C_5H_5NSO_3$$

$$C_5H_5NSO_3 + CH_3OH \rightarrow C_5H_5N \times HSO_4CH_3$$

С помощью реактива К. Фишера можно точно и быстро определять любые количества воды как в органических, так и неорганических соединениях, в различных растворителях и летучих веществах.

С помощью реактива К. Фишера может быть определена как гигроскопическая, так и кристаллизационная вода.

Реактивы и растворы, применяемые в данном методе, очень гигроскопичны, поэтому должны быть приняты меры предохранения их от атмосферной влаги.

Для титрования применяют прибор, который представляет собой закрытую систему, состоящую из бюретки, защищенной осушительной трубкой (хлорид кальция по ГОСТу 4460-77; силикагель - индикатор по ГОСТу 8984-75 и т.п.), сосуда для подачи реактива и колбы для титрования, соединенных с бюреткой. Колба должна быть также снабжена осушительной трубкой. Титрование проводят при перемешивании, для чего удобно применять магнитную мешалку.

Методика определения. Точную навеску препарата, содержащую приблизительно от 0,03 до 0,05 г воды, помещают в сухую колбу вместимостью 100 мл, в которую предварительно внесено 5 мл метилового спирта. Перемешивают 1 мин и титруют реактивом К. Фишера, прибавляя его при приближении к конечной точке по 0,1-0,05 мл.

Конец титрования может быть определен как визуально по изменению окраски от желтой до красновато - коричневой, так и электрометрическим титрованием "до полного прекращения тока" (см. "Электрометрические методы титрования"). Изменение тока в конечной точке титрования при этом выражено настолько четко, что для ее определения построение графиков не обязательно. При исполнении модифицированной схемы на электроды накладывается разность потенциалов от 0,03 до 0,05 В.

Параллельно титруют 5 мл метилового спирта (контрольный опыт).

Содержание воды в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(а - б) \times Т \times 100}{в},$$

где а - объем реактива К. Фишера, израсходованный на титрование в основном опыте, в миллилитрах; б - объем реактива К. Фишера, израсходованный на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах; в - навеска препарата в граммах; Т - титр реактива К. Фишера.

Приготовление реактива К. Фишера. Имеющийся в продаже реактив К. Фишера (ТУ 6-09-1487-76) состоит из двух отдельных растворов N 1 и 2, которые перед употреблением смешивают в объемном соотношении 1:2,17. Титр полученного реактива около 0,004 г/мл. Разбавленный реактив с титром около 0,001 г/мл готовят, смешивая полученный раствор с метиловым спиртом в соотношении 1:1, и применяют только при электрометрическом определении конечной точки титрования.

Установка титра. Около 0,04 г воды (точная навеска) вносят в сухую колбу вместимостью 100 мл, содержащую 5 мл метилового спирта, и титруют реактивом К. Фишера, прибавляя его в конце титрования по 0,1-0,05 мл.

Параллельно титруют 5 мл метилового спирта.

Титр в граммах на миллилитр (W) реактива К. Фишера вычисляют по формуле:

$$W = \frac{а}{б - в},$$

где а - навеска воды в граммах; б - объем реактива К. Фишера, израсходованный на титрование навески воды в метиловом спирте, в миллилитрах; в - объем реактива К. Фишера, израсходованный на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах.

При установке титра разбавленного реактива берут точную навеску воды около 0,01 г.

Титр реактива устанавливают каждый раз перед употреблением. Реактив К. Фишера хранят в сухом, защищенном от света месте в бутылях, плотно закрытых стеклянной пробкой.

Примечания. 1. При отсутствии готовых растворов N 1 и 2 каждый из них может быть приготовлен следующим образом.

Раствор N 1: в сосуд, содержащий 110 г пиридина (ГОСТ 13647-78 ч.д.а.) и охлаждаемый льдом, пропускают обезвоженный сернистый газ до привеса в 27 г. Срок годности раствора N 1 6 мес.

Раствор N 2: в сосуд из оранжевого стекла (с притертой пробкой) помещают 600 мл (475 г) метилового спирта и 75 г йода (ГОСТ 4159-79), закрывают пробкой, перемешивают и оставляют до полного растворения йода. Срок годности раствора N 2 не ограничен.

2. Пиридин и метиловый спирт, употребляемые в данном методе, не должны содержать воды более 0,1%.

3. При определении воды в твердых веществах, нерастворимых в метиловом спирте, тонко измельченную навеску вещества взбалтывают с метиловым спиртом, после чего титруют

реактивом К. Фишера. Некоторые вещества или смеси можно растворять в уксусной кислоте (ГОСТ 61-75), хлороформе (ГОСТ 20015-74), пиридине и других растворителях. Время взбалтывания навески с метиловым спиртом, тот или иной растворитель должны быть указаны в частных статьях.

4. Реактив К. Фишера описанного выше состава неприменим для анализа соединений, реагирующих с одним или несколькими компонентами реактива, как, например, аскорбиновая кислота, меркаптаны, сульфиды, гидрокарбонаты и карбонаты щелочных металлов, окиси и гидраты окисей металлов, альдегиды, кетоны и др.

5. Для определения воды в карбонильных соединениях и сильных кислотах при электрометрическом определении конечной точки можно использовать реактив К. Фишера видоизмененного состава, содержащий вместо метилового спирта N,N-диметилформамид. Готовят и применяют реактив в соответствии с ГОСТом 14870-77.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АЗОТА В ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЯХ

Прибор для определения азота (рис.18) <*> состоит из парообразователя 1 с предохранительной трубкой 2, сменных грушевидных колб с длинным горлом 3, воронки для ввода щелочи 4 с зажимом или краном 5, брызгоуловителя 6, прямого холодильника 7 и сменных конических колб - приемников 8.

<*> Рис. 18. Прибор для определения азота (объяснение в тексте). (Рисунок не приводится).

В колбу 3 помещают точную навеску вещества, эквивалентную 0,014-0,035 г азота, прибавляют 1 г растертой смеси сульфата калия и сульфата меди, взятых в отношении 10:1, и 7 мл концентрированной серной кислоты. Колбу 3 устанавливают наклонно под углом 45 град., закрывают стеклянной воронкой и кипятят содержимое до получения светло - зеленого раствора. После этого кипячение продолжают еще 30 мин. В некоторых случаях требуется более продолжительное сжигание после просветления раствора, на что должно быть указано в соответствующих частных статьях. По охлаждении в колбу 3 осторожно приливают при перемешивании 20 мл воды, вновь охлаждают и присоединяют колбу к прибору. В парообразователь 1 наливают воду, подкисленную серной кислотой по метиловому красному. Для обеспечения равномерного кипения воды в парообразователь 1 помещают стеклянные шарики. В приемник 8 перед началом отгонки наливают 20 мл раствора борной кислоты и прибавляют 5 капель смешанного индикатора. Нижний конец внутренней трубки холодильника 7 должен быть опущен в раствор борной кислоты. После сборки прибора в холодильник 7 пускают воду и доводят до кипения воду в парообразователе 1.

Затем в колбу 3 из воронки 4 через кран или зажим 5 медленно прибавляют 40 мл 30% раствора едкого натра, следя за тем, чтобы раствор в колбе 3 энергично перемешивался током пара. Для обеспечения большей герметичности прибора в воронке 4 следует оставлять некоторый избыток 30% раствора едкого натра. Собирают 100 мл отгона. Во время отгонки колбу 3 нагревают так, чтобы объем жидкости в ней оставался постоянным.

По окончании отгонки опускают приемник, трубку холодильника выводят из жидкости, промывают снаружи водой, продолжая подачу пара в колбу 3 в течение 1-2 мин. Промывную воду собирают в тот же приемник. После этого прекращают нагревание парообразователя 1 и немедленно отсоединяют колбу 3 от прибора.

Отгон титруют раствором хлористоводородной кислоты (0,1 моль/л) до перехода окраски индикатора из зеленой в красно - фиолетовую.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл раствора хлористоводородной кислоты (0,1 моль/л) соответствует 0,001401 г азота.

Примечания. 1. При минерализации трудносжигаемых веществ допускается использование катализаторов: 0,05 г металлического селена или 0,3 г окиси ртути, на что должно быть указано в частных статьях.

2. В случае применения прибора, в котором для соединения отдельных частей используются резиновые трубки и пробки, перед первым употреблением их необходимо прокипятить в течение 10 мин в 5% растворе едкого натра и тщательно промыть водой.

МЕТОД СЖИГАНИЯ В КОЛБЕ С КИСЛОРОДОМ

Метод сжигания веществ в атмосфере кислорода применяется для определения галогенов (хлора, брома, йода, фтора, серы и фосфора).

Сущность метода состоит в разрушении органических веществ сожжением в атмосфере кислорода, растворении образующихся продуктов сгорания в поглощающей жидкости и последующем определении элементов, находящихся в растворе в виде ионов.

Сожжение проводят в конической или круглодонной колбе вместимостью 750-1000 мл из термостойкого стекла со шлифом. В пробку колбы впаяна платиновая или нихромовая проволока диаметром 0,7-0,8 мм, заканчивающаяся платиновой или нихромовой корзиночкой или спиралью (держатель) (рис. 19) <*>, находящимися на расстоянии 1,5-2 см от дна колбы.

<*> Рис. 19. Прибор для сжигания в кислороде. (Рисунок не приводится).

Около 0,05 г тонкоизмельченного вещества (точная навеска) насыпают на кусочек фильтровальной бумаги (рис. 20) <*>, которую заворачивают в виде пакетика, оставляя узкую полоску.

<*> Рис. 20. Фильтровальная бумага для приготовления пакетика. (Рисунок не приводится).

При исследовании жидкости навеску помещают в капилляр, заплавленный парафином, или в капсулу - полиэтиленовую, из нитропленки или метилцеллюлозы. Для труднолетучих жидкостей возможно применение двойного бумажного пакетика.

При исследовании мазеобразных веществ применяют капсулу из нитропленки или пакет из вощаной бумаги. Капсулы и капилляры заворачивают в пакетик из фильтровальной бумаги, оставляя узкую полоску. При анализе твердых и мазеобразных соединений, сгорающих со вспышкой, к навеске прибавляют 3-5 мг парафина. Подготовленную пробу помещают в держатель.

В колбу для сжигания наливают воду или другую поглощающую жидкость и пропускают в течение 3-5 мин ток кислорода. Затем поджигают свободный конец узкой полоски фильтровальной бумаги и немедленно плотно закрывает колбу пробкой, смоченной водой; во время сжигания следует придерживать пробку рукой. По окончании сжигания колбу оставляют на 30-60 мин при периодическом перемешивании, после чего проводят определение тем или иным методом, подходящим для данного элемента.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Примечание. При работе соблюдать осторожность (надеть защитные очки, колбу поместить в предохранительный чехол, установить защитный экран). Колба для сжигания должна быть тщательно вымыта и свободна от следов органических веществ и растворителей.

Определение хлора и брома

Точную навеску вещества, указанную в частной статье, сжигают, как описано выше, используя в качестве поглощающей жидкости 20 мл 6 % раствора перекиси водорода. Стенки колбы и держатель образца обмывают 40 мл воды, прибавляют 5 капель 0,1 % спиртового раствора бромфенолового синего и нейтрализуют по каплям раствором едкого натра (0,1 моль/л) до перехода желтой окраски в синюю. Затем прибавляют 1 мл 0,3% раствора азотной кислоты, 5 капель раствора дифенилкарбазона и титруют раствором нитрата окисной ртути (0,01 моль/л) до перехода желтой окраски в светло - фиолетовую.

1 мл раствора нитрата окисной ртути (0,01 моль/л) соответствует 0,0007090 г хлора или 0,001598 г брома.

Определение йода

Точную навеску вещества, указанную в частной статье, сжигают, как описано выше, поглощая продукты сжигания 10 мл раствора едкого натра (0,2 моль/л). Шлиф и держатель обмывают 25 мл 10% раствора ацетата калия в ледяной уксусной кислоте, к которому предварительно прибавляют 15 капель брома, затем пробку с держателем и стенки колбы тщательно отмывают 40 мл воды, прибавляют по каплям 85% муравьиную кислоту до обесцвечивания раствора, 20 мл раствора серной кислоты (0,05 моль/л), 0,5 г йодида калия и выдерживают в темном месте в течение 5 мин. Выделившийся йод титруют раствором тиосульфата натрия (0,1 моль/л) (индикатор - крахмал).

1 мл раствора тиосульфата натрия (0,1 моль/л) соответствует 0,002116 г йода.

Определение фтора

Точную навеску вещества, указанную в частной статье, сжигают, как описано выше, поглощая продукты сжигания 15 мл воды. Пробку, держатель образца и стенки колбы обмывают 40

мл воды и в колбу вносят 0,6 мл раствора ализаринового красного С. Прибавляют по каплям раствор едкого натра (0,1 моль/л) до красно - малинового окрашивания и затем 2-3 капли 1,5% раствора азотной кислоты до перехода окрашивания в желтое, 3,5 мл буферного раствора pH 3,0 (см. примечание) и титруют раствором нитрата тория (0,005 моль/л) до розовой окраски.

1 мл раствора нитрата тория (0,005 моль/л) соответствует 0,000380 г фтора.

Для облегчения установления перехода окраски индикатора рекомендуется проведение предварительного титрования с известной навеской фторида натрия.

Примечание. Буферный раствор pH 3,0: растворяют 2,0 г монохлоруксусной кислоты в 20 мл воды и нейтрализуют раствором едкого натра (1 моль/л) до слабо - розовой окраски по фенолфталеину. Затем прибавляют 2,0 г монохлоруксусной кислоты и доводят объем раствора водой до 100 мл.

2. Точную навеску вещества, указанную в частной статье, сжигают, как описано выше, раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют по 25 мл 0,01% раствора арсеназо-1 и раствор нитрата тория (0,005 моль/л), доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Через 30 мин измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 580 нм. Содержание фтора находят по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. В мерные колбы вместимостью 100 мл вносят 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 и 8,0 мл стандартного раствора фтора и далее поступают, как указано выше, начиная со слов "... прибавляют по 25 мл". Измерение оптической плотности производят не менее 3 раз. Строят калибровочный график, откладывая по оси абсцисс количество микрограммов фтора, а по оси ординат - средние значения оптической плотности.

Примечание. Приготовление стандартного раствора фтора: 0,0552 г (точная навеска) фторида натрия растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 250 мл и доводят объем раствора водой до метки. 5 мл этого раствора разводят водой в мерной колбе вместимостью 50 мл до метки. 1 мл полученного раствора содержит 10 мкг фтор-иона.

Определение серы

Точную навеску вещества, указанную в частной статье, сжигают, как описано выше, используя в качестве поглощающей жидкости 15 мл 6% раствора перекиси водорода. Держатель образца и стенки обмывают 20 мл воды и выпаривают содержимое колбы до 4-5 мл. К охлажденному раствору прибавляют 2 мл разведенной уксусной кислоты, 20 мл 95% спирта и титруют раствором нитрата бария (0,01 моль/л) до перехода желто - зеленой окраски в розовую со смешанным индикатором (по 2 капли 0,02% водного раствора метиленового синего и 0,2% раствора торона).

1 мл раствора нитрата бария (0,01 моль/л) соответствует 0,0003206 г серы.

Определение фосфора

Точную навеску вещества, указанную в частной статье, сжигают, как описано выше, используя в качестве поглощающей жидкости 10 мл раствора серной кислоты (0,1 моль/л). Раствор выпаривают до появления паров сернистого ангидрида и переносят количественно в мерную колбу вместимостью 100 мл.

Раствор нейтрализуют насыщенным раствором карбоната натрия по фенолфталеину до розовой окраски. Прибавляют 5 мл смеси равных объемов 50% раствора молибдата аммония и концентрированной серной кислоты, перемешивают и оставляют на 5 мин. Затем прибавляют 2 мл раствора восстановителя и через 10 мин - 20 мл 40% раствора ацетата натрия. Объем раствора доводят водой до метки, перемешивают и измеряют оптическую плотность полученного раствора при 750 нм.

Содержание фосфора находят по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. В мерные колбы вместимостью 100 мл вносят 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0 мл стандартного раствора фосфора и далее поступают, как указано выше, начиная со слов: "Прибавляют 5 мл смеси равных объемов 50% раствора молибдата аммония..."

Строят калибровочный график, откладывая по оси ординат соответствующие значения оптической плотности.

Примечания. 1. Приготовление стандартного раствора фосфора: 0,0440 г (точная навеска) однозамещенного фосфата калия растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора водой до метки. 10 мл этого раствора переносят в мерную колбу

вместимостью 50 мл и доводят объем раствора водой до метки. 1 мл полученного раствора содержит 20 мкг фосфора.

2. Приготовление раствора восстановителя: 10 г метола и 6 г безводного сульфита натрия растворяют в мерной колбе вместимостью 500 мл и доводят объем раствора водой до метки.

КОМПЛЕКСОНОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ

Комплексонометрическое титрование основано на реакции комплексообразования катионов металлов с комплексонами - аминополикарбоновыми кислотами и их солями. Образующиеся комплексные соединения называют комплексонатами.

Из известных в настоящее время комплексонов наибольшее применение для комплексонометрического титрования получила динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты, встречающаяся в литературе под названиями: трилон Б, комплексон III, хелатон III и др. Трилон Б образует с катионами различных металлов в стехиометрическом отношении (1:1) устойчивые и хорошо растворимые в воде комплексонаты и используется для количественного определения кальция, магния, цинка, висмута, свинца и алюминия в лекарственных препаратах.

Индикаторы, применяемые для визуального определения, называются металлоиндикаторами. Они являются органическими красителями и обладают способностью изменять окраску при образовании комплексных соединений с катионами металлов. Металлоиндикаторы для комплексонометрии подбираются так, чтобы их взаимодействие с катионами определяемых металлов было обратимым и устойчивость соответствующих комплексов была заметно меньше устойчивости комплексонатов, образующихся в процессе титрования.

Прямое титрование растворами трилона Б проводят следующим образом: к анализируемому раствору прибавляют буферный раствор, имеющий необходимое значение pH, и небольшое количество металлоиндикатора. В точке эквивалентности окраска раствора изменяется от окраски свободного металлоиндикатора до окраски, свойственной его комплексу с катионом титранта.

При обратном титровании избыток трилона Б, не вступивший в соединение с определяемым катионом, оттитровывают при определенном значении pH и в присутствии соответствующего металлоиндикатора растворами солей цинка, магния, свинца и др.

Методика определения катионов

Алюминий: Точную навеску препарата (соответствующую 0,02-0,03 г алюминия) растворяют в 2 мл раствора хлористоводородной кислоты (1 моль/л) и 50 мл воды. Прибавляют 50 мл раствора трилона Б (0,05 моль/л) и нейтрализуют раствором едкого натра (1 моль/л) по метиловому красному. Нагревают раствор до кипения и выдерживают на кипящей водяной бане в течение 10 мин, охлаждают, прибавляют 0,05 г индикаторной смеси ксиленового оранжевого, 5 г гексаметилентетрамин и титруют избыток трилона Б раствором нитрата свинца (0,05 моль/л) до розово - фиолетового окрашивания.

1 мл раствора трилона Б (0,05 моль/л) соответствует 0,001349 г алюминия.

Висмут. Точную навеску препарата (соответствующую 0,1-0,2 г висмута) растворяют, как указано в частной статье. Прибавляют 50 мл воды и доводят pH до 1,0-2,0, добавляя по каплям разведенную азотную кислоту или раствор аммиака. Прибавляют 0,05 г индикаторной смеси ксиленолового оранжевого и медленно титруют раствором трилона Б (0,05 моль/л) до желтого окрашивания.

1 мл раствора трилона Б (0,05 моль/л) соответствует 0,01045 г висмута.

Кальций. Точную навеску препарата (соответствующую 0,04-0,05 г кальция) растворяют, как указано в частной статье, в воде или разведенной хлористоводородной кислоте и далее проводят определение по одному из приведенных способов.

1. Доводят объем раствора водой до 100 мл и титруют раствором трилона Б (0,05 моль/л). В конце титрования прибавляют 4 мл 30% раствора едкого натра, 3 мл раствора кальконкарбоновой кислоты, появляется розовое окрашивание; продолжают титрование до перехода окраски в интенсивно синий цвет.

2. Доводят объем раствора водой до 50 мл, прибавляют 10 мл буферного раствора с pH 9,5-10,0; 0,1 г индикаторной смеси или 7 капель раствора индикатора хромового темно - синего и титруют раствором трилона Б (0,05 моль/л) до сине - фиолетового окрашивания.

1 мл раствора трилона Б (0,05 моль/л) соответствует 0,002004 г кальция.

Свинец. Точную навеску препарата (соответствующую 0,1-0,2 г свинца) растворяют, как указано в частной статье. Прибавляют 50 мл воды, 0,05 г индикаторной смеси ксиленолового оранжевого, 5 г гексаметилентетрамина и титруют раствором трилона Б (0,05 моль/л) до желтого окрашивания.

1 мл раствора трилона Б (0,05 моль/л) соответствует 0,01035 г свинца.

Магний. Точную навеску препарата (соответствующую 0,02-0,03 г магния) растворяют, как указано в частной статье. Прибавляют 50 мл воды, 10 мл буферного раствора с pH 9,5-10,0; 0,1 г индикаторной смеси или 7 капель раствора индикатора эриохрома черного Т и титруют раствором трилона Б (0,05 моль/л) до синего окрашивания.

1 мл раствора трилона Б (0,05 моль/л) соответствует 0,001215 г магния.

Цинк. Точную навеску препарата (соответствующую 0,06-0,08 г цинка) растворяют, как указано в частной статье. Прибавляют 50 мл воды, 0,05 г индикаторной смеси ксиленолового оранжевого, 5 г гексаметилентетрамина и титруют раствором трилона Б (0,05 моль/л) до желтого окрашивания.

1 мл раствора трилона Б (0,05 моль/л) соответствует 0,003268 г цинка.

ИНДИКАТОРЫ К СТАТЬЕ "КОМПЛЕКСОНОМЕТРИЧЕСКОЕ ТИТРОВАНИЕ"

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Кальконкарбоновая кислота
3-Окси-4-(2-окси-4-сульфо-1-нафтилазо)-2-нафтойная кислота
(ч.д.а.)

$C_{21}H_{14}N_2O_7S$ М.м. 438,41

Темно - коричневый порошок с фиолетовым оттенком, практически нерастворим в воде, растворим в 50% ацетоне, спирте, легко растворим в растворах едких щелочей. В щелочной среде (pH > 12,0) имеет голубую окраску, а его комплексы с кальцием в тех же условиях - красновато - сиреневую. Переход окраски при прямом титровании от красновато - сиреневой к голубой.

Индикаторная смесь. 0,1 г индикатора и 10 г натрия сульфата безводного растирают в ступке и перемешивают.

Раствор индикатора. 0,025 г индикатора растворяют в 100 мл 50% спирта или ацетона.

Срок годности 2 мес.

На 100 мл титруемой жидкости берут 0,1 г индикаторной смеси или 3 мл раствора индикатора.

Хромовый темно - синий (кислотный хром темно - синий)
2-(5-Хлор-2-оксифенил)-азо-1,8-диоксинафталин -
3,6-дисульфокислоты динатриевая соль (ч.д.а.)

$C_{16}H_9ClN_2Na_2O_9S_2$ М.м. 518,82

Однородный порошок темно - коричневого цвета. В щелочной среде (pH 9,5-10,0) имеет сине - фиолетовую окраску, а его комплексы с кальцием, магнием и цинком в тех же условиях вишнево - красного цвета.

Переход окраски при прямом титровании от вишнево - красной к сине - фиолетовой.

Индикаторная смесь. 0,25 г индикатора и 25 г натрия хлорида (х.ч.) растирают в ступке и перемешивают.

Раствор индикатора. 0,5 г индикатора растворяют в 10 мл аммиачного буферного раствора (pH 9,5-10,0) и доводят объем раствора до 100 мл 95% спиртом.

Срок годности 1 мес.

На 50 мл титруемой жидкости берут около 0,1 г индикаторной смеси или 7 капель раствора индикатора.

Эриохром черный Т (протравной черный II)
1-(1-Окси-2-нафтилазо)-6-нитро-2-нафтол-4-сульфокислоты
натриевая соль (ч.д.а.)

$C_{20}H_{12}N_3NaO_7S$ М.м. 461,39

Однородный порошок темно - коричневого цвета. Мало растворим в воде. В щелочной среде (pH 9,5-10,0) имеет синюю окраску, а его комплексы с кальцием, магнием и цинком в тех же условиях красно - фиолетового цвета.

Переход окраски при прямом титровании от красно - фиолетовой к синей.

Индикаторная смесь. 0,25 г индикатора и 25 г натрия хлорида (х.ч.) растирают в ступке и перемешивают.

Раствор индикатора. 0,25 г индикатора и 2,25 г гидроксиламина гидрохлорида растворяют в 50 мл метилового спирта.

Срок годности 15 дней.

На 50 мл титруемой жидкости берут около 0,1 г индикаторной смеси или 7 капель раствора индикатора.

Ксиленоловый оранжевый

1 1
3,3 -Бис-[N, N -ди-(карбоксиметил)-аминометил]- о- -
крезолсульфофталеина тетранатриевая соль (ч.д.а.)

$C_{31}H_{28}N_2Na_4O_{13}S$ М.м. 760,58

Красно - коричневый блестящий кристаллический порошок, легко растворим в воде, разведенных кислотах; нерастворим в спирте и эфире; в сильнокислых растворах имеет розовую окраску, переходящую при pH > 2,0 в желтую; в щелочной среде (pH > 6,0) окрашен в красно - фиолетовый цвет.

Переход окраски при прямом титровании от красной к желтой.

Индикаторная смесь. 0,1 г индикатора и 10 г калия нитрата растирают в ступке и перемешивают.

Раствор индикатора. 0,25 г индикатора растворяют в 100 мл воды.

Срок годности 1 мес.

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

БУФЕРНЫЙ РАСТВОР pH 9,5-10,0

54 г аммония хлорида растворяют в 200 мл воды, прибавляют 350 мл 25% раствора аммиака и доводят объем раствора водой до 1 л.

Срок годности 3 мес.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

РАСТВОР ТРИЛОНА Б (0,05 МОЛЬ/Л)

$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \times 2H_2O$ М.м. 372,24

1 мл раствора содержит 0,01861 г динатриевой соли
1 1
этилендиамин-N, N, N , N -тетрауксусной кислоты двухводной.

Приготовление. 18,8 г трилона Б (ГОСТ 10652-73) растворяют в воде, доводят объем раствора водой до 1 л и фильтруют.

Установка титра. Около 3,27 г (точная навеска) металлического цинка (ГОСТ 3640-79, марки ЦВ или ЦО) растворяют в 40 мл разведенной серной кислоты в мерной колбе вместимостью 1 л и по растворении доводят объем раствора водой до метки.

Точно отмеривают из бюретки 25 мл приготовленного раствора цинка, прибавляют 5 мл буферного раствора pH 9,5-10,0, около 0,1 г индикаторной смеси эриохрома черного Т, 70 мл воды, перемешивают и титруют раствором (0,05 моль/л) трилона Б (от фиолетового до ярко - синего окрашивания).

Поправочный коэффициент (с учетом разведения) вычисляют по первому способу:

$$K = \frac{25 \times a}{1000 \times 0{,}003269 \times V}.$$

НИТРИТОМЕТРИЯ

Нитритометрия - метод объемного анализа, при котором в качестве реактива для титрования используется раствор нитрита натрия.

Применяется для количественного определения соединений, содержащих первичную или вторичную ароматическую аминогруппу, для определения гидразидов, а также ароматических нитросоединений после предварительного восстановления нитрогруппы до аминогруппы.

Методика определения. Точную массу препарата (около 0,001 г/моль) растворяют в смеси 10 мл воды и 10 мл разведенной хлористоводородной кислоты. Прибавляют воды до общего объема 80 мл, 1 г бромида калия и при постоянном перемешивании титруют раствором нитрита натрия (0,1 моль/л), прибавляя его в начале со скоростью 2 мл в минуту, а в конце титрования (за 0,5 мл до эквивалентного количества) по 0,05 мл через 1 мин.

Титрование проводят, поддерживая температуру раствора 15-20 град. С, однако в некоторых случаях требуется охлаждение до 0-5 град. С.

Точку эквивалентности определяют электрометрическими методами (потенциометрическое титрование, титрование "до полного прекращения тока") или с помощью внутренних индикаторов и внешнего индикатора (йодкрахмальная бумага).

При потенциометрическом титровании в качестве индикаторного электрода применяют платиновый электрод, электродом сравнения служит хлорсеребряный или насыщенный каломельный электрод.

Титрование методом "до полного прекращения тока" проводят в соответствии с общей статьей "Электрометрические методы титрования" <*>. При использовании модифицированной схемы на электроды накладывают разность потенциалов 0,3-0,4 В.

<*> См. с. 120, п. 2.

В качестве внутренних индикаторов используют тропеолин 00 (4 капли раствора), тропеолин 00 в смеси с метиленовым синим (4 капли раствора тропеолина 00 и 2 капли раствора метиленового синего) или нейтральный красный (2 капли раствора в начале и 2 капли в конце титрования). Титрование с тропеолином 00 ведут до перехода окраски от красной к желтой, со смесью тропеолина 00 с метиленовым синим - от красно - фиолетовой к голубой, с нейтральным красным - от красно - фиолетовой к синей. Выдержку в конце титрования с нейтральным красным увеличивают до 2 мин.

Титрование с йодкрахмальной бумагой ведут до тех пор, пока капля титруемого раствора, взятая через 1 мин после прибавления раствора нитрита натрия, не будет немедленно вызывать синее окрашивание на бумаге. Параллельно проводят контрольный опыт. В некоторых случаях выдержка может быть увеличена, о чем должно быть указано в частной статье.

КИСЛОТНОЕ ЧИСЛО

Кислотным числом называют количество миллиграммов едкого кали, необходимое для нейтрализации свободных кислот, содержащихся в 1 г исследуемого вещества.

Определение кислотного числа. Около 10 г (точная навеска) масла, жира, воска или около 1 г (точная навеска) смолы помещают в колбу вместимостью 250 мл и растворяют в 50 мл смеси равных объемов 95% спирта и эфира, предварительно нейтрализованной по фенолфталеину раствором едкого натра (0,1 моль/л); если необходимо, нагревают с обратным холодильником на водяной бане до полного растворения. Прибавляют 1 мл раствора фенолфталеина и титруют при постоянном помешивании раствором едкого натра (0,1 моль/л) до появления розового окрашивания, не исчезающего в течение 30 с. Для вещества с небольшим кислотным числом (до 1) титрование проводят из микробюретки.

Кислотное число (Кч) вычисляют по формуле:

$$Кч = \frac{а \times 5,61}{б},$$

где а - количество миллилитров раствора едкого натра (0,1 моль/л), израсходованное на титрование; б - навеска вещества в граммах; 5,61 - количество миллиграммов едкого кали, соответствующее 1 мл раствора едкого натра (0,1 моль/л).

ЧИСЛО ОМЫЛЕНИЯ

Числом омыления называют количество миллиграммов едкого кали, необходимое для нейтрализации свободных кислот и кислот, образующихся при полном гидролизе сложных эфиров, содержащихся в 1 г исследуемого вещества.

Определение числа омыления. Около 2 г вещества (точная навеска) помещают в колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 25 мл спиртового раствора едкого кали (0,5 моль/л), присоединяют к колбе обратный холодильник, погружают ее в кипящую водяную баню и нагревают в течение 1 ч, регулярно перемешивая путем вращения.

При исследовании трудно омыляющихся веществ прибавляют 5-10 мл ксилола и нагревают более продолжительное время, согласно указаниям в частных статьях.

Параллельно нагревают 25 мл спиртового раствора едкого кали (0,5 моль/л). Оба раствора тотчас же после прекращения нагревания разбавляют 25 мл свежепрокипяченной горячей воды, прибавляют по 1 мл раствора фенолфталеина и титруют раствором хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л) до обесцвечивания.

Из количества миллилитров раствора хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л), израсходованного в контрольном опыте, вычитают количество миллилитров раствора хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л), израсходованное на титрование исследуемого вещества. Полученная разность представляет собой количество миллилитров раствора едкого кали (0,5 моль/л), израсходованное на нейтрализацию свободных кислот и кислот, образовавшихся при полном гидролизе сложных эфиров во взятой навеске.

Число омыления (Ч) вычисляют по формуле:

$$Ч = \frac{(а - б)\ 28{,}05}{в},$$

где а - количество миллилитров раствора хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л), израсходованное на титрование в контрольном опыте; б - количество миллилитров раствора хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л), израсходованное на титрование исследуемого вещества; в - навеска вещества в граммах; 28,05 - количество миллиграммов едкого кали, соответствующее 1 мл раствора едкого кали (0,5 моль/л).

ЭФИРНОЕ ЧИСЛО

Эфирным числом называют количество миллиграммов едкого кали, необходимое для нейтрализации кислот, образующихся при гидролизе сложных эфиров, содержащихся в 1 г исследуемого вещества.

Эфирное число определяют по разности между числом омыления и кислотным числом.

ЙОДНОЕ ЧИСЛО

Йодным числом называют количество граммов йода, связываемое 100 г исследуемого вещества.

Определение йодного числа. Точную навеску исследуемого вещества (см. примечание) помещают в сухую колбу с притертой пробкой вместимостью 250-300 мл, растворяют в 3 мл эфира или хлороформа, прибавляют 20 мл раствора йода монохлорида (0,1 моль/л), закрывают колбу пробкой, смоченной раствором йодида калия, осторожно взбалтывают вращательным движением и выдерживают в темном месте в течение 1 ч. Затем прибавляют последовательно 10 мл раствора йодида калия, 50 мл воды и титруют раствором тиосульфата натрия (0,1 моль/л) при постоянном энергичном взбалтывании до светло - желтой окраски, после чего прибавляют 3 мл хлороформа, сильно взбалтывают, затем прибавляют 1 мл раствора крахмала и титруют до обесцвечивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

При анализе твердых жиров навеску растворяют в 6 мл эфира, прибавляют 20 мл раствора йода монохлорида (0,1 моль/л) и 25 мл воды. Дальнейшее определение проводят, как указано выше.

Из количества миллилитров раствора тиосульфата натрия (0,1 моль/л), израсходованного в контрольном опыте, вычитают количество миллилитров раствора тиосульфата натрия (0,1 моль/л), израсходованное на титрование исследуемого вещества. Полученная разность соответствует количеству миллилитров раствора йода (0,1 моль/л), связанному навеской исследуемого вещества.

Йодное число (I) вычисляют по формуле:

$$I = \frac{(а - б) \times 0{,}01269 \times 100}{в},$$

где а - количество миллилитров раствора тиосульфата натрия (0,1 моль/л), израсходованное на титрование в контрольном опыте; б - количество миллилитров раствора тиосульфата натрия (0,1 моль/л), израсходованное на титрование исследуемого вещества; в - навеска вещества в граммах.

Приготовление раствора йода монохлорида (0,1 моль/л). 11,06 г йодида калия и 7,10 г йодата калия помещают в склянку с притертой пробкой, прибавляют 50 мл воды и 50 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, закрывают пробкой и встряхивают до полного растворения образующегося при реакции йода. Раствор переносят в делительную воронку и взбалтывают с 10 мл хлороформа. Если хлороформный слой окрашивается в фиолетовый цвет, то прибавляют при сильном взбалтывании по каплям 1% раствор йодата калия до обесцвечивания хлороформного слоя. Если же хлороформный слой остается бесцветным, то прибавляют по каплям 1% раствор йодида калия до появления бледно - розовой окраски. После отстаивания водный слой сливают в мерную колбу и доводят объем раствора водой до 1 л. Приготовленный раствор должен иметь лимонно - желтый цвет.

Примечание. Величина навески вещества в граммах в зависимости от ожидаемого йодного числа приведена в нижеследующей таблице.

Йодное число	Навеска, г
От 0 до 30	1,1 - 0,7
>> 31 >> 50	0,7 - 0,5
>> 51 >> 100	0,5 - 0,25
>> 101 >> 150	0,25 - 0,15
Свыше 150	Менее 0,15

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОКРАСКИ ЖИДКОСТЕЙ

Окраску жидкостей определяют визуально путем сравнения с соответствующими эталонами. Исследуемые жидкости и эталоны берут для сравнения в равных количествах. Сравнение производят в пробирках одинакового стекла и диаметра при дневном отраженном свете на матово - белом фоне.

Окраска исследуемого образца должна быть вполне идентична эталону или только приближаться к отмеченной окраске, не превышая ее по интенсивности, но несколько отличаясь от нее по тону. Жидкость, которая должна быть бесцветной, рассматривают сверху через весь слой жидкости на матово - белом фоне. Бесцветными считают жидкости, которые по цвету не отличаются от воды, а в случае растворов - от соответствующего растворителя.

Приготовление исходных растворов

Раствор А. Около 6,00 г (точная навеска) растертого хлорида кобальта ($CoCl_2 \times 6H_2O$; М.м. 237,93) растворяют в растворе серной кислоты (0,1 моль/л) в мерной колбе вместимостью 100 мл, перемешивают и доводят объем раствора раствором серной кислоты (0,1 моль/л) до метки.

Содержание хлорида кобальта в растворе определяют следующим образом: 5 мл раствора хлорида кобальта помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл с притертой пробкой, прибавляют 5 мл 3% раствора перекиси водорода и 30 мл раствора едкого натра, смесь кипятят с обратным холодильником в течение 10 мин, затем охлаждают до комнатной температуры, прибавляют 2 г йодида калия и 15 мл 50% раствора серной кислоты. Выделившийся йод титруют раствором тиосульфата натрия (0,1 моль/л) (индикатор - крахмал).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл раствора тиосульфата натрия (0,1 моль/л) соответствует 0,02379 г хлорида кобальта (II).

Объем раствора хлорида кобальта ($CoCl_2 \times 6H_2O$) разбавляют таким образом, чтобы содержание хлорида кобальта в 1 мл составляло 0,060 г.

Раствор Б. 0,4900 г растертого бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$; М.м. 294,18) растворяют в растворе серной кислоты (0,1 моль/л) в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора раствором серной кислоты (0,1 моль/л) до метки. 1 мл полученного раствора должен содержать 0,0049 г бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$).

Содержание бихромата калия в растворе определяют следующим образом: 20 мл раствора бихромата калия помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл с притертой пробкой, прибавляют 30 мл разведенной хлористоводородной кислоты, 1 г йодида калия, оставляют на 5 мин в темном месте, затем прибавляют 80 мл воды и титруют выделившийся йод раствором тиосульфата натрия (0,1 моль/л) (индикатор - крахмал) до изменения окраски в зеленый цвет.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл раствора тиосульфата натрия (0,1 моль/л) соответствует 0,004903 г бихромата калия.

Раствор В. Около 6,00 г (точная навеска) растертого сульфата меди (II) ($CuSO_4 \times 5H_2O$; М.м. 249,68) растворяют в растворе серной кислоты (0,1 моль/л) в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем раствора раствором серной кислоты (0,1 моль/л) до метки.

Содержание сульфата меди в растворе определяют следующим образом: 10 мл раствора сульфата меди помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл с притертой пробкой, прибавляют 40 мл воды, 4 мл разведенной уксусной кислоты, 3 г йодида калия, смесь перемешивают и выделившийся йод титруют раствором тиосульфата натрия (0,1 моль/л) (индикатор - крахмал).

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл раствора тиосульфата натрия (0,1 моль/л) соответствует 0,02497 г сульфата меди (II). Объем раствора сульфата меди ($CuSO_4 \times 5H_2O$) разбавляют таким образом, чтобы содержание сульфата меди в 1 мл составляло 0,060 г.

Раствор Г. Около 4,50 г (точная навеска) хлорида железа (III) ($FeCl_3 \times 6H_2O$; М.м. 270,30) растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл в растворе серной кислоты (0,1 моль/л) и доводят объем раствора раствором серной кислоты (0,1 моль/л) до метки.

Содержание хлорида железа (III) в растворе определяют следующим образом: 10 мл раствора хлорида железа помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл с притертой пробкой, прибавляют 15 мл разведенной хлористоводородной кислоты, 4 г йодида калия и оставляют на 15 мин в темном месте. После прибавления 100 мл воды выделившийся йод титруют раствором тиосульфата натрия (0,1 моль/л) (индикатор - крахмал).

1 мл раствора тиосульфата натрия (0,1 моль/л) соответствует 0,02703 г хлорида железа (III).

Объем раствора хлорида железа ($FeCl_3 \times 6H_2O$) разбавляют таким образом, чтобы содержание хлорида железа в 1 мл составляло 0,045 г.

Срок годности исходных растворов 1 год.

Приготовление основных растворов

Основные растворы получают смешением исходных растворов хлорида кобальта (А), бихромата калия (Б), сульфата меди (В) и хлорида железа (Г) с раствором серной кислоты (0,1 моль/л) в следующих соотношениях.

Основной раствор	Раствор А, мл	Раствор Б, мл	Раствор В, мл	Раствор Г, мл	Раствор серной кислоты (0,1 моль /л), мл
I	35,00	8,00	17,00	40,00	-
II	9,50	10,70	1,90	4,00	73,90
III	40,50	6,30	6,10	12,00	35,10
IV	3,50	10,40	20,10	4,00	62,00

Срок годности основных растворов 1 год.

Приготовление эталонов

Эталоны для сравнения приготавливают из основных растворов путем разбавления их раствором серной кислоты (0,1 моль/л). Эталоны следует хранить по 5 мл в бесцветных, герметически укупоренных пробирках или запаянных ампулах вместимостью 5 мл в защищенном от света месте.

Срок годности эталонов N 1, 2, 3, 4 - 4 дня. Эталоны N 5, 6, 7 следует применять свежеприготовленными.

Номер эталона	Эталоны коричневых оттенков		Эталоны желтых оттенков		Эталоны розовых оттенков		Эталоны зеленых оттенков	
	шкала а		шкала б		шкала в		шкала г	
	основной раствор	раствор серной	основной раствор	раствор серной	основной раствор	раствор серной	основной раствор	раствор серной

	I, мл	кислоты (0,1 моль/л), мл	II, мл	кислоты (0,1 моль/л), мл	III, мл	кислоты (0,1 моль/л), мл	IV, мл	кислоты (0,1 моль/л), мл
1.	100,00	-	100,00	-	100,00	-	100,00	-
2	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
3.	25,00	75,00	25,00	75,00	25,00	75,00	25,00	75,00
4.	12,50	87,50	12,50	87,50	12,50	87,50	12,50	87,50
5.	6,30	93,70	6,30	93,70	6,30	93,70	6,30	93,70
6.	3,10	96,90	3,10	96,90	3,10	96,90	3,10	96,90
7.	1,60	98,40	1,60	98,40	1,60	98,40	1,60	98,40

При сравнении окраски испытуемого раствора с эталонами указывают, кроме номера эталона, букву шкалы. Например, окраска раствора не должна превышать эталон N 5б.

Примечание. Раствор серной кислоты (0,1 моль/л): медленно и осторожно, при постоянном перемешивании, вливают 6 мл концентрированной серной кислоты в 1020 мл воды.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОЗРАЧНОСТИ И СТЕПЕНИ МУТНОСТИ ЖИДКОСТЕЙ

Прозрачность и степень мутности жидкостей определяют путем сравнения испытуемой жидкости с растворителем или эталонами.

Испытание проводят при освещении электрической лампой матового стекла мощностью 40 Вт на черном фоне при вертикальном расположении пробирок (рис. 21) <*>.

<*> Рис. 21. Схема просмотра прозрачности и степени мутности жидкостей: 1 - источник света; 2 - экран; 3 - зона контроля; 4 - глаза. (Рисунок не приводится).

Жидкость считают прозрачной, если при ее рассмотрении невооруженным глазом не наблюдается присутствие нерастворенных частиц, кроме единичных волокон. Сравнение проводят с растворителем, взятым для приготовления жидкостей.

Эталонами для определения степени мутности служат взвеси из гидразина сульфата и гексаметилентетрамина.

I. Приготовление раствора гидразина сульфата. 0,50 г гидразина сульфата (ГОСТ 5841-74, ч.д.а.) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 40 мл воды, перемешивают, доводят объем раствора водой до метки и оставляют на 6 ч.

II. Приготовление раствора гексаметилентетрамина. 3,00 г гексаметилентетрамина растворяют в 30 мл воды, взятых пипеткой или бюреткой.

III. Приготовление исходного эталона. К 25 мл раствора гидразина сульфата прибавляют 25 мл раствора гексаметилентетрамина, тщательно перемешивают и оставляют на 24 ч. Растворы гидразина сульфата и гексаметилентетрамина берут пипеткой или бюреткой.

Срок годности исходного эталона 2 мес в склянках с притертыми пробками.

Примечание. Перед применением исходный эталон, основной эталон и эталонные растворы следует тщательно перемешать в течение 3 мин.

IV. Приготовление основного эталона. 15 мл исходного эталона, взятого пипеткой, помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, доводят объем жидкости водой до метки и перемешивают.

Срок годности основного эталона 24 ч.

V. Приготовление эталонных растворов. Для приготовления эталонных растворов I, II, III, IV основной эталон берут пипеткой или бюреткой в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем жидкости водой до метки.

	Эталонные растворы			
	I	II	III	IV
Основной эталон, мл	5	10	30	50
Вода, мл	95	90	70	50

Эталонные растворы I, II, III, IV должны быть свежеприготовленными.

Для сравнения берут равные объемы эталонного раствора и испытуемой жидкости (5 или 10 мл). Сравнение проводят в пробирках бесцветного стекла или стекла одинакового оттенка, одного и того же диаметра с притертыми пробками.

Определение степени мутности окрашенных жидкостей производят в компараторе. Часть испытуемой жидкости фильтруют через бумажный фильтр; в компараторе помещают рядом пробирки с фильтрованной и нефильтрованной жидкостями; позади пробирки с нефильтрованной жидкостью ставят пробирку с растворителем, позади пробирки с фильтрованной жидкостью помещают последовательно пробирки с соответствующими эталонами мутности до появления мути, сходной с мутью нефильтрованной жидкости. Пробирки просматривают при подсвечивании электрической лампой 40 Вт.

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ХИМИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА И БИОЛОГИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ

В настоящей статье для предпочтительного использования приняты следующие обозначения:

A - измеряемая величина;
a - свободный член линейной зависимости;
b - угловой коэффициент линейной зависимости;
D_0, D - доза стандартного и испытуемого препаратов;
F - критерий Фишера;
f - число степеней свободы;
i - порядковый номер варианты;
L - фактор, используемый при оценке сходимости результатов параллельных определений;
m, n - объемы выборки;
P, $\bar{P}$ - доверительная вероятность соответственно при дву- и односторонней постановке задачи;
Q_1, Q_n - контрольные критерии для идентификации грубых ошибок;
R - размах варьирования;
r - коэффициент корреляции;
s - стандартное отклонение;
s^2 - дисперсия;
$s_{\bar{x}}$ - стандартное отклонение среднего результата;
$s_{\lg}$ - логарифмическое стандартное отклонение;
$s^2_{\lg}$ - логарифмическая дисперсия;
$s_{\lg \bar{x}_g}$ - логарифмическое стандартное отклонение среднего результата;
s_0^2, s_b^2, s_a^2 - общая дисперсия и дисперсия коэффициентов линейной зависимости;
t - критерий Стьюдента;
U - коэффициент для расчета границ среднего результата гарантии качества анализируемого продукта;
W - весовой коэффициент пробита;
x, y - текущий координаты в уравнении линейной зависимости;

$\bar{Y}$ - активность препарата;

Xi, Yi - вычисленные, исходя из уравнения линейной зависимости значения переменных x и y;

Y - пробит;

$\bar{x}$, $\bar{y}$ - средние выборки (координаты центра линейной зависимости);

x_i, y_i - i-тая варианта (i-тая пара экспериментальных значений x и y);

$\bar{x}$ +/-"ДЕЛЬТА"$\bar{x}$ - граничные значения доверительного интервала среднего результата;

x_i +/-"ДЕЛЬТА"x_i - граничные значения доверительного интервала результата отдельного определения;

"ДЕЛЬТА" - разность некоторых величин;

"альфа" - уровень значимости, степень надежности;

"ДЕЛЬТА"x - полуширина доверительного интервала величины;

"дельта" - относительная величина систематической ошибки;

"эпсилон", "$\overline{\text{эпсилон}}$" - относительные ошибки соответственно результата отдельного определения и среднего результата;

"ми" - истинное значение измеряемой величины;

SUM - знак суммирования (сумма);

"$хи^2$" - критерий хи - квадрат.

I. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ХИМИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА

Метрологические характеристики методов и результатов, получаемых при статистической обработке данных эксперимента, позволяют проводить оценку и сравнение как экспериментальных методик, так и изучаемых объектов и на этой основе решать ряд прикладных задач, связанных с определением статистической достоверности результатов исследования.

I.1. ОСНОВНЫЕ СТАТИСТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОДНОРОДНОЙ ВЫБОРКИ И ИХ ВЫЧИСЛЕНИЕ

Проверка однородности выборки. Исключение выпадающих значений вариант. Термином "выборка" обозначают совокупность статистически эквивалентных результатов (вариант). В качестве такой совокупности можно, например, рассматривать ряд результатов, полученных при параллельных определениях содержания какого-либо вещества в однородной по составу пробе.

Допустим, что отдельные значения вариант выборки объема n обозначены через x_i ($1 <= i <= n$) и расположены в порядке возрастания:

$$x_1 ; x_2 ; \ldots x_i ; \ldots x_{n-1} ; x_n , \qquad (I.1.1)$$

Результаты, полученные при статистической обработке выборки, будут достоверны лишь в том случае, если эта выборка однородна, т.е. если варианты, входящие в нее, не отягощены грубыми ошибками, допущенными при измерении или расчете. Такие варианты должны быть исключены из выборки перед окончательным вычислением ее статистических характеристик. Для выборки небольшого объема ($n < 10$) идентификация вариант, отягощенных грубыми ошибками, может быть выполнена, исходя из величины размаха варьирования R (см. уравнения I.1.12, I.1.13 а, б). Для идентификации таких вариант в выборке большого объема ($n >= 10$) целесообразно проводить предварительную статистическую обработку всей выборки, полагая ее однородной, и уже затем на основании найденных статистических характеристик решать вопрос о справедливости сделанного предположения об однородности (см. выражение I.1.14).

В большинстве случаев среднее выборки $\bar{x}$ является наилучшей оценкой истинного значения измеряемой величины "ми", если его

вычисляют как среднее арифметическое всех вариант:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{1}^{n} x_i}{n} \qquad (I.1.2)$$

При этом разброс вариант x_i, вокруг среднего $\bar{x}$ характеризуется величиной стандартного отклонения s. В количественном химическом анализе величина s часто рассматривается как оценка случайной ошибки, свойственной данному методу анализа. Квадрат этой величины s^2 называют дисперсией. Величина дисперсии может рассматриваться как мера воспроизводимости результатов, представленных в данной выборке. Вычисление величин s и s^2 проводят по уравнениям I.1.5 и I.1.6. Иногда для этого предварительно определяют значения отклонений d_i и число степеней свободы (число независимых вариант) f:

$$d_i = x_i - \bar{x}; \qquad (I.1.3.)$$

$$f = n - 1; \qquad (I.1.4.)$$

$$s^2 = \frac{\sum_{1}^{n} d_i^2}{f} = \frac{\sum_{1}^{n} x_i^2 - nx^2}{f}; \qquad (I.1.5.)$$

$$s = \sqrt{s^2}. \qquad (I.1.6.)$$

Стандартное отклонение среднего результата $S_{\bar{x}}$ рассчитывают по по уравнению:

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}. \qquad (I.1.9.)$$

Примечание I.1.1. При наличии ряда из g выборок с порядковыми номерами k (1 <= k <= g) расчет дисперсии s^2 целесообразно проводить по формуле:

$$s^2 = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} \sum_{i=1}^{i=n_k} d_{ik}^2}{f} \times \frac{\sum_{k=1}^{k=g} [(n_k - 1) s_k^2]}{f} = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} \left[\sum_{i=1}^{i=n_k} x_{ik}^2 - n_k \bar{x}_k^2 \right]}{f} \qquad (I.1.7.)$$

При этом число степеней свободы равно:

$$f = \sum_{k=1}^{k=g} (n_k - 1). \qquad (I.1.8.)$$

где x_k - среднее k - той выборки; n_k - число вариант в k-той выборке; x_{ik} - i-тая варианта k-той выборки; s_k^2 - дисперсия k-той выборки; d_{ik} - отклонение i-той варианты k-той выборки.

Необходимым условием применения уравнений I.1.7 и I.1.8 является отсутствие статистически достоверной разницы между отдельными значениями s_k^2. В простейшем случае сравнение крайних значений s_k^2 проводят, исходя из величины критерия F, которую вычисляют по уравнению I.3.4 и интерпретируют, как указано в разделе I.3.

Примечание I.1.2. Если при измерениях получают логарифмы искомых вариант, среднее выборки вычисляют как среднее геометрическое, используя логарифм вариант:

$$\lg \bar{x}_g = \frac{\sum_1^n \lg x_i}{n}, \qquad (I.1.10)$$

откуда

$$\bar{x}_g = \sqrt[n]{x_1 x_2 \ldots x_n} = \text{antilg}\,(\lg \bar{x}_g). \qquad (I.1.11)$$

Значения s^2, s и $s_{\bar{x}}$ в этом случае также рассчитывают, исходя из логарифмов вариант, и обозначают соответственно через s_{lg}^2, s_{lg} и $s_{\bar{x}_g}$.

Пример I.1.1. При определении содержания стрептоцида в образце линимента были получены следующие данные.

Номер опыта i	1	2	3	4	5
x_i, %	9,52	9,55	9,83	10,12	10,33

n = 5; f = n - 1 = 5 - 1 = 4

$$x = \frac{\sum_1^n x_i}{n} = \frac{9{,}52 + 9{,}55 + 9{,}83 + 10{,}12 + 10{,}33}{5} = 9{,}87.$$

$d_i = |x_i - \bar{x}| = |x_i - 9{,}87|$, т.е. $d_1 = |9{,}52 - 9{,}87| = 0{,}35$ и т.д.

n n 2 _2

$$s^2 = \frac{SUM\ d_i^2}{f} = \frac{SUM\ x_i^2 - nx^2}{f} =$$

$$= \frac{(9{,}52^2 + 9{,}55^2 + 9{,}83^2 + 10{,}12^2 + 10{,}33^2) - 5 \times 9{,}87^2}{4} = 0{,}1252;$$

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{0{,}1252} = 0{,}3538;$$

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0{,}3538}{\sqrt{5}} = 0{,}1582.$$

Как было указано выше, значения x, s^2, s и $s_{\bar{x}}$ могут быть признаны достоверными, если ни одна из вариант выборки не отягощена грубой ошибкой, т. е. если выборка однородна. Проверка однородности выборок малого объема ($n < 10$) осуществляется без предварительного вычисления статистических характеристик, с этой целью после представления выборки в виде I.1.1 для крайних вариант x_1 и x_n рассчитывают значения контрольного критерия Q, исходя из величины размаха варьирования R:

$$R = [x_1 - x_n]; \qquad (I.1.12)$$

$$Q_1 = \frac{[x_1 - x_2]}{R}; \qquad (I.1.13а)$$

$$Q_n = \frac{[x_n - x_{n-1}]}{R}; \qquad (I.1.13б)$$

Выборка признается неоднородной, если хотя бы одно из вычисленных значений Q превышает табличное значение $Q(P, \bar{n})$, найденное для доверительной вероятности $\bar{P}$ (см. табл. 1 приложения). Варианты x_1 или x_n, для которых соответствующее значение $Q > Q(\bar{P}, n)$, отбрасываются, и для полученной выборки уменьшенного объема выполняют новый цикл вычислений по уравнениям I.1.12 и I.1.13 с целью проверки ее однородности. Полученная в конечном счете однородная выборка используется для вычисления x, s^2, s и $s_{\bar{x}}$.

Примечание I.1.3. При $|x_1 - x_2| < |x_2 - x_3|$ и $|x_n - x_{n-1}| < |x_{n-1} - x_{n-2}|$ уравнения I.1.13 а и I.1.13 б принимают

соответственно вид:

$$Q1 = \frac{|x2 - x3|}{R}; \quad Qn = \frac{|x_{n-1} - x_{n-2}|}{R}.$$

Пример I.1.2. При проведении девяти (n = 9) определений содержания общего азота в плазме крови крыс были получены следующие данные (в порядке возрастания):

i	1	2	3	4	5	6	7	8	9
x_i ,%	0,62	0,81	0,83	0,86	0,87	0,90	0,94	0,98	0,99

По уравнениям I.1.12 и I.1.13а находим:

$$R = |x1 - x_n| = |0,62 - 0,99| = 0,37;$$

$$Q1 = \frac{|x1 - x2|}{R} = \frac{|0,62 - 0,81|}{0,37} = 0,51.$$

По таблице 1 приложения находим:

$$Q(9; 95\%) = 0,46 < Q1 = 0,51;$$

$$Q(9; 99\%) = 0,55 > Q1 = 0,51.$$

Следовательно, гипотеза о том, что значение x1 = 0,62 должно быть исключено из рассматриваемой совокупности результатов измерений как отягощенное грубой ошибкой, может быть принята с доверительной вероятностью 95%, но должна быть отвергнута, если выбранное значение доверительной вероятности равно 99%.

Для выборок большого объема (n >= 10) проверку однородности проводят после предварительного вычисления статистических характеристик $\bar{x}$, s^2, s и $s_{\bar{x}}$. При этом выборка признается однородной, если для всех вариант выполняется условие:

$$|di| <= |3s|. \qquad (I.1.14)$$

Если выборка признана неоднородной, то варианты, для которых |di| > 3s, отбрасываются, как отягощенные грубыми ошибками с доверительной вероятностью P > 99,0%. В этом случае для полученной выборки сокращенного объема повторяют цикл вычислений статистических характеристик по уравнениям I.1.2, I.1.5, I.1.6, I.1.9 и снова проводят проверку однородности. Вычисление статистических характеристик считают законченным, когда выборка сокращенного объема оказывается однородной.

Примечание I.1.4. При решении вопроса об однородности конкретной выборки небольшого объема также можно воспользоваться выражением I.1.14, если известна оценка величины s, ранее найденная для данного метода измерения (расчета) вариант.

I.2. ДОВЕРИТЕЛЬНЫЕ ИНТЕРВАЛЫ И ОЦЕНКА ИХ ВЕЛИЧИНЫ

Если случайная однородная выборка конечного объема n получена в результате последовательных измерений некоторой величины A, имеющей истинное значение "ми", то среднее этой выборки $\bar{x}$ следует рассматривать лишь как приближенную оценку A. Достоверность этой

оценки характеризуется величиной доверительного интервала x +/- "ЕЛЬТА" $\bar{x}$, для которой с заданной доверительной вероятностью P выполняется условие:

$$(\bar{x} - \text{"ДЕЛЬТА"}\bar{x}) <= \text{"ми"} <= (\bar{x} + \text{"ДЕЛЬТА"}\bar{x}). \qquad (I.2.1)$$

Расчет граничных значений доверительного интервала проводят по Стьюденту, предполагая, что варианты, входящие в выборку, распределены нормально:

$$(\bar{x} +/- \text{"ДЕЛЬТА"}\bar{x}) = \bar{x} +/- \frac{t(P,f)s}{\sqrt{n}} \qquad (I.2.2)$$

Здесь t(P, f) - табличное значение критерия Стьюдента (см. таблицу II приложения).

Если при измерении одним и тем же методом двух близких значений A были получены две случайные однородные выборки с объемами n и m, то при m < n для выборки объема m справедливо выражение:

$$\bar{x}_{(m)} +/- \text{"ДЕЛЬТА"}\bar{x}_{(m)} = \bar{x}_{(m)} +/- \frac{t(P,f(n))S(n)}{\sqrt{m}} \qquad (I.2.3)$$

(индекс указывает принадлежность величин к выборке объема m или n).

Выражение I.2.3 позволяет оценить величину доверительного интервала среднего $\bar{x}(m)$, найденного, исходя из выборки объема m. Иными словами, доверительный интервал среднего $\bar{x}(m)$ выборки относительно малого объема m может быть сужен благодаря использованию известных величин s(n) и t(P, f(n)), найденных ранее для выборки большего объема n (в дальнейшем индекс n будет опущен).

Примечание I.2.1. Если $n <= 15$, а $\frac{m + n}{n} > 1,5$, величины s и f целесообразно вычислять, как указано в примечании I.1.1.

Подставляя n = 1 в выражение I.2.2 или m = 1 в выражение I.2.3, получаем:

$$x_i +/- \text{"ДЕЛЬТА"}x = x_i +/- t(P, f)s. \qquad (I.2.4)$$

Этот интервал является доверительным интервалом результата отдельного определения. Для него с доверительной вероятностью P выполняются взаимосвязанные условия:

$$x_i - \text{"ДЕЛЬТА"}x <= \text{"ми"} <= x_i + \text{"ДЕЛЬТА"}x; \qquad (I.2.5)$$

$$\text{"ми"} - \text{"ДЕЛЬТА"}x <= x_i <= \text{"ми"} + \text{"ДЕЛЬТА"}x; \qquad (I.2.6)$$

Значения "ДЕЛЬТА"$\bar{x}$ и "ДЕЛЬТА"x из выражений I.2.2 и I.2.4 используют при вычислении относительных погрешностей отдельной варианты ("эпсилон") и среднего результата ("$\overline{\text{эпсилон}}$"), выражая эти величины в %:

$$\text{"эпсилон"} = \frac{\text{"ДЕЛЬТА"}x}{} 100\% \qquad (I.2.7)$$

$$\overline{\text{"эпсилон"}} = \frac{\text{"ДЕЛЬТА"}\bar{x}}{\bar{x}} 100\% \qquad (I.2.8)$$

Пример I.2.1. В результате определения содержания хинона в стандартном образце хингидрона были получены следующие данные (n = 10).

i	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
xi,%	49,80	49,83	49,87	49,87	49,92	50,01	50,05	50,06	50,10	50,11

Расчеты по формуле I.1.2, I.1.4, I.1.5, I.1.6, I.1.9 дали следующие результаты:

$$\bar{x} = 49{,}96;\ f = 9;\ s^2 = 0{,}01366;\ s = 0{,}1169;\ s_{\bar{x}} = 0{,}03696.$$

Доверительные интервалы результата отдельного определения и среднего результата при P=90% получаем согласно I.2.4 и I.2.2:

$$x_i \text{ +/- "ДЕЛЬТА"}x = x_i \text{ +/- } t(P,f)s = x_i \text{ +/- } t(90\%,\ 9)s =$$

$$= x_i \text{ +/- } 1{,}83 \times 0{,}1169 = x_i \text{ +/- } 0{,}21;$$

$$\bar{x} \text{ +/- "ДЕЛЬТА"}\bar{x} = \bar{x} \text{ +/- } \frac{t(P,f)s}{\sqrt{n}} = 49{,}96 \text{ +/- } \frac{1{,}83 \times 0{,}1169}{\sqrt{10}} =$$

$$= 49{,}96 \text{ +/- } 0{,}07$$

Тогда относительные погрешности "эпсилон" и $\overline{\text{"эпсилон"}}$, согласно I.2.7 и I.2.8, равны:

$$\text{"эпсилон"} = \frac{\text{"ДЕЛЬТА"}x}{\bar{x}} 100\% = \frac{0{,}21}{49{,}96} \times 100\% = 0{,}42\%;$$

$$\overline{\text{"эпсилон"}} = \frac{\text{"ДЕЛЬТА"}\bar{x}}{\bar{x}} 100\% = \frac{0{,}07}{49{,}96} \times 100\% = 0{,}14\%.$$

Обозначая истинное содержание хинона в хингидроне через "ми", можно считать, что с 90% доверительной вероятностью справедливы неравенства:

$$\text{"ми"} - 0{,}21 <= x_i <= \text{"ми"} + 0{,}21;$$

$$x_i - 0{,}21 <= \text{"ми"} <= x_i + 0{,}21 \text{ (при любом i);}$$

$$\text{"ми"} - 0{,}07 <= \bar{x} <= \text{"ми"} + 0{,}07;\ \bar{x} - 0{,}07 <= \text{"ми"} <= \bar{x} + 0{,}07$$

(при n = 10).

Примечание I.2.2. Вычисление доверительных интервалов для случая, описанного в примечании I.1.2, проводят, исходя из логарифмов вариант. Тогда выражения I.2.2 и I.2.4 принимают вид:

$$\lg \bar{x} \pm \text{"ДЕЛЬТА"}\lg \bar{x} = \lg \bar{x} \pm \frac{t(P,f)s_{\lg}}{\sqrt{n}}; \quad (I.2.9)$$

$$\lg x_i \pm \text{"ДЕЛЬТА"}\lg x_i = \lg x_i \pm t(P,f)s_{\lg}. \quad (I.2.10)$$

Потенцирование выражений I.2.9 и I.2.10 приводит к несимметричным доверительным интервалам для значений $\bar{x}$ и x_i:

$$\text{antilg}(\lg \bar{x} - \text{"ДЕЛЬТА"}\lg \bar{x}) <= \bar{x} <= \text{antilg}(\lg \bar{x} + \text{"ДЕЛЬТА"}\lg \bar{x}); \quad (I.2.11)$$

$$\text{antilg}(\lg x_i - \text{"ДЕЛЬТА"}\lg x_i) <= x_i <= \text{antilg}(\lg x_i + \text{"ДЕЛЬТА"}\lg x_i). \quad (I.2.12)$$

где

$$\text{"ДЕЛЬТА"}\lg \bar{x} = \frac{t(p,f)s_{\lg}}{\sqrt{n}};$$

$$\text{"ДЕЛЬТА"}\lg x_i = t(P,f)s_{\lg}.$$

При этом для нижних и верхних границ доверительных интервалов $\bar{x}$ и x_i имеем:

$$\text{"эпсилон"} = \left[\frac{\left|\text{antilg}(\lg \bar{x} \pm \text{"ДЕЛЬТА"}\lg \bar{x}) - \bar{x}\right|}{\bar{x}}\right] 100\%; \quad (I.2.12а)$$

$$\text{"эпсилон"} = \left[\frac{\left|\text{antilg}(\lg x_i \pm \text{"ДЕЛЬТА"}\lg x_i) - x_i\right|}{x_i}\right] 100\%. \quad (I.2.12б)$$

I.3. МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА АНАЛИЗА. СРАВНЕНИЕ ДВУХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА ПО ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ

С целью получения метрологической характеристики метода проводят совместную статистическую обработку одной или нескольких выборок, полученных при анализе образцов с известным содержанием определяемого компонента "ми". Результаты статистической обработки представляют в виде табл. I.3.1.

Таблица I.3.1

Метрологические характеристики метода анализа

"ми"	f	$\bar{x}$	s^2	s	P	t(P,f)	"ДЕЛЬТА"x	"эпсилон"	"дельта"
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 <*>

<*> Графа 10 заполняется в том случае, если реализуется неравенство I.3.2.

Примечание I.3.1. При проведении совместной статистической обработки нескольких выборок, полученных при анализе образцов с разным содержанием определяемого компонента "ми", данные в графах 1, 2, 3, 4, 9 и 10 табл. I.3.1 приводят отдельно для каждой выборки. При этом в графах 2, 4, 5, 7, 8 в последней строке под чертой приводят обобщенные значения f, s^2, s, t, "ДЕЛЬТА"x, вычисленные с учетом примечания I.1.1.

Если для выборки объема m величина $|"ми" - \bar{x}| > 0$, следует решить вопрос о наличии или отсутствии систематической ошибки. Для этого вычисляют критерий Стьюдента t:

$$t = \frac{|"ми" - \bar{x}| \sqrt{m}}{s}. \qquad (I.3.1.)$$

Если, например, при P = 95% и f = m - 1, реализуется неравенство

$$t > t(P, f), \qquad (I.3.2)$$

полученные данным методом результаты отягощены систематической ошибкой, относительная величина которой "дельта" вычисляется по формуле:

$$"дельта" = \frac{\bar{x} - "ми"}{"ми"} 100\%. \qquad (I.3.3)$$

Следует помнить, что если величина A определена как среднее $\bar{x}$ некоей выборки, полученной эталонным методом, критерий Стьюдента t может рассчитываться по уравнению I.4.5.

При сравнении воспроизводимости двух методов анализа с оценками дисперсий $s1^2$ и $s2^2$ ($s1^2 > s2^2$) вычисляют критерий Фишера F:

$$F = \frac{s1^2}{s2^2}. \qquad (I.3.4)$$

Критерий F характеризует при $s1^2 > s2^2$ достоверность различия между $s1^2 > s2^2$.

Вычисленное значение F сравнивают с табличным значением F(P, f1, f2), найденным при P = 99% (см. таблицу III приложения).

Если

$$F > F(P, f1, f2), \qquad (I.3.5)$$

$s2^2$ $s2^2$

различие дисперсий $s1$ и $s2$ признается статистически значимым с вероятностью P, что позволяет сделать заключение о более высокой воспроизводимости второго метода. При

$$F <= F(P, f1, f2) \qquad (I.3.5a)$$

различие значений $s1^2$ и $s2^2$ не может быть признано значимым и заключение о различии воспроизводимости методов сделать нельзя ввиду недостаточного объема информации.

Примечание I.3.2. Для случая, описанного в примечании I.1.2, в табл. I.3.1 вместо величин "ми", $\bar{x}$, $s1^2$ и s приводят величины lg "ми", $\lg \bar{x}_g$, $s_{\lg}$ и $s_{\lg}$. При этом в графу 8, согласно примечанию I.2.2, вносят величину "ДЕЛЬТА"lg x, а в графу 9 - максимальное по абсолютной величине значение "эпсилон". Аналогичные замены проводят при вычислении t по уравнению I.3.1 и F - по уравнению I.3.4.

Для сравнения двух методов анализа результаты статистической обработки сводят в табл. I.3.2.

Таблица I.3.2

Данные для сравнительной метрологической оценки
двух методов анализа

Метод, N п/п	"ми"	f	$\bar{x}$	s^2	s	P	t(P, f) (табл.)	"ДЕЛЬТА"x	"эпсилон"	$t_{выч}$	F(P,f1,f2) (табл.) P - 99%	$F_{выч}$	"дельта"	Примечания
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 2														

Метрологическое сравнение методов анализа желательно проводить при "ми1" = "ми2", f1 > 10 и f2 > 10. Если точные значения "ми1" и "ми2" неизвестны, величины "дельта" и $t_{выч}$ не определяют.

Пример I.3.1. Пусть для двух выборок аналитических данных (1 и 2), характеризующих, например, различные методы анализа, получены метрологические характеристики, приведенные в графах 1-10 табл. I.3.3.

Таблица I.3.3

Номер выборки	"ми"	f	$\bar{x}$, %	s^2	s	P, %	t(P, f) (табл.)	"ДЕЛЬТА"x	"эпсилон"	t выч	F(P,f1,f2) (табл.) P = 99%	F выч	"дельта"
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	100	20	100,13	0,215	0,464	95	2,09	0,97	0,97	1,28	3,36	17,92	-
2	100	15	98,01	0,012	0,110	95	2,13	0,23	0,24	72,36			1,99

Для заполнения графы 11 вычислим значения t1 и t2:

$$t1 = \frac{|"ми" - \bar{x}1| \sqrt{m1}}{s1} = \frac{|100 - 100,13| \sqrt{20 + 1}}{0,464} = 1,28;$$

$$t2 = \frac{|"ми" - \bar{x}2| \sqrt{m2}}{s2} = \frac{|100 - 98,01| \sqrt{15 + 1}}{0,110} = 72,36;$$

Поскольку t1 = 1,28 < (95%, 20) = 2,09, гипотеза $|"ми1" - \bar{x}1|$ не равно 0 может быть отвергнута, что позволяет считать результаты выборки 1 свободными от систематической ошибки.

Напротив, поскольку t2 = 72,36 >> t2 (95%, 15) = 2,13, гипотезу $|"ми2" - \bar{x}2|$ не равно 0 приходится признать статистически достоверной, что свидетельствует о наличии систематической ошибки в результатах выборки 2. В графу 14 вносим:

$$"дельта2" = \frac{|"ми1" - \bar{x}1|}{"ми"} 100\% = \frac{|100 - 98,01|}{100} \times 100\% = 1,99\%.$$

Заполним графы 12 и 13:

$$F(99\%; 20; 15) = 3,36;$$

$$F = \frac{s1^2}{s2^2} = \frac{0,215}{0,012} = 17,92;$$

$$F = 17,92 >> f(99\%; 20; 15) = 3,36.$$

Следовательно, при P = 99% гипотезу о различии дисперсий $s1^2$ и $s2^2$ следует признать статистически достоверной.

Выводы:

а) результаты, полученные первым методом, являются правильными, т.е. они не отягощены систематической ошибкой;

б) результаты, полученные вторым методом, отягощены систематической ошибкой;

в) по воспроизводимости второй метод существенно лучше первого метода.

I.4. МЕТРОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СРЕДНЕГО РЕЗУЛЬТАТА. СРАВНЕНИЕ СРЕДНИХ РЕЗУЛЬТАТОВ ДВУХ ВЫБОРОК

Если с помощью данного метода анализа (измерения) следует определить значение некоторой величины А, то для полученной экспериментально однородной выборки объема m рассчитывают величины, необходимые для заполнения табл. I.4.1. Так поступают в том случае, если применяемый метод анализа (измерения) не был ранее аттестован метрологически. Если же этот метод уже имеет метрологическую аттестацию, графы 2, 4, 5, 7, 8 и 9 табл. I.4.1 заполняются

на основании данных табл. I.3.1, полученных при аттестации. При заполнении табл. I.4.1. следует при необходимости учитывать примечания I.2.1 и I.3.1.

Таблица I.4.1

Метрологические характеристики среднего результата

m	f	$\bar{x}$	s^2	s	$s_{\bar{x}}$	P	t (P, f)	"ДЕЛЬТА"x	$\bar{x}$ +/-"ДЕЛЬТА"$\bar{x}$	"эпсилон"
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

Таким образом, на основании выражения I.2.1 для измеряемой величины A в предположении отсутствия систематической ошибки с вероятностью P выполняется условие:

$$\bar{x} - \text{"ДЕЛЬТА"}\bar{x} <= A <= \bar{x} + \text{"ДЕЛЬТА"}\bar{x}, \qquad (I.4.1)$$

т. е.

$$\bar{A} = \bar{x} +/- \text{"ДЕЛЬТА"}\bar{x}. \qquad (I.4.2)$$

Примечание I.4.1. В случае, предусмотренном в примечании I.1.2, в графе 9 табл. I.4.1 приводят величину "ДЕЛЬТА"lg $\bar{x}$, а каждую из граф 3, 10 и 11 разбивают на две (а, б). В графе 3а приводят значение $\bar{x}_g$, в графе 3б - значение lg $\bar{x}_g$, в графах 10а и 10б - соответственно значения нижней и верхней границ доверительного интервала для $\bar{x}_g$ (см. уравнения I.2.11, I.2.12). Наконец, в графе 11 приводят максимальное по абсолютной величине значение "эпсилон", (см. уравнение I.2.12а).

Если в результате измерений одной и той же величины A получены две выборки объема n1 и n2, причем $\bar{x}1$ не равно $\bar{x}2$, может возникнуть необходимость проверки статистической достоверности гипотезы:

$$\bar{x}1 = \bar{x}2, \qquad (I.4.3)$$

т.е. значимости разности ($\bar{x}1$ - $\bar{x}2$).

Такая проверка необходима, если величина A определялась двумя разными методами с целью их сравнения или если величина A определялась одним и тем же методом для двух разных объектов, идентичность которых требуется доказать. Для проверки гипотезы I.4.3 следует установить, существует ли статистически значимое различие между дисперсиями $s1^2$ и $s2^2$. Эта проверка проводится так, как указано в разделе I.3 (см. выражения I.3.4, I.3.5, I.3.5а). Рассмотрим три случая.

1. Различие дисперсий $s1^2$ и $s2^2$ статистически недостоверно (справедливо неравенство I.3.5а). В этом случае средневзвешенное значение s^2 вычисляют по уравнению I.1.7, а дисперсию s^2_P разности |$\bar{x}1$ - $\bar{x}2$| - по уравнению I.4.4:

$$s_P^2 = \frac{s^2 (n1 + n2)}{n1n2}; \qquad (I.4.4)$$

$$s_P = \sqrt{s_P^2}. \qquad (I.4.4a)$$

Далее вычисляют критерий Стьюдента:

$$t = \frac{|\bar{x}1 - \bar{x}2|}{s_P} = \frac{|\bar{x}1 - x2|}{s} \sqrt{\frac{n1n2}{n1 + n2}}; \qquad (I.4.5)$$

$$f = n1 + n2 - 2. \qquad (I.4.5a)$$

Если при выбранном значении P (например, при P = 95%)

$$t > t(P, f), \qquad (I.4.6)$$

то результат проверки положителен - значение $(\bar{x}1 - \bar{x}2)$ является значимым и гипотезу $\bar{x}1 = \bar{x}2$ отбрасывают. В противном случае надо признать, что эта гипотеза не противоречит экспериментальным данным.

2. Различие значений $s1^2$ и $s2^2$ статистически достоверно (справедливо неравенство I.3.5). Если $s1^2 > s2^2$, дисперсию s_P^2 разности $(\bar{x}1 - \bar{x}2)$ находят по уравнению I.4.7, а число степеней свободы f'- по уравнению I.4.8:

$$s_P^2 = \frac{s1^2}{n1} + \frac{s2^2}{n2}; \qquad (I.4.7)$$

$$f' = (n1 + n2 - 2) \left[0,5 + \frac{s1^2 s2^2}{s1^4 + s2^4} \right]. \qquad (I.4.8)$$

Следовательно, в данном случае

$$t = \frac{|\bar{x}1 - \bar{x}2|}{s_P} = \frac{|\bar{x}1 - \bar{x}2| n1n2}{n2s1^2 + n1s2^2}. \qquad (I.4.9)$$

Вычисленное по уравнению I.4.9 значение t сравнивают с табличным значением t(P, f'), как это описано выше для случая 1.

Рассмотрение проблемы упрощается, когда $n1 \approx n2$ и $s1 >> s2$.

Тогда в отсутствие систематической ошибки среднее $\bar{x}2$ выборки объема n2 принимают за достаточно точную оценку величины A, т.е.

принимают $\bar{x}2$ = "ми." Справедливость гипотезы $\bar{x}1$ = "ми", эквивалентной гипотезе I.4.3, проверяют с помощью выражений I.3.1, I.3.2, принимая $f1 = n1 - 1$. Гипотеза I.4.3 отклоняется, как статистически недостоверная, если выполняется неравенство I.3.2.

3. Известно точное значение величины A. Если A = "ми",

проверяют две гипотезы: $\bar{x}1$ = "ми" (I.4.6) и $\bar{x}2$= "ми" (I.4.7). Проверку выполняют так, как описано в разделе I.3 с помощью выражений I.3.1 и I.3.2, отдельно для каждой из гипотез. Если гипотезы I.4.6 и I.4.7 статистически достоверны, то следует признать достоверной и гипотезу I.4.3. В противном случае гипотеза I.4.3 должна быть отброшена.

Примечание I.4.2. В случае, предусмотренном примечанием I.1.2,

при сравнении средних используют величины $\lg \bar{x}_g$, $s^2_{\lg}$ и $s_{\lg}$.

Когда разность $(\bar{x}1 - \bar{x}2)$ оказывается значимой, определяют доверительный интервал для разности соответствующих генеральных

средних $(\tilde{x}1$ и $\tilde{x}2)$:

$$|\bar{x}1 - \bar{x}2| - t(P,f)s_p <= |\tilde{x}1 - \tilde{x}2| <= |\bar{x}1 - \bar{x}2| + t(P,f)s_p \qquad (I.4.10)$$

Пример I.4.1. При определении содержания основного вещества в двух образцах препарата, изготовленных по разной технологии, получены метрологические характеристики средних результатов, приведенные в табл. I.4.2. Требуется решить, является ли первый образец по данному показателю лучшим в сравнении со вторым образцом.

Поскольку $F = \frac{s2^2}{s1^2} = \frac{0,31}{0,25} = 1,24 < F\ (99\%,\ 5,7) = 7,46$, то

согласно неравенству I.3.5а статистически достоверное различие

величин $s1^2$ и $s2^2$ отсутствует.

Таблица I.4.2

Номер образца	n	f	$\bar{x}$ %	s^2	s	$s_{\bar{x}}$	P %	t (P,f)	"ДЕЛЬТА"x	"ДЕЛЬТА"$_{\bar{x}}$	"эпсилон" %
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	8	7	99,10	0,25	0,50	0,18	95	2,36	1,18	0,42	0,42
2	6	5	98,33	0,31	0,56	0,23	95	2,57	1,44	0,59	0,60

Следовательно, гипотеза $\bar{x}1 = \bar{x}2$ (I.4.3) проверяется с помощью уравнений I.1.7, I.1.8, I.4.4 и I.4.5.

k=g 2 2 2

$$s = \frac{\sum_{k=1}^{k=g} [(n_k - 1)s_k]}{\sum_{k=1}^{k=g} (n_k - 1)} = \frac{f_1 s_1 + f_2 s_2}{f_1 + f_2} =$$

$$= \frac{7 \times 0{,}25 + 5 \times 0{,}31}{7 + 5} = 0{,}275;$$

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{0{,}275} = 0{,}524.$$

$$s_p^2 = \frac{s^2 (n_1 + n_2)}{n_1 n_2} = \frac{0{,}275 \times (8 + 6)}{8 \times 6} = 0{,}0802;$$

$$s_p = \sqrt{s_p^2} = \sqrt{0{,}0802} = 0{,}283.$$

$$f = n_1 + n_2 - 2 = 8 + 6 - 2 = 12.$$

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_p} = \frac{|99{,}10 - 98{,}33|}{0{,}283} = 2{,}72.$$

$$t = 2{,}72 > t(95\%;\ 12) = 2{,}18.$$

$$t = 2{,}72 < t(99\%;\ 12) = 3{,}08.$$

Следовательно, с доверительной вероятностью $P = 95\%$ гипотеза $\bar{x}_1$ не равно $\bar{x}_2$ может быть принята. Однако с доверительной вероятностью $P = 99\%$ принять эту гипотезу нельзя из-за недостатка информации.

Если гипотеза $\bar{x}_1$ не равно $\bar{x}_2$ принята, то определяют доверительный интервал разности генеральных средних $\tilde{x}_1$ и $\tilde{x}_2$ (уравнение I.4.10):

$$|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| - t(P, f)s_p \le |\tilde{x}_1 - \tilde{x}_2| \le |\bar{x}_1 - \bar{x}_2| + t(P, f)s_p$$

$$(P = 95\%;\ f = 12);$$

$$|99{,}10 - 98{,}33| - 2{,}18 \times 0{,}283 \le \tilde{x}_1 - \tilde{x}_2 \le$$

$$\le |99{,}10 - 98{,}33| + 2{,}18 \times 0{,}283$$

$$0{,}15 \le \tilde{x}_1 - \tilde{x}_2 \le 1{,}39$$

I.5. ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ АНАЛИЗА

Оценка сходимости результатов параллельных определений. При рядовых исследованиях аналитик обычно проводит два-три, реже четыре параллельных определения. Варианты полученной при этом упорядоченной выборки объема m, как правило, довольно значительно отличаются друг от друга. Если метод анализа метрологически аттестован, то максимальная разность результатов двух параллельных определений должна удовлетворять неравенству:

$$|x_1 - x_n| < L(P, m)s, \qquad (I.5.1)$$

где L(P, m) - фактор, вычисленный по Пирсону при P = 95%.

m	2	3	4
L	2,77	3,31	3,65

Если неравенство I.5.1 не выполняется, необходимо провести дополнительное определение и снова проверить, удовлетворяет ли величина $|x_1 - x_n|$ неравенству I.5.1.

Если для результатов четырех параллельных определений неравенство I.5.1 не выполняется, одна из вариант (x_1 или x_n) должна быть отброшена и заменена новой. При невозможности добиться выполнения неравенства I.5.1 следует считать, что конкретные условия анализа привели к снижению воспроизводимости метода и принятая оценка величины s применительно к данному случаю является заниженной. В этом случае поступают, как указано в разделе I.1.

Определение необходимого числа параллельных определений. Если необходимо получить средний результат $\bar{x}$ с относительной погрешностью "эпсилон" <= "фи", причем метод анализа метрологически аттестован, необходимое число параллельных определений m находят, исходя из уравнения I.2.3:

$$m >= \left[\frac{\text{"ДЕЛЬТА"} \times 100}{\text{"фи"}\bar{x}} \right]^2 . \qquad (I.5.2)$$

Гарантия качества продукции. Предположим, что качество продукции регламентируется предельными значениями a_{min} и a_{max} величины A, которую определяют на основании результатов анализа. Примем, что вероятность соответствия качества продукта условию

$$a_{min} < A < a_{max} \qquad (I.5.3)$$

должна составлять $\bar{P}$%.

Пусть величину A находят экспериментально как среднее выборки объема m, а метод ее определения метрологически аттестован. Тогда условие I.5.3 будет выполняться с вероятностью $\bar{P}$, если значение $\bar{x}$ = A будет лежать в пределах

$$a_{min} + \text{"ДЕЛЬТА"}\ \bar{A} < A < a_{max} - \text{"ДЕЛЬТА"}\bar{A}, \qquad (I.5.4)$$

где:

$$"ДЕЛЬТА"\bar{A} = \frac{U(\bar{P})s}{\sqrt{m}}. \qquad (I.5.5)$$

Значения коэффициента U для вероятности $\bar{P}$ = 95% и $\bar{P}$ = 99% соответственно равны 1,65 и 2,33. Иными словами для гарантии качества наблюдаемые пределы изменения величины A на практике следует ограничить значениями:

$$A_{min} = a_{min} + "ДЕЛЬТА"\bar{A} = a_{min} + \frac{U(\bar{P})s}{\sqrt{m}}; \qquad (I.5.6)$$

$$A_{max} = a_{max} - "ДЕЛЬТА"\bar{A} = a_{max} - \frac{U(\bar{P})s}{\sqrt{m}}; \qquad (I.5.7)$$

Наоборот, если заданы значения A_{min} и A_{max}, значения a_{min} и a_{max}, входящие в неравенство I.5.3, могут быть найдены путем решения уравнений I.5.6 и I.5.7. Наконец, если заданы пары значений A_{min}, a_{min} и A_{max}, a_{max}, то уравнения I.5.6 и I.5.7 могут быть решены относительно m. Это может быть использовано для оценки необходимого числа параллельных определений величины A.

Примечание I.5.1. В уравнениях I.5.5, I.5.6 и I.5.7 величина коэффициента $U(\bar{P})$ должна быть заменена величиной $t(\bar{P}, f)$, если значение f, определенное по уравнениям I.1.4 или I.1.8 < 15.

Примечание I.5.2. Для случая, предусмотренного примечанием I.1.2, описанные в разделе I.5 вычисления проводят с использованием величин $\lg \bar{x}_g$, $\lg x_i$ $s_{\lg}$ и т.п.

Пример I.5.1. Рассмотрим данные таблицы I.3.3, относящиеся к выборке 1, как метрологическую характеристику используемого метода анализа.

а) Пусть a_{min} = 98%, a_{max} = 100,50%. Тогда для испытуемого образца продукта средний результат анализа $\bar{A}$ при проведении трех параллельных определений (m = 3) должен находиться в пределах:

$$a_{min} + \frac{U(\bar{P})s}{\sqrt{m}} < A < a_{max} - \frac{U(\bar{P})s}{\sqrt{m}}$$

При $\bar{P}$ = 99%:

$$98 + \frac{2{,}33 \times 0{,}464}{\sqrt{3}} < A < 100{,}5 - \frac{2{,}33 \times 0{,}464}{\sqrt{3}};$$

$$98{,}62 < A < 99{,}88.$$

При P = 95%:

$$98 + \frac{1{,}65 \times 0{,}464}{\sqrt{3}} < A < 100{,}5 - \frac{1{,}65 \times 0{,}464}{\sqrt{3}};$$

$$98{,}44 < A < 100{,}06.$$

б) Реальный средний результат анализа образца испытуемого продукта A = 99% (при m = 3). Тогда определение пределов a_{min} и a_{max}, гарантированно характеризующих качество данного образца с заданной доверительной вероятностью $\overline{P}$, проводим, исходя из уравнения I.5.6 или I.5.7, полагая

$$A_{min} = A_{max} = A.$$

$$a_{min} = A - \frac{U(\overline{P})s}{\sqrt{m}};$$

$$a_{max} = A + \frac{U(\overline{P})s}{\sqrt{m}}.$$

При $\overline{P}$ = 99%:

$$a_{min} = 99 - \frac{2{,}33 \times 0{,}464}{\sqrt{3}} = 98{,}38\%;$$

$$a_{max} = 99 + \frac{2{,}33 \times 0{,}464}{\sqrt{3}} = 99{,}62\%.$$

При $\overline{P}$ = 95%:

$$a_{min} = 99 - \frac{1{,}65 \times 0{,}464}{\sqrt{3}} = 98{,}56\%;$$

$$a_{max} = 99 + \frac{1{,}65 \times 0{,}464}{\sqrt{3}} = 99{,}44\%.$$

Полученные оценки a_{min} и a_{max} близки к границам доверительного интервала $A \pm$ "ДЕЛЬТА"$\overline{x} = A \pm \frac{\text{"ДЕЛЬТА"}x}{\sqrt{m}} = 99 \pm \frac{0{,}97}{\sqrt{3}} = 99 \pm 0{,}56$, что соответствует примечанию I.5.1.

I.6. РАСЧЕТ И СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ ЛИНЕЙНОЙ ЗАВИСИМОСТИ

При использовании ряда химических и физико - химических методов количественного анализа непосредственному измерению подвергается некоторая величина y, которая является линейной функцией искомой концентрации (количества) x определяемого вещества или элемента. Иными словами, в основе таких методов анализа лежит существование линейной зависимости:

$$y = bx + a, \qquad (I.6.1)$$

где y - измеряемая величина; x - концентрация (количество) определяемого вещества или элемента; b - угловой коэффициент линейной зависимости; a - свободный член линейной зависимости.

Для использования зависимости I.6.1 в аналитических целях, т.е. для определения конкретной величины x по измеренному значению y, необходимо заранее найти числовые значения констант Ь и a, т.е. провести калибровку. Иногда константы функции (I.6.1) имеют тот или иной физический смысл, и их значения должны оцениваться с учетом соответствующего доверительного интервала. Если калибровка проведена и значения констант a и Ь определены, величину x_i находят по измеренному значению y_i;

$$x_i = \frac{1}{b} y_i - \frac{a}{b}. \qquad (I.6.2)$$

При калибровке величину x рассматривают как аргумент, а величину y - как функцию. Наличие линейной зависимости между x и y не всегда является очевидным. По этой причине экспериментальные данные, полученные при калибровке, в первую очередь используют для оценки жесткости, т. е. степени неслучайности линейной связи между x и y, и лишь затем определяют значения констант a и b и их доверительные интервалы. В первом приближении судить о жесткости линейной связи между переменными x и y можно по величине коэффициента корреляции r, который вычисляют по уравнению:

$$r = \frac{m \sum_{1}^{m} x_i y_i - \sum_{1}^{m} x_i \sum_{1}^{m} y_i}{\sqrt{\left[m \sum_{1}^{m} x_i^2 - \left(\sum_{1}^{m} x_i\right)^2\right]\left[m \sum_{1}^{m} y_i^2 - \left(\sum_{1}^{m} y_i\right)^2\right]}} \qquad (I.6.3)$$

исходя из экспериментальных данных, представленных в табл. I.6.1. Чем ближе |r| к единице, тем менее случайна наблюдаемая линейная зависимость между переменными x и y. В аналитической химии в большинстве случаев используют линейные зависимости с коэффициентом корреляции |r| >= 0,98 и только при анализе следовых количеств рассматривают линейные зависимости с коэффициентом корреляции |r| >= 0,9. Применение уравнения I.6.2 оправдано только при |r| >= 0,95.

Коэффициенты a и b и другие метрологические характеристики зависимости I.6.1 рассчитывают с использованием метода наименьших квадратов по экспериментально измеренным значениям переменной y для заданных значений аргумента x. Пусть в результате эксперимента найдены представленные в табл. I.6.1 пары значений аргумента x и функции y.

Таблица I.6.1

i	x_i	y_i
1	x_1	y_1
2	x_2	y_2
...	...	...
m	x_m	y_m

Тогда:

$$b = \frac{m \sum_{1}^{m} x_i y_i - \sum_{1}^{m} x_i \sum_{1}^{m} y_i}{m \sum_{1}^{m} x_i^2 - \left(\sum_{1}^{m} x_i\right)^2} \qquad (I.6.4)$$

$$a = \frac{\sum_{1}^{m} y_i - b \sum_{1}^{m} x_i}{m}; \qquad (I.6.5)$$

$$f = m - 2. \qquad (1.6.6)$$

Если полученные значения коэффициентов a и b использовать для вычисления значений y по заданным в табл. I.6.1 значениям аргумента x согласно зависимости I.6.1, то вычисленные значения Y обозначают через Y1, Y2, ... Yi, ... Yn. Разброс значений y_i относительно значений Yi, характеризует величина дисперсии s_0^2, которую вычисляют по уравнению:

$$s_0^2 = \frac{\sum_{1}^{m} (y_i - Y_i)^2}{f} = \frac{\sum_{1}^{m} y_i^2 - a\sum_{1}^{m} y_i - b\sum_{1}^{m} x_i y_i}{f}. \qquad (I.6.7)$$

В свою очередь дисперсии констант b и a находят по уравнениям:

$$s_b^2 = \frac{m s_0^2}{m\sum_{1}^{m} x_i^2 - \left(\sum_{1}^{m} x_i\right)^2}; \qquad (I.6.8)$$

$$s_a^2 = \frac{s_b^2}{m} \sum_{1}^{m} x_i^2. \qquad (1.6.9)$$

Стандартные отклонения s , и s и величины "ДЕЛЬТА"b и "ДЕЛЬТА"

$b \quad a$

а, необходимые для оценки доверительных интервалов констант, рассчитывают по уравнениям:

$$s_b = \sqrt{s_b^2}; \qquad (I.6.10)$$

$$s_a = \sqrt{s_a^2}; \qquad (I.6.11)$$

$$"ДЕЛЬТА"b = t(P; F)s_b; \qquad (I.6.12)$$

$$"ДЕЛЬТА"a = t(P; F)s_a. \qquad (I.6.13)$$

Уравнению I.6.1 с константами a и b обязательно удовлетворяет точка с координатами $\bar{x}$ и $\bar{y}$, называемая центром калибровочного графика:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{1}^{m} x_i}{m}; \qquad (I.6.14)$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{1}^{m} y_i}{m}. \qquad (I.6.15)$$

Наименьшие отклонения значений y_i от значений Yi наблюдаются в окрестностях центра графика. Стандартные отклонения s_y и s_x величины y и x, рассчитанных соответственно по уравнениям I.6.1 и I.6.2 исходя из известных значений x и y, определяются с учетом удаления последних от координат центра графика:

$$s_y = \sqrt{s_0^2\left[\frac{1}{m} + \frac{m(x - \bar{x})^2}{m\sum_{1}^{m} x_i^2 - \left(\sum_{1}^{m} x_i\right)^2}\right]}; \qquad (I.6.16)$$

$$s_x = \sqrt{\frac{s_0^2}{b^2}\left[\frac{1}{n_j} + \frac{1}{m} + \frac{m(\bar{y}_j - \bar{y})^2}{m\sum_{1}^{m} x_i^2 - \left(\sum_{1}^{m} x_i\right)^2}\right]} \qquad (I.6.17)$$

где $\bar{y}_j$ - среднее значение; n_j - число вариант, использованных

при определении y_j.

При $x = \bar{x}$ и $\bar{y}_j = \bar{y}$:

$$s_y = \sqrt{\frac{s_0^2}{m}}; \qquad (I.6.16а)$$

$$s_x = \sqrt{\frac{s_a^2}{b^2}\left[\frac{1}{n_j} + \frac{1}{m}\right]}.$$

С учетом значений s_y и s_x могут быть найдены значения величин "ДЕЛЬТА"y и "ДЕЛЬТА"x .

$$"ДЕЛЬТА"y = s_y\, t(P; F); \qquad (I.6.18)$$

$$"ДЕЛЬТА"x = s_x\, t(P; F). \qquad (I.6.19)$$

Значения s_x и "ДЕЛЬТА"x, найденные при $n_j = 1$, являются характеристиками воспроизводимости аналитического метода, если x - концентрация, а y - функция x.

Обычно результаты статистической обработки по методу наименьших квадратов сводят в таблицу (табл. I.6.2).

Таблица I.6.2

Результаты статистической обработки экспериментальных данных, полученных при изучении линейной зависимости вида y = bx + a

f	$\bar{x}$	$\bar{y}$	b	a	t(P, f) при P = 95%	"ДЕЛЬТА"b	"ДЕЛЬТА"a	s_0^2	r	s_x при $n_j = 1$, $y_j = \bar{y}$	"ДЕЛЬТА"x	"ДЕЛЬТАx"100 / $\bar{x}$
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Примечание I.6.1. Если целью экспериментальной работы являлось определение констант b и a, графы 11, 12 и 13 табл. I.6.2 не заполняются.

Примечание I.6.2. Если y = blg x + a, вычисления, описанные в разделе I.6, выполняют с учетом примечаний I.1.2 и I.2.2.

Примечание I.6.3. Сравнение дисперсий s_0^2, полученных в разных условиях для двух линейных зависимостей, может быть проведено, как указано в разделе I.3 (см. выражения I.3.4, I.3.5 и I.3.5а).

II. СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ БИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

II.1. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА БИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Во многих случаях установление свойств препаратов при помощи физических и химических анализов достаточно для полной характеристики свойств этих препаратов, включая и их биологическую активность. Однако физические и химические свойства препарата не всегда могут быть стандартизованы. Нередки случаи, когда связь между этими свойствами препарата и его биологической активностью установлена недостаточно определенно и однозначно. В подобных случаях биологическая активность фармакологического агента может быть определена только при помощи непосредственного биологического исследования.

Чаще всего показатель, характеризующий биологическую активность препарата, учитывается в количественной форме: например, масса аскорбиновой кислоты на 100 г ткани надпочечника при действии кортикотропина, время свертывания крови при действии гепарина и т. д. В этом случае конечным результатом испытания следует считать среднее значение показателя y, а точнее - доверительный интервал для y. О вычислении этих величин см. разд. I.1 и I.2.

Пример II.1. При введении 7 мышам внутрибрюшинно раствора гексенала в дозе 100 мг/кг получены следующие величины продолжительности наркоза y_i (в минутах): 35; 83; 53; 60; 71; 62; 39.

Расчет проводят по уравнениям: I.1.2; I.1; I.2.2 при P = 95%.

$\bar{y}$ = 57,60 мин; s^2 = 287,64; s = 16,96; $s_{\bar{y}}$ = 6,41.

f = 6; t(95%, 6) = 2,45; "ДЕЛЬТА"$\bar{y}$ = 15,70.

$\bar{y}$ +/- "ДЕЛЬТА"$\bar{y}$ = 57,6 +/- 15,7;

y_{min} = 41,9 мин; y_{max} = 73,3 мин.

Одной из важнейших задач биологических испытаний фармакологических веществ является сравнение испытуемого препарата со стандартным, для чего испытанию подвергаются одновременно две или большее число (если испытания производятся при некотором наборе доз) групп животных или других тест - объектов. При составлении этих групп следует обеспечивать однородность тест - объектов (в отношении пола, возраста, массы тела, условий содержания и т. д.) внутри групп, а также распределение тест - объектов по группам при помощи методов рандомизации.

Кроме того, следует стремиться к тому, чтобы число тест - объектов во всех группах было одинаково. Это является условием применимости ряда процедур статистического анализа, описываемых ниже, и всегда упрощает вычисление во всех остальных случаях.

Если по какой-либо причине (ошибка в эксперименте, гибель животного, не связанная с испытанием) в некоторых из групп выпало по одному результату, можно выровнять численности групп одним из двух способов:

а) исключить из больших групп по одному результату, но обязательно с применением рандомизации;

б) прибавить к каждой из меньших групп один результат, равный среднему из оставшихся в этой группе результатов, но в дальнейших расчетах число степеней свободы, относящихся к данной группе, должно считаться на единицу меньшим.

Выбор того или другого способа выравнивания численностей в группах зависит главным образом от числа групп, в которых образовались пробелы.

В принципе эти процедуры можно применять и при различии в численностях групп на две-три и большее число единиц, но это всегда менее желательно, так как снижает точность и надежность окончательных выводов по результатам испытания.

Сравнение стандартного и испытуемого препаратов, т.е. проверка того, одинаковы ли их биологические активности, производится при помощи критерия Стьюдента (см. раздел I.4).

Пример II.2. Опыт, описанный в примере II.1, был повторен на

другой группе из 7 мышей, но за 15 мин до введения гексенала вводили (также внутрибрюшинно) акрихин в дозе 150 мг/кг. Длительность наркоза y_i оказалась (в минутах): 75; 78; 114; 110; 93; 100; 87. Требуется выяснить, влияет ли предварительное введение акрихина на действие гексенала.

Расчет по уравнениям I.1.2 - I.1.6 дает: $\bar{y}_1 = 93{,}9$ мин;

$$s_1^2 = 226{,}48;\ s1 = 15{,}05;\ f1 = 6.$$

Далее с использованием уравнений I.1.8; I.1.4, I.4.1 и I.4.2 получают fобщ = 12, t = 4,24.

По табл. II приложения находим t (95%; 12) = 2,18. Сравнивая с этим табличным значением полученное выше фактическое значение t = 4,24, можно заключить, что вероятность того, что акрихин влияет на действие гексенала, превышает 95%. Используя более полную таблицу критических значений t, имеющуюся во всех руководствах по биометрии и математической статистике, можно убедиться, что данная вероятность превышает даже 99%, так как t (99%; 12) = 3,05, но эта вероятность несколько меньше 99,9%, ибо t (99,9%, 12) = 4,32.

При сравнении целенаправленных биологических активностей вероятность различия 95% может считаться приемлемой. Но если, например, решается вопрос об отсутствии вредных побочных действий, то требования к вероятности значительно возрастают. При подозрении особо опасного побочного действия "степень риска" (100 - P) = "альфа" (эту величину называют уровнем значимости) следует снижать до значений 10^{-4} или даже меньших; соответствующие критические значения t(P, f) можно найти в специальных математико - статистических таблицах. Если выбран определенный уровень значимости "альфа", то при t > t(P) различие считается значимым. В этом случае по уравнению I.4.6 вычисляют доверительный интервал разности сравниваемых показателей.

Чувствительность указанного метода сравнения двух препаратов значительно возрастает, если можно организовать испытание их на ряде достаточно однородных (сопряженных) пар тест - объектов. Сопряженную пару могут составить, например, животные из одного помета, одинакового пола и близкой массы тела или, если это допускается методикой испытания, два повторных определения на одном животном с достаточным разрывом во времени, обеспечивающим восстановление исходного состояния после первого опыта.

В первом случае каждая из групп должна состоять наполовину из "более тяжелых" членов пар и наполовину из "более легких". Во втором случае в один день половина группы подвергается одному воздействию и другая половина - другому, а в другой день подгруппы меняются местами; это делается, чтобы исключить возможный дополнительный источник различий.

При использовании n сопряженных пар составляется ряд разностей

"ДЕЛЬТА" = y2 - y1 и вычисляется величина $t = \dfrac{\overline{\text{"ДЕЛЬТА"}}}{s_{\overline{\text{"ДЕЛЬТА"}}}}$, где

$$\overline{\text{"ДЕЛЬТА"}} = \text{SUM "ДЕЛЬТА"} / n,$$

$$s_{\text{"ДЕЛЬТА"}}^2 = \sqrt{\frac{\text{SUM}\left(\text{"ДЕЛЬТА"} - \overline{\text{"ДЕЛЬТА"}}\right)^2}{n(n-1)}}.$$

Полученная величина t (без учета знака) сравнивается с табличным значением t (P,f) для принятого уровня значимости "альфа" и числа степеней свободы f = n - 1.

Пример II.3. Пусть тест - объекты N 1, 2, ... 7 из примера II.1 были сопряжены с тест - объектами N 3, 1, 5, 2, 6, 4, 7 из примера II.2 (в каждой паре были мыши из одного помета примерно с одинаковой массой тела). Тогда получается: "ДЕЛЬТА" = 254/7 = 36,3, S = 3,65, t=9,94, в то время как t (95%,7) = 2,36 и "дельта" t(99%, 7) = 3,50; t (99,9%, 7) = 5,4 (последнее значение взято из более полной таблицы значений t (P,f). Значит, при учете сопряженности пар (т.е. при исключении вариаций между пометами) различие констатируется с большей вероятностью (P > 99,9%), чем без учета этой сопряженности.

II.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДОЗОВОЙ ЗАВИСИМОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Биологическая активность препарата зависит от примененной дозы, и выяснение характера этой зависимости - одна из важных задач испытания препарата.

Многочисленные наблюдения показывают, что в интервале обычно применяемых доз фармакологический эффект (когда он выражается количественно) в первом приближении связан линейно с логарифмом дозы lg D.

$$y = y0 + b\lg D, \qquad \text{(II.2.1)}$$

где y0 и b - некоторые константы. Задачей испытания является проверка линейности связи между y и lg D, а затем негоризонтальности линии связи, т. е. наличия зависимости эффекта от дозы. Лишь после этого можно перейти к оценке констант y0 и b.

Для проверки линейности связи требуется измерить активности y1, y2, y3 по крайней мере для трех разных доз D1, D2, D3. Расчет существенно упрощается, если численности групп тест - объектов n, на которых исследуется действие доз D1, D2, D3, одинаковы, а сами дозы выбраны так, что lg D3 - lg D2 = lg D2 - lg D1, т. е. D3/D2 = D2/D1. Иными словами D 2 должно быть средним геометрическим из D1 и D3, так что lg D2 находится посередине интервала lg D1 - lg D3. В этом случае критерием линейности может служить отношение:

$$t = \frac{\bar{y}1 + \bar{y}3 - 2\bar{y}2}{\sqrt{2\,\mathrm{SUM}_n d^2 / n(n-1)}}, \qquad \text{(II.2.2)}$$

где $\mathrm{SUM}_n d^2 = \mathrm{SUM}_n (y1 - \bar{y}1)^2 + \mathrm{SUM}_n (y2 - \bar{y}2)^2 + \mathrm{SUM}_n (y3 - \bar{y}3)^2$.

Когда численности групп неодинаковы, для n = n1 + n2+ n3 производится замена:

$$\frac{\mathrm{SUM}_n d^2}{n(n-1)} \to \frac{\mathrm{SUM}_n d^2}{n1 + n2 + n3 - 3}\left(\frac{1}{n1} + \frac{1}{n2} + \frac{1}{n3}\right). \qquad \text{(II.2.3)}$$

Если значение t, вычисленное по II.2.2, окажется больше критического значения t (P, f) для числа степеней свободы <*> f = 3 x (n - 1), то гипотезу о линейности связи между y и lg D можно отвергнуть с вероятностью, большей P.

<*> f = n1 + n2 + n3 - 3 при неравных численностях групп.

Если гипотеза о линейности связи не опровергается, то переходят к проверке значимости наклона прямой, выражающей зависимость эффекта от дозы. Для этого вычисляют величину:

$$t = \sqrt{\frac{3n(n-1)}{2\,\mathrm{SUM}_n\, d^2}}\,(\bar{y}3 - \bar{y}1). \qquad \text{(II.2.4)}$$

Если эта величина окажется меньше, чем t(95%, f) при f = 3(n - 1), то можно считать, что эффект не зависит от дозы; если же t > t(95%, f), то эффект зависит от дозы <*>.

<*> Может показаться, что если эффект не зависит от дозы, то теряет смысл проверка линейности связи между y и lg D, и анализ надо начинать с применения критерия II.2.4, а не II.2.2. Но это не так. Если зависимость нелинейна, то критерий II.2.4 относится к среднему наклону, который может оказаться равным нулю, хотя активность при разных дозах различна.

Когда линейный характер зависимости y от lg D известен для препарата данного состава из предыдущих исследований и требуется лишь проверить значимость наклона прямой, выражающей эту зависимость, то можно обойтись испытаниями только для двух доз D1 и D2. В этом случае вместо II.2.4 для вычисления t применяют формулу:

$$t = \sqrt{\frac{n(n-1)}{\mathrm{SUM}_n\, d^2}}\,(\bar{y}2 - \bar{y}1). \qquad \text{(II.2.5)}$$

$$\left[f = 2(n-1),\ \text{причем}\ \mathrm{SUM}_n\, d^2 = \mathrm{SUM}_n\,(y1 - \bar{y}1)^2 + \mathrm{SUM}_n\,(y2 - \bar{y}2)^2\right].$$

При различных численностях групп в II.2.5 производят замену, аналогичную II.2.3.

Если по критерию II.2.4 или II.2.5 установлено, что эффект зависит от дозы, то оценку констант Ь и y0 проводят по формулам:

$$b = \frac{\bar{y}3 - \bar{y}1}{\lg D3 - \lg D1}; \qquad \text{(II.2.6)}$$

$$y0 = (\bar{y}1 + \bar{y}2 + \bar{y}3) / 3 - b(\lg D1 + \lg D3) / 2 \qquad \text{(II.2.7)}$$

при использовании трех доз и

$$b = \frac{\bar{y}2 - \bar{y}1}{\lg D2 - \lg D1}; \qquad \text{(II.2.8)}$$

$$y0 = \left[(\bar{y}1 + \bar{y}2) - b(\lg D1 + \lg D2)\right] / 2 \qquad \text{(II.2.9)}$$

при использовании двух доз. Доверительные интервалы для этих параметров строятся с использованием их стандартных ошибок, равных при трех дозах:

$$\sqrt{2\,\mathrm{SUM}_n\, d^2 / n(n-1)} \qquad \sqrt{\mathrm{SUM}_n\, d^2}$$

$$s_b = \sqrt{\frac{n}{\lg D3 - \lg D1}}; \qquad s_{y0} = \sqrt{\frac{n}{2n(n-1)}}, \qquad \text{(II.2.10)}$$

а при двух дозах

$$s_b = \sqrt{\frac{2\,\mathrm{SUM}_n\, d^2 / n(n-1)}{\lg D2 - \lg D1}}; \qquad s_{y0} = \sqrt{\frac{\mathrm{SUM}_n\, d^2}{2n(n-1)}}, \qquad \text{(II.2.11)}$$

Оценки параметров Ь и y0 получаются более точными, если испытания проведены при большем числе доз. В этом случае вычисления должны производиться по общим формулам регрессионного анализа. В частности (см. раздел I.6),

$$b = \frac{\mathrm{SUM}_n (xy) - \mathrm{SUM}_n x\, \mathrm{SUM}_n y/n}{\mathrm{SUM}_n x^2 - (\mathrm{SUM}_n x)^2 / n}, \qquad \text{(II.2.12)}$$

$$y0 = (\mathrm{SUM}_n y - b\,\mathrm{SUM}_n x) / n, \qquad \text{(II.2.13)}$$

где $x = \lg D$, а n - общее число экспериментальных точек для всех доз. Достаточно хорошее приближение получается, если в эти формулы вместо индивидуальных значений y подставить значения $\bar{y}$ для каждой из доз; в этом случае n будет означать число доз, а значения x и x^2 будут входить в соответствующие суммы по одному разу.

II.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКВИВАЛЕНТНЫХ ДОЗ

Одной из основных задач биологического испытания является установление эквивалентной дозы, т.е. той дозы D^0 стандартного препарата, которой соответствует по своей биологической активности доза D испытуемого препарата.

Биологическая активность последнего может очень сильно зависеть от особенностей выбранной группы тест - объектов, их физиологического состояния, времени года, деталей лабораторной методики и многих других факторов. Поэтому определение эквивалентных доз требует одновременного применения испытуемого и стандартного препаратов к двум подгруппам однородной группы тест - объектов.

Определение эквивалентных доз требует также знания того, как биологическая активность зависит от дозы. Описанные ниже методы относятся к тому наиболее частому случаю, когда биологическая активность y связана линейно с логарифмом дозы D по уравнению II.2.1; проверка такой линейности производится при помощи критерия II.2.2.

Испытуемый препарат может отличаться от стандартного как по наклону прямой (т.е. по значению коэффициента Ь), так и по ее положению (т.е. по значению постоянной y0).

Если имеются основания предполагать, что наклоны обеих прямых одинаковы (Ь = Ь0) и, следовательно, различие между препаратами обусловлено лишь различными значениями параметра y0, то для установления эквивалентных доз достаточно определить активность одного из препаратов при двух различных дозах, а другого - при одной дозе. Разумеется, активность для каждой дозы должна определяться из нескольких измерений, так что речь идет здесь о средних активностях. Во всех случаях предполагается, что для каждой дозы использовано одно и то же число n тест - объектов и что все распределения случайных вариаций нормальны с дисперсией, не зависящей от самих активностей.

Если нет достаточных оснований предполагать, что Ь = Ь0, то следует произвести для каждого препарата испытания по крайней мере при двух дозах: $D1^0$, $D2^0$ и D1, D2; удобнее выбрать эти дозы так, чтобы $D2^0 / D1^0 = D2 / D1$. Вообще же результаты испытания получаются тем точнее, чем больше доз использовано. Поэтому, помимо упомянутых выше испытаний, т. е. испытаний типов 1; 2 (или 2; 1) и 2; 2, в фармакопее предусматриваются также испытания других типов (см. табл. IV, приложения).

По результатам испытаний вычисляют прежде всего средние эффекты при каждой из доз - отдельно для стандартного и испытуемого препаратов. Затем находят значения.

$$"ФИ" = SUM\ "e_{ФИ}"\bar{y} / "z_{ФИ}", \qquad (II.3.1)$$

где "ФИ" - общее обозначение для функций E, F, G, H (см. табл. IV, приложения), а через $\bar{y}$ обозначена вся совокупность средних значений $\bar{y}^0_1$, $\bar{y}^0_2$, $\bar{y}^0_3$, $\bar{y}^0_4$, $\bar{y}_1$, $\bar{y}_2$, $\bar{y}_3$, y_4; множители $"e_{ФИ}"$, и знаменатели $"z_{ФИ}"$ берутся из табл. IV приложения. Полученные величины характеризуют: E - различие между эффектами вследствие различия доз; F - различие между эффектами вследствие различия между препаратами; G - параллельность дозовых зависимостей испытуемого и стандартного препарата; H - линейность этих дозовых зависимостей. Для испытаний типов 2; 1,3; 1, 3; 2 и 4; 3 надо переставить местами коэффициенты $"e_{ФИ}"$ для y^0 и $\bar{y}$, причем для F и G с изменением всех знаков на обратные, а для E и H - без изменения знаков; значения $"z_{ФИ}"$ и дисперсий остаются без изменения. Значения H должны вычисляться отдельно для набора $\bar{y}^0$ и отдельно для набора $\bar{y}$, т.е. линейность дозовой зависимости проверяется отдельно для стандартного и отдельно для испытуемого препаратов.

По результатам испытания вычисляется также величина:

$$V = \frac{SUM_i \left[SUM_{j=1}^{n} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \right]}{(r^0 + r)n(n - 1)}, \qquad (II.3.2)$$

где y_{ij} - индивидуальные эффекты при i-й дозе, $\bar{y}_i$, - средний эффект при этой дозе; r^0, r - соответственно число доз для стандартного и испытуемого препаратов; n - число испытаний при каждой дозе (оно должно быть одинаковым при всех дозах; нарушения этого исправляются так, как было описано в параграфе II.1). После этого по формулам в последнем столбце табл. IV приложения вычисляют величины A, B, V_G и V_H, необходимые для построения доверительных интервалов и проверки значимостей [при этом используется табличное значение t_P для числа степеней свободы $f = (r^0 + r)(n - 1)$; I - разность логарифмов соседних доз].

Прежде всего проверяют (где это допускается числом

использованных доз) линейность дозовых зависимостей и их параллельность, вычисляя

$$t = \frac{H}{\sqrt{V_H}}; \qquad (II.3.3)$$

$$t = \frac{G}{\sqrt{V_G}}. \qquad (II.3.4)$$

Полученные значения должны быть меньше t(95%, P).

Если нарушения линейности и параллельности дозовых зависимостей не обнаружено, то вычисляют:

$$b = E / I \qquad (II.3.5)$$

- наклон прямой дозовой зависимости (средний для обоих препаратов);

$$M = F / b \qquad (II.3.6)$$

- логарифм отношения эквивалентных доз, т. е. величину $M = \lg (D^0 / D)$;

$$D^0 / D = \text{antilg}\ (2 + M) \qquad (II.3.7)$$

- отношение эквивалентных доз (в процентах);

$$M_{H;B} = \frac{M}{1 - g} +/- \frac{t_P}{b(1 - g)} \sqrt{A(1 - g) + BM^2} \qquad (II.3.8)$$

- P-процентные доверительные границы для M, причем

$$g = Bt_P^2 / b^2; \qquad (II.3.9)$$

наконец, получают

$$(D^0 / D)_{H;B} \qquad (II.3.10)$$

- P-процентные доверительные границы для отношения эквивалентных доз (в процентах).

Середины доверительных интервалов II.3.8 не совпадают со значениями M из II.3.6, особенно при больших значениях g. Величина g должна быть всегда меньше единицы, в противном случае весь опыт следует считать некорректным и нуждающимся в повторении.

Если можно предположить, что активности испытуемого и стандартного препаратов отличаются незначительно, следует выбирать дозы так, чтобы было соответственно $\lg D = \frac{1}{2} (\lg D^0_1 + \lg D^0_2)$, $\lg D^0 = \frac{1}{2} (\lg D^1_1 + \lg D^1_2)$ в испытаниях типа 2; 1 и 1; 2 либо

$D1^0 = D1^0$; $D2^0 = D2^0$ в испытании типа 2; 2 и т. д. При существенном отличии этих активностей такой выбор доз неоптимален и от него следует отказаться. В этом случае из значения M, полученного по формуле II.3.6, следует вычесть величины $\lg D - \frac{1}{2}(\lg D1^0 + \lg D2^0)$, $\lg D - \frac{1}{2}(\lg D1^0 + \lg D2^0)$, $\lg D1 - \lg D1^0$ или др. в зависимости от типа испытания. В формулы II.3.7 и II.3.8 должно войти уже скорректированное значение M.

Пример II.4. В табл. II.3.1 приведены результаты испытания по стандартизации образца АКТГ; эффект характеризуется концентрацией (в мг%) аскорбиновой кислоты в надпочечнике. В данном случае мы имеем испытание типа 2; 3. По формуле II.3.1 получаем, используя значения $e_{ФИ}$ и $z_{ФИ}$ из табл. IV приложения, а значения $\bar{y}$ - из табл. II.3.1:

$$E = [(-1)\bar{y}1^0 + 1y2^0 + (-2)\bar{y}1 + 0\bar{y}2 + 2\bar{y}3] / 5 =$$

$$= (-351 + 269 - 2 \times 336 + 2 \times 189) / 5 = -75{,}2;$$

$$F = (- 3 \times 351 - 3 \times 269 + 2 \times 336 +$$

$$+ 2 \times 256 + 2 \times 189) / 6 = - 49{,}67;$$

$$G = (2 \times 351 - 2 \times 269 - 336 + 189) / 2 = 8{,}5:$$

$$H = 336 - 2 \times 256 + 189 = 13{,}0.$$

Далее по данным из табл. II.3.1 находим:

$$V = \frac{2552 + 1660 + 1958 + 2802 + 1582}{(2 + 3) \times 6 \times (6 - 1)} = 70{,}36,$$

так что формулы последнего столбца табл. IV, приложения, дают значения:

$$A = 5 \times 70{,}36/6 = 58{,}63;\ B = 77{,}66;\ V_G = 175{,}90;\ V_H = 422{,}16.$$

При вычислении B учтено, что $I = \lg 0{,}4 - \lg 0{,}1 = 0{,}602$.

Проверка на линейность дозовой зависимости и на параллельность прямых дает:

$$H \sqrt{V_H} = 13{,}0 \sqrt{422{,}16} = 0{,}633;$$

$$G \sqrt{V_G} = 8{,}5 \sqrt{175{,}90} = 0{,}641.$$

Таблица II.3.1

Уровни факторов (дозы)

	0	0			

Эффекты	y^0_1, D1 = 0,1 ЕД	y^0_2, D2 = 0,4 ЕД	y_1, D1 = 0,1 ЕД	y_2, D2 = 0,4 ЕД	y_3, D3 = 1,6 ЕД
	370	225	310	276	187
	342	268	356	228	215
	335	284	345	252	200
y_{ji}	369	247	313	273	168
	318	296	340	279	193
	372	264	352	228	171
$\bar{y}_i$	351	269	336	256	189
$\sum_{j=1}^{n} (y_{ij} - \bar{y})^2$	2552	1660	1958	2802	1582

Обе эти величины меньше, чем t(95%; f) = 2,060 [для $f = (r + r^0) \times (n - 1) = 25$ степеней свободы], так что можно продолжать расчет.

По формулам II.3.5 и II.3.6 получаем:

$$Ь = - 75,2 / 0,602 = -124,9;$$

$$M' = - 49,67 / (-124,9) = 0,3977.$$

Поскольку в данном испытании средние дозы стандартного и испытуемого препаратов не совпадают, то надо из M' вычесть величину

$$\frac{\lg 0,1 + \lg 0,4 + \lg 1,6}{3} - \frac{\lg 0,1 + \lg 0,4}{2} =$$

$$= - 0,3980 + 0,6990 = 0,3010,$$

так что

$$M = 0,3977 - 0,3010 = 0,0967; \; D^0/D = 124,9\%.$$

Далее вычисляем по формулам II.3.9 и II.3.8:

$$g = \frac{77,66 \times 1,960^2}{(- 124,9)^2} = 0,0191; \; 1 - g = 0,9809;$$

$$M_{H,B} = \frac{0,0967}{0,9809} +/- \frac{1,96}{(- 124,9) \times 0,9809} \times$$

$$\times \sqrt{58,63 \times 0,9809 + 77,66 \times 0,0961} = [- 0,0235; 0,2207].$$

Окончательно получаем:

$$(D^0/D)_{H,B} = [94,7\%; 166,2\%].$$

Доверительные интервалы во всех этих испытаниях могут быть сужены, если использовать в опыте сопряженные группы животных. Например, в испытании типа 2;2 целесообразно использовать n четверок животных, каждая из которых содержит животных из одного помета, одинакового пола и близкой массы тела; каждая четверка животных используется для определения четверки значений: y^0_1; y^0_2, y_1 и y_2. При такой постановке опыта

$$V = \frac{\sum d^2 - \sum \text{"ДЕЛЬТА"}}{}, \qquad \text{(II.3.11)}$$

$$3n(n - 1)$$

где d^2 - числитель формулы II.3.2, а

$$SUM\ "ДЕЛЬТА" = SUM\ [(y1^0 + y2^0 + y1^0 + y2^0) - (\bar{y}1^0 + \bar{y}2^0 + \bar{y}1 + \bar{y}2)]^2 . \qquad (II.3.12)$$

Число степеней свободы равно f = 3(n - 1).

Доверительный интервал может быть также сужен, если методика испытания допускает выполнение повторных определений на каждом животном - с достаточным разрывом во времени, обеспечивающем восстановление исходного состояния после первого опыта. В повторном опыте те животные, на которых определялась активность y^0, используются для определения y и наоборот. Кроме того, животные, получившие в первом опыте меньшую дозу, получают во втором опыте большую дозу и наоборот (метод двойного перекреста, см. табл. II.3.2).

Таблица II.3.2

Группа животных	Первый опыт	Второй опыт	Разность результатов
1	$y1^0$	y2	$ДЕЛЬТА1 = y2^0 - y1$
2	$y2^0$	y1	$ДЕЛЬТА2 = y1^0 - y2$
3	y1	$y2^0$	$ДЕЛЬТА3 = y2^0 - y1$
4	y2	$y1^0$	$ДЕЛЬТА4 = y1^0 - y2$

При таком построении испытания надо пользоваться формулами:

$$E = (\overline{ДЕЛЬТА1} - \overline{ДЕЛЬТА2} + \overline{ДЕЛЬТА3} - \overline{ДЕЛЬТА4}) / 4; \qquad (II.3.13)$$

$$F = (\overline{ДЕЛЬТА1} + \overline{ДЕЛЬТА2} - \overline{ДЕЛЬТА3} - \overline{ДЕЛЬТА4}) / 4; \qquad (II.3.14)$$

$$V = \frac{SUM_n\ (ДЕЛЬТА1 - \overline{ДЕЛЬТА1})^2 + SUM_n\ (ДЕЛЬТА2 - \overline{ДЕЛЬТА2})^2}{8n(n - 1)} + \frac{SUM_n\ (ДЕЛЬТА3 - \overline{ДЕЛЬТА3})^2 + SUM_n\ (ДЕЛЬТА4 - \overline{ДЕЛЬТА4})^2}{8n(n - 1)}; \qquad (II.3.15)$$

$$A = V/2,\ B = V/(2I^2). \qquad (II.3.16)$$

Дальнейшие расчеты производят по формулам II.3.5 - II.3.10, причем t(P, f) берется из табл. II приложения для числа степеней свободы f = 4 (n - 1).

Пример II.5. В табл. II.3.3. приведены результаты испытания (стандартизация образца АКТГ), построенного по методу двойного перекреста (в примере II.4 эти же данные были использованы в умышленно рандомизированном виде, чтобы не сказывался эффект сопряженности тест - объектов). По формулам II.3.13 - II.3.16 (получаем):

$$E = (-90 - 66 - 68 - 101)/4 = -81{,}25;$$

$$F = (-90 + 66 + 68 - 101)/4 = -14{,}25;$$

$$V = (1178 + 104 + 258 + 546)/(8 \times 3 \times 2) = 43{,}46;$$

$$A = 43{,}46/2 = 21{,}73;\ B = 43{,}46/(2 \times 0{,}602^2) = 59{,}96$$

$$(I = \lg 0{,}4 - \lg 0{,}1 = 0{,}602);$$

кроме того, $f = 4 \times 2 = 8$, $t\ (95\%,\ 8) = 2{,}306$.

Теперь по формулам II.3.5-II.3.10 находим:

$$Ь = -81{,}25/0{,}602 = -135{,}0;$$

$$M = -14{,}25 / (-135{,}0) = 0{,}1056;\ D^0/D = 127{,}6\%;$$

$$g = 59{,}96 \times 2{,}306^2 / (-135{,}0)^2 = 0{,}0175;\ 1 - g = 0{,}9825;$$

$$M_{H,B} = \frac{0{,}1056}{0{,}9825} +/-$$

$$+/- \frac{2{,}306}{-135{,}0 \times 0{,}9825} \sqrt{21{,}73 \times 0{,}9825 + 59{,}96 \times 0{,}1056^2} =$$

$$= 0{,}1075 +/- 0{,}0816 = [0{,}0259;\ 0{,}01891];$$

$$(D^0/D)_{H,B} = [106{,}1\%;\ 154{,}6\%].$$

Доверительный интервал для D^0/D получился более узким, чем без учета сопряженности тест - объектов (см. пример II.4), хотя использовано меньше результатов испытаний.

Когда имеются результаты нескольких независимых определений эквивалентных доз, их можно объединить с целью получения более точной оценки для D^0/D и более узкого доверительного интервала для этой величины. При этом пользуются приближенными формулами (точные формулы весьма громоздки):

$$\bar{M}_{H,B} = \frac{\bar{M}}{1 - g} +/- t(P,\ f) S_M, \qquad (II.3.17)$$

$$\frac{\bar{M}}{1 - g} = SUM\ (Wj \frac{Mj}{1 - g_j}) / SUM\ Wj; \qquad (II.3.18)$$

$$S_M = 1 / \sqrt{SUM\ Wj}, \qquad (II.3.19)$$

где весовыми коэффициентами Wj, служат обратные дисперсии $1 / s_{Mj}^2$:

$$W_j = \frac{1}{s^2_{M_j}} = \frac{b^2_j (1 - g^2_j)}{A_j(1 - g^2_j) + B_j M^2_j}; \qquad (II.3.20)$$

$j = 1, 2, ..., k$ есть номер испытания, а $t(P, f)$ берется для числа степеней свободы, равного сумме чисел степеней свободы отдельных испытаний: $f_0 = SUM\ f_j$. Доверительный интервал для усредненного отношения D_0/D находят по формуле:

$$(\overline{D_0}/D)_{H,B} = antilg(2 + M_{H,B}). \qquad (II.3.21)$$

Законность указанного объединения (т. е. случайности различия между отдельными M) проверяют при помощи критерия "хи - квадрат":

$$"хи"^2 = SUM\ (W_j \frac{M_j^2}{(1 - g^2_j)^2}) - \left[SUM\ (W_j \frac{M_j}{1 - g_j})\right]^2 / SUM\ W_j \qquad (II.3.22)$$

должно быть $"хи"^2 < "хи"^2\ (95\%,\ f)$, где $"хи"^2\ (95\%,\ f)$ берут из табл. II

Таблица II.3.3

Группа	1-й день опыта	2-й день опыта	"ДЕЛЬТА"	d = "ДЕЛЬТА" - - "$\overline{\text{ДЕЛЬТА}}$"	d^2
1	370	273	- 97	- 7	49
	y_1^0 342	y_2^0 279	- 63	27	729
	D_1^0 = 0,1 ЕД 335	D_2^0 = 0,4 ЕД 225	- 110	- 20	400
		Сумма	- 270	0	1178
		Среднее	- 90		
2	255	313	58	- 8	64
	y_2^0 268	y_1^0 340	72	6	36
	D_2^0 = 0,4 ЕД 284	D_1^0 = 0,1 ЕД 352	68	2	4
		Сумма	198	0	104
		Среднее	66		
3	310	247	- 63	5	25
	y_1^0 356	y_2^0 296	- 60	8	64
	D_1^0 = 0,1 ЕД 345	D_2^0 = 0,4 ЕД 264	- 81	- 13	169
		Сумма	204	0	258
		Среднее	- 68		
4	276	369	93	- 8	64
	y_2^0 228	y_1^0 318	90	- 11	121
	D_2^0 = 0,4 ЕД 252	D_1^0 = 0,1 ЕД 372	120	19	361

		Сумма Среднее	303 101	0	546

приложения для числа степеней свободы f = k - 1 (k - число объединяемых испытаний). В частности, когда объединяются результаты двух испытаний, то

$$"хи"^2 = \frac{W1W2\left[\frac{M1}{1 - g1} - \frac{M2}{1 - g2}\right]}{W1 + W2} \qquad (II.3.23)$$

при f = 1, так, что $"хи"^2$ (95%, 1) = 3,84.

II.4. ПРИМЕНЕНИЕ СХЕМЫ ЛАТИНСКОГО КВАДРАТА

При биологическом испытании антибиотиков методом диффузии в агар на лотках наиболее употребительна схема латинского квадрата, позволяющая рандомизировать неоднородность бактериальной культуры по обоим направлениям поверхности питательной среды. Например, в случае испытания 2; 2 дозы могут располагаться следующим образом:

$$\begin{array}{cccc}
D1^0 & D2^0 & D1 & D2 \\
D2 & D1^0 & D2^0 & D1 \\
D1 & D2 & D1^0 & D2^0 \\
D2^0 & D1 & D2 & D1^0
\end{array} \qquad (II.4.1)$$

Здесь каждая доза встречается по одному разу в каждой строке и в каждом столбце. В данном случае последовательные строки получены циклической перестановкой из предыдущих строк, но это не единственный способ построения латинского квадрата. Например, можно переставлять столбцы или строки (или и то, и другое) из приведенной выше схемы по жребию. В руководствах по планированию эксперимента можно найти и другие схемы.

Если для стандартного и испытуемого препаратов используются по три дозы, то соответствующий латинский квадрат будет иметь шесть строк и шесть столбцов и т.д. При двух дозах стандартного и двух дозах испытуемого препарата можно построить латинский квадрат 8x8, располагая дозы так, чтобы каждая встречалась по два раза в каждой строке и в каждом столбце.

Введем следующие обозначения: k - число строк в квадрате; r^0 и r - соответственно число использованных доз стандартного и испытуемого препаратов (например, при размещении четырех доз $D1^0$, $D2^0$, D1, D2 в квадрате 8x8 будет k = 8, r^0 = 2, r = 2, а для квадрата II.4.1: k = 4, r^0 = 2, r = 2); y_{ij} - эффективность в ячейке квадрата на пересечении i-й строки и j-го столбца (независимо от того, относится эта эффективность к стандартному или испытуемому препарату); $\bar{y}_i$ = SUM y_{ij} /k и $\bar{y}_j$ = SUM y_{ij} / k - средние эффективности соответственно для строки i и для столбца j;

$$y = \underset{i,j}{SUM}\, y_{i,j} / k = \underset{i}{SUM}\, y_i / k = \underset{j}{SUM}\, y_j / k$$

- общая средняя эффективность для всего комплекса. Тогда

$$V = \frac{\underset{j,i}{SUM}\, d^2 - k\left[\underset{i}{SUM}\, d_i^2 + \underset{j}{SUM}\, d_j^2\right]}{n(k^2 - 2k - r_0 - r + 2)}, \qquad (II.4.2)$$

где $\underset{i}{SUM}\, d_i^2 = \underset{i}{SUM}\left[\underset{j}{SUM}\,(y_{i,j} - \bar{y}_i)^2\right] = \underset{j}{SUM}\left[\underset{i}{SUM}\,(y_{i,j} - \bar{y}_j)^2\right]$,

$$\underset{i}{SUM}\, d_i^2 = \underset{i}{SUM}\,(\bar{y}_i - \bar{y})^2, \quad \underset{j}{SUM}\, d_j^2 = \underset{j}{SUM}\,(\bar{y}_j - \bar{y})^2,$$

а n - число испытаний при каждой дозе стандартного или испытуемого препарата. Остальные расчеты производятся по формулам предыдущего параграфа, причем t(P, f) берутся из табл. II приложения для числа степеней свободы f = (k -1)(k - 2).

Пример II.6. В табл. II.3.3 приведены результаты совместного испытания стандартного и испытуемого препаратов неомицина при дозах 100 и 200 мкг в 1 мл; активность характеризуется диаметром зоны угнетения в миллиметрах. Использован латинский квадрат вида (II.4.1). В этой же таблице показаны расчеты, приводящие к величинам $\underset{i}{SUM}\, d_i^2$ и $\underset{j}{SUM}\, d_j^2$, а в табл. II.4.2 показано вычисление средних дозовых эффективностей и величины $\underset{i,j}{SUM}\, d^2$.

Таким образом, $\underset{i,j}{SUM}\, d^2 = 14{,}00 + 28{,}75 + 5{,}00 + 8{,}75 = 56{,}50$,

а так как в данном случае n = 4, k = 4, $r_0 = 2$, r = 2, то по формуле II.4.2 получаем:

$$V = \frac{56{,}50 - 4 \times (5{,}125 + 2{,}125)}{4 \times (16 - 8 - 2 - 2 + 2)} = 1{,}146.$$

Данное испытание относится к типу 2;2, так что использование соответствующего раздела табл. IV приложения вместе с формулами II.3.4 - II.3.10 дает:

$$G = 219{,}0 - 230{,}75 - 221{,}50 + 232{,}75 = -0{,}50;$$

$$V_G = 4 \times 1{,}146 = 4{,}584; \quad |G| / \sqrt{V_G} = 0{,}233 < 2{,}447$$

(t(95%, f) для f = (4 - 1)(4 - 2) = 6), поэтому одинаковость наклонов двух дозовых прямых не отвергается; далее:

$$E = (-219{,}0 + 230{,}75 - 221{,}50 + 232{,}75) / 2 = 11{,}50;$$

$$F = (-219{,}0 - 230{,}75 + 221{,}50 + 232{,}75) / 2 = 2{,}25;$$

$$A = V = 1{,}146;\ I = \lg 200 - \lg 100 = 0{,}301;\ B = V/I = 12{,}65;$$

$$b = 11{,}50/0{,}301 = 38{,}2;\ M = 2{,}25/38{,}2 = 0{,}0589;\ D^0/D = 114{,}5\%;$$

$$g = 12{,}65 \times 2{,}447^2/38{,}2^2 = 0{,}052;\ 1 - g = 0{,}948;$$

$$M_{H,B} = \frac{0{,}0589}{0{,}948} \ +/-$$

$$+/- \frac{2{,}447}{38{,}2 \times 0{,}948} \sqrt{1{,}146 \times 0{,}948 + 12{,}65 \times 0{,}0589^2} =$$

$$= 0{,}062 +/- 0{,}0718 = [-0{,}0097;\ 0{,}1340];$$

$$(D^0/D)_{H,B} = 97{,}8\%;\ 136{,}1\%.$$

При проведении испытания по методу латинского квадрата потеря отдельных результатов нарушает всю схему расчетов, поэтому необходимо "заместить" их надлежащими оценками. Проще всего это можно сделать, подставив на место выпавшего результата среднее из оставшихся результатов для той же дозы того же препарата. Применяемый в дисперсионном анализе более сложный способ оценки выпавшего значения не дает в задаче определения эквивалентных доз существенного повышения точности общих результатов испытания.

Таблица II.4.1

Результаты испытания, $\bar{y}_{ij}$	$SUM\ y_{ij}$	y_i	d_i	d_i^2
$y_1^0 = 222$ $y_2^0 = 229$ y1 = 222 y2 = 235	908	227,00	1,00	1,0000
y2 = 231 $y_1^0 = 217$ $y_2^0 = 231$ y1 = 220	899	224,75	-1,25	1,5625
y1 = 221 y2 = 233 $y_1^0 = 218$ $y_2^0 = 228$	900	225,00	-1,00	1,0000
$y_2^0 = 235$ y1 = 223 y2 = 232 $y_1^0 = 219$	909	227,25	1,25	1,5625
$SUM\ y_{i,j}$ 909 902 903 902	3616	$SUM\ d_i^2 = 5{,}12$		
y_j 227,25 225,50 225,75 225,50	$\bar{y} = 226{,}00$			
d_j 1,25 - 0,50 - 0,25 - 0,50				
d_j^2 1,5625 0,2500 0,0625 0,2500	$SUM\ d_j^2 = 2{,}125$			

Таблица II.4.2

	y_1^0	d	d^2	y_2^0	d	d^2	y1	d	d^2	y_2	d	d^2
	222	3	9	229	- 1,75	3,0625	222	0,5	0,25	235	2,25	5,0625
	217	- 2	4	231	0,25	0,0625	220	- 1,5	2,25	231	- 1,75	3,0626
	218	- 1	1	228	- 2,75	7,5625	221	- 0,5	0,25	233	0,25	0,0625
	219	0	0	235	4,25	18,0625	233	1,5	2,25	232	- 0,75	0,5625
Сумма	876	0	14	923	0	28,75	886	0	5	931	0	8,75
Среднее	219,00			230,75			221,50			232,75		

II.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИБИОТИКОВ МЕТОДОМ ДИФФУЗИИ В АГАР НА ЧАШКАХ ПЕТРИ

Описанная в предыдущем параграфе методика определения активности антибиотиков по схеме латинского квадрата предполагает использование лотков. Возможен и другой способ определения этой активности - по диффузии в агар на чашках Петри. Ниже описан трехдозный вариант этого метода <*>.

<*> Этот раздел основан на разработке Всесоюзного НИИ антибиотиков и Государственного НИИ по стандартизации и контролю лекарственных средств Министерства здравоохранения СССР.

Стандартный (S) и испытуемый (U) образцы растворяют из расчета 1 мг в 1 мл (основной раствор), затем готовят по три концентрации рабочих растворов стандарта ($D1^S$, $D2^S$, $D3^S$) и испытуемого образца ($D1^U$, $D2^U$, $D3^U$), относящиеся друг к другу как 1:2:4. Все 6 растворов закапывают на одну чашку Петри, причем последовательность внесения растворов в цилиндры или в лунки должна быть случайной (возможные последовательности внесения растворов приведены в табл. II.5.1). Число чашек n должно быть не меньше 6.

Для уменьшения влияния колебаний во времени между внесением различных растворов рекомендуется после внесения растворов выдерживать чашки в течение 1-2 ч при комнатной температуре. После измерения зон угнетения роста результаты опыта $y^S_{i,j}$, и $y^U_{i,j}$ (i = 1, 2, 3 - номера доз, j = 1, 2, ..., n - номера чашек) записывают в таблицу (как показано в приведенном ниже численном примере). Там же записывают получаемые расчетом следующие вспомогательные величины:

$$Si = \sum_j y^S_{i,j} \quad \text{и} \quad Ui = \sum_j y^U_{i,j} \qquad (II.5.1)$$

- суммы по чашкам для каждой дозы стандарта и испытуемого образца;

$$Tj = \sum_i y^S_{i,j} + \sum_i y^U_{i,j}, \qquad (II.5.2)$$

- суммы по всем дозам для каждой чашки;

$$y = \sum_{i,j} y_{i,j} = (S1 + S2 + S3) + (U1 + U2 + U3) = \sum_j Tj \qquad (II.5.3)$$

- суммы всех диаметров зон задержки роста по всем дозам и чашкам. Далее вычисляют:

$$S = S1 + S2 + S3 \quad \text{и} \quad U = U1 + U2 + U3 \qquad (II.5.4)$$

- суммы всех диаметров зон задержки роста отдельно для стандарта и для испытуемого образца;

$$L_S = S3 - S1 \quad \text{и} \quad L_U = U3 - U1 \qquad (II.5.5)$$

- "линейные контрасты" для стандарта и для испытуемого образца;

$$Q_S = S1 - 2S2 + S3 \quad \text{и} \quad Q_U = U1 - 2U2 + U3 \qquad (II.5.6)$$

"квадратичные контрасты" для стандарта и для испытуемого образца.

Для проверки законности дальнейших расчетов следует провести дисперсионный анализ результатов опыта в соответствии с табл. II.5.2, а именно должно получиться F < F(95%; f, fост) для строк 2, 3, 4 и F > F (95%) для строки 1.

Выполнение первого условия одновременно означает, что вариации в этих строках 2, 3, 4 должны рассматриваться как случайные, и поэтому их следует включить в остаточную вариацию, произведя также перерасчет значимости линейной регрессии (кстати, это относится и к вариациям в строках 5 и 6, если они окажутся незначимыми). Разумеется, при указанном перерасчете степени свободы вариаций, включаемых в остаточную вариацию, должны прибавляться к числу степеней свободы последней (fост).

Таблица II.5.1

Расположение растворов стандарта и испытуемого образца при трехдозном варианте метода диффузии в агар

Номер чашек	Порядок внесения растворов в цилиндры						Номер чашек	Порядок внесения растворов в цилиндры					
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
1	S D1	S D2	U D2	S D3	U D1	U D2	17	S D1	U D2	U D3	S D1	S D3	U D2
2	S D1	S D2	U D1	S D3	U D3	U D2	18	S D1	U D2	S D3	S D2	U D3	U D1
3	S D1	S D2	U D3	U D2	S D3	U D1	19	S D1	U D2	S D3	S D2	U D1	U D3
4	S D1	S D2	U D1	U D3	S D3	U D2	20	S D1	U D2	U D3	S D3	U D1	S D2
5	S D1	S D2	U D1	U D2	S D3	U D3	21	S D1	U D2	U D1	S D3	U D3	S D2
6	S D1	S D2	U D3	U D1	S D2	U D3	22	S D1	U D2	U D3	S D2	U D1	S D3
7	S D1	S D3	U D1	S D2	U D3	U D2	23	S D1	U D2	U D1	S D2	U D3	S D3
8	S D1	S D3	U D3	S D2	U D1	U D2	24	S D1	U D2	S D3	U D3	U D1	S D2
9	S D1	S D3	U D2	U D3	S D2	U D1	25	S D1	U D2	S D3	U D1	U D3	S D2

10	S D1	U D3	U D2	U D1	S D2	U D3	26	S D1	U D3	U D1	S D2	S D3	U D2
11	S D1	U D1	U D2	S D3	S D2	U D3	27	S D1	U D3	S D2	S D3	U D2	U D1
12	S D1	U D1	U D3	S D2	S D3	U D3	28	S D1	U D3	S D3	S D2	U D1	U D2
13	S D1	U D1	S D2	S D3	U D2	U D3	29	S D1	U D3	U D1	S D3	U D2	S D2
14	S D1	U D1	S D3	U D2	U D3	S D2	30	S D1	U D3	S D3	U D2	U D1	S D2
15	S D1	U D1	S D2	U D3	U D2	S D3	31	S D2	U D3	S D2	U D1	U D2	S D3
16	S D1	U D2	U D3	S D2	S D3	U D1	32	S D1	U D3	U D1	S D2	S D3	U D2

Если дисперсионный анализ дал нужный результат (т.е. выполняются указанные выше условия), то вычисляется логарифм отношения активностей испытуемого образца и стандарта по формуле:

$$M = \lg \frac{A_U}{A_S} = \frac{4}{3} I \frac{U - S}{L_U + L_S}, \qquad (II.5.7)$$

где A_U и A_S - активности, соответствующие рабочим растворам, а I - логарифм знаменателя прогрессии разведения (в данном случае I = lg 2 = 0,301). Тогда отношение активностей равно:

$$R = \text{antilg } M \qquad (II.5.8)$$

Чтобы найти отношение активностей основных растворов a_U/a_S, надо умножить величину R на коэффициент, учитывающий соответствующие (например, максимальные) степени разведения основных растворов стандарта и образца ("гамма $_S$" и "гамма $_U$"). Тогда имеем:

$$a_U = a_S R \frac{\text{"гамма}_U\text{"}}{\text{"гамма}_S\text{"}}. \qquad (II.5.9)$$

Границы 95%-ного доверительного интервала для логарифма отношения активностей вычисляются по формуле:

$$M_{H,B} = CM \pm \sqrt{(C - 1)(CM^2 + \frac{8}{3} I^2)}, \qquad (II.5.10)$$

где

$$C = L^2 / (L^2 - t^2 S_{ост}), \qquad (II.5.11)$$

причем L и $S^2_{ост}$ берутся из табл. II.5.2, а t - есть значение критерия Стьюдента для P = 95% и fост числа степеней свободы величины $S^2_{ост}$. Границы доверительного интервала для отношения активностей (R_H и R_B) будут антилогарифмами величин M_H и M_B, а для доверительных границ активности образца надо вводить коэффициент "гамма $_U$" / "гамма $_S$" в соответствии с формулой II.5.9.

Пример. II.8. Активность стандарта - 950 ЕД/мг. Основной раствор стандарта готовят из расчета 1 мг/мл, так что a_S = 950 ЕД/мл. Учитывая, что контрольная концентрация для данного антибиотика равна 1 ЕД/мл, готовят рабочие растворы стандарта $D1_S$, $D2_S$ и $D3_S$ путем разведения основного раствора в 500, 1000 и 2000 раз. Полагая, что активность испытуемого образца близка к активности стандарта, и учитывая, что рабочие концентрации для образца $D1_U$, $D2_U$, $D3_U$, должны быть близки к рабочим концентрациям стандарта $D1_S$, $D2_S$, $D3_S$, основной раствор образца разводят также в 500, 1000 и 2000 раз. Количество чашек n = 6.

Результаты опыта записаны в табл. II.5.3. Там же записаны значения Si, Ui, Tj и y, вычисленные по формулам II.5.1 - II.5.3. По этим значениям, пользуясь формулами II.5.4 - II.5.6, получаем:

$$S = 3310; \quad L_S = 325; \quad Q_S = -5;$$

$$U = 3325: \quad L_U = 345; \quad Q_U = -5.$$

Дисперсионный анализ результатов опыта представлен в табл.II.5.4, из которой видно, что условия незначимости вариаций в строках 2, 3 и 4 и значимости вариации в строке 1 выполняются, что позволяет перейти к дальнейшим расчетам.

Прежде всего следует пересчитать остаточную вариацию с включением в нее незначимых вариаций. Поскольку в данном случае вариации незначимы не только в строках 2, 3 и 4, но и в строке 5, последнюю тоже следует включить в остаточную вариацию. Тогда получаем новое значение SUMост = 200,70 + 16,66 + 1,39 + 0 + 6,25 + 225,00 при числе степеней свободы fост = 25 + 4 = 29, так что $S^2_{ост}$ = 225,00/29 = 7,759. Новые результаты дисперсионного анализа представлены в табл. II.5.5.

Таблица II.5.2

Дисперсионный анализ результатов опыта

Номер строки	Источник вариаций	Число степеней свободы	Сумма квадратов SUM	Дисперсия $s^2 = \frac{SUM}{f}$	Отношение дисперсий $F = s^2 / S^2_{ост}$	Табличные значения F(95%,f,fост)
1	Линейная регрессия	1	$(L_S + L_U)^2 / 4n - L^2$	Дисперсии s^2 получаются делением сумм квадратов SUM на соответствующие им числа степеней свободы	Отношение дисперсий F получается делением дисперсий из предыдущего столбца на $S^2_{ост}$, т.е. на остаточную дисперсию	Значения F(95%,f,fост) берутся из таблицы, имеющейся в руководствах по математической статистике и биометрии, а также в сборниках математико - статистических таблиц
2	Непараллельность тарируемых прямых	1	$(L_S^2 + L_U^2) / 2n - L^2$			
3	Квадратичная регрессия	1	$(Q_S + Q_U)^2 / 12n = Q^2$			
4	Различие квадратичных регрессий	1	$(Q_S^2 + Q_U^2) / 6n - Q^2$			
5	Между приготовлениями	1	$(S_2^2 + U_2^2)^2 / 3n - y^2 / 6n$			
6	Между чашками	n - 1	$SUM_j T_2^2 / 6 - y^2 / 6n$			
7	Остаточная	fост = 5(n - 1)	Остаточная сумма квадратов SUMост получается вычитанием сумм квадратов всех предыдущих строк из полной суммы квадратов		-	
8	Полная	6 n - 1	$SUM_{i,j} y_{i,j}^2 - y^2 / 6n$	-	-	-

Таблица II.5.3

	Стандарт	Образец	

Номера чашек	S D1	S D2	S D3	U D1	U D2	U D3	Суммы по каждой чашке
1	155	185	210	155	185	210	T1 = 1100
2	155	180	210	155	185	220	T2 = 1105
3	165	190	215	160	190	215	T3 = 1135
4	155	185	210	155	185	210	T4 = 1100
5	150	180	210	155	180	205	T5 = 1080
6	160	185	210	155	185	220	T6 = 1115
	S1 = 940	S2 = 1105	S3= 1265	U1 = 935	U2 = 1110	U3 = 1280	y = 6635

Таблица II.5.4

Номер строки	Источник вариаций	f	SUM	s^2	F	F (95%; f, 25)
1	Линейная регрессия	1	18704,17	18704,17	2329,87	4,24
2	Непараллельность прямых	1	16,66	16,66	2,08	4,24
3	Квадратичная регрессия	1	1,39	1,39	0,17	4,24
4	Различие квадратических регрессий	1	0	0	0	4,24
5	Между приготовлениями	1	6,25	6,25	0,78	4,24
6	Между чашками	5	278,47	55,69	6,94	2,60
7	Остаточная	25	200,70	8,028	-	
8	Полная	35	19207,64	-	-	

Таблица II.5.5

Источник вариаций	f	SUM	S^2	F	F (0,95%; f, 29)

Линейная регрессия	1	18704,17	18704,17	2410,77	4,18
Между чашками	5	278,47	55,69	7,18	2,55
Остаточная	29	225,00	7,759	-	-
Полная	35	19207,64	-	-	-

Теперь по формулам II.5.7 - II.5.11 вычисляем:

$$M = \frac{4}{3}\ 0{,}301\ \frac{3325 - 3310}{345 + 325} = 0{,}008985, \quad R = 1{,}021;$$

$$a_U = 950 \times 1{,}021 \times \frac{2000}{2000} = 970 \text{ (ЕД/мл)};$$

$$C = 18704{,}17 / (18704{,}17 - 2{,}045^2 \times 7{,}759) = 1{,}0012$$

(t(95%,29) = 2,045),

$$M_{H,\ B} = 0{,}0090 +/- 0{,}0170\ [- 0{,}0080;\ 0{,}0260];$$

$$R_{H,\ B} = [0{,}9817;\ 1{,}062];$$

$$a_U^{нижн} = 950 \times 0{,}9817 \times \frac{2000}{2000} = 933 \text{ (ЕД/мл)};$$

$$a_U^{верх} = 950 \times 1{,}062 \times \frac{2000}{2000} = 1009 \text{ (ЕД/мл)}.$$

III. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ С АЛЬТЕРНАТИВНЫМИ РЕАКЦИЯМИ

III.1. ОЦЕНКА И СРАВНЕНИЕ ПОРОГОВЫХ ДОЗ ПРИ ИХ ПРЯМОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ

При испытаниях некоторых препаратов результат их действия учитывается не в количественной, а в альтернативной форме (наличие или отсутствие эффекта - гибели, судорог и т. д.; иногда это называют реакцией "все или ничего"). В ряде случаев может быть получена величина эффективной (пороговой) дозы ЕД для каждого отдельного препарата: фиксируют ту дозу, при которой получается ожидаемый эффект. Тогда оценкой эффективной дозы для данного препарата может служить среднее значение по достаточно большой группе животных. При расчетах найденные индивидуальные эффективные дозы ЕД заменяются их логарифмами x = lg ЕД, ибо распределение этих логарифмов обычно ближе к нормальному, чем распределение самих доз. После того как вычислены значения

$$\bar{x} = \mathrm{SUM}\ x/n; \qquad \text{(III.1.1)}$$

$$x_{H,B} = x +/- t(P, f)\ s_{\bar{x}} = x +/- t(P, f) \sqrt{\frac{\mathrm{SUM}\ (x - \bar{x})^2}{n\ (n - 1)}}, \qquad \text{(III.1.2)}$$

находят доверительные границы для эффективной дозы:

$$\text{ЕД}_{H,B} = \mathrm{antilg}\ (x_{H,B}). \qquad \text{(III.1.3)}$$

Величина t(P, f) ищется для числа степеней свободы f = n - 1.

Вычисление эквивалентной эффективной дозы и ее доверительных границ производится по формулам:

$$M = \bar{x} - \bar{x}^0; \qquad \text{(III.1.4)}$$

$$M_{H,B} = M +/- t(P, f)\ x\ s \sqrt{\frac{1}{n^0} + \frac{1}{n}}, \qquad \text{(III.1.5)}$$

$$\bar{x}^0 = \mathrm{SUM}\ x^0 / n^0; \quad \bar{x} = \mathrm{SUM}\ x/n; \qquad \text{(III.1.6)}$$

$$s = \sqrt{\frac{\mathrm{SUM}\ (x^0 - \bar{x})^2 + \mathrm{SUM}\ (x - \bar{x})^2}{n^0 + n - 2}}, \qquad \text{(III.1.7)}$$

а t(P, f) ищется для числа степеней свободы $f = n^0 + n - 2$.
Доверительные границы для отношения эквивалентных эффективных доз равны:

$$(\text{ЕД}^0/\text{ЕД})_{H,B} = \mathrm{antilg}\ (2 +/- M_{H,B}). \qquad \text{(III.1.8)}$$

Если рассматриваемый эффект не является необратимым, то лучше использовать одну группу тест - объектов, применяя к каждому из них сначала один препарат, а затем после интервала, необходимого для полного восстановления начального состояния, другой. Получив для каждого тест - объекта разность логарифмов пороговых доз

"ДЕЛЬТА" = x - x , вычисляют:

$$M = \overline{\text{"ДЕЛЬТА"}} = SUM\ \text{"ДЕЛЬТА"} / n; \qquad (III.1.9)$$

$$M_{H,B} = M +/- t_P \sqrt{SUM\ (\text{"ДЕЛЬТА"} - \overline{\text{"ДЕЛЬТА"}})^2 / n(n - 1)}, \qquad (III.1.10)$$

причем t(P, f) ищется для числа степеней f = n - 1. Такая постановка испытания позволяет уменьшить влияние изменчивости исходных состояний и параметров тест - объектов и приводит к сужению доверительных интервалов. При этом целесообразно разбить группу тест - объектов на две примерно равные подгруппы с тем, чтобы одна из них получала сначала стандартный, а затем испытуемый препарат, а другая подгруппа - наоборот. Этим обеспечивается лучшая рандомизация.

III.2. ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТА ПРИ КОСВЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЭФФЕКТИВНЫХ ДОЗ (ОЦЕНКА ED50)

Чаще всего прямое определение эффективной (пороговой) дозы для отдельного животного невозможно, и тогда количественной характеристикой активности препарата в каждом опыте служит доля (процент) тест - объектов, давших положительный ответ. Зависимость этой доли от дозы имеет всегда вид S-образной несимметричной кривой, которая при замене доз их логарифмами обычно становится более или менее симметричной. В качестве показателя, характеризующего биологическую активность препарата в целом, чаще всего принимается та доза, которая вызывает эффект у 50% тест - объектов; ее называют 50%-ной эффективной дозой и обозначают ED50 (в частности, для токсинов употребляется 50%-ная летальная доза LD50).

Для нахождения ED50 следует поставить опыты с несколькими (не менее трех) группами тест - объектов (как правило, не менее шести в каждой группе) при разных дозах. Интервал используемых доз должен обеспечивать достаточно широкий диапазон положительных ответов (примерно от 20 до 80%). После получения процентов p_i положительных ответов для каждой из доз Di они заменяются на так называемые пробиты Y_i согласно табл. V приложения. Смысл этой замены состоит в том, что зависимость между пробитами Y_i, и логарифмами доз x_i = lg Di, обычно близка к линейной. Эта близость соблюдается тем лучше, чем ближе значение p_i, к 50%, поэтому для каждой из групп вводится весовой коэффициент w_i, зависящий от p_i; значения w_i также приведены в табл. V приложения.

Дальнейший расчет производят следующим образом:

1. Вычисляют значения (для краткости индексы i опущены) SUM nw, SUM nwx, SUM nwy, SUM nwx^2, SUM nwxy (n_i - число использованных тест - объектов при дозе Di).
2. По этим значениям вычисляют:

$$V = 1 / SUM\ nw; \quad \bar{x} = SUM\ nwx / SUM\ nw;$$

$$\bar{y} = SUM\ nwy / SUM\ nw; \qquad (III.2.1)$$

$$SQ = SUM\ nwx^2 - (SUM\ nwx)^2 / SUM\ nw; \qquad (III.2.2)$$

$$SP = SUM\ nwxy - \bar{x}SUM\ nwy. \qquad (III.2.3)$$

3. Затем вычисляют

$$B = 1 / SQ; \qquad (III.2.4)$$

$$b = SP / SQ; \qquad (III.2.5)$$

$$x50 = \bar{x} + (5 - \bar{y})b; \qquad (III.2.6)$$

$$g = Bt_p^2 / b^2, \qquad (III.2.7)$$

где tp принимается равным t (95%, бесконечность) = 1,960 (т.е. всегда считается f = бесконечность).

4. Наконец, для x50 = lgED50 находят 95%-ные доверительные границы по формуле:

$$x_{50(H,B)} = \bar{x} + \frac{x50 - \bar{x}}{1 - g} +/- \frac{t_{95}}{b(1 - g)} \sqrt{V(1 - g) + B(x50 - \bar{x})^2}, \qquad (III.2.8)$$

после чего получают доверительные границы для ED50:

$$ED_{50(H,B)} = antilg\,(x_{50(H,B)}). \qquad (III.2.9)$$

При изучении нового вещества обычно требуется "прикидочное" испытание, для которого можно ограничиться двумя дозами (желательно при этом подобрать эти дозы так, чтобы они находились по разные стороны от ED50). В случае двух доз формулы III.2.4 и III.2.5 для B и Ь дают очень неточные значения, и следует пользоваться формулами:

$$B = \frac{w1 + w2}{nw1w2(x2 - x1)^2}; \qquad (III.2.10)$$

$$b = \frac{y2 - y1}{x2 - x1}; \qquad (III.2.11)$$

$$g = t_p^2 \, x \frac{w1 + w2}{nw1w2(y2 - y1)^2}. \qquad (III.2.12)$$

Число тест - объектов в обеих группах должно быть одинаково.

Достаточно хорошие оценки при двух дозах дают также формулы:

$$x50 = lgED50 = x1 + \frac{5 - y1}{y2 - y1} (x2 - x1); \qquad (III.2.13)$$

$$s_{x50} = (x2 - x1) \sqrt{\frac{2}{3n(y2 - y1)^2}}; \qquad (III.2.14)$$

$$x_{50(H,B)} = x50 +/- tpS_{x50} \qquad (III.2.15)$$

Пример III.I. При подкожной инъекции инсулина мышам регистрировалось наличие или отсутствие судорог (табл. III.2.1). Результаты первичных расчетов даны в этой же таблице.

Таблица III.2.1

Дозы D, мг	n	есть/нет	p, %	x = lg D	y	w	nw	nwx	nwy
0,2	8	1/7	12,5	- 0,699	3,85	0,387	3,096	- 2,164	11,92
0,4	8	6/2	75,0	- 0,398	5,67	0,539	4,312	- 1,716	24,45
Суммы:						0,926	7,408	- 3,880	36,37

По этим данным находим, используя формулы III.2.1 и III.2.10 - III.2.12:

$$I = -0{,}398 - (-0{,}699) = 0{,}301;\quad V = 1 / 7{,}408 = 0{,}1350;$$

$$\bar{x} = -3{,}880 / 7{,}408 = -0{,}5238;\quad \bar{y} = 36{,}37 / 7{,}408 = 4{,}910;$$

$$B = 0{,}926 / 8 \times 0{,}387 \times 0{,}539 \times 0{,}301^2 = 6{,}125;$$

$$g = 0{,}926 / 8 \times 0{,}387 \times 0{,}539\ (5{,}67 - 3{,}85)^2 = 0{,}1675;$$

$$1 - g = 0{,}8325;$$

$$Ь = (5{,}67 - 3{,}85) / 0{,}301 = 6{,}047.$$

Теперь по формулам III.2.6, III.2.8 и III.2.9 получаем:

$$x50 = -0{,}5238 + (5{,}00 - 4{,}910) / 6{,}047 = -0{,}5089;$$

$$ED50 = 0{,}310 \text{ мг};$$

$$x50 - \bar{x} = -0{,}5089 - (-0{,}5238) = 0{,}0149;$$

$$x50_{(H,B)} = -0{,}5238 + \frac{0{,}0149}{0{,}8325} \pm \frac{1{,}960}{6{,}047 \times 0{,}8325} \times \sqrt{0{,}1350 \times 0{,}8325 + 6{,}125 \times 0{,}0149^2} =$$

$$= -0{,}5059 \pm 0{,}1313 = -0{,}6372;\ -0{,}3746;$$

$$ED_{50(H,B)} = [230 \text{ мг};\ 423 \text{ мг}].$$

Приближенные формулы III.2.13 -III.2.15 дают для этого случая:

$$x_{50} = -0{,}699 + \frac{5{,}00 - 3{,}85}{5{,}67 - 3{,}85} - 0{,}398 - (-0{,}699) = -0{,}5088;$$

$$S_{x50} = [-0{,}398 - (-0{,}699)] \sqrt{3 \times 8\ (5{,}67 - 3{,}85)^2} = 0{,}0644.$$

Таким образом, получается хорошее совпадение с результатом точного расчета для x50, но несколько занижена оценка для s_{x50} (0,0644 вместо 0,1313/1,960 = 0,0670).

III.3. СРАВНЕНИЕ ED50 ДВУХ ПРЕПАРАТОВ

При определении эквивалентных ED50 также производится замена процентов положительных ответов соответствующими пробитами по таблице V приложения.

Если для испытуемого и стандартного препаратов использованы по две дозы, то дальнейшие расчеты можно выполнять так, как это было описано в разделе II.3., считая, полученные пробиты как бы активностями. Но при этом принимается

$$V = \frac{k}{\mathrm{SUM}\ n_j\ w_j}, \qquad \text{(III.3.1)}$$

где k - число групп; n_j - число тест - объектов в j-й группе, а w_j - весовые коэффициенты, о которых говорилось выше. Величина t(P, f) ищется для числа степеней свободы f = бесконечность, т. е. t = 1,960.

Пример III.2. При изучении токсичности тубазида на двух препаратах получены значения, приведенные в табл. III.3.1. Там же записаны все другие величины, которые требуются для расчета.

Таблица III.3.1

Дозы D, мг/кг	Погибло / Выжило	n	p, %	Пробиты	
				Y	w
160	1/7	8	12,5	3,85	0,387
180	6/2	8	75,0	5,67	0,539
160	3/5	8	37,5	4,68	0,613
180	7/1	8	87,5	6,15	0,387

Прежде всего по формуле II.3.4 с надлежащей заменой выражения для V проверяем значимость различия наклонов прямых пробит - логарифм дозы:

$$t = (6{,}15 - 4{,}68 - 5{,}67 + 3{,}85)\ \sqrt{\frac{8 \times 1{,}926}{4}} = 0{,}687.$$

Это значение меньше, чем t(95%; бесконечность) = 1,960, поэтому можно считать наклоны одинаковыми и в дальнейшем пользоваться формулой II.3.1, а также формулами для A и B из табл. IV приложения, но с V из формулы III.3.1:

$$E = (6{,}15 - 4{,}68 + 5{,}67 - 3{,}85) / 2 = 1{,}645;$$

$$F = (6{,}15 + 4{,}68 - 5{,}67 - 3{,}85) / 2 = 0{,}655;$$

$$V = 4 / 8 \times 1{,}926 = 0{,}2596,\ A = V = 0{,}2596.$$

$$I = \lg 180 - \lg 160 = 0{,}0512;\ B = 0{,}2596 / 0{,}0512^2 = 99{,}03.$$

Теперь по формулам II.3.5 - II.3.10 получаем:

$$Ь = 1{,}645 / 0{,}0512 = 32{,}13;$$

$$M = 0{,}655 / 32{,}13 = 0{,}02039;\ ED_{50}^{0} / ED_{50} = 105{,}6\%;$$

$$g = 99{,}03 \times 1{,}960^2 / 32{,}13^2 = 0{,}3685;\ 1 - g = 0{,}6315;$$

$$M_{H,B} = \frac{0{,}02039}{0{,}6315} +/- \frac{1{,}960}{32{,}13 \times 0{,}6315} \sqrt{0{,}2596 \times 0{,}6315 + 99{,}03 \times 0{,}02039^2} =$$

$$= 0{,}0323 \pm 0{,}0437 = [-0{,}0114;\ 0{,}0760];$$

$$(ED_{50}^{0} / ED_{50\,H,B}) = [97{,}4\%;\ 119{,}1\%).$$

Если для испытуемого и для стандартного препаратов использовалось больше, чем по две дозы, то расчет производят по формулам:

$$b = \frac{SP + SP^{0}}{SQ + SQ^{0}}; \qquad \text{(III.3.2)}$$

$$M = x^{0} - \bar{x} + \frac{\bar{y} - \bar{y}^{0}}{b}, \qquad \text{(III.3.3)}$$

$$A = 1 / SUM\ nw + 1 / SUM\ n^{0} w^{0}; \qquad \text{(III.3.4)}$$

$$B = 1 / (SQ + SQ^{0}); \qquad \text{(III.3.5)}$$

$$M_{H,B} = (\bar{x}^{0} - \bar{x}) + \frac{\bar{y} - \bar{y}^{0}}{b(1 - g)} \pm \qquad \text{(III.3.6)}$$

$$\pm \frac{t_{p}}{b(1 - g)} \sqrt{A(1 - g) + B \frac{(\bar{y} - y^{0})^{2}}{b^{2}}},$$

где по-прежнему $g = Bt^{2} / b^{2}$, а величины SQ и SP вычисляются по формулам III.2.2 и III.2.3.

III.4. КАЧЕСТВЕННОЕ СРАВНЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ

Когда какой - либо новый препарат изучается (например, по зависимости доза - эффект) при наличии другого препарата с аналогичным действием, может возникнуть необходимость сравнения эффективности этих препаратов при сопоставимых дозах (обычно при ED50 для каждого). Может потребоваться и доказательство эффективности препарата по сравнению с плацебо.

Если $n1^{+}$ и $n1^{-}$ - числа тест - объектов, давших соответственно положительный и отрицательный ответы при действии первого препарата, а $n2^{+}$ и $n2^{-}$ - то же для второго препарата, то значимость различия между этими двумя препаратами проверяется при помощи критерия "хи - квадрат":

$$"хи"^{2} = \frac{\left[\left|n1^{+}n2^{-} - n1^{-}n2^{+}\right| - \frac{1}{2}(n1^{+} + n2^{+})\right]^{2}(n1^{+} + n2^{+})}{n1^{+}n2^{+}(n1^{+} + n2^{+})(n1^{-} + n2^{-})}, \qquad \text{(III.3.7)}$$

где $n1^{+} = n1^{+} + n1^{-}$, $n2^{+} = n2^{+} + n2^{-}$ (т. е. общее число тест - объектов, подвергавшихся действию соответственно первого и второго

препаратов), а $|n_1^- n_2^+ - n_1^+ n_2^-|$ обозначает абсолютное значение (т.е. без учета знака) соответствующего числа. Полученное по формуле III.3.7 численное значение "хи"^{2} сравнивается с критическими значениями "хи"^{2} (P,f), полученными для числа степеней свободы f = 1 и равными: "хи"^{2} (95%, 1) = 3,84; "хи"^{2} (99%, 1) = 6,63; "хи"^{2} (99,9%, 1) = 10.83.

Пример III.3. Для проверки эффективности вакцины против туберкулеза телятам сначала делали либо предохранительную прививку, либо прививку контрольных средств, а затем их заражали микобактериями туберкулеза. Результаты получились следующие: с вакцинацией заболели 6 из 20, без вакцинации - 16 из 19 животных.

Следовательно, $n_1^+ = 6$; $n_1^- = 14$; $n_2^+ = 16$; $n_2^- = 3$; $n_1 = 20$; $n_2 = 19$, так что

$$\text{"хи"}^2 = \frac{(|6 \times 3 - 14 \times 16| - 39 / 2)^2 \times 39}{20 \times 19 \times 22 \times 17} = 9{,}54.$$

Это значение превышает "хи"^{2} (95%, 1) = 6,63, поэтому с вероятностью более 99% вакцина эффективна.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Таблица I

Числовые значения контрольного критерия Q(P, n)

n	Q		
	P = 90%	P = 95%	P = 99%
3	0,89	0,94	0,99
4	0,68	0,77	0,89
5	0,56	0,64	0,76
6	0,48	0,56	0,70
7	0,43	0,51	0,64
8	0,40	0,48	0,58
9	0,38	0,46	0,55

Таблица II

Числовые значения критерия Стьюдента и критерия "хи"^{2}

f	"хи"^{2}(P,f) (P = 95%)	Критерий Стьюдента t(P, f)				
		P				
		50 %	90%	95%	98%	99%
0	1	2	3	4	5	6
1	3,84	1,000	6,31	12,70	31,82	63,70
2	5,99	0,816	2,92	4,30	6,97	9,92
3	7,82	0,765	2,35	3,18	4,54	5,84
4	9,49	0,741	2,13	2,78	3,75	4,60
5	11,07	0,727	2,01	2,57	3,37	4,03
6	12,59	0,718	1,94	2,45	3,14	3,71
7	14,07	0,711	1,89	2,36	3,00	3,50

8	15,51	0,711	1,89	2,36	3,00	3,50
9	16,92	0,703	1,83	2,26	2,82	3,25
10	18,31	0,700	1,81	2,23	2,76	3,17
15	25,00	0,691	1,75	2,13	2,60	2,95
20	31,4	0,687	1,73	2,09	2,53	2,85
30	-	0,683	1,70	2,04	2,46	2,75
40	-	0,681	1,68	2,02	2,42	2,70
60	-	0,679	1,67	2,00	2,39	2,66
120	-	0,677	1,66	1,98	2,36	2,62
бесконечность	-	0,674	1,64	1,96	2,33	2,58
f	2 "хи"(P,f) (P = 95%)	75%	95%	97,5%	99%	99,5%
		$\overline{P}$				

Таблица III

Числовые значения критерия Фишера F(P,f1,f2) при P = 99%

f2	f1										
	1	2	3	4	5	6	8	10	12	16	20
1	4052	4999	5403	5625	5764	5859	5981	6056	6106	6169	6208
2	98,49	99,00	99,17	99,25	99,30	99,33	99,36	99,40	99,42	99,44	99,45
3	34,12	30,81	29,46	28,71	28,24	27,91	27,49	27,23	27,05	26,83	26,65
4	21,20	18,00	16,69	15,98	15,52	15,21	14,80	14,54	14,37	14,15	14,02
5	16,26	13,27	12,06	11,39	10,97	10,77	10,27	10,05	9,89	9,68	9,55
6	13,74	10,92	9,78	9,15	8,75	8,47	8,10	7,87	7,72	7,52	7,39
7	12,25	9,55	8,45	7,85	7,46	7,19	6,84	6,62	6,47	6,27	6,15
8	11,26	8,65	7,59	7,01	6,63	6,37	6,03	5,82	5,67	5,48	5,36
9	10,56	8,02	6,99	6,42	6,06	5,80	5,47	5,26	5,11	4,92	4,80
10	10,04	7,56	6,55	5,99	5,64	5,39	5,06	4,85	4,71	4,52	4,41
11	9,65	7,20	6,22	5,67	5,32	5,07	4,74	4,54	4,40	4,21	4,10
12	9,33	6,93	5,95	5,41	5,06	4,82	4,50	4,30	4,16	3,98	3,86
13	9,07	7,70	5,74	5,20	4,86	4,62	4,30	4,10	3,96	3,78	3,67
14	8,86	6,51	5,56	5,03	4,60	4,46	4,14	3,94	3,80	3,62	3,51
15	8,68	6,36	5,42	4,89	4,56	4,32	4,00	3,80	3,67	3,48	3,36
16	8,53	6,23	5,29	4,77	4,44	4,20	3,89	3,69	3,55	3,37	3,25
17	8,40	6,11	5,18	4,67	4,34	4,10	3,79	3,59	3,45	3,27	3,16
18	8,28	6,01	5,09	4,58	4,25	4,01	3,71	3,51	3,37	3,19	3,07
19	8,18	5,93	5,01	4,50	4,17	3,94	3,63	3,43	3,30	3,12	3,00
20	8,10	5,85	4,94	4,43	4,10	3,87	3,56	3,37	3,23	3,05	2,94
25	7,77	5,57	4,68	4,18	3,86	3,63	3,32	3,13	2,99	2,81	2,70
30	7,56	5,39	4,51	4,02	3,70	3,47	3,17	2,93	2,84	2,66	2,55
40	7,31	5,18	4,31	3,83	3,51	3,29	2,99	2,80	2,66	2,49	2,37
60	7,08	4,98	4,13	3,65	3,34	3,12	2,82	2,63	2,50	2,32	2,20

Таблица IV

Вспомогательные величины для расчета эквивалентных доз
и проверки линейности и параллельности дозовых
зависимостей (при равноотстоящих логарифмах доз)

Тип исп.	Функ-ции	$\bar{y}_1^0$	$\bar{y}_2^0$	$\bar{y}_3^0$	$\bar{y}_4^0$	$\bar{y}_1$	$\bar{y}_2$	$\bar{y}_3$	$\bar{y}_4$	z	Дисперсия
1; 2	E					- 1	1			1	$A = 3V/2$
	F	- 2				1	1			2	$B = 2V/I^2$
2; 2	E	- 1	1			- 1	1			2	$A = V$
	F	- 1	- 1			1	1			2	$B = V/I^2$

	G	1	- 1			- 1	1			1	V = 4V G
1; 3	E					- 1	0	1		2	A = 4 V/3 2
	F	- 3				1	1	1		3	B = V/2I
	H					1	- 2	1		1	V = 6V H
2; 3	E	- 1	1			- 2	0	2		5	A = 5V/6 2
	F	- 3	- 3			2	2	2		6	B = 2V/5I
	G	2	- 2			- 1	0	1		2	V = 5V/2 G
	H					1	- 2	1		1	V = 6V H
3; 3	E	- 1	0	1		- 1	0	1		4	A = 2V/3 2
	F	- 1	- 1	- 1		1	1	1		3	B = V/4I
	G	1	0	- 1		- 1	0	1		2	V = V G
	H	1	- 2	1		1	- 2	1		1	V = 6V H
3; 4	E	- 2	0	2		- 3	- 1	1	3	14	A = 7V/12 2
	F	- 4	- 4	- 4		3	3	3	3	12	B = V/7I
	G	5	0	- 5		- 3	- 1	1	3	10	V = 7V/10 G
	H	2	- 4	2		3	- 3	- 3	3	5	V = 6V/5 H
4; 4	E	- 3	- 1	1	3	- 3	- 1	1	3	20	A = V/2 2
	F	- 1	- 1	- 1	- 1	1	1	1	1	4	B = V/10I
	G	3	1	- 1	- 3	- 3	- 1	1	3	10	V = 2V/5 G
	H	1	- 1	- 1	1	1	- 1	- 1	1	1	V = 4V H

Таблица V

Пробиты (верхние числа) и весовые коэффициенты (нижние числа), соответствующие процентам положительных ответов

p	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2,67	2,95	3,12	3,36	3,44	3,44	3,52	3,60	3,66
	-	072	120	159	193	224	252	277	300	322
10	3,72	3,77	3,82	3,87	3,92	3,96	4,01	4,05	4,08	4,12
	342	361	379	396	411	426	440	454	466	478
20	4,16	4,19	4,23	4,26	4,29	4,33	4,36	4,39	4,42	4,45
	490	501	511	521	530	539	547	555	562	569
30	4,48	4,50	4,53	4,56	4,59	4,62	4,64	4,67	4,70	4,72
	576	582	588	593	598	603	607	612	615	619
40	4,75	4,77	4,80	4,82	4,85	4,87	4,90	4,92	4,95	4,98
	622	625	627	629	631	633	634	635	636	636
50	5,00	5,02	5,05	5,08	5,10	5,13	5,15	5,18	5,20	5,23
	637	636	636	635	634	633	631	629	627	625
60	5,25	5,28	5,30	5,33	5,36	5,38	5,41	5,44	5,47	5,50
	622	619	615	612	607	603	598	593	588	582
70	5,52	5,55	5,58	5,61	5,64	5,67	5,71	5,74	5,77	5,81
	576	569	562	555	547	539	530	521	511	501
80	5,84	5,88	5,92	5,95	5,99	6,04	6,08	6,13	6,18	6,23
	490	478	466	454	440	426	411	396	379	361
90	6,28	6,34	6,40	6,48	6,56	6,64	6,75	6,88	7,05	7,33

	342	322	300	277	252	224	193	159	120	072

Примечание. В значениях весовых коэффициентов опущены ноль и запятая; например, 593 следует читать как 0,593.

МЕТОДЫ АНАЛИЗА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ
FOLIA
ЛИСТЬЯ

Листьями в фармацевтической практике называют лекарственное сырье, представляющее собой высушенные или свежие листья или отдельные листочки сложного листа. Листья собирают обычно вполне развитые, с черешком или без черешка.

Внешние признаки. При определении внешних признаков мелкие и кожистые листья обычно исследуют сухими; крупные, тонкие листья, которые, как правило, бывают смятыми, предварительно размягчают во влажной камере или путем погружения на несколько минут в горячую воду, после чего раскладывают на стеклянной пластинке, тщательно расправляя. При этом обращают внимание на форму и размеры листовой пластинки и черешка, отмечают опушение листа (обилие и расположение волосков), характер края и жилкование, наличие эфирномасличных железок и других образований на поверхности листа или наличие вместилищ в мезофилле (лупа 10Х). Свежие листья исследуют без предварительной обработки.

Размеры - длину и ширину пластинки листа, длину и диаметр черешка - определяют с помощью измерительной линейки. Цвет определяют с обеих сторон листа на сухом материале при дневном освещении, запах - при растирании листа, вкус - пробуя кусочек сухого листа или его отвар (только у неядовитых объектов).

Микроскопия. Цельное, резаное и дробленое сырье. Из тонких листьев готовят препараты листа с поверхности; из толстых и кожистых листьев при необходимости готовят поперечные срезы. Для приготовления микропрепарата листа с поверхности мелкие листья используют целиком, от крупных берут отдельные участки с учетом распределения важнейших диагностических элементов: край листа, зубчик по краю листа, участок главной жилки, верхушка листа и основание. При определении резаных листьев выбирают несколько кусочков - с крупной жилкой и краем листа.

При рассматривании микропрепарата листа с поверхности обращают внимание на следующие основные диагностические признаки: строение эпидермиса, тип устьиц, характер трихом (волоски, железки), наличие и форму кристаллических включений, механической ткани, различных вместилищ, млечников, секреторных каналов и т. д.

Эпидермис листьев характеризуется определенной формой клеток - изодиаметрической или удлиненной с прямыми или извилистыми боковыми стенками, с тонкими или утолщенными оболочками, часто встречаются четковидные утолщения боковых (антиклинальных) стенок.

Характерен тип устьиц, определяемый числом и расположением околоустьичных клеток эпидермиса.

У двудольных различают четыре основных типа устьичного комплекса:

- аномоцитный (или ранункулоидный) - устьица окружены неопределенным числом клеток, не отличающихся по форме и размерам от остальных клеток эпидермиса;
- анизоцитный (или круцифероидный) - устьица окружены тремя околоустьичными клетками, из которых одна значительно меньше двух других;
- парацитный (или рубиацеоидный) - с каждой стороны устьица, вдоль его продольной оси расположены по одной или более околоустьичных клеток;
- диацитный (или кариофиллоидный) - устьица окружены двумя околоустьичными клетками, смежные стенки которых перпендикулярны устьичной щели.

У однодольных различают 5 типов:

- аперигенный тип - устьица не имеют типичных околоустьичных клеток;
- биперигенный тип - устьица окружены двумя околоустьичными клетками, расположенными латерально по отношению к замыкающим;
- тетраперигенный тип - устьица окружены четырьмя околоустьичными клетками: из них две клетки расположены латерально, а две других - полярно или все клетки латеральные, по две с каждой стороны;
- гексаперигенный тип - устьица имеют шесть околоустьичных клеток, из них две полярные и четыре латеральные;
- мультиперигенный тип - число околоустьичных клеток больше шести; они расположены вокруг устьица кольцом или без определенного порядка.

Для листьев некоторых растений характерно наличие водяных устьиц, которые отличаются крупным размером и расположены обычно на верхушке листа или зубчика, над гидатодой.

В эпидермисе могут встречаться секреторные клетки или клетки, содержащие цистолиты.

Эпидермальные клетки, окружающие волосок, нередко образуют розетку, что является важным диагностическим признаком. Обращают также внимание и на характер слоя кутикулы, покрывающей поверхность листа. Обычно кутикула лежит тонким ровным слоем, иногда она толстая или местами образует утолщения в виде складок.

Важное диагностическое значение имеют трихомы благодаря большому разнообразию их строения. Наиболее распространенным типом трихом являются волоски. Они подразделяются на одно- и многоклеточные, простые и головчатые (железистые). Простые волоски могут быть однорядными, двухрядными, многорядными, пучковыми, неразветвленными или разветвленными (звездчатые, ветвистые, Т-образные), с тонкими или толстыми стенками. Их поверхность гладкая, бородавчатая или продольно - складчатая, что зависит от особенностей кутикулы, покрывающей волосок. Еще более разнообразны головчатые волоски, которые различаются как строением ножки (одно-, двух- или многоклеточной), так и формой и строением головки (шаровидной, овальной или иной формы, одно-, двух- или многоклеточной, с содержимым или без него).

Другой тип эпидермальных образований (трихом) - железки. Они свойственны многим растениям и целым семействам, характеризуются определенной формой и строением. Как правило, в железках локализуется эфирное масло, но встречаются и другие включения или железки лишены содержимого.

В диагностике листьев имеют значение различные вместилища с эфирным маслом, слизью, смолами и другими гидрофобными веществами:

- схизогенные или схизо - лизигенные вместилища, расположенные в мезофилле листа;
- млечники, секреторные каналы, обычно сопровождающие проводящие пучки, жилки и отличающиеся разнообразным составом содержимого.

В листьях встречаются специальные клетки - идиобласты, содержащие кристаллы оксалата кальция, цистолиты и другие кристаллические включения. Кристаллы оксалата кальция могут быть разнообразной формы и размеров: одиночные кристаллы призматической, ромбоэдрической, октаэдрической или иной формы, в виде отдельных длинных игл или мелких иголочек, собранных пучками (рафиды), сростки кристаллов (друзы, сферокристаллы), скопления мельчайших кристаллов (кристаллический песок). Клетки с кристаллами расположены среди клеток мезофилла или образуют кристаллоносную обкладку вокруг проводящих пучков или группы волокон. Реже встречаются отложения других минеральных веществ - карбоната кальция, кремнезема и др.

Для приготовления поперечного среза выбирают кусочек листа, содержащий главную жилку; мелкие листья берут цельные. Готовят препарат таким образом, чтобы в нем был представлен поперечный срез главной жилки и часть мезофилла. Обращают внимание на форму главной жилки, число, форму и расположение проводящих пучков в жилке. В строении проводящих пучков отмечают расположение флоэмы и ксилемы, наличие механических тканей, кристаллоносной обкладки и др. Отмечают особенности структуры мезофилла - лист дорсовентральный (палисадная ткань расположена с одной стороны, а губчатая - с другой) или изолатеральный (палисадная ткань - с обеих сторон); наличие аэренхимы, кристаллов оксалата кальция, вместилищ, секреторных клеток и каналов, млечников и др. На поверхности листа хорошо видны толстая или складчатая кутикула, волоски, железки и др.

Порошок. В микропрепарате порошка видны жилки в продольном сечении. Отдельные фрагменты пластинки листа видны в основном с поверхности; в них можно найти все диагностические элементы, указанные для цельных листьев. Встречаются фрагменты листа в поперечном сечении, где хорошо видны структура мезофилла и особенности строения эпидермиса. В порошке много обрывков тканей и отдельных элементов: волоски и их обрывки, железки, отдельные кристаллы оксалата кальция и фрагменты кристаллоносной обкладки, механические клетки - волокна, склереиды, обрывки секреторных каналов, вместилищ, млечников и др.

Люминесцентная микроскопия. Рассматривают сухой порошок, реже поперечный срез листа, приготовленный из цельного или резаного сырья после предварительного размягчения во влажной камере. Наблюдается собственная (первичная) флюоресценция сырья в ультрафиолетовом свете. Наиболее яркое свечение имеют кутикула, клеточные оболочки механических тканей, элементов ксилемы, волосков, содержимое отдельных клеток или тканей мезофилла, эпидермиса листа в зависимости от их химического состава. Листья некоторых растений характеризуются ярким и специфическим свечением содержимого железок, секреторных каналов и вместилищ в зависимости от химического состава содержимого.

Гистохимические реакции проводят на поперечных срезах и в порошке на наличие эфирного масла, толстой кутикулы, слизи и др. Методика проведения реакций описана в соответствующей нормативно - технической документации.

Качественные реакции проводят с извлечением из сырья. Методика проведения реакций указана в соответствующей нормативно - технической документации.

Числовые показатели. В сырье определяют:

- содержание действующих веществ, биологическую активность; методы определения указаны в соответствующей нормативно - технической документации;
- влажность;
- содержание золы общей и золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты;
- измельченность и содержание примесей.

HERBAE
ТРАВЫ

Травами в фармацевтической практике называют лекарственное растительное сырье, представляющее собой высушенные или свежие надземные части травянистых растений. Травы собирают во время цветения, иногда во время бутонизации или плодоношения. Сырье состоит из стеблей с листьями и цветками, отчасти с бутонами и незрелыми плодами. У одних растений собирают только верхушки, у других - всю надземную часть, у третьих - надземную часть вместе с корнями.

Внешние признаки. При определении внешних признаков обращают внимание на строение стеблей, листьев, цветков (плодов), рассматривая невооруженным глазом или с помощью лупы (10Х). При необходимости сырье размачивают, погружая его на несколько минут в горячую воду, а затем раскладывают на стекле или другой гладкой поверхности, расправляя стебель, листья, цветки. Если трава измельченная, то для размачивания выбирают куски стебля, листья, цветки.

В строении стебля отмечают его особенности: простой или ветвистый характер ветвления; форму поперечного сечения - стебель цилиндрический, ребристый, четырехгранный и т. д.; опушение; размеры (длину и диаметр у основания); расположение на стебле листьев (очередное, супротивное, мутовчатое); тип соцветия; строение листьев, цветков, плодов.

Цвет определяют на сухом сырье при дневном освещении; запах - при растирании; вкус - пробуя кусочек сухого сырья или его отвар (только у неядовитых объектов).

Микроскопия. Цельное и резаное сырье. Готовят микропрепарат листа с поверхности. В некоторых случаях готовят микропрепараты стебля. В препаратах стебля обращают внимание на форму клеток эпидермиса, тип устьиц, наличие различных трихом (волосков, железок) и особенности их строения. Кроме того, обращают внимание на наличие механической ткани, кристаллических включений, вместилищ, секреторных каналов, млечников и т. п. В препаратах поперечного среза стебля отмечают расположение и строение проводящих пучков, наличие других особенностей, имеющих диагностическое значение.

Порошок. В порошке трав, кроме элементов листа, встречаются элементы цветков, обрывки тканей плодов и семян, фрагменты стебля - обрывки проводящих пучков, крупных сосудов, механических волокон и др.

Люминесцентная микроскопия. Рассматривают сухой порошок травы или листа. Наблюдается собственная (первичная) флюоресценция сырья в ультрафиолетовом свете. В порошке, кроме элементов листа, яркая флюоресценция характерна для обрывков проводящих пучков стебля (сосуды ксилемы и механические волокна); хорошо видна пыльца; обрывки эндосперма семени обычно имеют яркое голубое свечение (жирное масло).

Гистохимические реакции проводят на поперечных срезах или в порошке на наличие эфирного масла, толстой кутикулы, слизи и др. Методика проведения реакций описана в соответствующей нормативно - технической документации.

Качественные реакции проводят с извлечением из сырья. Методика проведения реакций указана в соответствующей нормативно - технической документации.

Числовые показатели. В сырье определяют:

- содержание действующих веществ, биологическую активность; методы определения указаны в соответствующей нормативно - технической документации;
- влажность;
- содержание золы общей и золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты;
- измельченность и содержание примесей.

FLORES
ЦВЕТКИ

Цветками в фармацевтической практике называют лекарственное сырье; представляющее собой высушенные отдельные цветки или соцветия, а также их части. Цветки собирают обычно в начале цветения, некоторые в фазу бутонизации.

Внешние признаки. В сырье определяют тип соцветия, опушенность; затем сырье размачивают, опуская его на 1 мин в горячую воду, и рассматривают невооруженным глазом или с помощью лупы (10Х) строение цветка (или соцветия). Цветок помещают на предметное стекло и под лупой разделяют его препаровальными иглами на отдельные части. Обращают внимание на строение околоцветника - простой (чашечковидный, венчиковидный) или двойной, строение чашечки и венчика (правильные - актиноморфные или неправильные - зигоморфные), число и форму чашелистиков (или зубчиков чашечки), число и форму лепестков (или зубчиков венчика), число и строение тычинок, число пестиков, особенности строения завязи.

Размеры - диаметр цветка (соцветия) - определяют с помощью измерительной линейки или миллиметровой бумаги на размоченном материале. Цвет сырья определяют при дневном освещении, запах - при растирании, вкус - пробуя кусочек сухого сырья или его отвар (только у неядовитых объектов).

Микроскопия. Цельное и резаное сырье. Готовят микропрепараты из отдельных частей соцветия (цветки, листочки обвертки) или частей цветка (лепестки, чашелистики), рассматривая их с поверхности. Обращают внимание на строение эпидермиса, наличие и строение волосков, железок, кристаллических включений, механических элементов (в листочках обвертки), форму и размеры пыльцевых зерен и др.

Люминесцентная микроскопия. Рассматривают сухой порошок или отдельные части соцветия, цветка; наблюдается собственная (первичная) флюоресценция сырья в ультрафиолетовом свете. Наиболее характерное свечение имеют кутикула, различные трихомы (волоски, железки), механические элементы, пыльцевые зерна, включения клеток в зависимости от их химического состава.

Качественные реакции проводят с извлечением из сырья. Методика проведения реакций описана в соответствующей нормативно - технической документации.

Числовые показатели. В сырье определяют:

- содержание действующих веществ, биологическую активность; методы определения указаны в соответствующей нормативно - технической документации;
- влажность;
- содержание золы общей и золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты;
- измельченность и содержание примесей.

FRUCTUS
ПЛОДЫ

Плодами в фармацевтической практике называют простые и сложные, а также ложные плоды, соплодия и их части. Плоды собирают зрелыми и высушивают. Некоторые сочные плоды перерабатывают свежими.

Внешние признаки. Плоды исследуют сухими, рассматривая их невооруженным глазом или с помощью лупы (10Х). Сочные плоды, изменившие во время сушки форму, рассматривают сначала в сухом виде, а затем после размачивания в горячей воде или кипячения в течение 5-10 мин.

Плод состоит из околоплодника (перикарпия) и заключенных в него семян. Перикарпий может быть сухой (сухие плоды) или мясистый (сочные плоды). Диагностическое значение имеют цвет, характер поверхности околоплодника, размеры (длина, толщина, поперечник плода), запах и вкус. В некоторых случаях определяют число гнезд в плоде, наличие эфирномасличных каналов или вместилищ. Для сочных плодов после размягчения определяют форму и особенности строения околоплодника, отделяют семена от мякоти и определяют их количество, форму, размеры, характер поверхности и т. д.

Размеры определяют с помощью измерительной линейки или миллиметровой бумаги. Цвет сырья определяют при дневном освещении, запах - при разламывании или растирании, вкус - пробуя кусочек сухого сырья или его отвар (только у неядовитых объектов).

Микроскопия. Цельное сырье. Для определения подлинности готовят поперечные срезы. Диагностическое значение имеет строение околоплодника. В околоплоднике различают три слоя: наружный - экзокарпий (эпидермис), средний - мезокарпий, внутренний - эндокарпий. Обращают внимание на форму, строение клеток эпидермиса, на наличие и особенности строения волосков; в мезокарпии важное диагностическое значение имеют наличие механических элементов, их форма и расположение, число и расположение эфирномасличных канальцев, проводящих пучков, наличие кристаллических включений, форма клеток паренхимы и др. Эндокарпий у некоторых плодов срастается с семенной кожурой, иногда эндокарпий представлен механической тканью в виде клеток с четковидными утолщениями.

Резаное и дробленое сырье. Диагностическое значение имеют клетки экзокарпия и эндокарпия, а также семенная кожура; механические элементы мезокарпия и кристаллические включения, особенности строения эндосперма, запасные питательные вещества и кристаллические включения.

Порошок. Диагностическое значение имеют те же элементы, что в резаном и дробленом сырье.

Люминесцентная микроскопия. Рассматривают поперечный срез после увлажнения плода во влажной камере, реже сухой порошок. Наблюдают первичную (собственную) флюоресценцию сырья в ультрафиолетовом свете. Видна структура околоплодника, где особенно ярко выделяются механические элементы, секреторные каналы и их содержимое, проводящие пучки. Ярко флюоресцирует эндосперм семени и ткани зародыша. Флюоресценция обусловлена химическим составом тканей и для каждого вида специфична.

Гистохимические реакции проводят с порошком сырья на наличие жирного и эфирного масел, на одревесневшие элементы и др. Методика проведения реакций указана в соответствующей нормативно - технической документации.

Качественные реакции проводят с извлечением из сырья. Методика проведения реакций описана в соответствующей нормативно - технической документации.

Числовые показатели. В сырье определяют:

- содержание действующих веществ; биологическую активность; методы определения указаны в соответствующей нормативно - технической документации;
- влажность;
- содержание золы общей и золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты;
- измельченность и содержание примесей.

SEMINA
СЕМЕНА

Семенами в фармацевтической практике называют цельные семена и отдельные семядоли. Семена собирают, как правило, зрелыми и высушивают.

Внешние признаки. Семена исследуют сухими, рассматривая их невооруженным глазом или с помощью лупы (10Х).

Семена состоят из семенной кожуры, эндосперма (у некоторых растений семена без эндосперма) и зародыша. Диагностическое значение имеют форма, размеры (длина, толщина или поперечник) семени, характер поверхности, цвет, запах и вкус, форма, размеры и расположение зародыша, наличие и форма рубчика или семяшва и т. д.

Размеры определяют с помощью измерительной линейки или миллиметровой бумаги, шарообразных семян - просеиванием сквозь сито с круглыми отверстиями. Цвет определяют при дневном освещении, запах - при разламывании или растирании, вкус - пробуя кусочек сухого сырья или его отвар (только у неядовитых объектов).

Микроскопия. Цельное сырье. Для определения подлинности готовят поперечные срезы. Обращают внимание на общее строение семени, характер и строение семенной кожуры, величину и форму запасной питательной ткани - эндосперма, форму и строение зародыша - семядолей, корешка, стебелька, почечки зародыша.

Наибольшее диагностическое значение имеет семенная кожура, которая состоит из нескольких слоев характерного строения. Механический слой кожуры состоит из вытянутых элементов (типа волокон) или из изодиаметрических клеток. Для некоторых семян характерно наличие слизи в эпидермальных клетках кожуры, для других - пигментного слоя. Форма клеток эндосперма, запасное питательное вещество и кристаллические включения также имеют диагностическое значение.

Порошок. Диагностическое значение имеет строение отдельных слоев семенной кожуры, особенно механического и пигментного. Чаще всего слои кожуры семени в микропрепарате порошка лежат пластами, что соответствует микроскопической картине препаратов кожуры с поверхности, иногда встречаются каменистые клетки (небольшими группами и отдельно). Нередко в порошке встречается сочетание двух или трех слоев семенной кожуры, что также является характерным признаком. Диагностическое значение имеет содержимое клеток эндосперма и зародыша (жирное масло, слизь, кристаллические включения и др.).

Люминесцентная микроскопия. Рассматривают поперечный срез после размягчения семени во влажной камере. Наблюдают первичную (собственную) флюоресценцию сырья в ультрафиолетовом свете. Четко выделяются отдельные слои семенной кожуры, ярко флюоресцируют одревесневшие ткани; флюоресценция эндосперма и зародыша зависит от химического состава содержимого клеток; жирное масло обусловливает яркую голубую флюоресценцию эндосперма и зародыша.

Гистохимические реакции проводят с порошком сырья на наличие жирного и эфирного масел, слизи, одревесневших элементов и др. Методика проведения реакций описана в соответствующей нормативно - технической документации.

Качественные реакции проводят с извлечением из сырья. Методика проведения реакций указана в соответствующей нормативно - технической документации.

Числовые показатели. В сырье определяют:

- содержание действующих веществ, биологическую активность; методы определения указаны в соответствующей нормативно - технической документации;
- влажность;
- содержание золы общей и золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты;
- измельченность и содержание примесей.

CORTICES
КОРА

Корой в фармацевтической практике называют наружную часть стволов, ветвей и корней деревьев и кустарников, расположенную к периферии от камбия. Кору, как правило, заготовляют весной, в период сокодвижения, и высушивают.

Внешние признаки. Цельная кора имеет вид трубчатых, желобоватых или плоских кусков различных размеров.

У коры определяют цвет, размеры (длину и толщину), особенности наружной и внутренней поверхности и излома.

Наружная поверхность коры с бурой или серой пробкой обычно гладкая или с продольными (или поперечными) морщинками, иногда с трещинками. Кора ветвей и стволов имеет округлые или продолговатые чечевички, иногда на ней могут быть листовые лишайники (кустистые лишайники при заготовке должны удаляться).

Внутренняя поверхность коры обычно более светлая, гладкая или ребристая. Поперечный излом обычно неровный: занозистый, волокнистый или зернистый.

Длину и толщину коры определяют с помощью измерительной линейки. Цвет определяют с наружной и внутренней поверхности при дневном освещении, запах - при соскобе внутренней поверхности на свежем изломе сухой коры или при увлажнении, вкус - пробуя сухую кору или ее отвар (только у неядовитых объектов).

Микроскопия. Цельное сырье. Готовят поперечные и продольные срезы предварительно размягченного сырья. При определении обращают внимание на наружную кору, располагающуюся к периферии от окончания сердцевинных лучей и состоящую из первичной коры (если сохранилась) и перидермы, и на внутреннюю (флоэму), расположенную от камбия до окончания сердцевинных лучей. Также обращают внимание на толщину, окраску и характер пробки, наличие колленхимы, соотношение толщины первичной и вторичной коры, ширину сердцевинных лучей.

Диагностическими признаками коры являются механические элементы - лубяные волокна (стереиды) и каменистые клетки (склереиды), их количество, расположение и строение. Располагаются механические элементы одиночно или группами, рассеянно или поясами. Стенки лубяных волокон или каменистых клеток обычно сильно утолщены и лигнифицированы.

Диагностическое значение имеют также включения оксалата кальция, млечники, клетки с эфирным маслом. Кристаллы оксалата кальция имеют разную форму (друзы и одиночные кристаллы). Одиночные кристаллы часто встречаются в отдельных клетках паренхимы или в клетках паренхимы, окружающих лубяные волокна, образуя кристаллоносную обкладку.

Крахмальные зерна, встречающиеся в коре, мелкие и диагностического значения не имеют.

Резаное сырье. Для микроскопического исследования резаной коры готовят продольный или поперечный срез или соскоб. В таких препаратах почти все элементы видны в продольном сечении. Диагностическое значение имеют те же элементы, что и на срезах.

Порошок. Готовят микропрепараты порошка. Важнейшими диагностическими признаками в порошках коры являются: механические элементы (лубяные волокна, каменистые клетки), их расположение (одиночно или группами), включения оксалата кальция, млечники, вместилища.

Обращают внимание также на пласты клеток пробки, состоящие из многоугольных клеток (вид с поверхности). В клетках паренхимы обычно содержатся крахмальные зерна, кристаллы оксалата кальция, иногда эфирное масло.

Люминесцентная микроскопия. Рассматривают поперечные срезы коры или порошок (соскоб) в ультрафиолетовом свете. Ярким свечением обладают одревесневшие элементы (лубяные волокна, каменистые клетки); флюоресценция клеток паренхимы зависит от химического состава коры.

Гистохимические реакции проводят на поперечных срезах коры или с порошком сырья. При этом чаще всего проводят реакции на наличие действующих веществ, в некоторых случаях - на

сопутствующие. Методика проведения реакций описана в соответствующей нормативно - технической документации.

Качественные реакции проводят на сухом сырье, с соскобом, порошком или с извлечением из сырья. Методики проведения реакций приведены в соответствующей нормативно - технической документации.

Числовые показатели. В сырье определяют:

- содержание действующих веществ, биологическую активность; методы определения указаны в соответствующей нормативно - технической документации;
- влажность;
- содержание золы общей и золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты;
- измельченность и содержание примесей, в том числе содержание кусочков коры, покрытых кустистыми лишайниками.

RADICES, RHIZOMATA, BULBI, TUBERA, BULBOTUBERA
КОРНИ, КОРНЕВИЩА, ЛУКОВИЦЫ, КЛУБНИ, КЛУБНЕЛУКОВИЦЫ

В фармацевтической практике используют высушенные, реже свежие подземные органы многолетних растений, собранные чаще осенью или ранней весной, очищенные или отмытые от земли, освобожденные от отмерших частей, остатков стеблей и листьев. Крупные подземные органы перед сушкой разрезают на части (продольно или поперек).

Сырье может быть представлено корнями - radices, корневищами - rhizomata, корневищами и корнями - rhizomata et radices, корневищами с корнями - rhizomata cum radicibus, луковицами - bulbi, клубнями - tubera и клубнелуковицами - bulbotubera.

Внешние признаки. У подземных органов определяют форму, особенности наружной поверхности и излома, размер, цвет с поверхности и на свежем изломе, запах и вкус.

Корни цилиндрические, реже конические, простые или разветвленные. Корневища простые или разветвленные, многоглавые, цилиндрические или овальные, четковидные, внутри сплошные или полые, прямые, изогнутые или перекрученные и т.д. Луковицы и клубнелуковицы шаровидные, яйцевидные, продолговатые, сплющенные и т.п. Клубни шаровидные, овальные, иногда сплющенные, веретеновидные и т.п.

Поверхность неочищенных подземных органов может быть ровной или (чаще) морщинистой. Для корней обычно характерна продольно - морщинистая поверхность, для корневищ - продольная и поперечная морщинистость часто со следами удаленных корней, отмерших листьев и стеблей. Излом может быть ровный, зернистый, занозистый или волокнистый. На изломе или поперечном разрезе крупных корней, корневищ и клубней рассматривают невооруженным глазом, под лупой (10Х) или стереомикроскопом расположение проводящих элементов.

Корни могут иметь первичное и вторичное строение. При первичном строении в центре виден центральный осевой цилиндр, при вторичном строении в центре находится древесина.

Корневища могут иметь пучковое и беспучковое строение. У корневищ однодольных растений проводящие пучки разбросаны без особого порядка в коре и в центральном цилиндре. У двудольных растений при пучковом строении проводящие пучки расположены в виде кольца ближе к поверхности корневища, в центре широкая сердцевина. Корневища беспучкового строения отличаются от корней наличием в центре сердцевины (у некоторых видов она разрушена - корневище полое).

Луковицы состоят из более или менее утолщенных сочных чешуй, сидящих на укороченном стебле (донце), и обычно нескольких наружных сухих чешуй.

Клубни чаще всего имеют морщинистую поверхность и пучковое строение.

Клубнелуковицы имеют только наружные сухие чешуи.

Длину, диаметр, толщину определяют с помощью измерительной линейки или миллиметровой бумаги. Диаметр и толщину измеряют в наиболее широком месте. Цвет сырья определяют при дневном освещении, запах - при разламывании или растирании, вкус - пробуя кусочек сухого сырья или его отвар (только у неядовитых объектов).

Микроскопия. Цельное сырье. Для определения подлинности подземных органов готовят поперечные срезы, реже продольные.

Корни. При первичном строении корня на поперечном срезе видны: покровная ткань - эпидермис (эпидерма, ризодерма), клетки которого часто образуют корневые волоски. Под эпидермисом расположена первичная кора. У однодольных растений внутренний слой коры (эндодерма) имеет характерное строение: состоит из одного ряда клеток с утолщенными внутренними и радиальными стенками (подковообразные утолщения). В центре корня расположен центральный осевой цилиндр с радиальным проводящим пучком. При вторичном строении корня на поперечном срезе видны: покровная ткань - перидерма, кора и древесина. Перидерма состоит из более или менее толстого слоя пробки, феллогена и феллодермы. Кора состоит из клеток

паренхимы, проводящих элементов луба, нередко присутствуют механические элементы: лубяные волокна, каменистые клетки. У некоторых видов сырья в коре расположены секреторные вместилища, каналы, млечники. Линия камбия более или менее четкая. Древесина, как правило, имеет лучистое строение. В древесине различают сосуды, трахеиды, паренхиму, у некоторых видов древесные волокна (либриформ).

Корневища. На поперечном срезе у корневищ однодольных растений покровная ткань представлена эпидермисом; часто эпидермис разрушен, при этом наружные слои паренхимы коры опробковевшие. У некоторых корневищ под эпидермисом расположена гиподерма. Корневища двудольных растений покрыты перидермой. Проводящие пучки как у однодольных, так и у двудольных коллатеральные, биколлатеральные, концентрические; у однодольных растений они закрытые, у двудольных открытые. При беспучковом строении для корневища характерны те же элементы, что и для корней со вторичным строением, только в центре корневища - сердцевина, иногда разрушенная.

В клубнях и клубнелуковицах преобладающей тканью является паренхима с запасным питательным веществом, в которой расположены проводящие пучки.

Важнейшими диагностическими признаками для подземных органов являются расположение и характер проводящих и механических элементов, наличие разнообразных вместилищ, каналов, млечников, кристаллов оксалата кальция, запасного питательного вещества (крахмал, слизь, инулин, жирное масло) и др.

Резаное и дробленое сырье. При микроскопическом исследовании отмечают характер утолщения сосудов и трахеид, наличие и форму механических элементов (волокна, каменистые клетки), кристаллов оксалата кальция, млечников, секреторных вместилищ, каналов и др.

В соскобе определяют характер запасного питательного вещества, форму и размеры крахмальных зерен.

Порошок. Диагностическими элементами в порошке подземных органов являются сосуды и трахеиды с характерными утолщениями стенок, механические элементы, которые встречаются группами или одиночно, кристаллы оксалата кальция, секреторные каналы, вместилища, млечники и запасные питательные вещества.

Люминесцентная микроскопия. Рассматривают поперечный срез (или распил), сухой порошок или соскоб подземных органов. Наблюдается собственная (первичная) флюоресценция сырья в ультрафиолетовом свете. Наиболее яркое свечение имеют одревесневшие элементы (сосуды, трахеиды, лубяные и древесные волокна; каменистые клетки), содержимое секреторных образований (вместилищ, каналов, млечников); флюоресценция клеток паренхимы зависит от химического состава.

Гистохимические реакции проводят на поперечных срезах или с порошком сырья чаще всего на наличие действующих веществ, запасного питательного вещества. Методика проведения реакций указана в соответствующей нормативно - технической документации.

Качественные реакции проводят на сухом сырье, с порошком или соскобом, но чаще с извлечением из сырья. Методика проведения реакций описана в соответствующей нормативно - технической документации.

Числовые показатели. В сырье определяют:

- содержание действующих веществ, биологическую активность; методы определения указаны в соответствующей нормативно - технической документации;
- влажность;
- содержание золы общей и золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты;
- измельченность и содержание примесей.

SPECIES
СБОРЫ

Сборы представляют собой смеси нескольких видов измельченного, реже цельного, лекарственного растительного сырья, иногда с добавлением солей, эфирных масел и используемые в качестве лекарственных средств.

Приготовление. Сырье, используемое для приготовления сборов, должно соответствовать требованиям нормативно - технической документации. Сырье, входящее в состав сборов, измельчают по отдельности. Степень измельчения сырья, входящего в состав сборов, используемых для приготовления настоев и отваров, должна соответствовать требованиям статьи "Настои и отвары".

Листья, травы и кору режут, кожистые листья превращают в крупный порошок; корни и корневища в зависимости от формы, величины и твердости режут или дробят; плоды и семена измельчают на мельнице или пропускают через вальцы; некоторые семена и ягоды берут

цельными; цветки и мелкие цветочные корзинки берут цельными или измельчают. Во всех случаях измельчения пыль отсеивают сквозь сито с размером отверстий 0,18 мм.

Компоненты, входящие в состав сбора, перемешивают до получения равномерной смеси. В тех случаях, когда в состав сбора входит соль, из нее готовят насыщенный раствор и опрыскивают им сбор при перемешивании, после чего высушивают при температуре не выше 60 град. С.

Сырье гигроскопичное и легко портящееся от увлажнения следует прибавлять в сбор после опрыскивания других компонентов раствором соли и высушивания с последующим перемешиванием.

Эфирное масло вносят в сбор в виде спиртового раствора (1:10) опрыскиванием при перемешивании.

Внешние признаки. Сборы - это смесь нескольких видов измельченного или цельного лекарственного растительного сырья с морфологическими признаками, характерными для компонентов, входящих в состав сбора. В сборах определяют запах и вкус. Вкус определяют в водном извлечении.

Подлинность. Для определения подлинности сбора из средней пробы берут аналитическую пробу массой 10 г, помещают на чистую гладкую поверхность и в ней определяют составные компоненты по внешнему виду, рассматривая их невооруженным глазом и с помощью лупы (10Х).

Трудно распознаваемые или сильно измельченные частицы подвергают микроскопическому анализу в соответствии со статьей "Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья". Для этого обрабатывают 25-30 однородных по внешнему виду частиц и из нескольких кусочков готовят препараты, рассматривая их под микроскопом для определения вида сырья. Подлинность сильно измельченных частиц определяют по методике исследования порошков. Все исследуемые кусочки должны иметь диагностические признаки, соответствующие видам сырья, входящим в состав сбора.

Числовые показатели. В сборах определяют:

- содержание действующих веществ; методы определения указаны в соответствующей нормативно - технической документации;
- влажность;
- содержание золы общей и золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты;
- измельченность и содержание примесей.

ПРАВИЛА ПРИЕМКИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ ДЛЯ АНАЛИЗА

Приемку лекарственного растительного сырья производят партиями.

Партией считают количество сырья массой не менее 50 кг 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;
- обозначение нормативно - технической документации на сырье;
- подпись лица, ответственного за качество сырья, с указанием фамилии и должности.

Каждую единицу продукции подвергают внешнему осмотру для установления соответствия упаковки и маркировки требованиям нормативно - технической документации. Обращают внимание на правильность упаковки, состояние тары (отсутствие подмочки, подтеков и других повреждений, отрицательно влияющих на качество и сохранность сырья).

Для проверки соответствия качества сырья требованиям нормативно - технической документации отбирают выборку из неповрежденных единиц продукции, взятых из разных мест партии в количестве, указанном в табл. 1. Проверку качества сырья в поврежденных единицах продукции производят отдельно от неповрежденных, вскрывая каждую единицу продукции.

Таблица 1

Количество единиц продукции сырья	Объем выборки

1-5	Все единицы
6-50	5 единиц
Свыше 50	10% единиц продукции, составляющих партию

Примечание. Неполные 10 единиц продукции приравнивают к 10 единицам (например, при наличии в партии 51 единицы продукции объем выборки составляет 6 единиц).

Попавшие в выборку единицы продукции вскрывают и путем внешнего осмотра определяют однородность сырья по способу подготовки (цельное, измельченное, прессованное и т. д.), цвету, запаху, засоренности; наличие плесени, гнили, устойчивого постороннего запаха, не исчезающего при проветривании; засоренность ядовитыми растениями и посторонними примесями (камни, стекло, помет грызунов и птиц и т. д.). Одновременно невооруженным глазом и с помощью лупы (5-10Х) определяют наличие амбарных вредителей.

При установлении (внешний осмотр) неоднородности сырья, наличия плесени и гнили, засоренности посторонними растениями в количествах, явно превышающих допустимые примеси и т. д. вся партия должна быть рассортирована, после чего вторично предъявлена к сдаче.

При обнаружении в сырье затхлого, устойчивого постороннего запаха, не исчезающего при проветривании, ядовитых растений и посторонних примесей (помет грызунов и птиц, стекло и др.), зараженности амбарными вредителями II и III степеней партия сырья не подлежит приемке.

Отбор проб. Из каждой единицы продукции, отобранной для вскрытия, берут, избегая измельчения, 3 точечные пробы:
сверху, снизу и из середины. Из мешков, тюков и кип точечные пробы отбирают на глубине не менее 10 см рукой сверху, затем, после распарывания по шву, из середины и снизу; точечные пробы семян и сухих плодов отбирают зерновым щупом. Из сырья, упакованного в ящик, первую точечную пробу отбирают из верхнего слоя, вторую - после удаления сырья примерно до половины ящика и третью - со дна ящика. Точечные пробы должны быть примерно одинаковыми по массе. Из всех точечных проб, осторожно перемешивая, составляют объединенную пробу.

Для установления степени зараженности амбарными вредителями из объединенной пробы методом квартования выделяют пробу массой 500 г для мелких видов сырья и массой 1000 г - для крупных видов сырья. Эту пробу помещают в плотно закрывающуюся банку, в которую вкладывают этикетку.

Из объединенной пробы методом квартования выделяют среднюю пробу. Для этого сырье разравнивают на гладкой, чистой, ровной поверхности в виде квадрата по возможности тонким равномерным по толщине слоем и по диагонали делят на четыре треугольника. Два противоположных треугольника сырья 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 средней пробы, указанной в табл. 2. Остатки объединенной пробы сырья присоединяют к партии. Допустимые отклонения в массе средней пробы не должны превышать +/- 10%.

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

Таблица 2

Наименование сырья	Масса средней пробы, г
Почки березовые	150
Почки сосновые	350
Листья цельные, кроме нижеперечисленных:	400
лист сенны	200
лист толокнянки и брусники	150
Листья резаные, обмолоченные	200
Цветки, кроме нижеперечисленных:	300
цветки полыни цитварной	150
цветки ноготков, кукурузные столбики с рыльцами	200
цветки бузины черной	75
цветки ромашки аптечной	200
цветки ромашки далматской	400
Травы цельные, побеги, кроме нижеперечисленных:	600
трава душицы	150

побеги анабазиса	200
Травы резаные, обмолоченные	200
Сочные плоды, кроме нижеперечисленных:	200
плоды шиповника	300
плоды стручкового перца	550
Сухие плоды и семена, кроме нижеперечисленных:	300
семена дурмана индейского, термопсиса, льна	200
плоды амми и семена джута	150
Клубни, корни и корневища цельные, кроме нижеперечисленных:	600
корневище и корень марены, корневище лапчатки	400
клубни салепа	200
корневище и корень девясила	1000
корневище мужского папоротника и корень ревеня	1500
корень мыльный туркестанский	10300
корень солодки очищенный	2500
корень солодки неочищенный, корень барбариса	6000
Корни и корневища резаные, дробленые	250
Корни и корневища в порошке	150
Кора цельная	600
Кора резаная	200
Прочее растительное сырье:	
ликоподий	100
рожки спорыньи	200
березовый гриб - чага	3000
морская капуста - слоевища	5000
морская капуста шинкованная	1000
морская капуста - порошок	400
Сырье животного происхождения:	
бадяга	150

Из средней пробы методом квартования выделяют аналитические пробы для определения:

- подлинности, измельченности и содержания примесей;
- влажности (аналитическую пробу для определения влажности отделяют сразу же после отбора средней пробы и упаковывают герметически);
- содержания золы и действующих веществ.

Примечание. Для таких видов сырья, как цельные травы, корни, корневища, клубни, после выделения аналитической пробы для определения подлинности, измельченности и содержания примесей часть средней пробы, предназначенную для определения влажности, содержания золы и действующих веществ, измельчают ножницами или секатором на крупные куски, тщательно перемешивают и затем выделяют соответствующие аналитические пробы.

Масса аналитических проб должна соответствовать указанной в табл. 3.

Таблица 3

Наименование сырья	Масса аналитической пробы (г) для определения		
	подлинности, измельченности и содержания примесей	влажности	содержания золы и действующих веществ
Почки березовые	50	25	25
Почки сосновые	200	25	100
Листья цельные, кроме нижеперечисленных:	200	25	150
лист сенны	100	15	50
лист брусники, толокнянки	50	25	50
Листья резаные, обмолоченные	5	25	100
Цветки, кроме нижеперечисленных:	200	25	50
цветки полыни цитварной	25	15	50

цветки ноготков, кукурузные столбики с рыльцами	100	25	50
цветки бузины черной	20	15	25
цветки ромашки аптечной	50	25	100
цветки ромашки далматской	300	25	50
Травы цельные, побеги, кроме нижеперечисленных:	300	50	200
трава душицы	25	15	50
побеги анабазиса	50	25	100
Травы резаные, обмолоченные	50	25	100
Сочные плоды, кроме нижеперечисленных:	100	50	50
плод шиповника	200	25	50
плод стручкового перца	300	25	150
Сухие плоды и семена, кроме нижеперечисленных:	200	25	50
семена дурмана индейского, термопсиса, льна	50	25	100
плоды амми и семена джута	10	25	100
Корни, клубни и корневища цельные, кроме нижеперечисленных:	300	50	200
корневища и корень марены, корневище лапчатки	200	50	100
клубни салепа	100	25	50
корневище и корень девясила	600	50	100
корневище мужского папоротника и корень ревеня	1000	100	300
корень мыльный туркестанский	10 000	200	-
корень солодки неочищенный, корень барбариса	5000	100	500
корень солодки очищенный	2000	100	200
Корни и корневища резаные, дробленые	100	25	100
Корни и корневища в порошке	50	15	25
Кора цельная	400	50	100
Кора резаная	100	25	50
Прочее растительное сырье:			
ликоподий	50	25	25
рожки спорыньи	50	25	100
березовый гриб - чага	2000	500	100
морская капуста - слоевище	3000	500	1000
морская капуста шинкованная	500	100	300
морская капуста - порошок	100	50	200
Сырье животного происхождения:			
бадяга	100	25	-

Примечание. Масса средней и аналитической проб для свежего лекарственного растительного сырья указана в соответствующей нормативно - технической документации.

Если при выделении аналитических проб в двух противоположных треугольниках масса сырья окажется меньше или больше указанной в табл. 3, следует из оставшихся двух треугольников отделить сырье по всей толщине слоя и добавить недостающую часть или таким же образом удалить его из отобранных треугольников.

Аналитические пробы должны быть взвешены с погрешностью +/-:

0, 01 - при массе пробы до 50 г;

0, 1 - при массе пробы от 100 до 500 г;

1, 0 - при массе пробы от 500 до 1000 г;

5, 0 - при массе пробы более 1000 г.

При установлении в результате испытаний несоответствия качества сырья требованиям нормативно - технической документации проводят его повторную проверку. Для повторного анализа от невскрытых единиц продукции отбирают выборку в соответствии с табл. 1. Результаты повторного анализа являются окончательными и распространяются на всю партию.

Примечание. Указанная статья не распространяется на правила приемки и методы отбора корня женьшеня.

Отбор проб фасованной продукции

Лекарственное растительное сырье расфасовывается в пачки и полиэтиленовые пакеты в цельном, резаном, дробленом, порошкованном, резано - прессованном виде, а также в форме брикетов и сигарет для использования в качестве лекарственных средств.

Приемку фасованной продукции проводят сериями. Серией считается определенное количество (не более 10 т) однородной продукции, выпущенной в течение 1 сут и сопровождаемой одним документом, удостоверяющим его качество. Серия формируется из одной или нескольких партий сырья (но не более 3), предварительно смешанных.

Единицы продукции в выборку необходимо отбирать из разных мест контролируемой серии.

Объем выборки зависит от объема серии и указан в табл. 4.

Таблица 4

Количество транспортных единиц продукции в серии	Объем выборки
1-5	Все единицы
6-50	5 единиц
Свыше 50	Одна транспортная единица продукции от каждых 10 единиц, составляющих серию, для лекарственного растительного сырья, расфасованного в пачки и полиэтиленовые пакеты в цельном, резаном, дробленом виде, в виде порошка, в форме брикетов и сигарет. Одна транспортная единица от каждых 20 единиц для лекарственного растительного сырья, расфасованного в резано - прессованном виде

Примечание. Неполные 10 или 20 транспортных единиц приравнивают к 10 или 20 единицам соответственно.

Отбор проб. Попавшие в выборку транспортные единицы продукции (ящики) вскрывают и из разных мест каждого вскрытого ящика отбирают по 2 фасовочные единицы (потребительские упаковки) лекарственного растительного средства. Из выборки, представленной 1-4 транспортными единицами, отбирают 10 фасовочных единиц. Отобранные фасовочные единицы готовой продукции составляют объединенную пробу.

ОТБОР СРЕДНЕЙ И АНАЛИТИЧЕСКИХ ПРОБ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СРЕДСТВА. 1. Фасованное в цельном, резаном, дробленом виде и в виде порошка. Отобранные упаковки объединенной пробы вскрывают, содержимое высыпают на гладкую чистую ровную поверхность, тщательно перемешивают и методом квартования выделяют среднюю пробу. Масса средней пробы указана в табл. 2.

Из средней пробы методом квартования выделяют аналитические пробы. Масса аналитических проб указана в табл. 3.

Масса средней и аналитических проб для сырья, расфасованного в виде порошка, указана в табл. 2 и 3, как предусмотрено для сырья резаного и дробленого.

2. Фасованное в резано - прессованном виде. Из объединенной пробы берут 5 упаковок для определения содержания измельченных кусочков и осыпи. Остальные единицы упаковки вскрывают, содержимое высыпают, перемешивают и методом квартования выделяют среднюю пробу массой 100 г. Из средней пробы методом квартования выделяют 3 аналитические пробы: для определения подлинности и распадаемости - 25 г, для определения влажности (потери в массе при высушивании) - 25 г, для определения золы и действующих веществ - 50 г.

3. Фасованное в форме брикета. Брикеты объединенной пробы раскладывают в один слой, затем произвольно из разных мест берут 20 брикетов (средняя проба), из них 10 брикетов используют для определения размеров брикета и массы, а 10 других брикетов - для определения содержания осыпи. После определения осыпи эти 10 брикетов разрушают, тщательно перемешивают и методом квартования выделяют аналитические пробы.

Масса аналитических проб указана в табл. 3.

В случае, если объединенная проба состоит из 10 брикетов, 5 брикетов используют для определения размеров брикета и массы, а 5 других - для определения осыпи и выделения аналитических проб.

4. Сигареты. Пачки объединенной пробы раскладывают в один слой и произвольно из разных мест отбирают 10 пачек (средняя проба); 5 пачек используют для определения массы и измельченности, а 5 других пачек после разрушения сигарет - для выделения аналитических проб.

Масса аналитических проб указана в табл. 3, как предусмотрено для листьев резаных и обмолоченных.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОДЛИННОСТИ, ИЗМЕЛЬЧЕННОСТИ И СОДЕРЖАНИЯ ПРИМЕСЕЙ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Подлинность сырья, измельченность и содержание примесей определяют в аналитической пробе, масса которой для каждого вида сырья приведена в табл. 3.

Определение подлинности

Подлинность сырья устанавливают по внешним признакам, анатомо - диагностическим признакам при микроскопическом исследовании и качественным реакциям в соответствии с требованиями нормативно - технической 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

Пробу сырья помещают на сито, указанное в соответствующей нормативно - технической 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, порошкованного 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 погрешностью +/- 0,1 г при массе аналитической пробы свыше 100 г и +/- 0,05 г при массе аналитической пробы 100 г и менее.

Допустимая норма содержания измельченных частиц для каждого вида сырья указана в соответствующей нормативно - технической документации.

Определение содержания примесей

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 нормативно - технической 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 +/-0,1 г при массе аналитической пробы более 100 г и с погрешностью +/-0,05 г при массе аналитической пробы 100 г и менее.

Содержание каждого вида примеси в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m1 \times 100}{m2},$$

где m1 - масса примеси в граммах; m2 - масса аналитической пробы сырья в граммах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ ЗАРАЖЕННОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ АМБАРНЫМИ ВРЕДИТЕЛЯМИ

Исследование на наличие амбарных вредителей проводят в обязательном порядке при приемке лекарственного растительного сырья, а также ежегодно при хранении.

Сырье проверяют на наличие живых и мертвых вредителей путем осмотра невооруженным глазом и с помощью лупы (5 - 10X) при внешнем осмотре, а также при определении измельченности и содержания примесей. При этом обращают внимание на наличие частей сырья, поврежденных амбарными вредителями. Кроме сырья, тщательно просматривают швы, складки упаковочного материала, щели в ящиках. При обнаружении в сырье амбарных вредителей определяют степень его зараженности, используя специально выделенную аналитическую пробу <*>.

<*> См. с. 267.

Аналитическую пробу сырья просеивают сквозь сито с размером отверстий 0,5 мм. В сырье, прошедшем сквозь сито, проверяют наличие клещей; в сырье, оставшемся на сите, - наличие моли, точильщика и их личинок и других живых и мертвых вредителей. Количество клещей подсчитывают, используя лупу, моли, ее личинок, куколок и других вредителей - невооруженным глазом и с помощью лупы. Количество найденных вредителей и их личинок пересчитывают на 1 кг сырья и устанавливают степень его зараженности.

При наличии в 1 кг сырья не более 20 клещей [клещ мучной (Tyroglyphus farinae L.), клещ волосатый (Glyciphagus destructor Schrank.), клещ хищный (Cheyletus eruditus Schrank.), сухофруктовый клещ (Carpoglyphus lactis L.) и др.] зараженность сырья клещом относят к I степени; при наличии более 20 клещей, свободно передвигающихся по поверхности сырья и не образующих сплошных масс, - ко II степени; если клещей много, они образуют сплошные войлочные массы, движение их затруднено - к III степени.

При наличии в 1 кг сырья амбарной моли (Tinea granella L.) и ее личинок, а также хлебного точильщика (Sidotrepa panicea L.) и других вредителей в количестве не более 5 зараженность сырья относят к I степени; при наличии 6-10 вредителей - ко II степени, более 10 вредителей - к III степени.

В случае обнаружения в лекарственном растительном сырье амбарных вредителей его подвергают дезинсекции, после чего просеивают сквозь сито с размером отверстий 0,5 мм (при зараженности клещами) или с диаметром отверстий 3 мм (при зараженности другими вредителями).

После обработки сырье используют в зависимости от степени зараженности. При I степени зараженности сырье может быть допущено к медицинскому применению, при II степени и в исключительных случаях при III степени зараженности сырье может быть использовано для переработки с целью получения индивидуальных веществ.

ТЕХНИКА МИКРОСКОПИЧЕСКОГО И МИКРОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Техника приготовления микроскопических препаратов из лекарственного растительного сырья разнообразна и зависит от морфологической группы исследуемого объекта, а также от состояния сырья - цельного, дробленого, резаного или порошкообразного.

Листья, травы, цветки

Цельное и резаное сырье. При исследовании цельного сырья берут кусочки пластинки листа с краем и жилкой; у трав берут лист, иногда также кусочек стебля и цветок, у цветков - чашечку и венчик. При исследовании резаного сырья берут по нескольку различных кусочков.

Просветление можно проводить двумя способами.

I. Несколько кусочков сырья помещают в колбу или пробирку, прибавляют 5% раствор едкого натра, разведенный водой (1:1), и кипятят в течение 1-2 мин. Затем содержимое выливают в чашку Петри (или фарфоровую), жидкость сливают и сырье тщательно промывают водой. Из воды кусочки сырья вынимают скальпелем или лопаточкой и помещают на предметное стекло в каплю раствора хлоралгидрата или глицерина.

II. Кусочки кипятят в растворе хлоралгидрата, разведенного водой (1:1), в течение 5-10 мин (до просветления). Просветленный кусочек сырья помещают на предметное стекло в каплю раствора хлоралгидрата или глицерина, разделяют скальпелем или препаровальной иглой на две части, одну из них осторожно переворачивают. Объект накрывают покровным стеклом, слегка подогревают до удаления пузырьков воздуха и после охлаждения рассматривают лист с обеих сторон под микроскопом сначала при малом, затем при большом увеличении. При приготовлении микропрепаратов из толстых листьев их предварительно раздавливают скальпелем.

Для исследования стеблей их отрезки кипятят в 5% растворе едкого натра, тщательно промывают водой, снимают эпидермис скальпелем или препаровальными иглами и рассматривают его с поверхности; из остальных тканей готовят препарат, раздавливая объект скальпелем на предметном стекле в растворе хлоралгидрата или глицерина.

При необходимости приготовления поперечных срезов листьев и стеблей их кипятят в растворе хлоралгидрата в течение 10 мин и делают срезы, зажимая кусочки листа в пробку или сердцевину бузины. Готовые срезы помещают в воду и далее используют для приготовления микропрепаратов, рассматривая их в растворе хлоралгидрата.

Порошок. На предметное стекло наносят 1-2 капли раствора хлоралгидрата и небольшое количество исследуемого порошка. Порошок берут кончиком препаровальной иглы, смоченной хлоралгидратом, тщательно размешивают, закрывают покровным стеклом и нагревают до удаления пузырьков воздуха. Затем стекло слегка придавливают ручкой препаровальной иглы, выступившую по краям жидкость удаляют полоской фильтровальной бумаги. Порошки кожистых листьев просветляют кипячением в 5% растворе едкого натра.

Плоды, семена

Цельное сырье. Готовят препараты кожуры семени и околоплодника с поверхности или поперечные срезы.

Препараты кожуры и околоплодника с поверхности. 2-3 семени или плода кипятят в пробирке в растворе 5% едкого натра в течение 2-3 мин и тщательно промывают водой. Объект помещают на предметное стекло, препаровальными иглами отделяют кожуру семени или ткани околоплодника и рассматривают их в растворе хлоралгидрата или глицерина.

Срезы. Для приготовления срезов сухие плоды и семена предварительно размягчают, поместив их на сутки во влажную камеру (влажной камерой служит эксикатор с водой, в которую добавлено несколько капель хлороформа) или водяным паром в течение 15-30 мин или более в зависимости от твердости объекта.

Мелкие плоды и семена запаивают в парафиновый блок размером 0,5 X 0,5 X 1,5 см. Кончиком нагретой препаровальной иглы расплавляют парафин и в образовавшуюся ямку быстро погружают объект. Поверхность объекта должна быть сухой. Срезы объекта делают вместе с парафином; срезы выбирают из парафина препаровальной иглой, смоченной жидкостью, и готовят микропрепараты в растворе глицерина или хлоралгидрата.

Порошок. Готовят несколько микропрепаратов для выявления диагностических элементов кожуры семени и околоплодника и содержимого эндосперма или зародыша. Препарат готовят так же, как указано в разделе "Листья, травы, цветки". В качестве просветляющей жидкости используют раствор хлоралгидрата или 50% раствор едкого натра.

Крахмал. Готовят два препарата - в растворе йода (раствор Люголя) и в воде; от йода крахмальные зерна окрашиваются в синий цвет. В воде определяют их форму, строение, размеры крахмальных зерен измеряют окулярным микрометром.

Жирное и эфирное масло. Для обнаружения жирного и эфирного масла готовят препарат в растворе судана III и подогревают; капли жирного или эфирного масла окрашиваются в оранжево - розовый цвет.

Слизь. Для обнаружения слизи готовят препарат порошка в растворе черной туши и тотчас рассматривают под микроскопом (малое увеличение); слизь заметна в виде бесцветных масс на черном фоне.

При исследовании строения клеток кожуры и околоплодника в порошке из плодов и семян, содержащих крахмал или незначительное количество жирного масла, препарат готовят в растворе хлоралгидрата при легком подогревании. При необходимости порошок обезжиривают и просветляют.

Для обезжиривания порошок сырья помещают в пробирку с притертой пробкой и заливают 2-3 раза смесью спирта с эфиром (1:3) и после настаивания каждый раз в течение 20 мин растворитель сливают. Вместо смеси спирта с эфиром для обезжиривания можно использовать ксилол или эфир.

Для просветления 0,5-1 г порошка насыпают в фарфоровую чашку, прибавляют 5-10 мл разведенной азотной кислоты и кипятят в течение 1 мин, затем жидкость процеживают через ткань и порошок промывают горячей водой. Остаток на ткани собирают лопаточкой обратно в фарфоровую чашку, обливают 5-10 мл 5% раствора едкого натра, кипятят в течение 1 мин, снова процеживают через ту же ткань и промывают горячей водой. После этого порошок рассматривают в растворе глицерина под микроскопом.

Кора

Цельное сырье. Готовят поперечные или продольные срезы коры. Кусочки коры размером 2-3 X 0,5-1 см кипятят в колбе или пробирке с водой в течение 5 мин. Размягченные куски выравнивают скальпелем так, чтобы они имели строго поперечное или продольное сечение. Делают срезы и готовят микропрепараты в растворе хлоралгидрата или глицерина. При необходимости готовят препараты в соответствующих реактивах для выявления различных структур или веществ.

Одревесневшие (лигнифицированные) элементы. К срезу на предметном стекле прибавляют несколько капель раствора флороглюцина и 1 каплю 25% раствора серной кислоты. Через минуту жидкость отсасывают полоской фильтровальной бумаги, срез заключают в раствор хлоралгидрата или глицерина и закрывают покровным стеклом (рассматривают без подогревания); одревесневшие механические элементы окрашиваются в малиново - красный цвет.

Для окраски одревесневших элементов можно использовать также раствор сафранина. Срезы помещают в 1% раствор сафранина в 50% спирте на 30 мин (в закрытом бюксе или на часовом стекле), промывают сначала 50% спиртом, затем подкисленным спиртом (на 100 мл спирта прибавляют 2 капли концентрированной хлористоводородной кислоты) и заключают на предметном стекле в глицерин. Одревесневшие оболочки окрашиваются в красный цвет.

Крахмал. Для обнаружения крахмала делают соскоб с сухой коры и рассматривают его в растворе Люголя. Крахмальные зерна окрашиваются в синий цвет.

Дубильные вещества. Наличие дубильных веществ устанавливают, нанося 1 каплю раствора железоаммониевых квасцов или хлорида окисного железа на внутреннюю поверхность сухой коры; появляется черно - синее или черно - зеленое окрашивание.

Производные антрацена. Наличие производных антрацена определяют, нанося 1-2 капли раствора едкого натра на внутреннюю поверхность коры (кроваво - красное окрашивание), или проводят микросублимацию описанным ниже способом.

Резаное сырье. Соскоб коры или мелкие кусочки кипятят в течение 3-5 мин в 5% растворе едкого натра, промывают водой и готовят микропрепараты, раздавливая объект скальпелем в растворе глицерина или хлоралгидрата.

Одревесневшие элементы определяют по реакции, описанной для цельного сырья.

Наличие крахмала, дубильных веществ, производных антрацена определяют в соскобе сухой коры.

Порошок. Готовят несколько микропрепаратов для выявления диагностических элементов коры (в растворе хлоралгидрата) и содержащихся в ней веществ.

Одревесневшие (лигнифицированные) элементы. На предметное стекло помещают около 0,1 г порошка, прибавляют 1-2 капли раствора флороглюцина, 1 каплю 25% раствора серной кислоты и закрывают покровным стеклом. Затем с одной стороны наносят 1-2 капли раствора хлоралгидрата, а с противоположной - отсасывают жидкость фильтровальной бумагой. Одревесневшие механические элементы окрашиваются в малиново - красный цвет.

Производные антрацена (реакция микросублимации). На предметное стекло ставят трубку диаметром 1,5 см и высотой 2 см. Внутрь стеклянной трубки помещают небольшое количество испытуемого порошка (или соскоба), сверху накрывают другим предметным стеклом, ставят на асбестовую сетку, закрепленную в штативе, и подогревают. Пламя горелки следует держать от предметного стекла на расстоянии 5-7 см. На поверхность стекла, которое служит для улавливания сублимата, помещают кусочки фильтровальной бумаги и смачивают время от времени холодной водой. Через некоторое время на нижней стороне стекла появляется налет. Под микроскопом в сублимате видны тонкие желтые иголочки, которые в ультрафиолетовом свете (люминесцентный микроскоп) имеют яркое желтое или оранжево - красное свечение. В 5% спиртовом растворе едкого кали сублимат растворяется с красным окрашиванием.

Корни, корневища, клубни, луковицы, клубнелуковицы

Цельное сырье. Готовят поперечные и продольные срезы. Небольшие куски подземных органов помещают в холодную воду и выдерживают около суток, затем помещают в смесь 95% спирта и глицерина (1:1) на 3 сут. Размоченные объекты выравнивают скальпелем так, чтобы они имели строго поперечное или продольное сечение. Делают срезы и готовят микропрепараты в растворе хлоралгидрата или глицерина и рассматривают диагностические признаки сначала при малом, затем при большом увеличении.

С соскобом сухих подземных органов или порошком проводят необходимые микрохимические реакции.

Наличие одревесневших элементов, крахмала, слизи, жирного и эфирного масла, дубильных веществ, производных антрацена определяют, как указано в разделах "Плоды и семена" и "Кора".

Инулин. Для обнаружения инулина на предметное стекло помещают около 0,1 г порошка, 1-2 капли раствора альфа - нафтола (резорцина или тимола) и 1 каплю концентрированной серной

кислоты; появляется красновато - фиолетовое окрашивание (от резорцина и тимола - оранжево - красное). О наличии инулина можно делать выводы только при отсутствии крахмала.

Резаное или дробленое сырье. Кусочки подземных органов кипятят в течение 3-5 мин в 5% растворе едкого натра, тщательно промывают водой и готовят микропрепараты, раздавливая кусочки в растворе глицерина или хлоралгидрата.

С соскобом или порошком подземных органов проводят микрохимические реакции, как указано в разделе "Кора".

Порошок. Готовят несколько препаратов для выявления диагностических элементов подземных органов (в растворе хлоралгидрата) и содержащихся в них веществ.

Наличие одревесневших элементов, крахмала, слизи, жирного и эфирного масла, дубильных веществ и производных антрацена определяют, как указано в разделах "Плоды и семена" и "Кора".

ЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Метод люминесцентной микроскопии применяется (где это целесообразно) для определения подлинности лекарственного растительного сырья. Преимуществом метода является возможность его применения для изучения сухого растительного материала, из которого готовят толстые срезы или препараты порошка, и рассматривают их в падающем свете, при освещении препарата сверху, через опак - иллюминатор или объектив.

Люминесцентная микроскопия выполняется с помощью люминесцентных микроскопов или обычных биологических микроскопов, снабженных специальными люминесцентными осветителями.

Приготовление микропрепаратов. Для приготовления микропрепаратов используют сухое лекарственное растительное сырье или его порошок. Предварительное размачивание сырья исключается, так как это приводит к вымыванию веществ из клеток; допускается лишь непродолжительное размягчение во влажной камере.

Листья. Готовят обычно препараты из порошка листьев, которые рассматривают без включающей жидкости. Наиболее яркая люминесценция характерна для одревесневших элементов - сосудов жилки, механических волокон, а также для кутикулы и кутинизированных оболочек различных эпидермальных образований (волосков, железок и др.). В эпидермальных клетках часто содержатся флавоноиды, обусловливающие коричневую, желтую или зеленовато - желтую люминесценцию. Клетки мезофила содержат различные включения - желтые, голубые, зеленовато - желтые, коричневые - в зависимости от их химического состава. Хлорофилл в высушенном растительном материале не люминесцирует. Кристаллы оксалата кальция также не обладают люминесценцией.

При необходимости приготовления среза лист предварительно размягчают во влажной камере и с помощью бритвы делают толстый срез (2-3 мм), который закрепляют на предметном стекле пластилином. Более тонкие срезы помещают во включающую жидкость и накрывают покровным стеклом.

В качестве включающей жидкости используют воду, глицерин, 5% раствор поливинилового спирта, нефлюоресцирующее вазелиновое масло. Включающая жидкость не должна растворять содержащиеся в препарате люминесцирующие вещества.

Травы. При анализе трав готовят микропрепараты листьев. При необходимости приготовления препарата стебля его размягчают во влажной камере и готовят срезы. Толстые срезы (2-3 мм) закрепляют на предметном стекле с помощью пластилина и рассматривают без включающей жидкости, тонкие - помещают в подходящую жидкость и накрывают покровным стеклом. Наиболее яркую люминесценцию имеют одревесневшие элементы проводящих пучков - сосуды и механические волокна, склеренхимные клетки, встречающиеся в коре и сердцевине стебля. В клетках эпидермиса и коры часто встречаются флавоноиды; у некоторых видов сырья в клетках обкладки, вокруг проводящих пучков содержатся алкалоиды, которые обладают разнообразным свечением: синим, голубым, зеленым, зеленовато - желтым, золотисто - желтым, оранжево - красным в зависимости от состава.

Цветки. Чаще готовят препараты из порошка цветков или отдельных частей цветка (соцветия), которые рассматривают обычно без включающей жидкости. В цветках часто содержатся флавоноиды, каротиноиды и другие вещества, обладающие флюоресценцией. Отчетливо видны пыльцевые зерна, имеющие желтое, зеленовато - желтое или голубоватое свечение.

Плоды. Готовят обычно поперечные срезы плода после предварительного размягчения во влажной камере и рассматривают во включающей жидкости или без нее в зависимости от толщины среза. Для плодов характерна люминесценция тканей околоплодника (экзокарпия, механических клеток мезокарпия, проводящих пучков). Отчетливо видны секреторные каналы - ярко светится их содержимое; клетки выстилающего слоя обычно имеют желтовато - коричневую

люминесценцию. В содержимом каналов нередко видны ярко люминесцирующие кристаллические включения, чаще всего желтого или желто - зеленого цвета.

Семена. Готовят обычно поперечные срезы семени после предварительного размягчения во влажной камере и рассматривают их во включающей жидкости или без нее в зависимости от толщины среза. Обращают внимание на характер люминесценции семенной кожуры, в которой отчетливо выделяются склеренхимные слои. Клетки эпидермиса, содержащие слизь, обычно имеют сине - голубое свечение. Эндосперм и ткани зародыша, богатые жирным маслом, характеризуются голубой люминесценцией.

Кора. Кору предварительно размягчают во влажной камере, готовят толстые поперечные срезы (до 3-5 мм), которые закрепляют на предметном стекле пластилином, и рассматривают без включающей жидкости; тонкие срезы заключают в жидкость. Для некоторых видов сырья характерна люминесценция пробкового слоя коры: оболочки клеток пробки светятся интенсивно - синим, их содержимое - темно - красным (антоцианы). Яркое и разнообразное свечение имеют механические элементы (лубяные волокна и каменистые клетки): голубое, зеленовато - голубое, желтовато - зеленое. Люминесценция паренхимы коры зависит от химического состава. Антраценпроизводные обусловливают яркое оранжевое или огненно - оранжевое свечение. Дубильные вещества обладают свойством "тушить" люминесценцию, поэтому ткани, содержащие дубильные вещества, темно - коричневого, почти черного, цвета.

Препарат, приготовленный из порошка коры или соскоба, рассматривают без включающей жидкости. В нем наиболее ярко видны механические элементы.

Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы. Готовят поперечные срезы, распилы, препараты порошка или соскоба. Срезы готовят из материала, предварительно размягченного во влажной камере, распилы (из толстых корней и корневищ) - из сухого материала с помощью тонкой пилы или фрезы. С помощью бритвы с поверхности распила снимают тонкий слой для удаления слоя клеток, покрытых пылью. Толстые срезы и распилы (до 3- 5 мм) закрепляют на предметном стекле пластилином и рассматривают без включающей жидкости. Слой пробки у подземных органов обычно тусклый, почти черный. Ярко люминесцируют древесина (у корней и корневищ) и проводящие пучки, а также склеренхимные элементы. Их свечение очень разнообразно: от буровато - зеленого, желто - зеленого до светло - голубого и интенсивно - синего в зависимости от вида сырья. Еще более разнообразна люминесценция паренхимы тканей и различных секреторных образований (вместилищ, каналов, ходов, млечников, различных идиобластов), что определяется их химическим составом. В секреторных образованиях встречаются кристаллические включения кумаринов, алкалоидов, флавоноидов, обладающие яркой люминесценцией.

В препаратах порошка видны отдельные сосуды, группы механических волокон, каменистые клетки, отдельные секреторные образования или их обрывки, ярко люминесцирующие клетки паренхимы, содержащие те или иные вещества.

Препараты в люминесцентном микроскопе рассматривают в ультрафиолетовом свете, наблюдая первичную (собственную) люминесценцию.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛАЖНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Под влажностью сырья понимают потерю в массе за счет гигроскопической влаги и летучих веществ, которую определяют в сырье при высушивании до постоянной массы.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц около 10 мм, перемешивают и берут две навески массой 3-5 г, взвешенные с погрешностью +/- 0,01 г. Каждую навеску помещают в предварительно высушенную и взвешенную вместе с крышкой бюксу и ставят в нагретый до 100-105 град. С сушильный шкаф. Время высушивания отсчитывают с того момента, когда температура в сушильном шкафу вновь достигнет 100- 105 град. С. Первое взвешивание листьев, трав и цветков проводят через 2 ч, корней, корневищ, коры, плодов, семян и других видов сырья - через 3 ч.

Высушивание проводят до постоянной массы. Постоянная масса считается достигнутой, если разница между двумя последующими взвешиваниями после 30 мин высушивания и 30 мин охлаждения в эксикаторе не превышает 0,01 г.

Определение потери в массе при высушивании для пересчета количества действующих веществ и золы на абсолютно сухое сырье проводят в навесках 1-2 г (точная навеска), взятых из аналитической пробы, предназначенной для определения содержания золы и действующих веществ вышеописанным методом, но при разнице между взвешиваниями, не превышающей 0,0005 г.

Влажность сырья (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m - m1)100}{},$$

m

где m - масса сырья до высушивания в граммах; m1 - масса сырья после высушивания в граммах.

За окончательный результат определения принимают среднее арифметическое двух параллельных определений, вычисленных до десятых долей процента. Допускаемое расхождение между результатами двух параллельных определений не должно превышать 0,5%.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Около 2 г (точная навеска) измельченного сырья, просеянного сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, заливают 250 мл нагретой до кипения воды и кипятят с обратным холодильником на электрической плитке с закрытой спиралью в течение 30 мин при периодическом перемешивании. Жидкость охлаждают до комнатной температуры и процеживают около 100 мл в коническую колбу вместимостью 200-250 мл через вату так, чтобы частицы сырья не попали в колбу. Затем отбирают пипеткой 25 мл полученного извлечения в другую коническую колбу вместимостью 750 мл, прибавляют 500 мл воды, 25 мл раствора индигосульфокислоты и титруют при постоянном перемешивании раствором перманганата калия (0,02 моль/л) до золотисто - желтого окрашивания.

Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл раствора перманганата калия (0,02 моль/л) соответствует 0,004157 г дубильных веществ в пересчете на танин.

Содержание дубильных веществ (X) в процентах в пересчете на абсолютное сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V - V1) \times 0{,}004157 \times 250 \times 100 \times 100}{m \times 25 \times (100 - W)},$$

где V - объем раствора перманганата калия (0,02 моль/л), израсходованного на титрование извлечения, в миллилитрах; V1 - объем раствора перманганата калия (0,02 моль/л), израсходованного на титрование в контрольном опыте, в миллилитрах; 0,004157 - количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора перманганата калия (0,02 моль/л) (в пересчете на танин), в граммах; m - масса сырья в граммах; W - потеря в массе при высушивании сырья в процентах; 250 - общий объем извлечения в миллилитрах; 25 - объем извлечения, взятого для титрования, в миллилитрах.

OLEA AETHEREA
МАСЛА ЭФИРНЫЕ

Эфирные масла представляют собой смеси душистых веществ, относящихся к различным классам органических соединений, преимущественно к терпеноидам, реже ароматическим или алифатическим соединениям.

Эфирные масла получают обычно из растительного сырья путем дистилляции с водой или водяным паром, а также экстракцией органическими растворителями, прессованием и другими способами.

Описание. Бесцветные или окрашенные прозрачные жидкости, чаще желтоватого цвета, со специфическим запахом и вкусом. Как правило, эфирные масла легче воды.

Под влиянием воздуха и света многие эфирные масла, постепенно окисляясь, изменяют запах и цвет (темнеют). Некоторые эфирные масла при хранении загустевают.

Растворимость. Мало растворимы, очень мало растворимы или практически нерастворимы в воде; легко растворимы или растворимы в спирте, эфире и других органических растворителях.

В спирте различной концентрации (указанной в соответствующей нормативно - технической документации) растворимость определяют следующим образом: в мерный цилиндр вместимостью 10 мл наливают 1 мл масла и постепенно приливают из бюретки при тщательном взбалтывании по 0,1 мл спирта определенной концентрации при 20 град. С до полного растворения масла.

Подлинность. Цвет и прозрачность определяют, поместив 10 мл масла в цилиндр из прозрачного бесцветного стекла диаметром 2-3 см, наблюдая в проходящем свете. Запах определяют, нанося около 0,1 мл (2 капли) масла на полоску фильтровальной бумаги длиной 12 см и шириной 5 см так, чтобы масло не смачивало края бумаги, и сравнивают запах испытуемого образца через каждые 15 мин с запахом контрольного образца, нанесенного таким же образом на фильтровальную бумагу. В течение 1 ч запах должен быть одинаков с запахом контрольного образца. Вкус определяют, прикладывая к языку полоску фильтровальной бумаги с нанесенной на

нее каплей масла, или смешивают 1 каплю эфирного масла с 1 г сахарной пудры и пробуют на язык.

Посторонние примеси. Спирт. 2-3 капли эфирного масла наносят на воду, налитую на часовое стекло, и наблюдают на черном фоне; не должно быть заметного помутнения вокруг масла. 1 мл масла наливают в пробирку, закрывают ее рыхлым комочком ваты, в середину которого помещен кристаллик фуксина, и подогревают до кипения; не должно быть фиолетово - розового окрашивания ваты.

Жирные и минеральные масла. 1 мл эфирного масла взбалтывают в пробирке с 10 мл спирта; не должно наблюдаться помутнения и капель жирного масла.

Вода. Содержание воды определяют методом дистилляции <*>.

<*> См. с. 176

Числовые показатели. Температуру затвердевания определяют по изложенной выше методике <*>, при этом высота слоя масла должна быть не менее 5 см.

<*> См. с. 20.

Плотность определяют с помощью пикнометра <*>. Угол вращения плоскости поляризации определяют в поляриметре <**>.

<*> См. с. 24.

<**> См. с. 30.

Показатель преломления определяют рефрактометром <*>.

<*> См. с. 29.

Кислотное число определяют в навеске 1,5-2 г масла, взятой с погрешностью +/- 0,01 г и растворенной в 5 мл нейтрализованного спирта <*>.

<*> См. с. 191.

Эфирное число, обозначающее количество миллиграммов едкого кали, пошедшее на омыление сложных эфиров, содержащихся в 1 г эфирного масла, определяют в растворе, полученном после определения кислотного числа. К этому раствору прибавляют 20 мл спиртового раствора едкого кали (0,5 моль/л) и нагревают на водяной бане в колбе с воздушным холодильником (диаметр трубки 1 см, длина 100 см) в течение 1 ч, считая с момента закипания. Затем раствор разбавляют 100 мл воды и избыток едкого кали оттитровывают раствором серной кислоты (0,25 моль/л) (индикатор - фенолфталеин).

Эфирное число (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{28{,}05V}{m},$$

где V - объем спиртового раствора едкого кали (0,5 моль/л), израсходованного на омыление эфиров, в миллилитрах; m - навеска масла в граммах; 28,05 - количество миллиграммов едкого кали, содержащихся в 1 мл спиртового раствора едкого кали (0,5 моль/л).

Эфирное число используют для вычисления содержания сложных эфиров или связанных спиртов в процентах (X1) по формуле:

$$X1 = \frac{XM100}{56{,}1 \times 1000} = \frac{XM}{561},$$

где X - эфирное число; M - молекулярная масса эфира или спирта; 56,1 - молекулярная масса едкого кали.

Эфирное число после ацетилирования обозначает количество миллиграммов едкого кали, необходимое для омыления суммы сложных эфиров, содержащихся первоначально в 1 г масла и образовавшихся при ацетилировании.

Определение проводят следующим образом: 10 г масла помещают в специальную колбу для ацетилирования с пришлифованным воздушным холодильником, приливают 10 мл уксусного ангидрида и прибавляют около 2 г безводного ацетата натрия. Смесь кипятят на песчаной бане в

течение 2 ч. После охлаждения прибавляют 20 мл воды и нагревают на водяной бане при частом взбалтывании в течение 15 мин. Затем смесь переносят в делительную воронку вместимостью 100 мл и отделяют слой масла. Масло 4-5 раз промывают при взбалтывании 50 мл насыщенного раствора хлорида натрия (до нейтральной реакции промывных вод) (индикатор - метиловый оранжевый), затем масло дважды промывают порциями воды по 20 мл для удаления следов хлорида натрия, обезвоживают безводным сульфатом натрия (около 3 г) и фильтруют.

1-2 г полученного масла (с точностью до 0,001 г) взвешивают в конической колбе, растворяют в 5 мл спирта, нейтрализуют спиртовым раствором едкого кали (0,5 моль/л) (индикатор - фенолфталеин) и определяют эфирное число, как описано выше.

Эфирное число после ацетилирования (X2) вычисляют по формуле:

$$X2 = \frac{28{,}05V1}{m1},$$

где V1 - объем раствора едкого кали (0,5 моль/л), израсходованного на омыление эфиров после ацетилирования, в миллилитрах; m1 - навеска в граммах; 28,05 - количество миллиграммов едкого кали, содержащихся в 1 мл спиртового раствора едкого кали (0,5 моль/л).

Содержание свободных спиртов (X3) в процентах вычисляют по формуле:

$$X3 = \frac{(X2 - X)M100}{56{,}1 \times 1000\left[1 - \frac{(X2 - X)42}{56{,}1 \times 1000}\right]} = \frac{(X2 - X)M}{561 - 0{,}42(X2 - X)},$$

где X - эфирное число; X2 - эфирное число после ацетилирования; M - молекулярная масса спирта; 56,1 - молекулярная масса едкого кали; $\left[1 - \frac{(X2 - X)42}{56{,}1 \times 1000}\right]$ - поправка на увеличение массы эфирного масла за счет присоединения ацетильного остатка с молекулярной массой 42.

Общее содержание спиртов выражается суммой связанных и свободных спиртов.

Содержание фенолов определяют следующим образом: в кассиеву колбу вместимостью 200-250 мл с шейкой, градуированной на 10 мл (с точностью до 0,1 мл), вносят пипеткой 5 мл испытуемого масла и 150 мл 5% раствора едкого натра и взбалтывают в течение 15 мин. Отстоявшееся масло вводят в градуированную шейку колбы прибавлением такого же раствора едкого натра. Через 1 ч отсчитывают количество не прореагировавшего масла.

Содержание фенолов (X4) в процентах вычисляют по формуле:

$$X4 = \frac{(5 - V2) \times 100}{5} = (5 - V2) \times 20,$$

где 5 - объем испытуемого масла в миллилитрах; V2 - количество масла, не прореагировавшего с 5% раствором едкого натра, в миллилитрах.

Температура масла при внесении в колбу и при отсчете должна быть одинаковой.

Упаковка. Эфирные масла упаковывают в тару стеклянную и металлическую. Особенности упаковки отдельных эфирных масел указаны в соответствующей нормативно - технической документации.

Хранение. В прохладном, защищенном от света месте.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЭФИРНОГО МАСЛА В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Определение содержания эфирного масла проводят путем его перегонки с водяным паром из растительного сырья с последующим измерением объема. Содержание масла выражают в объемно - весовых процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье.

Масса сырья, степень его измельчения, время перегонки, метод и возможные растворители указаны в соответствующей нормативно - технической документации на лекарственное растительное сырье.

Определение проводят одним из четырех описанных ниже методов. Сырье, содержащее эфирное масло, которое при перегонке претерпевает изменения, образует эмульсию, легко загустевает или имеет плотность, близкую к единице, анализируют методами 3 или 4.

Метод 1. Для определения эфирного масла используют прибор, изображенный на рис. 22 <*>. Навеску измельченного сырья помещают в широкогорлую круглодонную или плоскодонную колбу "а" вместимостью 1000 мл, приливают 300 мл воды и закрывают резиновой пробкой "б" с обратным шариковым холодильником "в". В пробке снизу укрепляют металлические крючки, на которые при помощи тонкой проволоки подвешивают градуированный приемник "г" так, чтобы конец холодильника находился над воронкообразным расширением приемника, не касаясь его. Приемник должен свободно помещаться в горле колбы, не касаясь стенок, и отстоять от уровня воды не менее чем на 50 мм. Цена деления градуированной части приемника 0,025 мл.

<*> Рис. 22. Прибор для определения содержания эфирного масла методом 1.

а - широкогорлая круглодонная или плоскодонная колба; б - резиновая пробка; в - обратный шариковый холодильник; г - градуированный приемник. (Рисунок не приводится).

Колбу с содержимым нагревают и кипятят в течение времени, указанного в соответствующей нормативно - технической документации на лекарственное растительное сырье.

Объем масла в градуированной части приемника замеряют после окончания перегонки и охлаждения прибора до комнатной температуры.

После 6-8 определений холодильник и градуированный приемник необходимо промыть последовательно ацетоном и водой.

Содержание эфирного масла в объемно - весовых процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \times 100 \times 100}{m(100 - W)},$$

где V - объем эфирного масла в миллилитрах; m - масса сырья в граммах; W - потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Метод 2. Для определения эфирного масла используют прибор, изображенный на рис. 23 <*>. Прибор для определения эфирного масла состоит из круглодонной колбы а вместимостью 1000 мл, паропроводной изогнутой трубки б, холодильника в, градуированной трубки приемника г, оканчивающейся внизу спускным краном д и сливной трубкой е. В верхней части приемника имеется расширение ж с боковой трубкой з, которая служит для внесения растворителя эфирного масла в дистиллят и сообщения внутренней части прибора с атмосферой. Колба и паропроводная трубка соединяются через нормальный шлиф. Градуированная трубка имеет цену деления 0,02 мл. Для заполнения прибора водой используется резиновая трубка "и" с внутренним диаметром 4,5-5 мм, длиной 450 мм и воронка к диаметром 30-40 мм.

<*> Рис. 23. Прибор для определения содержания эфирного масла методами 2 и 3.

а - круглодонная колба; б - паропроводная изогнутая трубка: в - холодильник; г - градуированная трубка приемника; д - спускной кран; е - сливная трубка; ж - расширение; з - боковая трубка; и - резиновая трубка; к - воронка. (Рисунок не приводится).

Перед каждым определением через прибор пропускают пар в течение 15-20 мин. После 6-8 определений прибор необходимо промыть последовательно ацетоном и водой.

Примечание. Допускается применение такого же разборного прибора, у которого паропроводная трубка б сочленена с холодильником через нормальный шлиф, а сливная трубка е заменена каучуковой.

Навеску измельченного сырья помещают в колбу, приливают 300 мл воды, колбу соединяют с паропроводной трубкой и заполняют водой градуированную и сливную трубки через кран при помощи резиновой трубки, оканчивающейся воронкой. Колбу с содержимым нагревают и кипятят с интенсивностью, при которой скорость стекания дистиллята составляет 60-65 капель в 1 мин в течение времени, указанного в соответствующей нормативно - технической документации на лекарственное растительное сырье.

Через 5 мин после окончания перегонки открывают кран, постепенно спуская дистиллят так, чтобы эфирное масло заняло градуированную часть трубки приемника, и еще через 5 мин замеряют объем эфирного масла.

Содержание эфирного масла в объемно - весовых процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \times 100 \times 100}{m(100 - W)},$$

где V - объем эфирного масла в миллилитрах; m - масса сырья в граммах; W - потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Метод 3. Для определения эфирного масла методом 3 используют прибор, изображенный на рис. 23. Навеску измельченного сырья помещают в колбу, приливают 300 мл воды, колбу соединяют с паропроводной трубкой и заполняют водой градуированную и сливную трубки через кран при помощи резиновой трубки, оканчивающейся воронкой. Затем через боковую трубку при помощи пипетки вливают в приемник около 0,5 мл декалина и точно замеряют его объем, опуская для этого уровень жидкости в градуированную часть трубки. Далее поступают, как описано в методе 2.

Содержание эфирного масла в объемно-весовых процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V - V1) \times 100 \times 100}{m(100 - W)},$$

где V - объем раствора масла в декалине в миллилитрах; V1 - объем декалина в миллилитрах; m - масса сырья в граммах; W - потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Метод 4. Для определения эфирного масла методом 4 используют прибор, изображенный на рис. 24 <*>.

<*> Рис. 24. Прибор для определения содержания эфирного масла методом 4.

а - круглодонная колба с коротким горлом; б - паропроводная трубка; в - холодильник; г - отстойник; д - термометр; е - градуированная трубка; ж - спускной кран; з - сливная трубка; и - резиновая трубка; к - воронка. (Рисунок не приводится).

Прибор состоит из круглодонной колбы с коротким горлом а вместимостью 1000 мл, паропроводной трубки б, холодильника в, отстойника г с термометром до 100 град. С д, ртутный шарик которого находится на уровне отверстия холодильника, градуированной трубки е с ценой деления 0,001 мл, спускного крана ж и сливной трубки з. Для заполнения прибора водой используется резиновая трубка "и" с внутренним диаметром 4,5 - 5 мм, длиной 450 мм и воронка к диаметром 30-40 мм.

Перед каждым определением через прибор пропускают пар в течение 15-20 мин. После 6-8 определений прибор последовательно промывают ацетоном и водой.

Навеску измельченного сырья помещают в колбу, прибавляют необходимое количество воды. Колбу соединяют с паропроводной трубкой и заполняют водой градуированную и сливную трубки через кран при помощи резиновой трубки, оканчивающейся воронкой, до тех пор, пока в нижней воронкообразной части отстойника не наберется слой воды высотой 8-12 мм. Во время перегонки этот уровень воды должен оставаться без изменения. Колбу с содержимым нагревают и кипятят в течение времени, указанного в нормативно - технической документации на лекарственное растительное сырье. Во время перегонки температура в отстойнике не должна превышать 25 град. С. Через 5 мин после окончания перегонки открывают кран, постепенно спуская дистиллят так, чтобы эфирное масло заняло градуированную часть трубки. Еще через 5 мин замеряют объем эфирного масла.

Содержание эфирного масла в объемно-весовых процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{V \times 100 \times 100}{m(100 - W)},$$

где V - объем эфирного масла в миллилитрах; m - масса сырья в граммах; W - потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Определение экстрактивных веществ в сырье проводят в случае отсутствия в нормативно - технической документации метода количественного определения действующих веществ.

Около 1 г измельченного сырья (тонкая навеска), просеянного сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещают в коническую колбу вместимостью 200-250 мл, прибавляют 50 мл растворителя, указанного в соответствующей нормативно-технической документации на лекарственное растительное сырье, колбу закрывают пробкой, взвешивают (с погрешностью +/- 0,01 г) и оставляют на 1 ч. Затем колбу соединяют с обратным холодильником, нагревают,

поддерживая слабое кипение, в течение 2 ч. После охлаждения колбу с содержимым вновь закрывают той же пробкой, взвешивают и потерю в массе восполняют растворителем. Содержимое колбы тщательно взбалтывают и фильтруют через сухой бумажный фильтр в сухую колбу вместимостью 150-200 мл. 25 мл фильтрата пипеткой переносят в предварительно высушенную при температуре 100-105 град. С до постоянной массы и точно взвешенную фарфоровую чашку диаметром 7-9 см и выпаривают на водяной бане досуха. Чашку с остатком сушат при температуре 100-105 град. С до постоянной массы, затем охлаждают в течение 30 мин в эксикаторе, на дне которого находится безводный хлорид кальция, и немедленно взвешивают.

Содержание экстрактивных веществ в процентах (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m \times 200 \times 100}{m1(100 - W)},$$

где m - масса сухого остатка в граммах; m1 - масса сырья в граммах; W - потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

ХРАНЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Лекарственное растительное сырье и лекарственные растительные средства необходимо хранить в упакованном в соответствии с требованиями нормативно - технической документации виде. Помещение для хранения должно быть сухим, чистым, хорошо вентилируемым, не зараженным амбарными вредителями, без прямого попадания солнечных лучей.

Раздельно по группам в изолированных помещениях хранят:

- ядовитое и сильнодействующее сырье;
- эфирномасличное сырье;
- плоды и семена.

Сырье хранят в штабелях на стеллажах. Расстояние между стеллажом и полом должно быть не менее 25 см, высота штабеля для плодов, семян и почек - не более 2,5 м, для листьев, цветков, трав - не более 4 м, для остальных видов - 4 м и более. Штабель должен быть размещен на расстоянии от стены не менее 60 см, промежутки между штабелями не менее 80 см. На каждый штабель прикрепляется этикетка размером 20X10 см с указанием:

- наименования сырья;
- наименования предприятия-отправителя;
- года и месяца сбора или заготовки;
- номера партии (серии);
- даты поступления.

Сырье при хранении необходимо ежегодно перекладывать, обращая внимание на наличие амбарных вредителей и на соответствие длительности хранения сроку годности, указанному в нормативно - технической документации. Помещение и стеллажи ежегодно должны подвергаться дезинфекции.

ТИТРОВАННЫЕ РАСТВОРЫ, РЕАКТИВЫ И ИНДИКАТОРЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ АНАЛИЗЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Титрованные растворы

Приготовление спиртового раствора едкого кали (0,5 моль/л). 1 мл раствора содержит 0,02805 г едкого кали.

35 г едкого кали растворяют в 20 мл воды в склянке с резиновой пробкой и доливают очищенным спиртом до 1 л. Раствор оставляют на 24 ч. Быстро сливают прозрачную жидкость с осадка в склянку с резиновой пробкой.

Очистку спирта проводят следующим образом: к 1 л 95% спирта прибавляют 10 г раздробленного едкого кали, смесь кипятят в течение 30 мин с обратным холодильником и спирт отгоняют.

Установка титра. Точно отмеривают из бюретки 25 мл раствора хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л), разбавляют 50 мл воды, приливают 2-3 капли раствора фенолфталеина и титруют приготовленным раствором едкого кали до слабо - розового окрашивания.

Поправочный коэффициент К вычисляют по следующей формуле:

$$K = \frac{V0 - K0}{V},$$

где V0 - объем раствора хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л) в миллилитрах; V - объем раствора едкого кали, израсходованного на титрование, в миллилитрах; К0 - поправочный коэффициент раствора хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л).

Приготовление раствора хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л). 1 мл раствора содержит 0,01823 г хлористого водорода.

42 мл концентрированной хлористоводородной кислоты (плотность 1,19) разбавляют водой до 1 л.

Установка титра. Около 5 г гидрокарбоната натрия взвешивают в платиновом тигле и нагревают до постоянной массы при 280-300 град. С на песчаной бане, перемешивая время от времени платиновой проволокой.

Около 0,7 г (точная навеска) полученного карбоната натрия растворяют в 100 мл воды в конической колбе вместимостью 250 мл, прибавляют 2 капли раствора метилового оранжевого и титруют приготовленным раствором хлористоводородной кислоты до появления розовато - оранжевого окрашивания.

Поправочный коэффициент К вычисляют по формуле:

$$K = \frac{a}{TV},$$

где а - навеска карбоната натрия в граммах; V - объем раствора хлористоводородной кислоты, израсходованного на титрование, в миллилитрах; Т = 0,02650.

Приготовление раствора серной кислоты (0,25 моль/л).
1 мл раствора содержит 0,02452 г серной кислоты.

Приготовление. Медленно и осторожно, при постоянном перемешивании, вливают 15 мл концентрированной серной кислоты (плотность 1,8300 - 1,8350) в 1020 мл воды.

Установка титра. Как описано при установке титра раствора хлористоводородной кислоты (0,5 моль/л).

Приготовление раствора перманганата калия (0,02 моль/л). 1 мл раствора содержит 0,003161 г перманганата калия.

3,3 г перманганата калия растворяют в 1000 мл воды и кипятят в течение 10 мин. Колбу закрывают пробкой, оставляют на 2 сут в темном месте, затем фильтруют через стеклянный фильтр.

Установка титра. Точно отмеривают из бюретки 25 мл приготовленного раствора в склянку с притертой пробкой, содержащую 20 мл раствора йодида калия. Подкисляют 2 мл разведенной серной кислоты, закрывают пробкой, смоченной раствором йодида калия, и оставляют в течение 10 мин в темном месте. Разбавляют 200 мл воды, обмывая пробку водой, и выделившийся йод титруют раствором тиосульфата натрия (0,1 моль/л) до обесцвечивания (индикатор - крахмал).

Поправочный коэффициент К вычисляют по формуле:

$$K = \frac{V0 \times K0}{V},$$

где V0 - объем раствора тиосульфата натрия (0,1 моль/л), израсходованного на титрование, в миллилитрах; V - объем раствора перманганата калия, взятого для установки титра (25 мл); К0 - поправочный коэффициент раствора тиосульфата натрия (0,1 моль/л).

Титр раствора следует часто проверять.

Хранят в темных склянках с притертыми пробками.

Приготовление разведенной серной кислоты. К 5 частям воды медленно и осторожно, при постоянном перемешивании, вливают 1 часть концентрированной серной кислоты.

Приготовление раствора йодида калия. 10 г йодида калия растворяют в свежепрокипяченной и охлажденной воде и разбавляют такой же водой до 100 мл. Раствор должен быть бесцветным. Раствор необходимо хранить в банках оранжевого стекла с притертыми пробками в защищенном от света месте.

Приготовление раствора тиосульфата натрия (0,1 моль/л). 1 мл раствора содержит 0,02482 г тиосульфата натрия.

26 г серноватистокислого натрия (тиосульфата натрия) и 0,1 г углекислого натрия растворяют в свежепрокипяченной и охлажденной воде и доводят такой же водой до 1000 мл. Раствор выдерживают 10 сут в защищенном от света месте. При наличии осадка жидкость сифонируют.

Установка титра. Около 0,15 г (точная навеска) перекристаллизованного из горячей воды и высушенного при 130-150 град. С до постоянной массы мелкорастертого двухромовокислого калия

растворяют в 50 мл воды в склянке с притертой пробкой, прибавляют 2 г йодида калия, растворенного в 10 мл воды, 5 мл 25% раствора хлористоводородной кислоты, закрывают пробкой, смоченной раствором йодида калия, и оставляют в темном месте в течение 10 мин. Разбавляют 200 мл воды, обмывая пробку водой, и титруют приготовленным раствором тиосульфата натрия до зеленовато - желтого окрашивания. Затем приливают 2-3 мл крахмала и продолжают титровать до перехода синей окраски в светло-зеленую.

Поправочный коэффициент К вычисляют по формуле:

$$K = \frac{a}{0{,}009404 \times V},$$

где а - навеска двухромовокислого калия в граммах; V - объем раствора тиосульфата натрия, израсходованного на титрование, в миллилитрах; 0,004904 - количество двухромовокислого калия, соответствующее 1 мл раствора тиосульфата натрия (0,1 моль/л), в граммах.

Приготовление индигосульфокислоты. 1 г индигокармина растворяют в 25 мл концентрированной серной кислоты, затем прибавляют еще 25 мл концентрированной серной кислоты и разбавляют водой до 1000 мл, осторожно вливая раствор в воду.

Реактивы

Приготовление раствора глицерина. 33 мл глицерина разбавляют водой до 100 мл и прибавляют крупинку камфоры или 1 каплю жидкого фенола.

Приготовление раствора хлоралгидрата. 20 г хлоралгидрата растворяют при нагревании в 5 мл воды и прибавляют 5 мл глицерина.

Приготовление раствора йода (раствор Люголя). 0,5 г йода и 1 г йодида калия растворяют в небольшом количестве воды и разбавляют водой до 100 мл. Перед употреблением раствор разбавляют водой в соотношении 1:4. Раствор хранят в защищенном от света месте.

Приготовление раствора судана III. 0,01 г судана III растворяют в 5 мл 95% спирта и прибавляют 5 мл глицерина.

Приготовление раствора туши. Жидкую черную тушь разводят водой в соотношении 1:10.

Приготовление раствора флороглюцина и 25% раствора серной кислоты. Приготовляют в двух отдельных склянках. В первой склянке 1 г флороглюцина растворяют в 100 мл 95% спирта. Во второй склянке к 100 мл воды осторожно, при постоянном перемешивании, прибавляют 30 мл концентрированной серной кислоты. Раствор после охлаждения разбавляют водой до плотности около 1,178.

Приготовление раствора сафранина. Приготовляют в двух отдельных склянках с притертыми пробками. В первой склянке 1 г сафранина растворяют в 100 мл 50% спирта. Во второй склянке к 100 мл 95% спирта прибавляют две капли 10% раствора хлористоводородной кислоты и взбалтывают.

Приготовление 5% раствора едкого натра. 5 г едкого натра растворяют в воде и разбавляют водой до 100 мл.

Приготовление 1% раствора железоаммониевых квасцов.

1 г железоаммониевых квасцов растворяют в воде и разбавляют водой до 100 мл.

Приготовление раствора хлорида окисного железа. 30 г железа треххлористого 6-водного (хлорида окисного железа) растворяют в воде и разбавляют водой до 1 л.

Приготовление реактива для проведения реакции Молиша. Реактив готовят в двух отдельных склянках с притертыми пробками.

В первой склянке 2 г альфа - нафтола растворяют в 10 мл 95% спирта; альфа - нафтол можно заменить тимолом или резорцином. Раствор хранят в защищенном от света месте при комнатной температуре не более 7 сут. Во вторую склянку наливают концентрированную серную кислоту.

Приготовление раствора метиленового синего. 0,1 г метиленового синего растворяют в 500 мл 95% спирта.

Приготовление реактива Майера. 1,358 г сулемы растворяют в 60 мл воды, приливают раствор 5 г йодида калия в 10 мл воды и разбавляют водой до 100 мл.

Приготовление реактива Драгендорфа. Раствор I: 0,85 г азотнокислого основного висмута растворяют в смеси из 40 мл воды и 10 мл уксусной кислоты. Раствор II:8 г йодида калия растворяют в 20 мл воды. Смешивают равные объемы растворов I и II. К 10 мл полученной смеси прибавляют 100 мл воды и 20 мл уксусной кислоты.

Приготовление хлорал-йода. К раствору хлоргидрата прибавляют при взбалтывании йод в избытке так, чтобы на дне остались нерастворимые кристаллы йода. Перед употреблением

взбалтывают. Если йод растворился, его вновь прибавляют в раствор в избытке. Реактив хранят в склянке оранжевого стекла в защищенном от света месте.

Индикаторы

МЕТИЛОВЫЙ ОРАНЖЕВЫЙ

4-Диметиламиноазобензол-4'-сульфонат натрия

$C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$ М.м. 327,34

Кристаллический порошок оранжевого, иногда с коричневым оттенком, цвета. Трудно растворим в воде, легче растворим в горячей воде, практически нерастворим в спирте.

Переход окраски от красной через оранжевую к желтой в пределах pH 3,0-4,4.

Приготовление. 0,1 г растертого индикатора растворяют в воде и доводят водой до 100 мл.

ФЕНОЛФТАЛЕИН

альфа, альфа-Ди-(4-оксифенил)-фталид

$C_{20}H_{14}O_4$ М.м. 318,33

Белый или желтоватый мелкокристаллический порошок без запаха и вкуса. Очень мало растворим в воде, растворим в спирте, мало растворим в эфире. Переход окраски от бесцветной к красной в пределах pH 8,2-10,0.

Приготовление. 1 г индикатора растворяют в спирте и доводят 95% спиртом до 100 мл.

КРАХМАЛ

Белый, матовый, тонкий порошок без запаха и вкуса. Приготовление. 1 г крахмала растирают в ступке с 5 мл воды до получения однородной кашицы и смесь медленно вливают при постоянном размешивании в 100 мл кипящей воды. Кипятят в течение 2-3 мин до получения слегка опалесцирующей жидкости.

Раствором можно пользоваться не более 2-3 дней.

На 100 мл титруемой жидкости берут 1-2 мл раствора индикатора.

Примечание. При изготовлении раствора из картофельного крахмала клейстер, полученный указанным выше образом, дополнительно нагревают в автоклаве при 120 град. С в течение часа.

НАИМЕНОВАНИЯ, СИМВОЛЫ И ОТНОСИТЕЛЬНЫЕ АТОМНЫЕ МАССЫ НЕКОТОРЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

Относительные атомные массы (ранее употреблялся термин "атомные веса"), приведенные ниже, определены относительно изотопа ^{12}C, принятого точно за 12, до 4-значных цифр.

Наименование	Символ	Относительная атомная масса	Наименование	Символ	Относительная атомная масса
Азот	N	14,01	Молибден	Mo	95,94
Алюминий	Al	26,98	Мышьяк	As	74,92
Барий	Ba	137,33	Натрий	Na	22,99
Бор	B	10,81	Никель	Ni	58,71 <*>
Бром	Br	79,90	Олово	Sn	118,7 <*>
Ванадий	V	50,94 <*>	Платина	Pt	195,1 <*>
Водород	H	1,008	Ртуть	Hg	200,6 <*>
Вольфрам	W	183,85 <*>	Рутений	Ru	101,1 <*>
Висмут	Bi	209,0	Свинец	Pb	207,2
Гелий	He	4,003	Селен	Se	78,96 <*>
Гольмий	Ho	164,9	Сера	S	32,06
Железо	Fe	55,85 <*>	Серебро	Ag	107,9
Золото	Au	197,0	Стронций	Sr	87,62
Йод	I	126,9	Сурьма	Sb	121,75 <*>
Кадмий	Cd	112,4	Титан	Ti	47,90 <*>
Калий	K	39,10 <*>	Торий	Th	232,0
Кальций	Ca	40,08	Углерод	C	12,01

Кислород	O	16,00 <*>	Уран	U	238,0
Кобальт	Co	58,93	Фосфор	P	30,97
Кремний	Si	28,09 <*>	Фтор	F	19,00
Лантан	La	138,9	Хлор	Cl	35,45
Литий	Li	6,941 <*>	Хром	Cr	52,00
Магний	Mg	24,31	Церий	Ce	140,1
Марганец	Mn	54,94	Цинк	Zn	65,38
Медь	Cu	63,55 <*>	Цирконий	Zr	91,22

Примечание. Приведенные в таблице относительные атомные массы элементов приняты Международным союзом по теоретической и прикладной химии (JUPAC) в 1975 г. (Pure App. Chem., 1976. vol. 47, 75).

<*> Величины считаются достоверными до +/- 1 в последней цифре или до +/- 3, если помечены звездочкой.

АЛКОГОЛЕМЕТРИЧЕСКИЕ ТАБЛИЦЫ

I. Соотношение между плотностью водно - спиртового раствора и содержанием безводного спирта в растворе

Плотность Ро 20	Содержание безводного спирта в водно - спиртовом растворе				Плотность Ро 20	Содержание безводного спирта в водно - спиртовом растворе			
	в процентах		граммов в 100мл при 20 град. С	милли-литров в 100 г.при взвешивании в воздухе		в процентах		граммов в 100мл при 20 град. С	милли-литров в 100 г.при взвешивании в воздухе
	по массе	по объему				по массе	по объему		
0,99823	0,00	0,00	0,00	0,00	4	20	4,03	18	4,06
80	12	16	13	16	2	32	17	29	20
0,9978	23	29	23	29	0	44	32	41	36
6	34	43	34	43	0,9918	3,55	4,46	3,52	4,50
4	44	56	44	56	6	67	61	64	65
2	55	70	55	70	4	78	75	75	80
0	66	83	66	83	2	90	90	87	95
0,9968	77	97	77	97	0	4,02	5,05	99	5,10
6	87	1,10	87	1,10	0,9908	14	20	4,10	25
4	98	24	98	24	6	26	35	22	41
2	1,09	38	1,09	38	4	38	50	34	56
0	20	51	19	51	2	50	65	46	71
0,9958	31	65	32	66	0	62	80	58	87
6	42	79	41	80	0,9898	75	95	70	6,02
4	52	92	52	93	6	87	6,10	81	17
2	63	2,06	63	2,07	4	99	26	94	34
0	74	20	74	21	2	5,11	41	5,06	49
0,9948	85	34	85	35	0	24	57	19	65
6	96	48	96	50	0,9888	37	73	31	81
4	2,07	62	2,07	64	6	49	88	43	97
2	19	76	18	78	4	62	7,04	56	7,13
0	29	90	29	92	2	75	20	68	29
0,9938	41	3,04	40	3,06	0	87	36	81	46
6	52	18	51	20	0,9878	6,00	52	94	62
4	63	32	62	34	6	13	67	6,05	77
2	75	46	73	48	4	26	83	18	94
0	86	60	84	63	2	39	99	31	8,10
0,9928	97	74	95	77	0	52	8,15	43	27
6	3,09	89	3,07	92	0,9868	65	32	57	44
6	78	48	69	61	4	27	43	97	83
4	92	64	82	77	2	42	61	13,11	17,01
2	7,05	80	95	93	0	57	80	26	21
0	18	97	7,08	9,11	0,9768	72	98	40	40
0,9858	32	9,13	21	27	6	87	17,17	55	60
6	45	30	34	45	4	14,02	35	69	79
0,9854	7,58	9,47	7,47	9,62	2	18	54	84	99

2	72	63	60	78	0	33	73	99	18,19
0	85	80	73	96	0,9758	49	91	14,14	38
0,9848	99	97	87	10,13	6	64	18,10	29	58
6	8,12	10,13	8,00	30	4	80	29	44	78
4	26	30	13	47	2	96	48	59	97
2	39	47	26	65	0	15,11	67	74	19,17
0	53	63	39	82	0,9748	27	86	89	37
0,9838	67	80	52	99	6	43	19,05	15,04	57
6	80	97	66	11,17	4	58	24	19	77
4	94	11,14	79	34	2	74	43	34	97
2	9,08	31	93	52	0	90	62	49	20,16
0	22	48	9,06	70	0,9738	16,05	81	64	36
0,9828	35	65	19	87	6	21	20,00	79	56
6	49	82	33	12,04	4	37	19	94	76
4	63	99	46	22	0,9732	16,52	20,37	16,08	20,95
2	77	12,16	60	40	0	68	56	23	21,15
0	91	34	74	58	0,9728	84	75	38	35
0,9818	10,05	51	87	75	6	99	93	52	54
6	19	68	10,01	93	4	17,15	21,12	67	74
4	34	85	14	13.11	2	30	31	82	94
2	48	13,03	28	29	0	45	49	96	22,13
0	62	20	42	47	0,9718	61	68	17,11	33
0,9808	76	38	56	66	6	76	86	25	52
6	91	55	69	83	4	92	22,05	40	72
4	11,05	73	84	14,02	2	18,07	23	55	91
2	20	90	97	20	0	22	41	69	23,10
0	34	14,08	11,11	38	0,9708	37	60	84	31
0,9798	49	26	25	57	6	52	78	98	50
6	64	44	40	76	4	67	96	18,12	69
4	78	62	54	94	2	83	23,14	26	88
2	93	79	67	15,12	0	98	32	41	24,07
0	12,07	97	82	31	0,9698	19,13	50	55	26
0,9788	22	15,15	96	50	6	28	68	69	45
6	37	34	12,11	69	4	43	86	83	64
4	52	52	25	88	2	58	24,04	97	83
2	67	70	39	16,07	0	73	22	19,12	25,02
0	81	88	53	26	0,9688	88	40	26	21
0,9778	96	16,06	68	44	6	20,03	57	39	40
6	13,11	25	83	64	4	18	75	53	59
2	33	93	68	77	0	78	54	68	96
0	47	25,11	82	96	0,9588	92	69	80	34,13
0,9678	62	28	95	26,15	6	27,04	84	92	29
6	77	46	20,09	34	4	17	99	26,04	46
4	92	64	24	53	2	30	33,14	16	62
2	21,07	81	37	72	0	43	29	27	79
0	21	99	51	91	0,9578	55	44	39	95
0,9668	36	26,16	65	27,09	6	68	59	51	35,11
6	50	34	79	28	4	81	73	62	26
4	65	51	92	47	2	94	88	74	43
2	80	68	21,06	65	0	28,06	34,03	86	59
0	94	85	19	83	0,9568	19	17	97	75
0,9658	22,09	27,03	33	28,02	6	31	31	27,08	90
6	23	20	47	20	4	43	45	19	36,06
4	37	37	60	38	2	56	60	31	22
2	52	54	74	56	0	68	74	42	37
0	66	71	87	75	0,9558	80	88	53	53
0,9648	81	88	22,00	93	6	93	35,02	64	68
6	95	28,05	14	29,12	4	29,05	16	75	84
4	23,09	22	27	29	2	17	30	86	99
2	23	38	40	47	0	29	44	97	37,15
0	38	55	53	65	0,9548	41	58	28,07	30
0,9638	52	72	67	83	6	53	72	19	46
6	66	88	79	30,00	4	65	85	30	51
4	80	29,05	93	18	2	77	99	41	76
2	94	21	23,05	36	0	89	36,13	52	92
0	24,08	38	19	54	0,9538	30,01	26	62	38,06
0,9628	22	54	32	71	6	13	40	73	21
6	36	71	45	90	4	25	53	83	36
4	50	87	58	31,07	2	36	67	94	51
2	64	30,03	70	24	0	48	80	29,05	66
0	78	19	83	42	0,9528	60	94	16	81

0,9618	92	35	95	60	6	72	37,07	26	96
6	25,05	52	24,09	78	4	84	20	36	39,10
4	19	68	21	95	2	95	34	47	25
2	32	84	34	32,12	0	31,07	47	57	40
0	46	31,0	47	30	0,9518	18	60	68	55
0,9608	25,59	31,16	24,59	32,48	6	30	73	78	69
6	73	31	71	63	4	41	86	88	84
4	86	47	84	81	2	53	99	98	98
2	26,00	63	96	98	0	64	38,12	30,09	40,12
0	13	78	25,08	33,14	0,9508	76	25	19	27
0,9598	26	94	21	31	6	87	38	29	42
6	39	32,09	33	48	4	99	51	39	56
4	52	24	45	64	2	32,10	64	50	70
2	65	39	56	81	0	21	77	60	85
0	33	90	70	41,00	6	27	42	35,06	27
6	44	39,03	81	14	4	37	53	15	41
4	55	15	90	28	2	47	64	23	53
2	66	28	31,00	42	0	58	75	32	66
0	78	40	10	56	0,9398	68	86	41	79
0,9488	32,89	39,53	31,20	41,71	6	78	98	50	93
6	33,00	66	30	86	4	88	45,09	59	48,06
4	11	78	40	99	2	98	20	68	18
2	22	91	50	42,14	0	38,09	31	76	31
0	33	40,04	60	28	0,9388	19	42	85	43
0,9478	44	16	70	42	6	29	53	94	56
6	55	28	79	56	4	39	64	36,02	69
4	66	41	89	70	2	49	75	11	82
2	77	53	99	84	0	59	86	20	95
0	88	65	32,08	98	0,9378	69	97	28	49,07
0,9468	99	78	18	43,12	6	79	46,08	37	20
6	34,10	90	28	26	4	89	19	46	33
4	21	41,02	38	39	2	99	30	54	46
2	32	15	48	54	0	39,09	41	63	58
0	43	27	57	68	0,9368	39,19	46,52	36,72	49,71
0,9458	54	39	67	81	6	29	63	80	84
6	65	51	76	95	4	39	73	88	96
4	76	63	86	44,08	2	49	84	97	50,08
2	86	75	95	22	0	59	95	37,06	21
0	97	87	33,05	35	0,9358	69	47,06	14	34
0,9448	35,08	99	14	49	6	79	17	23	47
6	19	42,11	24	63	4	89	27	31	59
4	29	23	33	76	2	99	38	40	72
2	40	35	43	90	0	40,09	49	48	85
0	50	46	51	45,03	0,9348	19	59	56	97
0,9438	61	58	61	17	6	29	70	65	51,10
6	71	70	70	30	4	38	81	73	22
4	82	82	80	44	2	48	92	82	35
2	93	94	89	58	0	58	48,02	90	47
0	36,03	43,05	98	71	0,9338	68	13	99	60
0,9428	13	17	34,07	84	6	78	23	38,07	72
6	24	28	16	97	4	88	33	15	84
4	34	39	25	46,10	2	98	44	23	97
2	45	51	34	23	0	41,07	54	31	52,09
0	55	62	43	36	0,9328	17	65	40	22
0,9418	65	74	52	49	6	27	75	48	34
6	76	85	61	62	4	36	86	56	46
4	86	97	70	75	2	46	96	64	58
2	96	44,08	79	88	0	56	49,07	73	71
0	37,07	19	88	47,01	0,9318	65	17	81	83
0,9408	17	30	96	14	6	75	27	89	95
4	85	38	97	53,08	2	18	96	59	58
2	94	48	39,05	20	0	28	54,06	67	70
0	42,04	58	13	32	0,9218	37	15	74	81
0,9308	13	69	22	45	6	46	25	82	93
6	23	79	30	56	4	55	34	89	59,05
4	33	89	38	68	2	65	44	97	17
2	42	99	46	80	0	74	54	43,05	29
0	52	50,10	54	93	0,9208	83	63	12	40
0,9298	61	20	62	54,05	6	92	73	20	52
6	71	30	70	17	4	47,01	82	27	63
4	80	40	78	29	2	10	92	35	75

2	90	50	86	41	0	20	55,01	42	86
0	43,00	60	94	53	0,9198	29	11	50	98
0,9288	09	71	40,02	66	6	38	20	57	60,10
6	18	81	10	78	4	47	30	65	22
4	28	91	18	90	2	56	39	72	33
2	37	51,01	26	55,02	0	65	48	79	44
0	47	11	34	14	0,9188	74	58	87	56
0,9278	56	21	42	26	6	83	67	94	67
6	66	31	50	38	4	93	77	44,02	79
4	75	41	58	50	2	48,02	86	09	91
2	85	51	66	62	0	11	95	16	61,02
0	94	61	73	74	0,9178	20	56,05	24	14
0,9268	44,04	71	81	86	6	29	14	31	25
6	13	81	89	98	4	38	23	38	37
4	23	91	97	56,10	2	47	33	46	49
2	32	52,00	41,04	21	0	56	42	53	60
0	41	10	12	33	0,9168	65	51	60	71
0,9258	51	20	20	45	6	75	61	68	83
6	60	30	28	57	4	84	70	75	95
4	70	40	36	69	2	93	79	82	62,06
2	79	50	44	81	0	49,02	89	90	18
0	88	60	52	93	0,9158	11	98	97	29
0,9248	44,98	52,69	41,59	57,04	6	20	57,07	45,04	40
6	45,07	79	67	16	4	29	17	12	53
4	16	89	74	28	2	38	26	19	64
2	26	99	82	40	0	47	35	26	76
0	35	53,09	90	52	0,9148	56	44	34	87
0,9238	44	18	97	63	6	65	53	41	98
6	53	28	42,05	75	4	74	62	48	63,09
4	63	38	13	88	2	83	72	56	21
2	72	48	21	58,00	0	92	81	63	32
0	81	57	28	11	0,9138	50,01	90	70	44
0,9228	91	67	36	23	6	10	99	77	55
6	46,00	77	44	35	4	19	58,08	84	66
4	09	86	51	46	2	28	17	91	77
0	37	26	98	89	0,9038	46	36	22	69,08
0,9128	50,46	58,35	46,05	64,00	6	54	45	29	19
6	55	44	12	11	4	63	53	35	30
4	64	54	20	23	2	72	62	42	42
2	73	63	27	35	0	81	71	50	53
0	82	72	35	46	0,9028	89	79	56	63
0,9118	91	81	42	57	6	98	88	63	74
6	51,00	90	49	68	4	55,07	97	70	86
4	09	99	56	80	2	16	63,05	76	97
2	18	59,08	63	91	0	25	14	83	70,08
0	27	17	70	65,02	0,9018	33	22	90	19
0,9108	36	26	77	14	6	42	31	97	30
6	45	35	84	25	4	51	40	50,04	42
4	54	44	91	36	2	60	48	10	52
2	63	53	99	48	0	68	57	17	64
0	71	62	47,06	59	0,9008	55,77	63,65	50,24	70,75
0,9098	80	71	13	70	6	86	74	31	86
6	89	80	20	82	4	95	82	37	97
4	98	89	27	93	2	56,03	91	44	71,08
2	52,07	98	34	66,05	0	12	64,00	51	20
0	16	60,07	41	16	0,8998	21	08	58	30
0,9088	25	16	48	27	6	30	17	65	42
6	34	25	55	39	4	38	25	71	53
4	43	34	62	50	2	47	34	78	64
2	52	43	70	61	0	56	42	84	75
0	60	52	77	72	0,8988	65	51	92	86
0,9078	69	60	83	83	6	73	59	99	97
6	78	69	90	95	4	82	68	51,05	72,08
4	87	78	97	67,06	2	91	76	11	19
2	96	87	48,04	17	0	57,00	85	18	30
0	53,05	96	11	29	0,8978	08	93	25	41
0,9068	14	61,05	18	41	6	17	65,02	32	53
6	22	14	26	52	4	26	10	38	63
4	31	22	32	62	2	34	18	44	73
2	40	31	39	73	0	43	27	52	85
0	49	40	46	85	0,8968	52	35	58	96

0,9058	58	49	53	97	6	60	43	64	73,06
6	67	57	60	68,07	4	69	52	71	18
4	75	66	67	19	2	78	61	78	30
2	84	75	74	30	0	87	69	85	41
0	93	84	81	41	0,8958	95	77	91	51
0,9048	54,02	92	87	52	6	58,04	86	99	63
6	11	62,01	94	63	4	13	94	52,05	73
4	19	10	49,01	75	2	21	66,02	11	84
2	28	19	08	87	0	30	11	18	95
0	37	27	15	96	0,8948	39	19	24	74,06
6	47	27	30	17	4	44	70,05	29	21
4	56	36	38	29	2	53	12	34	31
2	65	44	44	39	0	61	20	41	42
0	74	53	51	51	0,8848	70	28	47	53
0,8938	82	61	57	61	6	79	36	53	64
6	91	69	64	72	4	87	45	60	75
4	59,00	77	70	83	2	96	53	67	86
2	08	86	77	95	0	63,04	61	73	97
0	17	94	83	75,05	0,8838	13	69	79	80,08
0,8928	26	67,02	90	16	6	21	77	86	19
6	34	11	97	27	4	30	85	92	30
4	43	19	53,03	39	2	39	93	98	40
2	52	27	09	49	0	47	71,01	56,05	51
0	60	36	17	61	0,8828	56	09	11	62
0,8918	69	44	23	72	6	64	17	17	73
6	77	52	29	83	4	73	25	24	84
4	86	61	36	94	2	82	33	30	95
2	95	69	43	76,05	0	90	41	36	81,06
0	60,03	77	49	15	0,8818	99	49	42	17
0,8908	12	85	55	26	6	64,07	57	49	28
6	21	94	62	38	4	16	65	55	39
4	29	68,02	69	49	2	24	72	61	49
2	38	10	75	59	0	33	80	67	60
0	47	18	81	70	0,8808	41	88	73	70
0,8898	55	26	88	81	6	50	96	80	81
6	64	35	95	93	4	59	72,04	86	93
4	72	43	54,01	77,04	2	67	12	92	82,04
2	81	51	07	14	0	76	20	99	15
0	90	59	14	25	0,8798	84	28	57,05	25
0,8888	60,98	68,67	54,20	77,36	6	93	36	11	36
6	61,07	75	26	47	4	65,01	44	17	47
4	15	83	33	57	2	10	51	23	57
2	24	91	39	68	0	18	59	29	68
0	33	69,00	46	80	0,8788	27	67	36	79
0,8878	41	08	52	91	6	35	75	42	90
6	50	16	59	78,02	4	44	83	48	83,01
4	58	24	65	12	2	52	91	55	12
2	67	32	71	23	0	61	98	60	22
0	76	40	78	34	0,8778	69	73,06	66	33
0,8868	84	48	84	45	6	78	14	73	45
6	93	56	90	56	4	86	22	79	56
4	62,01	64	96	66	2	95	29	85	66
2	10	72	55,03	77	0	66,03	37	91	77
0	18	80	09	88	0,8768	66,12	73,45	57,97	83,87
0,8858	27	88	15	99	6	20	53	58,03	98
6	36	96	22	79,10	4	29	60	09	84,08
2	37	68	15	19	0	26	19	92	14
0	46	76	22	30	0,8668	35	26	98	24
0,8758	54	84	28	42	6	43	33	61,03	34
6	63	91	33	51	4	52	41	10	46
4	71	99	40	63	2	60	48	15	56
2	80	74,07	46	74	0	68	56	22	67
0	88	15	52	85	0,8658	77	63	27	77
0,8748	97	22	58	95	6	85	70	33	88
6	67,05	30	64	85,06	4	94	78	39	99
4	14	37	70	16	2	71,02	85	44	90,09
2	22	45	76	27	0	10	93	51	21
0	31	53	82	38	0,8648	71,19	78,00	61,56	90,31
0,8738	39	61	89	49	6	27	07	62	41
6	47	68	94	59	4	36	15	68	53
4	56	76	59,01	70	2	44	22	74	63

2	64	84	07	81	0	52	29	79	73
0	73	91	12	91	0,8638	61	37	86	84
0,8728	81	99	19	86,03	6	69	44	91	95
6	90	75,06	24	12	4	77	51	97	91,05
4	98	14	31	24	2	86	59	62,03	16
2	68,07	22	37	35	0	94	66	08	26
0	15	29	42	45	0,8628	72,03	73	14	36
0,8718	24	37	49	56	6	11	81	20	47
6	32	45	55	67	4	19	88	26	57
4	41	52	61	77	2	28	95	31	68
2	49	60	67	89	0	37	79,03	38	79
0	58	68	73	87,00	0,8618	44	10	43	90
0,8708	66	75	79	10	6	53	17	49	92,00
6	75	83	85	21	4	61	24	54	10
4	83	90	91	31	2	69	32	60	22
2	92	98	97	42	0	78	39	66	32
0	69,00	76,06	60,03	53	0,8608	86	46	72	42
0,8698	08	13	09	63	6	95	53	77	52
6	17	21	15	74	4	73,03	61	83	64
4	25	28	21	85	2	11	68	89	74
2	34	36	27	96	0	20	75	94	84
0	42	43	32	88,06	0,8598	28	83	63,01	96
0,8688	51	51	39	17	6	36	90	06	93,06
6	59	58	44	27	4	45	97	12	16
4	68	66	51	38	2	53	80,04	17	27
2	76	74	57	50	0	61	11	23	37
0	84	81	62	60	0,8588	70	19	29	49
0,8678	93	89	69	71	6	78	26	35	59
6	70,01	96	74	81	4	86	33	40	70
4	10	77,04	81	93	2	95	40	46	80
2	18	11	86	89,02	0	74,03	47	51	90
0,8578	11	54	57	94,01	6	91	76	11	83
6	20	62	63	13	4	99	83	16	93
4	28	69	69	23	2	78,07	90	22	99,04
2	36	76	74	33	0	16	97	28	15
0	44	83	80	43	0,8478	24	84,04	33	25
0,8568	53	90	85	54	6	32	10	38	34
6	61	97	91	64	4	40	17	43	45
4	69	81,05	97	76	2	48	24	49	56
2	78	12	64,03	87	0	56	31	54	67
0	86	19	08	97	0,8468	64	38	60	78
0,8558	94	26	14	95,07	6	73	44	65	87
6	75,02	33	19	17	4	81	51	70	98
4	11	40	25	28	2	89	58	76	100,08
2	19	47	30	38	0	97	65	81	19
0	27	54	36	49	0,8458	79,05	71	86	28
0,8548	35	61	41	59	6	13	78	91	39
6	44	68	47	70	4	22	85	97	50
4	52	75	52	80	2	30	91	67,02	60
2	60	82	58	90	0	38	98	07	70
0	69	89	63	96,01	0,8448	46	85,05	13	80
0,8538	77	96	68	11	6	54	12	18	91
6	85	82,03	74	21	4	62	18	23	101,01
4	93	10	80	32	2	70	25	29	12
2	76,01	17	85	43	0	78	32	34	23
0	10	24	91	53	0,8438	87	38	39	32
0,8528	76,18	82,31	64,96	96,63	6	95	45	44	42
6	26	38	65,02	74	4	80,03	51	49	52
4	35	45	08	85	2	11	58	55	63
2	43	52	13	95	0	19	65	60	74
0	51	59	19	97,06	0,8428	27	71	65	83
0,8518	59	66	24	16	6	35	78	70	94
6	67	73	30	27	4	43	85	76	102,04
4	76	80	35	38	2	51	91	81	14
2	84	87	41	48	0	60	98	86	25
0	92	94	46	59	0,8418	68	86,05	92	36
0,8508	77,00	83,01	52	69	6	76	11	96	45
6	09	08	57	80	4	84	18	68,02	56
4	17	14	62	89	2	92	24	07	65
2	25	21	68	99	0	81,00	31	12	76
0	33	28	73	98,10	0,8408	81,08	86,37	68,17	102,85

0,8498	42	35	79	20	6	16	44	22	96
6	50	42	84	31	4	24	50	27	103,06
4	58	49	90	42	2	32	57	33	17
2	66	56	95	53	0	40	63	37	26
0	74	63	66,01	63	0,8398	48	70	43	37
0,8488	83	69	05	73	6	56	76	48	47
4	64	83	53	58	2	29	71	81	20
2	72	89	58	67	0	37	77	85	29
0	80	96	63	78	0,8298	45	83	90	39
0,8388	88	87,02	68	87	6	53	90	96	51
6	96	09	74	98	4	61	96	71,00	61
4	82,04	15	78	104,08	2	68	90,02	05	70
2	12	21	83	18	0	76	08	10	81
0	20	28	89	29	0,8288	85,84	90,14	71,14	108,90
0,8378	28	34	93	38	6	92	20	19	109,00
6	36	41	99	49	4	86,00	26	24	10
4	44	47	69,04	59	2	07	32	29	20
2	52	53	08	68	0	15	38	33	30
0	60	60	14	79	0,8278	23	43	37	38
0,8368	68	66	19	89	6	31	49	42	48
6	76	72	23	98	4	38	55	47	58
4	84	79	29	105,09	2	46	61	52	68
2	92	85	34	19	0	54	67	56	78
0	83,00	92	39	30	0,8268	62	73	61	88
0,8358	08	98	44	40	6	69	79	66	98
6	16	88,04	49	49	4	77	85	71	110,08
4	24	11	54	61	2	85	91	75	18
2	32	17	59	70	0	93	97	80	28
0	40	23	64	80	0,8258	87,00	91,03	85	38
0,8348	48	29	68	89	6	08	09	89	48
6	56	36	74	106,01	4	16	15	94	58
4	64	42	79	10	2	24	20	98	66
2	72	48	83	20	0	31	26	72,03	76
0	80	54	88	30	0,8248	39	32	08	86
0,8338	88	61	94	42	6	47	38	12	96
6	96	67	98	51	4	54	44	18	111,06
4	84,04	73	70,03	61	2	62	50	23	16
2	11	79	08	70	0	70	55	27	25
0	19	86	13	82	0,8238	78	61	32	35
0,8328	27	92	18	91	6	85	67	36	45
6	35	98	23	107,01	4	93	73	41	55
4	43	89,04	28	10	2	88,01	79	45	65
2	51	10	32	20	0	08	85	50	75
0	59	16	37	30	0,8228	16	90	53	83
0,8318	67	23	43	42	6	24	96	58	93
6	74	29	47	52	4	31	92,02	63	112,03
4	82	35	52	61	2	39	08	68	14
2	90	41	57	71	0	47	13	72	22
0	98	47	62	80	0,8218	54	19	76	32
0,8308	85,06	53	66	91	6	62	25	81	42
6	14	59	71	108,00	4	69	30	85	51
4	21	65	76	10	2	77	36	90	61
0	85	42	94	71	0,8118	27	91	91	117,07
0,8208	92	47	98	81	6	35	96	95	16
6	89,00	53	73,03	91	4	42	95,01	99	25
4	08	58	07	113,00	2	49	06	75,03	34
2	15	64	12	10	0	56	11	07	43
0	23	70	17	20	0,8108	64	16	11	52
0,8198	30	75	20	29	6	71	21	15	61
6	38	81	25	39	4	78	26	19	70
4	45	87	30	49	2	85	31	22	80
2	53	92	34	58	0	93	36	26	89
0	60	98	39	68	0,8098	93,00	41	30	98
0,8188	68	93,04	43	78	6	07	46	34	118,07
6	75	09	47	86	4	14	52	39	18
4	83	14	51	95	2	22	57	43	27
2	91	20	56	114,06	0	29	62	47	36
0	98	25	60	15	0,8088	36	67	51	45
0,8178	90,06	31	65	25	6	43	72	55	54
6	13	36	69	33	4	50	77	59	63
4	21	42	73	44	2	58	82	63	73

2	28	47	77	53	0	65	87	67	82
0	35	53	82	63	0,8078	72	92	71	91
0,8168	90,43	93,58	73,86	114,72	6	79	97	75	119,00
6	50	63	90	80	4	86	96,02	79	09
4	58	69	95	91	2	94	07	83	18
2	65	74	99	115,00	0	94,01	12	86	27
0	73	80	74,03	10	0,8068	08	16	90	35
0,8158	80	85	07	19	6	15	21	94	44
6	88	91	12	30	4	22	26	98	53
4	95	96	16	38	2	29	31	76,02	63
2	91,03	94,02	21	49	0	36	36	05	72
0	10	07	25	58	0,8058	43	41	09	81
0,8148	17	12	29	67	6	50	45	13	89
6	25	17	33	76	4	57	50	16	98
4	32	23	37	86	2	65	55	20	120,08
2	39	28	41	95	0	72	60	24	17
0	47	33	45	116,03	0,8048	94,79	96,65	76,28	120,26
0,8138	54	38	49	12	6	86	70	32	35
6	61	43	53	21	4	93	74	35	43
4	69	49	58	32	2	95,00	79	39	52
2	76	54	62	41	0	07	84	43	61
0	83	59	66	50	0,8038	14	89	47	70
0,8128	91	64	70	59	6	21	94	51	80
6	98	70	74	70	4	28	99	55	89
4	92,05	75	78	78	2	35	97,03	58	97
2	13	80	82	87	0	42	08	62	121,06
0	20	85	86	96	0,8028	49	12	65	14
6	56	17	69	23	0,7958	88	68	90	17
4	63	22	74	33	6	94	72	93	25
2	70	26	77	40	4	98,01	77	97	35
0	77	31	81	50	2	08	81	78,00	43
0,8018	84	35	85	58	0	14	85	03	51
6	91	40	88	67	0,7948	21	89	06	59
4	98	44	92	75	6	27	94	09	69
2	96,04	49	96	84	4	34	98	12	77
0	11	54	77,O0	94	2	41	99,02	15	85
0,8008	18	58	03	122,01	0	47	06	19	93
6	25	63	07	11	0,7938	54	10	22	125,02
4	32	67	10	19	6	60	14	25	10
2	39	72	14	29	4	67	18	28	18
0	46	76	17	36	2	74	22	31	26
0,7998	52	81	21	46	0	80	26	34	34
6	59	86	25	55	0,7928	90,87	99,30	78,37	125,43
4	66	90	28	63	6	93	34	41	51
2	73	95	32	72	4	99,00	38	44	59
0	80	99	35	80	2	06	42	47	67
0,7988	87	98,04	38	90	0	13	46	50	75
6	93	08	41	98	0,7918	19	50	53	84
4	97,00	12	44	123,06	6	26	54	56	92
2	07	17	48	16	4	32	58	60	126,01
0	14	21	53	24	2	38	62	63	09
0,7978	20	25	56	32	0	45	66	66	17
6	27	29	59	40	0,7908	99,51	99,70	78,69	126,25
4	34	34	63	50	6	58	74	72	33
2	41	38	66	58	4	64	78	75	42
0	47	42	69	66	2	70	82	78	50
0,7968	54	47	73	76	0	77	86	82	58
6	61	51	76	84	0,7898	83	89	84	64
4	67	55	79	92	6	89	93	87	72
2	74	59	83	99	4	96	97	90	81
0	81	64	86	124,09	0,78927	100,0	100,00	78,93	126,87

2. Количества (в миллилитрах при 20 град. С)
воды и спирта различной крепости, которые необходимо
смешать, чтобы получить 1 л спирта крепостью 30%,
40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и 92%

Крепость взятого спирта %	30%		40%		50%		60%		70%		80%		90%		92%	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
96	262	738	355	645	452	548	555	445	665	335	783	217	913	87	941	59
95	266	734	360	640	459	541	564	436	675	325	795	205	927	73	955	45
94	270	730	366	634	466	534	572	428	686	314	807	193	941	59	970	30
93	275	725	371	629	473	527	681	419	696	304	820	180	956	44	985	15
92	279	721	377	623	481	519	590	410	707	293	832	168	970	30		
91	283	717	383	617	488	512	599	401	717	283	845	155	985	15		
90	287	713	389	611	495	505	608	392	728	272	858	142				
89	292	708	395	605	503	497	617	383	739	261	871	129				
88	296	704	401	599	511	489	627	373	751	249	884	116				
87	301	699	407	593	518	482	636	364	762	238	898	102				
86	305	695	413	587	526	474	646	354	774	226	911	89				
85	310	690	419	581	534	466	656	344	786	214	925	75				
84	315	685	426	574	543	457	666	334	798	202	940	60				
83	320	680	432	568	551	449	676	324	810	190	954	46				
82	325	675	439	561	560	440	687	313	823	177	969	31				
81	330	670	446	554	568	432	698	302	836	164	984	16				
80	335	665	453	547	577	423	709	291	849	151						
79	340	660	460	540	587	413	720	280	863	137						
78	346	654	468	532	596	404	732	268	876	124						
77	351	649	475	525	605	395	743	257	890	110						
76	357	643	483	517	615	385	755	245	905	95						
75	363	637	491	509	625	375	768	232	920	80						
74	369	631	499	501	636	364	781	219	935	65						
73	375	625	507	493	646	354	794	206	951	49						
72	381	619	516	484	657	343	807	193	967	33						
71	388	612	525	475	669	331	821	179	983	17						
70	394	606	534	466	680	320	835	165								
69	401	599	543	457	692	308	849	151								
68	408	592	553	447	704	296	864	136								
67	416	584	562	438	716	284	879	121								
66	423	577	572	428	729	271	895	105								
65	431	569	583	417	742	258	911	89								
64	438	562	593	407	756	244	928	72								
63	447	553	604	396	770	230	945	55								

62	455	545	616	384	784	216	963	37								
61	464	536	627	373	799	201	981	19								
60	472	528	639	361	815	185										
59	482	518	652	348	830	170										
58	491	509	665	335	847	153										
57	501	499	678	322	864	136										
56	511	489	692	308	881	119										
55	522	478	706	294	899	101										
54	532	468	720	280	918	82										
53	544	456	736	264	937	63										
52	555	445	751	249	958	42										
51	567	433	768	232	978	22										
50	580	420	785	215												
49	593	407	803	197												
48	607	393	821	179												
47	621	379	840	160												
46	636	364	860	140												
45	651	349	881	119												
44	667	333	902	98												
43	684	316	925	75												
42	701	299	949	51												
41	720	280	974	26												
40	739	261														
39	759	241														
38	781	219														
37	803	197														
36	826	174														
35	851	149														
34	878	122														
33	905	95														
32	935	65														

3. Таблица для получения спирта различной крепости при 20 град. С

Крепость разводимого спирта (1000 объемов), %	Желаемая крепость разведенного спирта												
	30%	35%	40%	45%	50%	55%	60%	65%	70%	75%	80%	85%	90%
35	167												
40	335	144											
45	505	290	127										
50	674	436	255	114									
55	845	583	384	229	103								
60	1017	730	514	344	207	95							
65	1189	878	644	460	311	190	88						
70	1360	1027	774	577	417	285	175	81					
75	1535	1177	906	694	523	382	264	163	76				
80	1709	1327	1039	812	630	480	353	246	153	72			
85	1884	1478	1172	932	738	578	443	329	231	144	68		
90	2061	1630	1306	1052	847	677	535	414	310	218	138	65	
95	2239	1785	1443	1174	957	779	629	501	391	295	209	133	64

Примечание. Цифра в месте пересечения горизонтальной и вертикальной строк указывает объем воды при 20 град. С, который следует прилить к 1000 объемам спирта имеющейся крепости при 20 град. С, для получаемого разведения. Пример: для получения 50% спирта из имеющегося 80% 1000 объемов последнего следует смешать с 630 объемами воды.

4. Количества (в миллилитрах при 20 град. С) воды
и спирта различной крепости, которые необходимо
смешать, чтобы получить 1 л спирта крепостью 30%, 35%,
40%,, 45%, 50% 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%

Крепость разводимого спирта, %	30%		35%		40%		45%		50%		55%	
	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт
95	316	707	368	658	421	607	474	556	526	504	579	451
90	333	687	389	634	444	581	500	526	556	470	611	414
85	353	665	412	609	471	551	529	493	588	434	647	374
80	375	641	438	581	500	519	562	457	625	394	688	330
75	400	614	467	549	533	483	600	417	667	349	733	280
70	429	584	500	514	571	443	643	371	714	298	786	225
65	462	549	538	473	615	396	692	319	769	240	846	161
60	500	509	583	426	667	343	750	258	833	173	916	87
55	545	462	636	371	727	279	818	187	909	94		
50	600	405	700	305	800	204	900	103				
45	667	336	778	225	889	113						
40	750	252	875	126								
35	857	143										

Продолжение

Крепость разводимого спирта, %	60%		65%		70%		75%		80%		85%		90%	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
95	632	397	684	343	737	288	789	233	842	176	895	119	947	61
90	667	357	722	299	778	240	833	182	889	122	944	62		
85	706	313	765	252	824	190	882	127	941	64				
80	750	265	812	200	875	134	938	67						
75	800	211	867	141	933	71								
70	857	150	929	76										
65	923	81												
60														
55														
50														
45														
40														
35														

5. Количества (в миллилитрах при 20 град. С) воды и спирта различной крепости, которые необходимо смешать, чтобы получить 1 л (при 20 град. С) спирта крепостью 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%

Крепость разводимого спирта, %	30%		35%		40%		45%	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
96,5	310,9	713,1	362,7	664,7	414,5	615,3	466,3	565,0
96,4	311,2	712,7	363,1	664,2	414,9	614,8	466,8	564,4
96,3	311,5	712,3	363,4	663,8	415,4	614,3	467,3	563,8
96,2	311,9	712,0	363,8	663,3	415,8	613,7	467,8	563,2
96,1	312,2	711,6	364,2	662,9	416,2	613,2	468,2	562,6
96,0	312,5	711,2	364,6	662,4	416,7	612,7	468,8	562,0
95,9	312,8	710,8	365,0	662,0	417,1	612,2	469,2	561,5
95,8	313,2	710,4	365,3	661,5	417,5	611,7	469,7	560,9
95,7	313,5	710,0	365,7	661,1	418,0	611,1	470,2	560,3
95,6	313,8	709,6	366,1	660,6	418,4	610,6	470,7	559,7
95,5	314,1	709,2	366,5	660,1	418,8	610,1	471,2	559,1
95,4	314,5	708,8	366,9	659,7	419,3	609,6	471,7	558,5
95,3	314,8	708,4	367,3	659,2	419,7	609,1	472,2	558,0
95,2	315,1	708,0	367,6	658,8	420,2	608,5	472,7	557,4
95,1	315,5	707,6	368,0	658,3	420,6	608,0	473,2	556,8

Продолжение

Крепость разводимого спирта, %	50%		55%		60%		65%		70%	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
96,5	518,1	513,8	569,9	461,8	621,8	409,1	673,6	355,8	725,4	301,8
96,4	518,7	513,1	570,5	461,1	622,4	408,3	674,3	354,9	726,1	300,9
96,3	519,2	512,5	571,1	460,4	623,1	407,6	675,0	354,1	726,9	300,0
96,2	519,8	511,8	571,7	459,7	623,7	406,8	675,7	353,2	727,7	299,1
96,1	520,3	511,2	572,3	458,9	624,3	406,0	676,4	352,4	728,4	298,2
96,0	520,8	510,5	572,9	458,2	625,0	405,2	677,1	351,5	729,2	297,2
95,9	521,4	509,9	573,5	457,5	625,7	404,4	677,8	350,7	729,9	296,3
95,8	521,9	509,2	574,1	456,8	626,3	403,7	678,5	349,8	730,7	295,4
95,7	522,5	508,6	574,7	456,1	627,0	402,9	679,2	349,0	731,5	294,5
95,6	523,0	507,9	575,3	455,4	627,6	402,1	679,9	348,2	732,2	293,6
95,5	523,6	507,3	575,9	454,7	628,3	401,3	680,6	347,3	733,0	292,7
95,4	524,1	506,6	576,5	453,9	628,9	400,5	681,3	346,5	733,7	291,8
95,3	524,7	506,0	577,1	453,2	629,6	399,7	682,1	345,6	734,5	290,9
95,2	525,2	505,3	577,7	452,5	630,3	399,0	682,8	344,8	735,3	290,0
95,1	525,8	504,7	578,3	451,8	630,9	398,2	683,5	343,9	736,1	289,0

Продолжение

Крепость разводимого спирта, %	75%		80%		85%		90%		95%	
	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода	спирт	вода
96,5	777,2	247,2	829,0	192,0	880,8	135,8	932,6	78,2	984,5	18,6
96,4	778,0	246,3	829,9	190,9	881,7	134,7	933,6	77,1	985,5	17,3
96,3	778,8	245,3	830,7	189,9	882,7	133,6	934,6	75,9	986,5	16,1

96,2	779,6	244,3	831,6	188,8	883,6	132,4	935,6	74,7	987,5	14,9
96,1	780,4	243,3	832,5	187,8	884,5	131,3	936,5	73,6	988,6	13,6
96,0	781,3	242,4	833,3	186,8	885,4	130,2	937,5	72,4	989,6	12,4
95,9	782,1	241,4	834,2	185,7	886,3	129,1	938,5	71,2	990,6	11,2
95,8	782,9	240,4	835,1	184,7	887,3	128,0	939,5	70,0	991,6	9,9
95,7	783,7	239,4	835,9	183,6	888,2	126,9	940,4	68,9	992,7	8,7
95,6	784,5	238,5	836,8	182,6	889,1	125,8	941,4	67,7	993,7	7,5
95,5	785,3	237,5	837,7	181,6	890,1	124,7	942,4	66,5	994,8	6,2
95,4	786,2	236,5	838,6	180,5	891,0	123,6	943,4	65,4	995,8	5,0
95,3	787,0	235,5	839,5	179,5	891,9	122,5	944,4	64,2	996,8	3,7
95,2	787,8	234,5	840,3	178,4	892,9	121,4	945,4	63,0	997,9	2,5
95,1	788,6	233,6	841,2	177,4	893,8	120,3	946,4	61,8	998,9	1,3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРИМЕСЕЙ ХИМИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ В РАДИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

Определение примесей химических элементов в радиофармацевтических препаратах осуществляют методом эмиссионного спектрального анализа по спектрам испускания. Анализ предполагает сжигание пробы испытуемого вещества в газовом пламени, электрической дуге или электрической высоковольтной искре. При этом происходят испарение исследуемого вещества и его диссоциация на атомы и ионы, которые возбуждаются и испускают свет. Излучение источника света складывается из излучения возбужденных атомов всех элементов, присутствующих в пробе. Атомы каждого элемента испускают кванты света только определенных длин волн (так называемое характеристическое излучение), выделяемых посредством спектральных приборов, в которых происходит разложение света, испускаемого источником, в линейчатый спектр.

Для осуществления спектрального анализа необходимо перевести анализируемое вещество в газообразное состояние, возбудить свечение газа, разложить излучение в спектр, осуществить регистрацию спектра и провести по полученному спектру качественную и количественную оценку содержания определяемых элементов.

В качестве источников света в практике спектрального анализа нашли широкое применение электрическая дуга переменного или постоянного тока и высоковольтная искра, получаемые при использовании специальных генераторов. В этом случае электрический разряд осуществляется путем подачи соответствующего напряжения на электроды, устанавливаемые в штатив - держатель таким образом, чтобы разрядный промежуток между электродами был расположен на оптической оси спектрального прибора. Электроды представляют собой преимущественно стержни, изготовляемые из какого-либо токопроводящего материала (угля, меди, алюминия и т.п.), содержащего минимальное количество примесей и имеющего эмиссионный спектр с небольшим количеством линий. Анализируемую пробу вводят в межэлектродный промежуток с помощью одного из следующих приемов: вдувание, испарение и др.

Разложение идущего от источника излучения света в спектр по длинам волн осуществляется с помощью спектральных приборов, основными составными частями которых являются: коллиматорная часть с входной щелью прибора; диспергирующая система, включающая спектральную призму, изготовленную из кварца или стекла, или дифракционную решетку; камерный объектив, дающий монохроматическое изображение входной щели - спектральные линии различных длин волн.

Полученный линейчатый спектр наблюдается визуально либо регистрируется одним из двух способов: фотографическим или фотоэлектрическим. Наибольшее распространение в практике спектрального анализа получили методы, основанные на фотографической регистрации спектров с помощью спектрографов, в фокальной плоскости камерного объектива которых имеется кассета для фотопластинки.

Каждый спектральный прибор предназначен для регистрации спектра в определенной области длин волн. В ультрафиолетовой и видимой областях широко применяют как призменные, так и дифракционные спектральные приборы. Спектрографы с кварцевой оптикой позволяют получать спектр в области 200-600 нм, в которой расположены чувствительные линии большинства из известных элементов. Спектрографы со стеклянной оптикой используют для работы в видимой области от 360 до 1000 нм. Приборы с дифракционной решеткой позволяют получать спектр в интервале длин волн от 200 до 1000 нм. Эти приборы, обладающие большой дисперсией, дают возможность разделять спектральные линии с близкими длинами волн, что особенно важно для анализа веществ, спектр которых богат линиями.

Зафиксированные на фотопластинке спектры могут быть использованы для качественных и количественных определений соответствующих элементов.

Качественный анализ, как правило, проводят по наиболее чувствительным линиям определяемых элементов. Эти линии хорошо изучены и собраны в соответствующие таблицы и атласы спектральных линий. Для их идентификации используют спектры сравнения, в качестве которых служат спектры определяемых или других элементов с большим числом линий. На практике, как правило, спектром сравнения является спектр железа, который фотографируют рядом, под или над спектром исследуемой пробы при одинаковых условиях возбуждения. Наличие хороших атласов железа и спектропроекторов позволяет определять положение линий (длины волн в нанометрах) в спектре испытуемой пробы с точностью, достаточной для определения их принадлежности тому или иному элементу.

Количественное определение спектральным методом основано на зависимости между интенсивностью (I) спектральной линии определяемого элемента и его концентрацией, описываемой уравнением:

$$I = ac^{b},$$

где c - концентрация определяемого элемента в пробе; a, b - постоянные величины.

Интенсивность линий зависит также от режима работы источника возбуждения, скорости испарения пробы, освещения щели спектрального прибора и других причин. При случайных изменениях этих условий меняется интенсивность линий, в связи с чем количественный анализ, основанный на измерении абсолютной интенсивности, недостаточно точен. Для получения количественных определений с меньшей ошибкой пользуются отношением интенсивности линий определяемого элемента и элемента сравнения (внутреннего стандарта), вводимого специально в анализируемую пробу в определенном количестве. Пару линий, используемую в количественном спектральном анализе, - линию определяемого элемента и линию элемента сравнения - называют гомологической или аналитической парой. Для измерения относительной интенсивности линий аналитической пары спектр исследуемой пробы фотографируют на пластинку. При этом получают ряд линий, степень почернения которых на фотопластинке зависит от их интенсивности. Количественно почернение фотопластинки принято измерять величиной плотности почернения (S), которую вычисляют по формуле:

$$S = \lg \frac{I0}{I},$$

где I0 - интенсивность света, прошедшего через незачерненную часть фотопластинки (так называемая вуаль); I - интенсивность света, прошедшего через зачерненную часть пластинки.

Плотность почернения измеряют на микрофотометре.

Разность плотности почернения аналитической пары линий "ДЕЛЬТА"S = S1 - S2 (где S1 - почернение линий определяемого элемента и S2 - линии сравнения) служит мерой относительной интенсивности этих двух линий. Связь между "ДЕЛЬТА"S и концентрацией определяемого элемента находят, фотометрируя линии спектров эталонных образцов, в которых элемент, подлежащий определению, содержится в различных, но точно известных концентрациях. Существует большое количество различных вариантов фотографического метода спектрального анализа, приспособленного к особенностям разнообразных аналитических задач. Для анализа радиофармацевтических препаратов, представляющих собой водные растворы радионуклидов без изотопного носителя или изотонические растворы (по натрия хлориду и натрия фосфату двузамещенному), наиболее удобен метод анализа сухого остатка, получаемого при выпаривании капель раствора радиофармацевтического препарата на торцовой поверхности угольных электродов. Этот метод позволяет определять примеси большого количества элементов из одной пробы объемом 0,2-0,3 мл с достаточно высокой чувствительностью (см. приложение 2) при использовании обычного оборудования отечественного производства.

Методика. Угольные электроды марки В-3 (ОСЧ-7-3) диаметром 6 мм и длиной 50 мм подвергают обжигу в дуге переменного тока силой 14-15 А в течение 30 с и затем пропитывают полистиролом, погружая на 20 с обожженные концы на глубину 1-2 мм в 3% раствор полистирола (ГОСТ 20282-74) в бензоле (ГОСТ 5955-75) с последующим высушиванием под сушильной лампой (любой марки, например, СУ-500). На подготовленные таким образом электроды наносят по 0,05 мл эталонных растворов, каждый из которых содержит определяемые элементы в известных концентрациях (см. приложение 1). Нанесенные растворы затем упаривают досуха. Каждый эталон наносят на 2-3 пары электродов.

На 4-6 электродов, подготовленных вышеописанным способом, наносят по 0,05 мл раствора внутреннего стандарта, содержащего 0,004 мг/мл кобальта в виде хлорида и 1,3 мг/мл натрия хлорида в 1% растворе хлористоводородной кислоты (ГОСТ 14261-77). После высушивания

растворов на эти же электроды наносят по 0,05 мл испытуемого препарата, который также упаривают досуха.

Спектры сухих остатков эталонных растворов и испытуемой пробы возбуждают в дуге переменного тока силой 9-10 А, получаемой с помощью дугового генератора, и последовательно фотографируют 2-3 раза каждый, вставляя в штатив - держатель попарно электроды с нанесенными эталонами или пробами.

Рекомендуемые условия анализа. Спектрограф - кварцевый, средней дисперсии, с трехлинзовой системой освещения щели.

Ширина щели спектрографа - 0,015 мм.

Фотопластинки (размером 9Х12 см) - тип УФШ-3 чувствительностью не менее 15 относительных единиц при 250 нм (для спектра 210-250 нм) и тип СП-2 чувствительностью не менее 15 относительных единиц при 255 нм (для спектра 250-350 нм). Обе фотопластинки вставляют одновременно в кассету спектрографа. Фотопластинки проявляют в метолгидрохиноновом проявителе.

Ниже приведены длины волн (в нанометрах) аналитических пар линий элементов, подлежащих определению в радиофармацевтических препаратах.

Cd 226,502		Sb 259,806	
Ba 233,526		Fe 259,957	
As 234,984	Co 243,665	Be 265,078	
Al 236,710		Mn 280,108	
Te 238,575		Pb 283,306	
Hg 253,652		Cr 283,563	Co 304,400
		Sn 283,999	
		Ni 305,070	
		Bi 306,772	
		Mo 317,035	
		Zn 334,502	
		Cu 327,396	

Измеряют почернение аналитических линий S в спектрах эталонного раствора и пробы с помощью микрофотометра. Для каждого элемента вычисляют величины:

$$\text{"ДЕЛЬТА"}S = S1 - S2,$$

где S1 - почернение аналитической линии; S2 - почернение линии сравнения - кобальта в соответствующих зафиксированных на фотопластинке спектрах.

Затем находят среднее арифметическое значение "ДЕЛЬТА"Sср для каждого элемента в эталонных растворах и по полученным значениям строят калибровочные графики в координатах "ДЕЛЬТА"S - lg c, где c - концентрация элемента в эталоне (мг/мл).

Содержание элементов в препарате находят графическим путем по соответствующим калибровочным графикам, определив "ДЕЛЬТА"S для аналитических пар линий элементов и кобальта в спектрах испытуемого препарата. При отсутствии в спектре испытуемого препарата аналитической линии какого-либо элемента следует считать, что его содержание ниже предела чувствительности метода определения, указанного в приложении 2.

Специфические условия определения элементов, не вошедших в данную статью, указывают в соответствующих разделах фармакопейных статей на конкретные радиофармацевтические препараты.

Описанная методика в общем виде применима для анализа водных растворов радионуклидов без изотопного носителя, не содержащих солей, и изотонических растворов (по натрия хлориду и натрия фосфату двузамещенному). При этом следует принимать во внимание следующие методические особенности.

1.Растворы радионуклидов без изотопного носителя (не содержащие солей). В эталонные растворы, помимо определяемых элементов, вводят натрия хлорид в количестве 1,3 мг/мл.

Экспозиция при возбуждении спектров сухих остатков эталонных растворов и испытуемого препарата составляет 15 с.

2. Изотонические растворы радиофармацевтических препаратов (содержащие 8 мг/мл натрия хлорида или 16 мг/мл натрия фосфата двузамещенного). В зависимости от состава исследуемого препарата в эталонные растворы, помимо определяемых элементов, вводят 9 мг/мл натрия хлорида или 16 мг/мл натрия фосфата двузамещенного.

С целью более прочного закрепления сухого остатка на полистирольную пленку угольных электродов, приготовленных указанным выше способом, наносят по одной капле 0,2% раствора

желатина и после его упаривания досуха на электроды наносят эталонные растворы и испытуемый препарат.

Экспозиция при возбуждении спектров сухих остатков изотонических растворов, содержащих 9 мг/мл натрия хлорида, составляет 20 с, а растворов, содержащих 16 мг/мл натрия фосфата двузамещенного, - 25 с.

Погрешность определения примесей элементов при использовании описанной методики составляет: Ba, Be, Bi, Cr, Mn, Mo, Sn, Sb, Pb, Ni <= +/-10%; As, Cu, Cd, Fe, Te, Zn <= +/-15%; Hg <= +/-20%.

Испытание на подлинность. Описанная методика может быть использована также для установления подлинности некоторых химических элементов, являющихся компонентами радиофармацевтических препаратов. В этом случае ограничиваются качественным спектральным анализом. Методика подготовки угольных электродов, нанесения испытуемого препарата, возбуждения и регистрации спектра, а также применяемые приборы аналогичны описанным в разделе "Методика".

Полученную фотопластинку расшифровывают с помощью атласа спектральных линий на спектропроекторе. В качестве аналитических используют линии элементов, указанные также в разделе "Методика".

По наличию в спектре линий определяемого элемента устанавливают подлинность препарата. В случае наличия в препарате элементов, не вошедших в приведенный в разделе "Методика" перечень, используемые аналитические линии указывают в частной фармакопейной статье на испытуемый препарат в разделе "Подлинность".

Приложение 1

Состав эталонных растворов

N п/п	Содержание элементов, мг/мл x 10^3																		
	Fe	Sn	Pb	Cr	Ni	Bi	Mo	Ba	Mn	Cu	Be	Sb	Cd	Hg	Zn	As	Te	Al	Co
1	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,05	0,05	0,05	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	4,0
2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,1	0,1	0,1	1,0	1,0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	4,0
3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,25	0,25	0,25	2,5	2,5	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	4,0
4	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	0,5	0,5	0,5	5,0	5,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	4,0
5	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	1,0	1,0	1,0	10,0	10,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	4,0

Примечание 1
к приложению 1

Приготовление эталонных растворов

Эталонные растворы приготовляют из основных и промежуточных растворов определяемых элементов. Для приготовления всех растворов следует использовать дистиллированную воду и реактивы высокой степени чистоты (х.ч. или ч.д.а.).

а) Основные растворы.

1. Раствор натрия хлорида. 16 г натрия хлорида вносят в мерную колбу вместимостью 250 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Содержание натрия хлорида в растворе 64 мг/мл.

2. Раствор кобальта. 0,0881 г кобальта хлорида вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 1% растворе хлористоводородной кислоты, доводят объем раствора той же кислотой до метки и перемешивают.

Содержание кобальта в растворе 0,4 мг/мл.

3. Раствор сурьмы. 0,1000 г сурьмы металлической (ГОСТ 1089-73, марка Су000) помещают в стакан вместимостью 100-150 мл, растворяют при нагревании в 10-15 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, прибавляя по каплям небольшое количество пергидроля (~= 1 мл). Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора разведенной хлористоводородной кислотой до метки и перемешивают.

Содержание сурьмы в растворе 1,0 мг/мл.

4. Раствор мышьяка. Определяют содержание основного вещества в натрия арсенате. На основании полученных результатов готовят раствор мышьяка с концентрацией 1,0 мг/мл путем растворения вычисленной точной навески натрия арсената в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл. Объем полученного раствора доводят водой до метки и перемешивают.

5. Раствор бария. 0,1903 г бария нитрата вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 10-20 мл воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Содержание бария в растворе 1,0 мг/мл.

6. Раствор ртути. 0,1080 г окиси ртути желтой помещают в стакан вместимостью 100 мл, растворяют в 8-10 мл раствора хлористоводородной кислоты (1:1) при слабом нагревании. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Содержание ртути в растворе 1,0 мг/мл.

7. Раствор железа. 0,1430 г окиси железа помещают в стакан вместимостью 100-150 мл, растворяют при нагревании в 10 мл раствора хлористоводородной кислоты (1:1) и полученный раствор упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 20-40 мл 1% раствора хлористоводородной кислоты, переносят количественно в мерную колбу вместимостью 100 мл; доводят объем раствора этой же кислотой до метки и перемешивают.

Содержание железа в растворе 1,0 мг/мл.

8. Раствор свинца. 0,1600 г свинца нитрата переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Содержание свинца в растворе 1,0 мг/мл.

9. Раствор висмута. 0,1115 г висмута окиси помещают в стакан вместимостью 100 мл, растворяют в 10 мл концентрированной хлористоводородной кислоты при слабом нагревании. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора разбавленной хлористоводородной кислотой до метки и перемешивают.

Содержание висмута в растворе 1,0 мг/мл.

10. Раствор бериллия. Определяют содержание бериллия в бериллия нитрате по следующей методике. 0,9000 г бериллия нитрата помещают в стакан вместимостью 200 мл, растворяют в 100 мл 5% (по объему) раствора азотной кислоты (ГОСТ 11125-78). Раствор нагревают до кипения и осаждают гидрат окиси бериллия аммиаком (ГОСТ 3760-79), прибавляя его по каплям пипеткой до появления явного запаха. Полученный раствор с осадком отфильтровывают через беззольный бумажный фильтр. Осадок на фильтре промывают несколько раз горячей промывной жидкостью - 2% водным раствором аммония нитрата (ГОСТ 22867-77) с добавлением нескольких капель аммиака. Фильтр с осадком высушивают, озоляют и прокаливают в платиновом тигле с крышкой до постоянной массы при температуре 1000 град. С. Тигель охлаждают в эксикаторе над концентрированной серной кислотой (ГОСТ 4204-77) и быстро взвешивают.

На основании полученных результатов готовят раствор бериллия с концентрацией 1,0 мг/мл путем растворения вычисленной точной навески бериллия нитрата в воде мерной колбе вместимостью 100 мл. Объем полученного раствора доводят водой до метки и перемешивают.

11. Раствор олова. 0,1000 г олова металлического помещают в стакан вместимостью 100-150 мл, растворяют при нагревании в 20 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, прикрыв стакан часовым стеклом. Для ускорения растворения олова в стакан следует опустить кусочек металлической платины (пластинка размером 1Х1 см или проволока длиной 3-5 см). Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора разбавленной хлористоводородной кислотой до метки и перемешивают.

Содержание олова в растворе 1,0 мг/мл.

12. Раствор меди (ГОСТ 859-66, марка М0), кадмия, марганца (ГОСТ 6008-75, марка Мр00) и никеля (ГОСТ 849-70, марка Н0). 0,1000 г каждого металла (точная навеска) помещают в отдельные стаканы вместимостью 100 мл, растворяют при нагревании в 10 мл раствора азотной кислоты (1:1) и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 5 мл разбавленной хлористоводородной кислоты и полученный раствор вновь упаривают досуха. Последнюю операцию повторяют еще два раза. Сухой остаток растворяют в 20 мл 1% раствора хлористоводородной кислоты; полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора той же кислотой до метки и перемешивают.

Содержание соответствующего элемента в растворе 1,0 мг/мл.

13. Раствор теллура. 0,1251 г двуокиси теллура помещают в стакан вместимостью 100-150 мл, растворяют при нагревании в 10-15 мл концентрированной азотной кислоты (ГОСТ 11125-78). Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Содержание теллура в растворе 1,0 мг/мл.

14. Раствор молибдена. 0,1500 г молибденового ангидрида вносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 5 мл свежеприготовленного 10% раствора едкого натра, доводят объем раствора разбавленной хлористоводородной кислотой (1:10) до метки и перемешивают.

Содержание молибдена в растворе 1,0 мг/мл.

15. Растворы цинка (ГОСТ 989-75, х.ч.), хрома (ГОСТ 5905-74, марка Х00) и алюминия (ГОСТ 11069-74, марка А99). 0,100 г каждого металла (точная навеска) помещают в отдельные стаканы вместимостью 100-150 мл, растворяют при нагревании в 10-15 мл разбавленной (1:1) хлористоводородной кислоты и упаривают досуха. Сухой остаток растворяют в 20-40 мл 1% раствора хлористоводородной кислоты. Полученный раствор переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем тем же раствором кислоты до метки и перемешивают.

Содержание соответствующего элемента в растворе 1,0 мг/мл.

16. 0,2% раствор желатина. В мерную колбу вместимостью 50 мл вносят 1 мл 10% раствора желатина, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

б) Промежуточные растворы. Приготовляют 4 промежуточных раствора определяемых элементов.

Раствор N 1. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят по 10 мл основных растворов железа, олова, хрома, никеля, висмута, свинца, молибдена и бария, доводят объем раствора 1% раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают.

Содержание элементов в растворе по 0,1 мг/мл.

Раствор N 2. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят по 1 мл основных растворов марганца, бериллия и меди, доводят объем раствора 1% раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают.

Содержание элементов в растворе по 0,01 мг/мл.

Раствор N 3. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят по 10 мл основных растворов сурьмы и кадмия, доводят объем раствора 1% раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают.

Содержание элементов в растворе по 0,1 мг/мл.

Раствор N 4. В мерную колбу вместимостью 100 мл вносят по 10 мл основных растворов цинка, ртути, алюминия, теллура и мышьяка, доводят объем 1% раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают.

Содержание элементов в растворе по 0,1 мг/мл.

в) Приготовление эталонных растворов. Для приготовления эталонных растворов в 5 мерных колб вместимостью 100 мл вносят промежуточные растворы и основной раствор кобальта в следующих объемах.

N эталона	Объем промежуточного раствора, мл				Объем основного раствора кобальта, мл
	N 1	N 2	N 3	N 4	
1	0,25	0,5	0,5	1,0	1,0

2	0,5	1,0	1,0	2,5	1,0
3	1,0	2,5	2,5	5,0	1,0
4	2,5	5,0	5,0	10,0	1,0
5	5,0	10,0	10,0	20,0	1,0

В эталонные растворы, предназначенные для анализа растворов радионуклидов без носителя, вносят по 2 мл основного раствора натрия хлорида. В эталонные растворы, предназначенные для анализа изотонических растворов, содержащих натрия хлорид, вносят по 14 мл основного раствора натрия хлорида, а содержащих натрия фосфат двузамещенный - навески по 1,6 г безводного натрия фосфата двузамещенного.

Объем каждого раствора доводят 1% раствором хлористоводородной кислоты до метки и перемешивают. Состав эталонных растворов приведен в приложении 1.

Приложение 2

Пределы обнаружения примесей элементов
в радиофармацевтических препаратах

Элемент	Чувствительность обнаружения, мг/мл x 10^{-3}		
	растворы радионуклидов без носителя	изотонические растворы, содержащие натрия хлорид	изотонические растворы, содержащие натрия фосфат двузамещенный
As	1,0	1,0	2,5
Ba	0,1	0,1	0,25
Be	0,002	0,005	0,01
Bi	0,05	0,1	0,25
Cd	0,5	1,0	2,5
Cr	0,05	0,1	0,25
Cu	0,02	0,05	0,1
Fe	0,1	0,25	0,5
Hq	1,0	2,5	-
Mn	0,01	0,01	0,05
Mo	0,1	0,1	0,25
Ni	0,1	0,1	0,25
Pb	0,1	0,1	0,25
Sn	0,1	0,1	0,25
Sb	0,5	1,0	1,0
Te	1,0	1,0	2,5
Zn	1,0	2,5	2,5
Al	0,5	1,0	-