

УДК 543.862:535.372

В. Н. Леонтьев, зав. каф. биотехнологии, канд. хим. наук;

Н. А. Коваленко, доц., канд. хим. наук;

О. И. Лазовская, вед. инж.;

Г. Н. Супиченко, ст. преп., канд. хим. наук

(БГТУ, г. Минск)

СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКАЯ МЕТОДИКА ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГИПЕРИЦИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВАХ

По литературным данным для количественного определения гиперицина в растительном сырье, биологически активных добавках и лекарственных препаратах наиболее часто используют хроматографические (высокоэффективная жидкостная хроматография) и спектрофотометрические методы анализа. Однако использование методов высокоэффективной жидкостной хроматографии требует дорогостоящего оборудования, особо чистых реагентов и квалифицированного персонала для проведения сложной пробоподготовки и анализа, что ограничивает массовое применение хроматографических методик для анализа гиперицина и его производных. Спектрофотометрические методики количественного определения гиперицина являются наиболее простыми и недорогими, однако они обладают недостаточной чувствительностью и селективностью, что обусловлено вкладом других компонентов растительного сырья в аналитический сигнал в исследуемом диапазоне длин волн. Вместе с тем гиперицин и его производные обладают достаточно интенсивной собственной флуоресценцией, поэтому использование в качестве аналитического сигнала интенсивности испускания гиперицинсодержащих растворов представляет научный и практический интерес.

Цель настоящего исследования – разработка сравнительно дешевой, простой в исполнении спектрофлуориметрической методики определения гиперицина, обладающей более высокой чувствительностью по сравнению с традиционно используемыми спектрофотометрическими методами.

В рамках поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

– оптимизировать условия спектрофлуориметрического определения гиперицина (длину волны возбуждения и длину волны испускания);

– установить область линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации;

– провести апробацию разработанной методики на настойке для внутреннего применения «Диагиперон» (НПУП «Диалек»).

Исследования проведены на модельных растворах, полученных путем последовательного разбавления раствора стандартного образца гиперидина с концентрацией $1,8 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Спектральные измерения выполнены в кварцевой кювете толщиной 1 см на спектрофлуориметре Solar CM 2203 (Solar, Беларусь) при температуре кюветного отсека 25°C . Щели монохроматоров возбуждения и испускания составляли 2 нм, шаг сканирования – 0,5 нм.

На основании анализа электронных спектров поглощения, спектров возбуждения и испускания метанольных растворов стандартного образца гиперидина выбраны следующие условия спектрофлуориметрического анализа: длина волны возбуждения – 470 нм, длина волны испускания – 593 нм. Выбор длины волны возбуждения 470 нм обусловлен тем, что по литературным данным облучение гиперидина в диапазоне 530–550 нм может приводить к образованию синглетного кислорода, способного разрушать молекулы гиперидина.

Для построения калибровочного графика (рис.) использовали серию стандартных растворов гиперидина с концентрациями $(0,2-9,0) \cdot 10^{-7}$ моль/л, полученных путем последовательного разбавления метанольного раствора стандартного образца с концентрацией $1,8 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

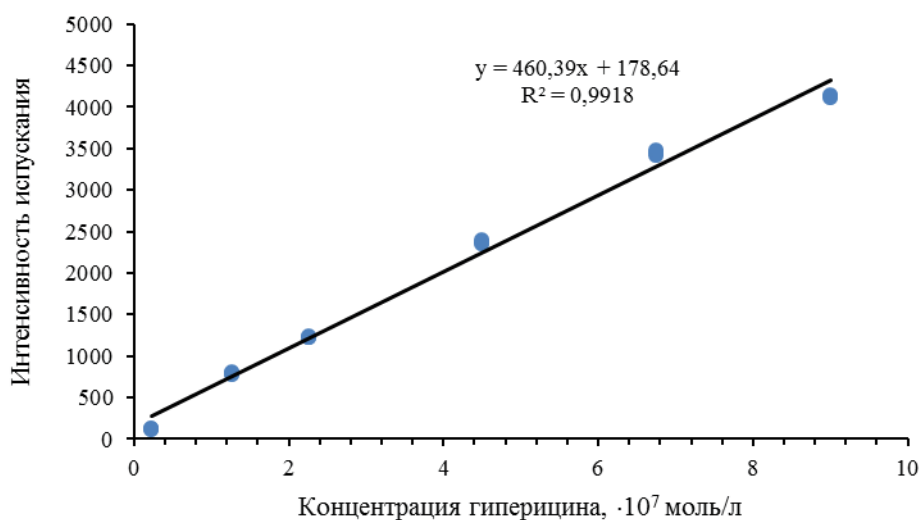


Рисунок – Зависимость интенсивности флуоресценции метанольных растворов гиперидина от его концентрации ($\lambda_{\text{возб}} = 470$ нм, $\lambda_{\text{исп}} = 593$ нм)

Как видно из рисунка, коэффициент корреляции составляет 0,9918, т.е. совокупность анализируемых данных описывается прямой линией.

Апробацию методики спектрофлуориметрического определения гиперидина проводили на настойке «Диагиперон». По инструкции к препарату регламентируемое содержание гиперидина в настойке должно составлять не менее 0,075 мг/мл.

Испытуемый раствор настойки «Диагиперон» готовили следующим образом. Из 10,0 мл настойки удаляли растворитель на роторном испарителе при 39°C. Сухой остаток растворяли в 10 мл метанола, помещали в мерную колбу вместимостью 25,0 мл и доводили объем метанолом до метки. 5,0 мл полученной смеси фильтровали через мембранный фильтр, отбросив первые 2 мл. Аликвоту фильтрата объемом 1,0 мл помещали в мерную колбу вместимостью 25,0 мл, доводили объем метанолом до метки и перемешивали. Полученный метанольный раствор разбавляли в 125 раз и измеряли интенсивность флуоресценции при $\lambda_{исп} = 593$ нм. Значение интенсивности флуоресценции равно 791,93 отн. ед., что с учетом разбавлений соответствует содержанию гиперидина в настойке 0,16 мг/мл (т.е. $2,89 \cdot 10^{-4}$ моль/л).

Для подтверждения полученных данных количественное определение гиперидина в настойке «Диагиперон» провели методом двух добавок. В таблице приведены значения интенсивности флуоресценции метанольных растворов в зависимости от концентрации добавленного стандартного раствора.

Таблица – Интенсивность флуоресценции растворов настойки «Диагиперон» в зависимости от концентрации стандартной добавки

Образец	$C_{доб} \cdot 10^6$, моль/л	$I_{фл}$
1	0	58,2738
2	0,28854	87,4811
3	0,4122	101,5424

Зависимость носит прямолинейный характер и имеет вид: $I_{фл} = 104,31C_{доб} + 58,069$. Коэффициент корреляции $R^2 = 0,9992$.

Содержание гиперидина в анализируемом растворе по методу двух добавок равно $0,56 \cdot 10^{-6}$ моль/л, что в пересчете на настойку «Диагиперон» с учетом всех разбавлений составляет 0,15 мг/мл.

Таким образом, результаты спектрофлуориметрического определения гиперидина в настойке «Диагиперон» методом калибровочного графика и методом двух добавок практически совпадают и соответствуют регламентируемым значениям содержания гиперидина.