УДК 615.2/.3.015.2.074:681.31

В.П. Буряк, О.І. Панасенко, О.А. Кремзер, І.В. Мельник, Б.П. Зоря, О.О. Мартиновський, Н.А. Постол, В.В. Парченко, А.Г. Каплаушенко, А.С. Гоцуля, С.М. Куліш, І.О. Юрченко

ЗАСТОСУВАННЯ ДИФЕРЕНЦІЙНОЇ СПЕКТРОФОТОМЕТРІЇ ДЛЯ АНАЛІЗУ ДВОКОМПОНЕНТНОЇ СУМІШІ ПРИРОДНИХ ФУРОКУМАРИНІВ

Запорізький державний медичний університет

Ключові слова: *природні фурокумарини, псорален, ізопсорален, диференційна спектрофотометрія.*
Ключевые слова: *природные фурокумарины, псорален, изопсорален, дифференциальная спектрофотометрия.*
Key words: *natural furocoumarins, psoralen, angelicin, differential spectrophotometry.*

Розроблено диференційний спектрофотометричний метод кількісного визначення двокомпонентної суміші природних фурокумаринів псоралену та ізопсоралену. Коефіцієнт достовірності (в %) свідчить, що розкидання середніх не перевищує 3%, а методика характеризується високою точністю.

Разработан дифференциальный спектрофотометрический метод количественного определения двокомпонентной смеси природных фурокумаринов проралена и изопсоралена. Коэфициент достоверности (в %) свидетельствует, что разброс средних не превышает 3%, а методика характеризуется высокой точностью.

A differential spectrophotometrical method of quantitive determination of the dicomponential mixture of natural furocoumarins psoralen and angelicin was developed. The coefficient of authenticity (Cs %) proves that interval of the middle does not eceed 3% and the method is characteried by percise accurancy.

Дослідження якості багатокомпонентних ліків – одна з найскладніших проблем сучасного фармакопейного аналізу [8]. До теперішнього часу для її вирішення в значній більшості використовувалися класичні хімічні методи аналізу,основним недоліком яких є необхідність попереднього розділення компонентів, що спричиняє до втрати певної кількості досліджуваних речовин [1, 5, 7]. До того ж, при цьому використовувалися токсичні розчинники (хлороформ, ацетон, ізоаміловий спирт, чотирихлористий вуглець, дихлоретан та ін.), а виконання методик потребує досить тривалого часу.

В останній час для аналізу багатокомпонентних сумішей почали використовувати фізико-хімічні та інструментальні методи аналізу, серед яких ультрафіолетова спектрофотометрія дозволяє визначати кількість компонентів у сумішах без попереднього їх розділення [6].

МЕТА РОБОТИ – вивчення можливості кількісного аналізу двокомпонентної суміші природних фурокумаринів псоралену та ізопсоралену (ангеліцину) за допомогою методу диференціальної спектрофотометрії [4].

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Вперше ЕОМ при спектрофотометричному аналізі сумішей була використана наприкінці п'ятдесятих років XX століття [16, 17].

Як відомо, метод Фірордта малопридатний у випадку сумішей, компоненти яких мають схожі спектри вбирання [15]. Відтворюваність аналізу таких сумішей може бути покращена не тільки за рахунок збільшення кількості аналітичних довжин хвиль [14], але й за рахунок більш точного вимірювання абсорбції розчину.

Більш точні вимірювання абсорбції досягаються методом диференційної спектрофотометрії [2, 3]. Метод диференційної спектрофотометрії придатний як для аналізу індивідуальних лікарських засобів, так і для аналізу сумішей. Описані різні варіанти аналізу сумішей [4]. За одним з них абсорбцію ΔA досліджуваного розчину, який вміщує компоненти 1 та 2, виміряють при довжині хвилі λ, яка відповідає максимуму вбирання компоненту 1. У якості розчину порівняння застосовують розчин, що вміщує компонент 2. Його концентрацію (C^o_2) підбирають таким чином, щоб

$$C_2^{\circ} = C_1 + C_2 \qquad (1)$$

Де C_1 та C_2 - концентрації компонентів 1 і 2 у досліджуваному розчині.

При відомих показниках вбирання κ_1 та κ_2 компонентів 1 та 2 C_1 та C_2 розраховують за рівняннями:

$$C_1 = \frac{\Delta A}{\kappa_1 - \kappa_2} \qquad (2)$$

$$C_2 = C_2 - C_1 \qquad (3)$$

Слід зауважити, що сумарна концентрація $C_1 + C_2$ може бути встановлена за величиною наважки, а при наявності сумішей за точками перетинання спектрів вбирання компонентів 1 та 2, тобто за точками, у яких показники вбирання обох компонентів дорівнюють один одному.

Чим більша різниця показників вбирання компонентів при вибраній аналітичній довжині хвилі, тим краще відтворюваність результатів, описаним методом.

Метод диференційної спектрофотометрії був використаний нами для розробки аналізу природної суміші фурокумаринів псоралену та ізопсоралену, які виділяються з лікарської рослини Псоралеї (Psoralea Drupaceae) та мають фотосенсибілізуючу дію [9].

В науковій літературі описано метод кислотно-основного титрування псоралену та ізопсоралену [10], який дозволяє визначати тільки суму фурокумаринів, в той час як фотосесибілізуюча дія препарату обумовлена тільки кількістю фурокумарину псоралену [11].

Б.З. Усманов та співавтори [13] запропонували спектрофотометричну методику визначення фурокумаринів псоралеї (Psoralea Drupaceae). Попередньо речовини розділяли хроматографічно на папері, який був імпрегнований 10% розчином формальдегіду в системі н-гексан-бензол-метанол (5:4:1). Помилка спектрофотометричного визначення окремих фурокумаринів знаходилась в межах 6 - 10%.

©ᵘ . є. ᵒ ΨΥδΞ, ɔ.ᵢ. є ΔΡΔΦΙ Ρ=Σ, ɔ.ⁱ . ˣ ΥΙ ΠΛΙ Υ, ᵘ . ˏ Ι ΟαΡΜΕ, ᵒ . є. ʳ ΣΥδ, ɔ. ɔ. ˏ ΔΥΧΜΡΣΖΦαΞΜΝ ˏ.ⁱ . є ΣΦΧΣΟ ᵘ .ᵘ . є ΔΥάΙ Ρ=Σ, ⁱ .ᶜ . ˣ ΔΤΟΔΨΈΙ Ρ=Σ, ⁱ . ; . ᶜ ΣΫΨΟδ, ; . ˏ . ˣ ΨΩκέ, ᵤ ɔ. ΒΥάΙ Ρ=Σ, 2008

Для розробки методики диференціальної спектрофотометрії по визначенню компонентів суміші були зняті УФ-спектри псоралену та ізопсоралену в 95% етанолі за допомогою спектрофотометра Agilent 8453 в концентрації 1мг% *(рис. 1)*.

На спектрах вбирання досліджуваних речовин були вибрані 3 найбільш характерні довжини хвиль (246, 248 та 268 нм). При 264 нм визначали сумарний вміст псоралену та ізопсоралену, так як при цій довжині хвилі питомі показники вбирання фурокумаринів дорівнюють один одному. Вміст псоралену розраховували виходячи із значення абсорбції при 246 та 248 нм, де спостерігалася найбільша різниця в інтенсивності компонентів суміші.

З метою виключення помилки, пов'язаною з колібровкою приладу, температурним фактором та ін., рекомендується у якості стандартного зразка застосовувати псоралену-стандарт.

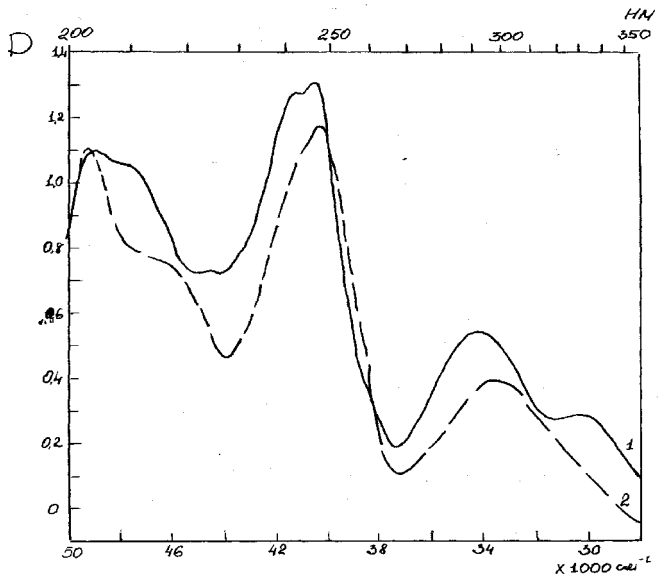

*Рисунок.1.*Уф-спектри псоралену (—) та ізопсоралену (– –) в 95% етанолі.

При виготовленні модельних сумішей та для аналітичних цілей був використаний ізопсорален, виділений з природної суміші фурокумаринів, неодноразово перекристалізований з метанолу та висушений до постійної ваги до спектру (λмакс 248, 300 нм у 95% етиловому спирті, температура топлення 138 – 140 °С).

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ. Біля 0,05 г природної суміші псоралену та ізопсоралену (точна наважка) вміщували у мірну колбу місткістю 250 мл та додавали 100-150 мл 95% етанолу, нагрівали на киплячому водяному оргівнику протягом 10 хв при постійному перемішуванні. Одержаний розчин охолоджували, доводили об'єм 95% етанолом до мітки, 5 мл одержаного розчину переносили до мірної колби ємкістю 50 мл доводили об'єм розчину 95% етанолом до мітки та старанно перемішували (розчин А). Абсорбцію розчину А вимірювали за допомогою спектрофотометру Agilent 8453 у кюветі з товщиною шару у 10 мм при дожині хвилі 263 нм. У якості розчину порівняння використовували 95% етанол. Паралельно при тій же довжині хвилі визначали абсорбцію розчину стандартного зразку псоралену в концентрації 0,002 г у 100 мл. Вміст суми фурокумаринів (псоралену та ізопсоралену) розраховували за рівнянням:

$$x = \frac{A_1 \cdot b \cdot 100}{A_0 \cdot a} \qquad (4)$$

де A_1 – абсорбція досліджуваного розчину при 263 нм;

A_0 – абсорбція розчину стандартного зразка псоралену (0,002 г у 100 мл);

a – наважка досліджуваного препарату (в г);

b – наважка стандартного зразка псоралену (в г).

Вміст суми фурокумаринів у препараті в перерахунку на суху речовину повинен бути від 95% до 105%.

10 мл розчину А переносили піпеткою у мірну колбу місткістю 50 мл, доводили об'єм розчину 95% етанолом до мітки та старанно перемішували (розчин Б).

Абсорбцію розчину Б вимірювали при 246 та 248 нм. У якості розчину порівняння використовували 95% етанол. Паралельно при тих же довжинах хвилі визначали абсорбцію розчину стандартного зразка псоралену в концентрації 0,0004 г у 100 мл.

Кількість псоралену в препараті (в %) розраховували за рівнянням:

$$x = \frac{(A_2^{246} - A_2^{248}) \cdot b \cdot 100}{(A_0^{246} - A_0^{248}) \cdot a}$$

де A_2^{246} та - абсорбція досліджуваного розчину при 246 та 248 нм;

A_0^{246} та A_0^{248} - абсорбція розчину стандартного зразка псоралену (0,0004 г в 100 мл) при 246 та 248 нм;

a – наважка досліджуваного препарату (в г);

b - навжка стандартного зразка псоралену (в г).

Вміст псоралену в перерахунку на суху речовину повинен бути не менше 35% та не більше як 45%.

Примітка. Приготування розчину стандартного зразка псоралену. 0,05 г (точна наважка) псоралену вміщували у мірну колбу місткістю 250 мл, додавали 100-150 мл 95% етанолу та перемішували до повного розчинення речовини. Доводили об'єм розчину 95% етанолом до мітки і старанно перемішували. 10 мл одержаного розчину переносили до мірної колби місткістю 100 мл, доводили до мітки 95% етанолом, перемішували. Концентрація виготовленого розчину псоралену складала 0,002 г в 100 мл.

10 мл розчину стандартного зразку псоралену (0,002 г в 100 мл) піпеткою переносили до мірної колби місткістю 50 мл, доводили об'єм розчину 95% етанолом до мітки, старанно перемішували. Концентрація виготовленого розчину складала 0,0004 г в 100 мл.

Точність та відтворюваність розроблених методик кількісного визначення суми фурокумаринів у субстанції визначали на модельних сумішах (табл. 1). Відносна помилка середнього результату за розробленими методиками при визначенні псоралену не перевищувала ± 1,64%, при визначенні суми фурокумарину - ± 1,70 %.

При оцінюванні розробленого нами методу диференціальної спектрофотометрії були використані рекомендації

©ᵘ . є. ᵒ ΨΥδΞ, ɔ.ᵢ є ΔΡΔΦΙ Ρ≡Σ, ɔ.ⁱ . ˣ ΥΙ ΠΛΙ Υ, ᵘ . ˏ Ι ΟαΡΜΕ, ᵒ . є. ʳ ΣΥδ, ɔ. ɔ. ˏ ΔΥΧΜΡΣΖΦα≡ΜΝ ˎ.ⁱ . є ΣΦΧΣΟ ᵘ .ᵘ . є ΔΥάΙ Ρ≡Σ, ⁱ .ᶜ . ˣ ΔΤΟΔΨέ Ι Ρ≡Σ, ⁱ . ; . ᶜ ΣΫΨΟΔ, ; . ˏ . ˣ ΨΟΧέ, ɔ. ΒΥάΙ Ρ≡Σ, 2008

номенклатурної комісії з аналітичної хімії Міжнародної спілки теоретичної та прикладної хімії [12] та Державної Фармакопеї України [9]. Коефіцієнт достовірності (в %) вказує що розкидання середніх не перевищує 3%, тобто запропонований нами метод достатньо точний і може бути з успіхом використаний в практиці фармацевтичного аналізу.

Таблиця 1

Результати визначення фурокумаринів в природній суміші псоралену та ізопсоралену за розробленою методикою

Компоненти суміші	Концентрація діючої речовини в наважці (мг в 100 мл)	Знайдену за розробленою методикою		Метрологічні характеристики
		В мг	В %	
Субстанція суми фуроку-маринів	1,0000	1,0260	102,60	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 99,69 \pm 4,02$
	1,0000	1,0151	101,51	S = 1, 64
	1,0000	0,9953	99,53	$S_R = 0,0164$
	1,0000	0,9860	98,60	$\pm \Delta x = 4,02$
	1,0000	0,9850	98,50	$C_S = 1,05\%$
	1,0000	0,9905	99,05	
Псорален	0, 4800	0, 4762	99, 22	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 99,70 \pm 4,75$
	0, 4800	0, 4836	100, 77	S = 1, 93
	0, 4800	0, 4794	99, 86	$S_R = 0,0193$
	0, 4800	0, 4674	97, 36	$\pm \Delta\bar{x} = 4,75$
	0, 4800	0,4742	98, 79	$C_S = 1,94\%$
	0, 4800	0, 4902	102, 12	

ВИСНОВКИ

1. Розроблено метод диференційного спектрофотометричного визначення природної суміші фурокумаринів (псоралену та ізопсоралену), яка була виділена з лікарської рослини Псоралеї (Psoralea Drupaceae). Значення відносного стандартного відхилення при визначенні суми фурокумаринів не перевищує 0,0164, а проралену - 0,0193.

2. Оцінювання методу аналізу суміші псоралену та ізопсоралену із застосуванням коефіцієнту достовірності (в %) вказує, що розкидання середніх не перевищує 3% і це свідчить про високу точність запропонованого методу.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Архипова А.В., Коваленко Л.И., Кочерова А.Н. и др.* Руководство к лабораторным занятиям по фармацевтической химии // Под ред. проф. П.Л. Сенова. М.: Медицина, 1978. – 360 с.
2. *Барковский В.Ф., Ганопольский В.И.* Дифференциальный спектрофотометрический анализ . – М.: Химия, 1969. – 168 с.
3. *Беликов В.Г.* Дифференциальная фотометрия. – Ставрополь: кн. изд-во, 1970. – 183 с.
4. *Бернштейн И.Я.; Каминский Ю.Л.* Фотометрический анализ в органической химии.- Л.: Химия, 1975. – 230 с.
5. *Буртко Л.И.; Грищенко В.С.* Руководство по количественному анализу лекарственных препаратов.- М.; Медицина, 1978. – 256 с.
6. *Буряк В.П., Каленюк Т.Т.* Спектрофотомедичний аналіз багатокомпонентних ліків та основи розрахункових методів і ЕОМ.- Фармацевтичний ж., 1976, №2. – С. 47-52.
7. *Бушкова М.Н., Вайсман Г.А., Рапапорт Л.И. и др.* Анализ лекартв в условиях аптек.- Киев: из-во «Здоров'я», 1975. – 408 с.
8. *Георгиевский В.П.* Аналитическая химия в контроле качества лекарственных средств и судебной экспертизе. Вип. XX. Актуальні питання фармацевтичної та медичної науки та практики. Запоріжжя, 2007. - С. 237 - 254.
9. Державна Фармакопея України.-1-е вид.- Харків: PIPEL, 2001.- 556 с.
10. *Исламбеков С.К.* Количественное определение природных фурокумаринов псоралена и изопсоралена, выделенных из Psoralea Drupaceal // Химия природных соединений, 1970, №6. – С. 1456 - 1464.
11. *Кузнецова Г.А.* Природные кумарины и фурокумарины. - Л.: Наука. Ленинградское из-ние, 1967 – С. 248.
12. Рекомендации по представлению результатов химического анализа / Под ред. *Б.Я.Каплан* // Журн. аналит. химии, 1971, т. 26, вып. 5. - С. 1021 - 1023.
13. *Устинов Б.З., Касимов А.У., Абубакиров Н.К.* Спектрофотометрическое определение фурокумаринов Psoralea Drupaceal и Ficus Carica// Химия природных соединений. 1969, №6. – С. 473 - 476.
14. *Финкильштейн А.И.* Спектрофотометрические методы анализа в химической промышленности// Завод. лаб., 1971. – Т.27, №8 – С.923 - 950.
15. *Штерн Э., Тиммонс К.* Электронная абсорбционная спектроскопия в органической химии. – М.: Мир. 1974. – С. 295.
16. *Rogoff M.* Automatic analysis of infrared spectra// Ann. N. I. Acad. Sci. – 1957. – Vol. 69. – P. 27–37.

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ:

Буряк В.П. – д. фарм. н., професор, завідувач кафедри токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ.
Панасенко О.І. - д. фарм. н., професор кафедри токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ.
Мельник І.В. к. фарм. н., доцент кафедри токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ.
Кремзер О.А. – к. фарм. н., доцент кафедри токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ.
Зоря Б.П. - д. фарм. н., професор кафедри токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ.
Мартыновский А.А. - д. фарм. н., професор-консультант кафедри токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ.
Постол Н.А. - к. фарм. н., асистент кафедри токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ.
Парченко В.В. - к. фарм. н., асистент кафедри токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ.
Каплаушенко А.Г. - к. фарм. н., асистент кафедри токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ.
Гоцуля А.С. - асистент кафедри токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ.
Кулиш С.Н. – аспірант кафедри токсикологічної та неорганічної хімії ЗДМУ.
Юрченко І.А. – провізор-інтерн ЗДМУ.

©ᵘ . є. º ΨΥδΞ, ɔ. ‿ є ΔΡΔΦΙ Ρ=Σ, ɔ.ⁱ . ˣ ΥΙ ΠΛΙ Υ, ‿ᵘ . ¸ Ι ΟαΡΜΕ, º . є. ʳ ΣΥδ, ɔ. ɔ. ¸ ΔΥΧΜΡΣΖΦαΞΜΝ ¸ .ⁱ . є ΣΦΧΣΟ, ᵘ .ᵘ . є ΔΥάΙ Ρ=Σ, ⁱ .ᶜ . ˣ ΔΤΟΔΨΈ Ι Ρ=Σ, ⁱ . ; . ᶜ ΣΫΨΟδ, ; . ¸ . ˣ ΨΘκέ, ‿ɔ. ΒΥάΙ Ρ=Σ, 2008