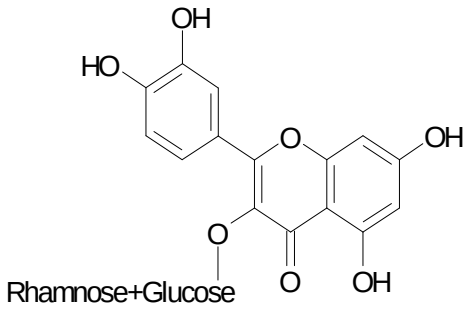
УДК 615.074;543.42

СОРБЦИОННО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РУТИНА В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

Бельтюкова С.В., Бычкова А.А.

Одесская национальная академия пищевых технологий,
65039 , г. Одесса, Канатная, 112

Рутин – 3-(β-D-глюкопиранозил(1→6)-β-L-рамнопиранозид) кверцетина является одним из наиболее распространенных биоантиоксидантов ряда флавоноидов (флавоноловых гликозидов):



Полифенолы занимают ведущее место среди биологически активных веществ. Их биологическое действие связано с Р-витаминной активностью флавоноидов, антимикробной – катехинов, а весь комплекс полифенолов обладает антилучевым, антистрессовым, антиоксидантным действием. Фенольные вещества занимают ведущее место в лечебно-профилактическом питании. Флавоноиды препятствуют окислению липопротеидов низкой плотности плазмы крови и развитию атеросклеротических повреждений стенок кровеносных сосудов (артерий), подавляя процессы внутриклеточного перекисного окисления липидов. Флавоноиды угнетают агрегацию тромбоцитов, что также является положительным фактором в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний. Они предотвращают окислительное повреждение нуклеиновых кислот и препятствуют развитию процессов канцерогенеза. Наиболее распространенными биоантиоксидантами (АО) ряда флавоноидов являются кверцетин и рутин [1-3], которые содержатся во многих лекарственных растениях.

Методы определения АО, в том числе и флавонолов, основаны на способности их молекул окисляться как в растворе, так и на поверхности электродов из материалов различной природы. Предложено вольтамперометрическое определение флавонолов в фармпрепаратах, основанное на регистрации высоты волны окисления рутина на платиновом электроде на фоне 0,1М H_2SO_4 [4], либо на фоне 0,1М HCl [5].Однако чувствительность определения в этих методах невысока, предел обнаружения составляет $1{,}6\cdot10^{-5}$ – $7{,}9\cdot10^{-6}$ моль/л. Известны спектроскопические методы определения флавонолов. Спектрофотометрическая методика определения фенольного состава подземных органов сабельника болотного позволяет провести качественный анализ по спектрам поглощения, расчет количественного содержания флавоноидов проводится в пересчете на хлорогеновую кислоту [9]. Чаще всего эти препараты в растительном сырье определяют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [6,7], с помощью обращено-фазовой ВЭЖХ [8]. Эти методы дают возможность одновременного обнаружения флавоноидов в лекарственных растениях, характеризуются высокими

пределами обнаружения (5-6)·10^{-8}моль/л. Однако они требуют наличия достаточно дорогостоящей и сложной аппаратуры.

Ввиду большого интереса к флавоноидам, как важным природным антиоксидантам, обладающим биологической активностью, разработка простых экспрессных и воспроизводимых методик определения АО в растительном сырье представляет собой актуальную задачу. Весьма перспективными являются тест-методы, которые позволяют дать предварительную полуколичественную или количественную оценку присутствия химического компонента в образце, а также провести предварительный скрининг, отбраковку и установление фальсификации образцов. Особенно это важно в процессе контроля качества пищевых продуктов и фармацевтических препаратов.

Нами разработана простая методика тест-определения рутина, основанная на регистрации собственной люминесценции этого препарата, усиленной в присутствии иттрия (III). Способ позволяет осуществлять быстрый скрининг качества фармпрепаратов.

Аппаратура и материалы. Спектры люминесценции рутина и его комплекса с иттрием (III) регистрировали с помощью спектрометра СДЛ-1 (люминесценцию возбуждали светом ртутно-кварцевой лампы СВД-120 А со светофильтром УФС-2, выделяющим излучение с $\lambda_{макс}$=365нм). Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра UV-VIS Specord M40, pH растворов измеряли с помощью иономера универсального ЭВ-74.

Раствор рутина ($1{,}0\cdot10^{-3}$моль/л) готовили по точной навеске препарата в этаноле. Буферный раствор гексаметилентетрамина 10%-ного готовили растворением навески препарата в дистиллированной воде с последующим подкислением соляной кислотой до pH=6,4. Раствор лаурилсульфата натрия ($1\cdot10^{-2}$моль/л) готовили растворением точной навески препарата в дистиллированной воде. Раствор альбумина (альбумин яичного белка 10%-ный) готовили растворением точной навески препарата в дистиллированной воде, 1%-ный раствор альбумина готовили путем разбавления исходного дистиллированной водой.

Экспериментальная часть.

Этанольный раствор рутина при облучении УФ-светом ртутной лампы проявляет люминесцентные свойства, но интенсивность люминесценции (I люм.) невелика. Известно, что I люм. лиганда в некоторых случаях может возрастать при комплексообразовании с ионами металлов, не имеющих собственного поглощения в видимой области спектра. В связи с этим нами было изучено влияние ионов Y (III), La (III), Sc (III), Al (III) на I люм. рутина. При этом было обнаружено, что наиболее высокой интенсивностью люминесценции обладают комплексы с Y (III), который и был выбран для дальнейших исследований.

Спектр поглощения этанольного раствора рутина характеризуется полосой в УФ-области спектра с $\lambda_{макс.}$=363нм с молярным коэффициентом поглощения ε=25600л/см·моль, что свидетельствует об интенсивном поглощении этим лигандом УФ-излучения. При комплексообразовании с ионами Y (III) полоса поглощения рутина сдвигается в видимую область ($\lambda_{макс.}$=415нм). Сдвиг максимума составляет 52нм (рис.1). Батохромное смещение максимума спектра поглощения рутина может служить подтверждением комплексообразования с Y (III). Спектр люминесценции комплекса сдвинут по сравнению со спектром поглощения на 115нм в сторону длинных волн и имеет максимум при $\lambda_{изл.}$=530нм. Оптическая плотность раствора увеличивается в присутствии альбумина, при этом максимум полосы поглощения сохраняется. Увеличение интенсивности полосы поглощения свидетельствует об образовании тройного комплекса с альбумином. Установлено, что I люм. комплекса увеличивается в 10 раз в присутствии альбумина.

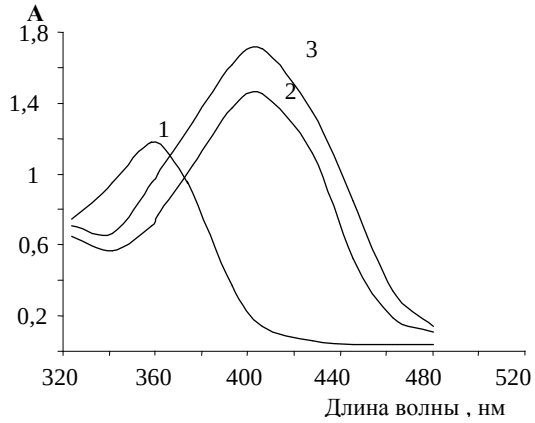


Рис. 1. Спектры поглощения рутина (1), комплекса рутина с иттрием (III)(2), с иттрием (III) и альбумином(3)

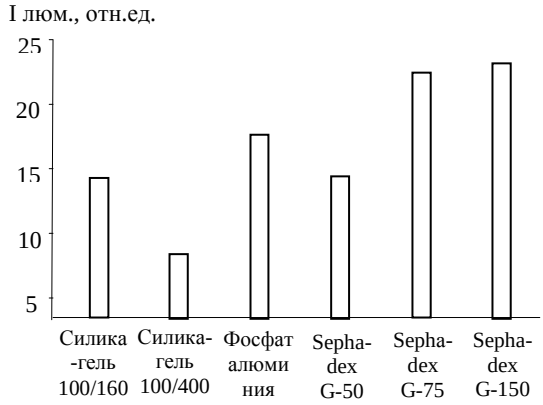


Рис. 2. Интенсивность люминесценции рутина на различных сорбентах, модифицированных ионами иттрия (III) в присутствии альбумина

Интенсивность люминесценции комплекса сохраняется на сорбентах. Исследована сорбция комплекса на различных сорбентах: пенополиуретане, цеолитах (CaA, NaA), фосфате алюминия, силикагеле, Sephadex G-50, G-75, G-150. Установлено, что максимальная интенсивность люминесценции комплекса наблюдается на Sephadex G-75 и G-150, иммобилизированных ионами иттрия (III) (рис.2). Иммобилизацию проводили путем обработки соответствующей навески сорбента водным раствором хлорида иттрия (III) ($1\cdot10^{-2}$моль/л), до гелеобразного состояния. Время сорбции рутина составляет 10-15 минут.

Спектр люминесценции комплекса на Sephadex G-75 имеет тот же максимум люминесценции, что и в растворе ($\lambda_{изл.}$=530нм), и сдвинут по сравнению со спектром поглощения на 115нм в сторону длинных волн (рис.3).

Интенсивность люминесценции рутина на сорбенте зависит от pH раствора, из которого проводится сорбция. Наибольшая I люм. наблюдается при pH=6,4. В качестве буфера использовали раствор уротропина 10%-ный, подкисленный соляной кислотой до pH=6,4. Интенсивность люминесценции сорбата зависит от температуры (рис.4а) и времени высушивания сорбента (рис.4б). Как видно из рисунка максимальная интенсивность люминесценции наблюдается при высушивании сорбата при 100°C в течении 60 минут.

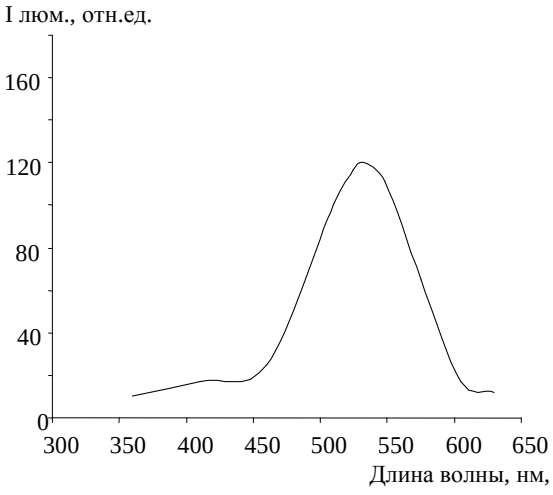


Рис. 3. Спектр люминесценции сорбата комплекса рутина с иттрием (III) на Sephadex G-75

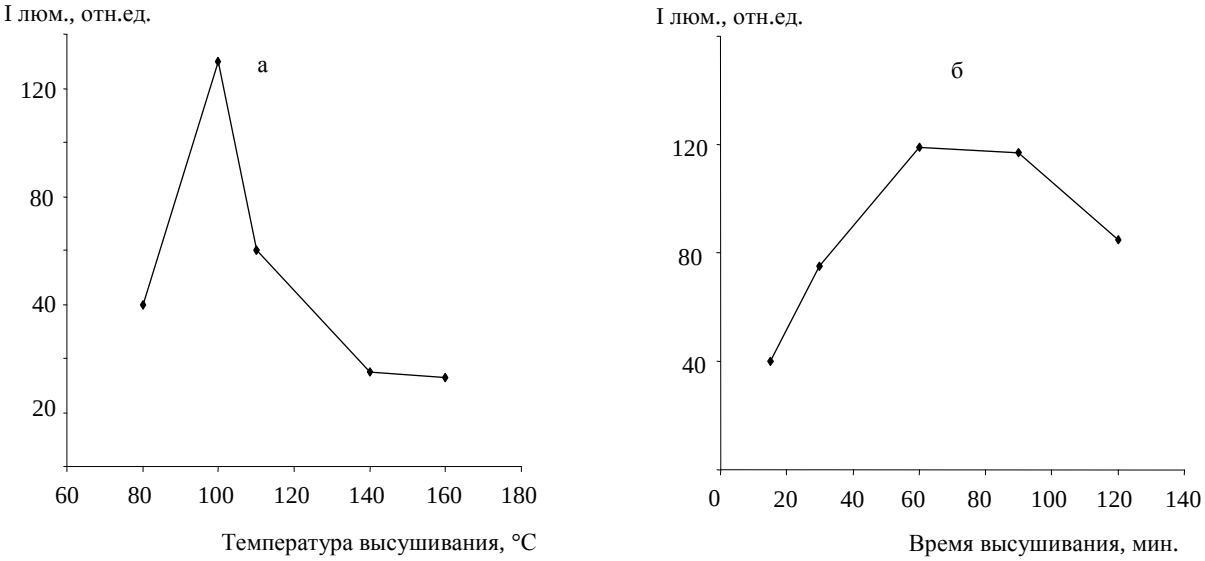


Рис. 4. Интенсивность люминесценции сорбата при различной температуре (а)

и длительности высушивании (б)

Изучение зависимости интенсивности люминесценции рутина от количества иттрия (III) на Sephadex G-75 показало, что интенсивность люминесценции возрастает с увеличением концентрации иттрия (III) (рис.5).

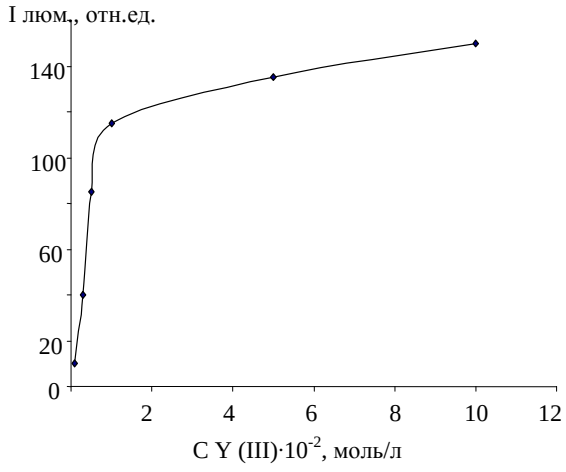


Рис. 5. Зависимость I люм. комплекса от концентрации иттрия(III) на Sephadex G-75

Для дальнейших исследований нами выбрана концентрация иттрия (III) – $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Линейная область зависимости интенсивности люминесценции комплекса от концентрации рутина наблюдается в диапазоне концентраций рутина $(3\text{-}60) \cdot 10^{-3}$мг/мл. Изучено влияние поверхностно-активных веществ на I люм. комплекса. Установлено, что I люм. сорбата комплекса рутина с иттрием (III) возрастает в 2,5 раза в присутствии анионного поверхностно-активного вещества – лаурилсульфата натрия.

На основании полученных результатов разработана методика тест-определения рутина в фармацевтических препаратах: «Рутин», «Аскорутин», «Троксевазин». Определение проводили по методу добавок.

Методика определения.

Таблетки (2 шт.) препарата «Рутин» предварительно растирают в ступке до порошкообразного состояния. Навеску 0,5г препарата количественно переносят в колбу, прибавляют 30мл этанола, перемешивают на магнитной мешалке в течение 30 мин., потом отфильтровывают и доводят объем до 50мл. Спиртовый раствор препарата разбавляют таким образом,

чтобы не наблюдалось гашение люминесценции. В три стаканчика помещают по 100 мг Sephadex G-75, добавляют 1 мл водного раствора хлорида иттрия (III) ($1\cdot10^{-2}$моль/л). Образуется гель. Затем добавляют по 1мл спиртового раствора препарата в каждый стаканчик и по 0,25мл стандартного раствора рутина с содержанием $6\cdot10^{-2}$мг/мл в два из них. Во все три стаканчика добавляют по 0,2мл раствора лаурилсульфата натрия ($1\cdot10^{-3}$моль/л), по 0,2мл 1%-ного раствора альбумина и по 0,1мл буферного раствора гексаметилентетрамина 10%-ного с pH=6,4, перемешивают в течение 15 минут. Осадок отфильтровывают и высушивают в течение 60 минут при 100°С, растирают в ступке до порошкообразного состояния и регистрируют интенсивность люминесценции комплекса, иммобилизованного на сорбенте при $\lambda_{изл.}$=530нм, при возбуждении люминесценции светом ртутной лампы со светофильтром УФС-2 ($\lambda_{возб.}$=365нм).

Аналогично готовят пробы со второй добавкой по содержанию в два раза превышающей первую.

Содержание рутина в пробе рассчитывают по методу добавок по формуле:

$C_x=C_{доб.}I_x/I_{x+доб.}-I_x$, где

C_x – содержание рутина в пробе,

$C_{доб.}$ – концентрация добавки,

I_x – интенсивность люминесценции пробы без добавки,

$I_{x+доб}$ – интенсивность люминесценции пробы с добавкой.

Тест-определение проводили, сравнивая интенсивность люминесценции пробы с интенсивностью люминесценции стандартных образцов, которые содержат разные количества рутина (6-60) $\cdot10^{-3}$ мг/мл и подготовленных таким же способом, как описано выше. На основании сравнительной оценки делают вывод о содержимом рутина в образце.

Результаты определения рутина проверены методом «введено-найдено» и показана правильность разработанной методики.

Результаты определения рутина в фармацевтических препаратах приведены в табл.1. Как видно из таблицы в препарате «Троксевазин» найдено 89% основного вещества, это связано с тем, что в данном фармацевтическом препарате основным действующим веществом является производное рутина - троксерутин, содержание которого не превышает 90% [10]. Предел обнаружения рутина составляет $1\cdot10^{-7}$моль/л.

Предложенная методика определения содержания рутина может применяться для оценки качества фармацевтических препаратов на его основе.

Таблица 1. Результаты определения рутина в фармацевтических препаратах

Объект анализа – Фарм.препарат	Содержание, г	Найдено, г	Sr
«Рутин»	0,02	0,0196±0,0004	0,0750
«Аскорутин»	0,05	0,052±0,0002	0,0418
«Троксевазин»	0,3	0,266±0,020	0,0225

Литература

1. Кочетова М.В. Определение биологически активных фенолов и полифенолов в различных объектах методами хроматографии / Кочетова М.В., Семенистая Е.Н., Ларионов О.Г., Ревина А.А. // Успехи химии. — 2007. – – Т. 76, № 1. — С. 89 — 100.
2. Бурлакова Е.Б. Биоантиоксиданты / Бурлакова Е.Б. // Рос. хим. журн. — 2007. — Т. LI, № 1. — С. 3 — 12.
3. Будников Г.К. Антиоксиданты как объекты биоаналитической химии / Будников Г.К., Зиятдинова Г.К. // Журн. аналит. химии. — 2005. — Т. 60, № 7. – – С. 678 — 691.
4. Зиятдинова Г.К. Определение флавонолов в фармпрепаратах методом вольтамперометрии / Зиятдинова Г.К., Будников Г.К. // Химико – фарм. журн. — 2005. — Т. 39, № 10. — С. 54 — 56.
5. Слепченко Т.Б. Контроль качества биологически активных добавок методами вольтамперометрии. Определение витаминов В1, В2, С, Е. и кверцетина / Слепченко Т.Б., Анисимова Л.С., Слепченко В.Ф., Михеева Е.В., Пикула Н.П. // Химико – фарм. журн. — 2005. — Т. 39, № 3. — С. 54 — 56.
6. Рубенчиков Р.А. Изучение состава фенольных соединений фиалки полевой методом ВЭЖХ / Рубенчиков Р.А., Гончаров Н.Ф. // Химико – фарм. журн. — 2005. — Т. 39, № 3. — С. 31 — 32.
7. Wang L. – H. General method for determination flavonoids in medical plants and raw cosmetic using HPLS with a photodiode array detector / Wang L. – H., Li W. – H. // Химко – фарм. журн. — 2007. — Т. 41, № 4. — С. 46 — 51.
8. Алексеева М.А. Определение полифенольных компонентов хмеля с помощью обращенно – фазовой ВЭЖХ / Алексеева М.А., Эллер К.И., Арзамасцев А.П. // Химко – фарм. журн. — 2004. — Т. 38, № 12. — С. 39 — 41.
9. Жукова О.Л. Изучение фенольного состава подземных органов сабельника болотного / Жукова О.Л., Абрамов А.А., Даргаева Т.Д., Маркарян А.А. // Вестн. Моск. Ун – та. — 2006. — Т. 47, № 5. — С. 342 — 345 .
10. Машковский М.Д. Троксевазин / Машковский М.Д. // Лекарственные средства — 2000 — Т. 1, Вып.. 14. — С. 441.

SORPTION-LUMINESCENT DETERMINATION OF RUTIN IN PHARMACEUTICAL PREPARATIONS

Beltyukova S.V., Bychkova A.A.

A spectrofluorimetric method for determination of rutin in pharmaceutical preparations was developed. The method is based on the luminescence of rutin enhanced by yttrium (III). The detection limit is $1 \cdot 10^{-7}$M rutin.