

Л. И. Митькина, И. И. Зайцева

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ И НИПАГИНА ПРИ ИХ СОВМЕСТНОМ ПРИСУТСТВИИ В ПРЕПАРАТЕ “ДЕЗОКСИНАТ РАСТВОР 0,25 %”

НПЦ “Фармзащита”, Химки Московской обл.

Целью настоящего исследования была разработка методов количественного определения активного компонента — дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и консерванта нипагина в препарате “Дезоксинат раствор 0,25 %”, содержащем нипагин в количестве 0,1 %.

Известны спектрофотометрические методы индивидуального определения ДНК и нипагина в максимумах поглощения в УФ-области [1, 2]. Однако при их совместном присутствии такое определение становится невозможным, поскольку спектры поглощения ДНК и нипагина в УФ-области полностью перекрываются (рисунок).

В настоящей работе показана эффективность использования метода разностной спектрофотометрии в случае перекрывающихся спектров поглощения отдельных компонентов.

Метод разностной спектрофотометрии для количественного определения нуклеиновых кислот, впервые примененный Спириным на кислотном гидролизате [3], и в настоящее время является самым распространенным [4 – 6]. Метод основан на использовании разности оптических поглощений при двух значениях длин волн. Одна длина волны (270 нм) выбирается вблизи максимума поглощения нуклеиновых кислот (максимум поглощения гидролизата около 267 нм) такая, при которой нуклеиновые кислоты с разным нуклеотидным составом обладают более или менее одинаковым поглощением. Вторая длина волны (290 нм) выбирается по возможности так, чтобы поглощение примесей (ароматических аминокислот, полипептидов) при ней было равно поглощению примесей при длине волны 270 нм. При использовании разности поглощений при этих длинах волн нивелируются различия в нуклеотидном составе нуклеиновых кислот и устраняется влияние примесей ненуклеиновой природы.

Подобный прием применен нами при разработке методов анализа препарата “Дезоксинат раствор 0,25 %”. При определении ДНК необходимо было устранить мешающее влияние нипагина, а при определении нипагина — мешающее влияние ДНК.

### Экспериментальная часть

Анализ индивидуальных спектров поглощения ДНК и нипагина в соответствующих концентрациях (рисунок) позволил подобрать такие значения длин волн, при которых суммарное поглощение определяемого и мешающего компонента (поглощение смеси)

равно поглощению мешающего компонента в максимуме поглощения определяемого компонента.

Для определения ДНК подобрана длина волны 241,5 нм, при которой суммарное поглощение ДНК и нипагина (поглощение смеси) равно поглощению нипагина в максимуме поглощения ДНК при 258 нм. Разность оптических плотностей при этих значениях длин волн характеризует поглощение ДНК в максимуме поглощения и пропорционально его концентрации.

Таким же образом для определения содержания нипагина подобрана длина волны 231 нм, при которой суммарное поглощение ДНК и нипагина равно мешающему поглощению ДНК в максимуме поглощения нипагина при 256 нм. Использование разности оптических плотностей при значениях длин волн 256 и 231 нм позволяет устранить мешающее влияние ДНК на определение нипагина.

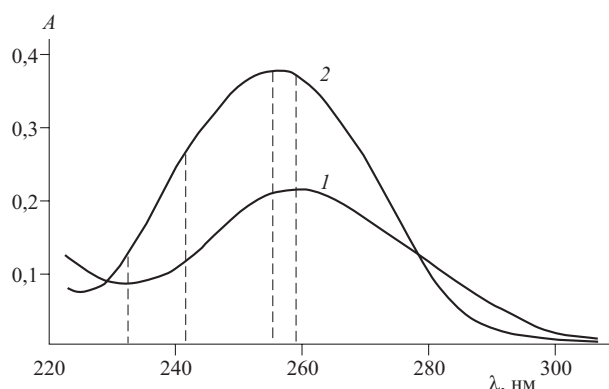
### Методика определения

1 мл препарата помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Измеряют оптические плотности поглощения полученного раствора на спектрофотометре при длинах волн 231; 241,5; 256 и 258 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм относительно воды.

Содержание ДНК в 1 мл раствора в миллиграммах ( $X_1$ ) вычисляют по формуле:

$$X_1 = \frac{(A_{258} - A_{241,5}) \cdot 250 \cdot 10}{206},$$

где  $A_{258}$  и  $A_{241,5}$  — оптические плотности поглощения раствора при длинах волн 258 и 241,5 нм соответственно; 206 — удельный показатель поглощения ДНК



Спектры поглощения ДНК (1) и нипагина (2): С, %:  $1,00 \cdot 10^{-3}$  (1);  $4,00 \cdot 10^{-4}$  (2)

Таблица 1  
Результаты определения ДНК на модельных растворах, содержащих ДНК и нипагин

№ раствора	μ, мг/мл	$X_i$	$\bar{X}$	S	$\Delta\bar{X}$	$\frac{\Delta X \cdot 100\%}{X}$
1 нипагина 0,994 мг/мл	2,65	2,59	2,63	$5,07 \cdot 10^{-2}$	0,08	3,0
		2,69				
		2,66				
		2,59				
		2,59				
2 нипагина 1,098 мг/мл	2,65	2,79	2,78	$6,40 \cdot 10^{-2}$	0,10	3,6
		2,83				
		2,82				
		2,69				
		2,42				
3 нипагина 0,902 мг/мл	2,65	2,45	2,39	$6,14 \cdot 10^{-2}$	0,10	4,2
		2,42				
		2,37				
		2,31				
		2,31				

при длине волны 258 нм (определено на четырех сериях растворов ДНК, концентрацию которых определяли по [3]).

Содержание нипагина в 1 мл раствора в миллиграммах ( $X_2$ ) вычисляют по формуле:

$$X_2 = \frac{(A_{256} - A_{231}) \cdot C_0 \cdot 250}{A_0 \cdot 1},$$

где  $A_{256}$  и  $A_{231}$  — оптические плотности поглощения раствора при длинах волн 256 и 231 нм соответственно;  $A_0$  — оптическая плотность поглощения раствора стандартного образца нипагина при длине волны 256 нм;  $C_0$  — содержание нипагина в 1 мл раствора стандартного образца, в миллиграммах.

Примечание 1. Приготовление раствора стандартного образца нипагина. Около 0,01 г (точная навеска) нипагина (ФС 42 – 1460 – 89) помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. 2 мл полученного раствора помещают в колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают.

Содержание нипагина ( $C_0$ ) в 1 мл раствора стандартного образца в миллиграммах вычисляют по формуле:

$$C_0 = \frac{a \cdot 2 \cdot 1000}{100 \cdot 50},$$

где  $a$  — навеска нипагина, в граммах.

Таблица 2  
Результаты определения нипагина на модельных растворах, содержащих ДНК (2,65 мг/мл) и нипагин

№ раствора	μ, мг/мл	$X_i$	$\bar{X}$	S	$\Delta\bar{X}$	$\frac{\Delta X \cdot 100\%}{X}$
1	0,994	0,995	0,995	$0,53 \cdot 10^{-2}$	0,009	0,9
		1,000				
		0,998				
		0,997				
		1,000				
2	1,098	1,097	1,083	$2,17 \cdot 10^{-2}$	0,035	3,2
		1,102				
		1,054				
		1,081				
		1,081				
3	0,902	0,929	0,940	$0,79 \cdot 10^{-2}$	0,013	1,4
		0,944				
		0,939				
		0,947				
		0,947				

Примечание 2. Выбранные значения длин волн рекомендуется периодически проверять и при необходимости корректировать.

На модельных растворах, в которых содержание нипагина изменялось в пределах  $\pm 10\%$  от заданного, относительная погрешность определения нипагина составила до 5 %, ДНК — до 10 % (табл. 1 и 2).

Таким образом, на примере препарата “Дезоксинат раствор 0,25 %” показана возможность определения количественного содержания двух компонентов при перекрывающихся спектрах их поглощения предложенным методом, согласно которому сначала измеряют оптическую плотность в максимуме поглощения определяемого компонента, затем при такой длине волны, где суммарное поглощение определяемого и мешающего компонентов равно поглощению мешающего компонента, в максимуме поглощения определяемого компонента и разность найденных оптических плотностей используют для определения количественного содержания определяемого компонента.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Нуклеиновые кислоты*, Э. Чаргафф, Дж. Дэвидсон (ред.), Москва (1962), сс. 45, 63.
2. В. В. Кобяков, А. М. Овсянян, В. П. Панов, *Хим.-фарм. журн.*, **16**(3), 115 (1982).
3. А. С. Спириин, *Биохимия*, **23**, 656 – 662 (1958).
4. ФС 42-3922-00, *Дезоксинат*.
5. ФСП 42-0043-2398-02, *Нуклеоспермат натрия*.
6. ВФС 42-2630-95, *Натрия дезоксирибонуклеат*.

Поступила 02.12.03