**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
| [Ячейка: 1 интервал, ширина линии 16,5 см. Строка ниже: точно 2] |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Флуориметрия** |  | **ОФС.1.2.1.1.0006** |
|  |  | **Взамен ОФС.1.2.1.1.0006.15** |

|  |
| --- |
|  |

Метод флуориметрии (или флуоресцентная спектрофотомерия), основан на измерении интенсивности флуоресценции, излучаемой испытуемым образцом относительно флуоресценции, излучаемой стандартным образцом.

**Область применения**

Спектры флуоресценции специфичны для определяемых веществ, поэтому данный метод может быть применён для их идентификации. При количественных определениях интенсивность флуоресценции раствора испытуемого образца сравнивают с интенсивностью флуоресценции раствора стандартного образца флуоресцирующего вещества известной концентрации, измеренной в идентичных условиях на одном и том же приборе.

Метод флуориметрии в 10–100 раз чувствительнее абсорбционной спектрофотометрии, но флуоресцентными свойствами обладает только ограниченный круг соединений: ароматические, особенно с конденсированными структурами, гетероциклические и карбонильные соединения. Из фармацевтических субстанций определению методом флуориметрии подлежат, например: аминокислоты (фенилаланин, триптофан, тирозин), алкалоиды (стрихнин, резерпин, хинин), витамины (фолиевая кислота, рибофлавин, ретинола ацетат), стероидные гормоны (этинилэстрадиол).

**Метод**

Флуоресценция (один из видов люминесценции) – испускание света химическим веществом, находящимся в возбуждённом состоянии, при переходе в основное состояние. Первоначальный переход вещества из основного в возбуждённое состояние происходит при этом виде люминесценции за счёт поглощения им световой энергии при облучении ультрафиолетовым, видимым или иным электромагнитным излучением. Флуоресценция органических соединений охватывает область спектра от 200 до 830 нм.

Как правило, длина волны флуоресцентного излучения больше длины волны возбуждения на 20–30 нм и более из-за потери части энергии в возбуждённом состоянии (Стоксов сдвиг). Поглощение и испускание излучения осуществляется благодаря переходу электронов между различными энергетическими уровнями или молекулярными орбиталями. Испускание света происходит через определённый промежуток времени после его поглощения; этот промежуток времени представляет собой длительность пребывания молекулы в возбуждённом состоянии. Для большинства флуоресцирующих веществ время затухания флуоресценции составляет обычно 10−9–10−8с. Короткое время жизни флуоресценции отличает этот тип люминесценции от фосфоресценции, которая представляет собой долгоживущее свечение, имеющее время жизни от 10−3 с до нескольких мин.

Интенсивность флуоресценции измеряется в условных единицах, пропорциональных отклику детектора и обозначается символом *I*.

Спектр испускания флуоресценции представляет собой зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны (в нм) или частоты (в см−1) при заданной длине волны возбуждения. Спектр возбуждения флуоресценции представляет собой зависимость интенсивности излучения в максимуме испускания флуорофора от длины волны или частоты возбуждающего света. При этом спектр возбуждения обычно совпадает со спектром поглощения, так же как и интенсивность флуоресценции пропорциональна светопоглощению. Комбинирование спектров испускания, полученных при различных длинах волн возбуждения, даёт трёхмерную карту испускания.

Интенсивность флуоресценции зависит от:

- температуры;

- растворителя;

- величины рН испытуемого раствора;

- присутствия в растворе посторонних частиц;

- концентрации кислорода в испытуемом растворе;

- постороннего освещения.

Эффективность флуоресценции обратно пропорциональна температуре. Для некоторых веществ эффективность флуоресценции может снижаться на 1,0–2,0 % при повышении температуры на 1 °С. В таких случаях требуется термостатирование образцов.

Флуоресценцию определяют в растворах с концентрацией от 10−5М и менее, в диапазоне, для которого наблюдается прямая зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации. При более высоких концентрациях всё более значительная часть поступающего света абсорбируется образцом вблизи поверхности кюветы, и линейная зависимость величины сигнала от концентрации определяемого вещества нарушается.

Интенсивность и спектральное распределение флуоресценции зависит от растворителя. Растворитель, используемый для измерения, должен быть правильно подобран. Его чистота и рН могут заметно влиять на результат испытаний. Многие соединения, флуоресцирующие в органических растворителях, практически не флуоресцируют в воде. Все замеры интенсивности флуоресценции должны быть скорректированы относительно растворителя.

Перед измерением флуоресценции из испытуемого раствора фильтрованием или центрифугированием должны быть удалены твёрдые частицы, так как они могут поглощать некоторую долю возбуждающей энергии, дезактивировать возбужденные молекулы или завышать измеряемую величину из-за многократных отражений в кювете с образцом. При фильтровании через фильтр следует учитывать, что материал фильтра может содержать флуоресцентные примеси.

Интенсивность флуоресценции обратно пропорциональна концентрации кислорода, являющегося сильным гасителем флуоресценции. По степени тушения флуоресценции можно определять концентрацию кислорода в окружающей среде. Для удаления кислорода через испытуемый образец пропускают азот или гелий.

Большинство флуоресцирующих веществ чувствительно к свету. Во время облучения во флуориметре они могут подвергаться фоторазложению с образованием других флуоресцирующих продуктов. Такие эффекты обнаруживают при наблюдении за показаниями детектора во времени и могут быть снижены путём приглушения света с помощью светофильтров или экранов.

Шкала длин волн фильтрационных флуориметров и спектрофлуориметров должна периодически калиброваться.

**Оборудование**

Для проведения флуориметрического испытания используют приборы двух типов: фильтрационный флуориметр и спектрофлуориметр.

***Фильтрационный флуориметр*** состоит из источника излучения, первичного фильтра длин волн, камеры для образца, вторичного фильтра длин волн и системы детектирования флуоресценции. Как правило, детектор помещён под углом 90° к возбуждающему световому потоку. Геометрия прямого угла предусматривает детектирование только произведённого флуоресцентного сигнала. Детектор получает часть возбуждающего излучения в результате рассеивающих свойств самого раствора, а также из-за присутствия в растворе твёрдых частиц. Для устранения этого остаточного рассеяния используют спектральные фильтры. Первичный фильтр отбирает коротковолновое излучение, способное к возбуждению испытуемых образцов, вторичный фильтр пропускает флуоресценцию в длинноволновой области, но блокирует рассеянное возбуждение.

Детекторы флуориметров преобразуют оптический сигнал в электрический с помощью фотоумножителей разных типов. Каждый тип детектора имеет специальные характеристики: спектральная область максимальной чувствительности, степень усиления, соотношение сигнал/шум.

***Спектрофлуориметры*** отличаются от фильтрационных флуориметров тем, что вместо спектральных фильтров в них используют монохроматоры типа призмы или решётки. Эти приборы более предпочтительны для аналитических целей. В спектрофлуориметрах монохроматоры снабжены щелями. Чем уже щель, тем выше разрешение и спектральная чистота, но меньше чувствительность. Выбор размера щели определяется разделением между длинами волн возбуждающего и испускаемого излучения и необходимым уровнем чувствительности.

В качестве источников возбуждающего излучения в флуориметрах используют:

- ртутные лампы низкого давления, предоставляющие большое количество длин волн возбуждения, но не являющиеся источником излучения равномерного спектра;

- ксеноновые газоразрядные лампы, обеспечивающие высокоинтенсивное почти равномерное излучение в широком диапазоне спектра (300–800 нм) и достаточно интенсивное в коротковолновой области до 200 нм;

- лазеры, излучающие свет высокой интенсивности в очень узком интервале длин волн (не более 0,01 нм) и позволяющие благодаря этому не использовать монохроматоры или первичные светофильтры;

- светодиоды и светодиодные матрицы, излучающие свет в определённых диапазонах длин волн.

Для размещения испытуемых образцов в флуориметрах используют, как правило, прямоугольные кварцевые кюветы, отполированные со всех 4 вертикальных сторон, иногда – цилиндрические кюветы или пробирки. Обычно объём испытуемых образцов составляет 2–3 мл, но к некоторым приборам прилагаются кюветы вместимостью от 100 до 300 мкл или капиллярные держатели для ещё меньшего объёма.

**Методика**

Испытуемый образец растворяют в растворителе или смеси растворителей, указанных в фармакопейной статье. Настраивают прибор в соответствии с инструкцией производителя. Полученный раствор помещают в кювету или камеру флуориметра и облучают возбуждающим светом, имеющим как можно большую монохроматичность, при длине волны, указанной в фармакопейной статье.

Измеряют интенсивность испускаемого света под углом 90°относительно возбуждающего света после прохождения сквозь светофильтр или монохроматор, избирательно пропускающий свет с длиной волны максимальной флуоресценции.

***Последовательность выполнения количественного определения***

В прибор помещают растворитель или смесь растворителей, используемые для растворения испытуемого образца, и устанавливают регистрирующее устройство на нулевое значение. Затем помещают раствор стандартного образца и устанавливают чувствительность прибора таким образом, чтобы отклик показаний был не менее 50. Если для регулировки чувствительности требуется изменение ширины щели, должны быть повторены обнуление прибора относительно растворителя и измерение интенсивности флуоресценции стандартного образца. После этого в прибор помещают раствор испытуемого образца с неизвестной концентрацией и регистрируют показания прибора. В случае линейной зависимости интенсивности испускаемого света от концентрации вещества рассчитывают последнюю в растворе испытуемого образца (*C)* по формуле:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | $$C= \frac{I⋅C\_{0}}{I\_{0}},$$ |  |
| где | *С* | – | концентрация испытуемого раствора; |
|  | *C*0 | – | концентрация вещества в стандартном растворе; |
|  | *I* | – | интенсивность света, испускаемого испытуемым раствором; |
|  | *I*0 | – | интенсивность света, испускаемого стандартным раствором. |

Если значение интенсивности флуоресценции не прямо пропорционально значению концентрации раствора, измерение может быть произведено с использованием калибровочного графика.

В некоторых случаях измерения флуоресценции испытуемого образца могут производиться с использованием независимого стандарта (флуоресцентного стекла или раствора другого флуоресцентного вещества). В качестве стандартов могут быть использованы: раствор известной концентрации хинина в серной кислоты растворе 0,05 М или раствор флуоресцеина в растворе натрия гидроксида 0,1 М. В таких случаях концентрацию испытуемого образца следует определять с использованием предварительно полученного в тех же условиях калибровочного графика.