

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Уральский государственный медицинский университет»

ПРОИЗВОДНЫЕ ИЗОАЛЛОКСАЗИНА В КАЧЕСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Учебно-методическое пособие

Екатеринбург
Издательство УГМУ
2016

УДК 615.1(075.8)
ББК 52.82
П801

*Печатается по решению
Методической комиссии специальности
ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России
(протокол № 4 от 27.11.2015 г.)*

*Ответственный редактор
д-р фармацевт. наук О. А. Мельникова*

*Рецензенты:
д-р мед. наук Л. П. Ларионов
д-р хим. наук В. Д. Тхай*

П801 *Производные изоаллоксазина в качестве лекарственных средств
[Текст] : уч.-метод. пособие / Под ред. О. А. Мельниковой; ФГБОУ ВО УГМУ
Минздрава России. — Екатеринбург : Изд-во УГМУ, 2016. — 72 с.*

ISBN 978–5–89895–800–8

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов 4 и 5-го курсов очного отделения и 5 и 6-го курсов заочного отделения фармацевтического факультета, интернов, аспирантов и соискателей.

УДК 615.1(075.8)
ББК 52.82

ISBN 978–5–89895–800–8

© УГМУ, 2016

СОДЕРЖАНИЕ

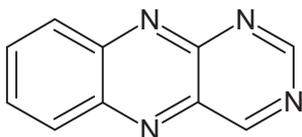
ПРОИЗВОДНЫЕ ИЗОАЛЛОКСАЗИНА

Химическое строение	4
Суточная потребность. Пищевые источники.	4
Метаболизм рибофлавина в организме	6
Биохимические функции рибофлавина	6
Получение	7
Химические свойства	8
Подлинность рибофлавина	9
Подлинность рибофлавина мононуклеотида	13
Количественное определение	14
Чистота	16
Хранение.	17
Применение	17
Форма выпуска.	17
Список использованной литературы.	18
<i>Приложение 1</i>	
Способ микробиологического синтеза рибофлавина	19
<i>Приложение 2</i>	
Расшифровка фармакопейной статьи	21
<i>Приложение 3</i>	
ФС из Британской фармакопеи	30
<i>Приложение 4</i>	
Задачи	40
<i>Приложение 5</i>	
Ответы на задачи	41
<i>Приложение 6</i>	
Прописи с рибофлавином	42

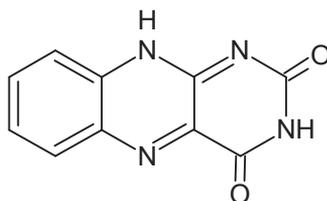
ПРОИЗВОДНЫЕ ИЗОАЛЛОКСАЗИНА

Химическое строение

Гетероциклическая система изоаллоксазин подобно птеридину включает два гетероцикла: пиримидин и пиазин, но содержит еще бензольный цикл. Таким образом, изоаллоксазин является частично гидрированным производным бензоптеридина. Пиримидиновое ядро изоаллоксазина имеет характер лактамного цикла [1].



Бензоптеридин



Изоаллоксазин

Изоаллоксазин за счет системы сопряжения двойных связей в птеридиновом цикле имеет яркую желтую окраску, поэтому называется флавином (от лат. flavus — желтый). Витамины комплекса В — флавиновые витамины.

В медицинской практике применяются рибофлавин и рибофлавина мононуклеотид (см. табл. 1).

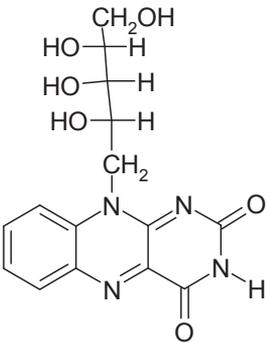
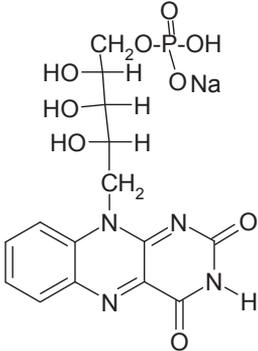
Строение рибофлавина было установлено на основании изучения продуктов его распада и полного синтеза, который был осуществлен в 1935 г. Каррером с сотрудниками. [7]

Суточная потребность. Пищевые источники

Суточная потребность в рибофлавине — 1–3 мг.

Основными источниками рибофлавина являются печень, почки, желток куриного яйца, творог. В кислом молоке витамина содержится больше, чем в свежем. В растительных продуктах витамина

Свойства производных изоаллоксазина

Рибофлавин	Рибофлавина мононуклеотид
	
Желто-оранжевый кристаллический порошок со слабым специфическим запахом	Желто-оранжевый кристаллический порошок без запаха
На свету не устойчив	На свету не устойчив
Удельное вращение -115 до -135° в спиртовом растворе гидроксида калия	Удельное вращение $+37$ до $+43^\circ$ в 5М растворе соляной кислоты
Медленно растворим в воде. Пр. н.р. в этаноле, хлороформе Растворим в кислотах и щелочах (амфотерное соединение)	Растворим в воде. Пр. н.р. в этаноле, хлороформе
Флуоресценция водного раствора: интенсивно зеленая в УФ-излучении (флуориметрическое определение)	Флуоресценция водного раствора: желто-зеленая в УФ-свете (254 нм) (исчезает в кислотах и щелочах)
4 максимума поглощения в водных растворах: 223, 267, 370, 445 нм	3 максимума в среде ацетатного буфера: 266, 373, 445 нм
ИК-спектр — после прессования с калия бромидом	
Удельное вращение (поляриметрическое определение возможно благодаря рибитильному фрагменту)	

B_2 мало (исключение — миндальные орехи). Также содержится в дрожжах, мясе, рыбе, субпродуктах, овощах, лимонах. Частично дефицит рибофлавина восполняется кишечной микрофлорой.

Метаболизм рибофлавина в организме

В пище витамин B_2 находится преимущественно в составе коферментных систем, связанных с белками, — флавопротеинов. Под влиянием пищеварительных ферментов витамин высвобождается и всасывается путем простой диффузии в тонком кишечнике. Там рибофлавин фосфорилируется до FMN и FAD. Реакции протекают следующим образом:

- 5-ОН- группа боковой цепи рибитола фосфорилируется флавокиназой с образованием FMN;
- FMN с помощью фосфатных связей соединяется с аденозинфосфатом при участии фермента пиродифосфорилазы.

Биохимические функции рибофлавина

Основное значение витамина B_2 состоит в том, что он входит в состав флавиновых коферментов — FMN и FAD. Роль этих коферментов заключается в следующем:

- FMN и FAD — коферменты оксидаз, переносящих электроны и H^+ с окисляемого субстрата на кислород. Таковыми являются ферменты, участвующие в распаде аминокислот (оксидазы D- и L-аминокислот), нуклеотидов (ксантиноксидаза), биогенных аминов (моно- и диаминооксидазы) и другие.
- FMN и FAD — промежуточные переносчики электронов и протонов в дыхательной цепи: FMN входит в состав I-го комплекса цепи тканевого дыхания, FAD — в состав II-го комплекса.
- FAD — кофермент пируват- и α -кетоглутаратдегидрогеназных комплексов (наряду с ТПФ и другими коферментами FAD осуществляет окислительное декарбоксилирование соответствующих кетокислот), а также единственный кофермент сукцинатдегидрогеназы (фермента цикла Кребса).

- FAD — участник реакций окисления жирных кислот в митохондриях (он является коферментом ацил-КоА-дегидрогеназы) [5].

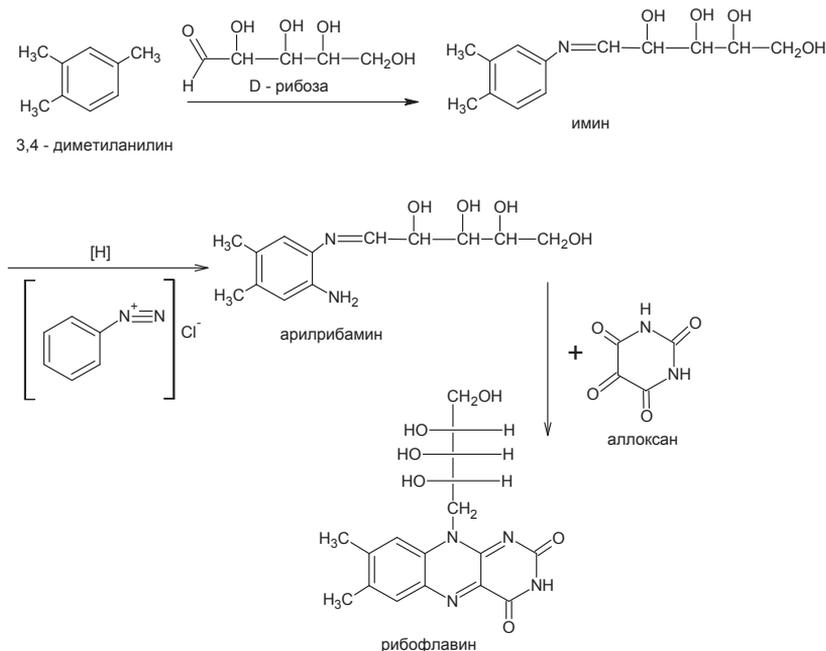
Рибофлавин участвует в синтезе белков и жиров, оказывает влияние на состояние ЦНС, действует на процессы обмена в роговице и сетчатке глаза.

Получение

Рибофлавин можно получить из животного и растительного сырья. Однако процесс этот трудоемок и дает очень низкий выход.

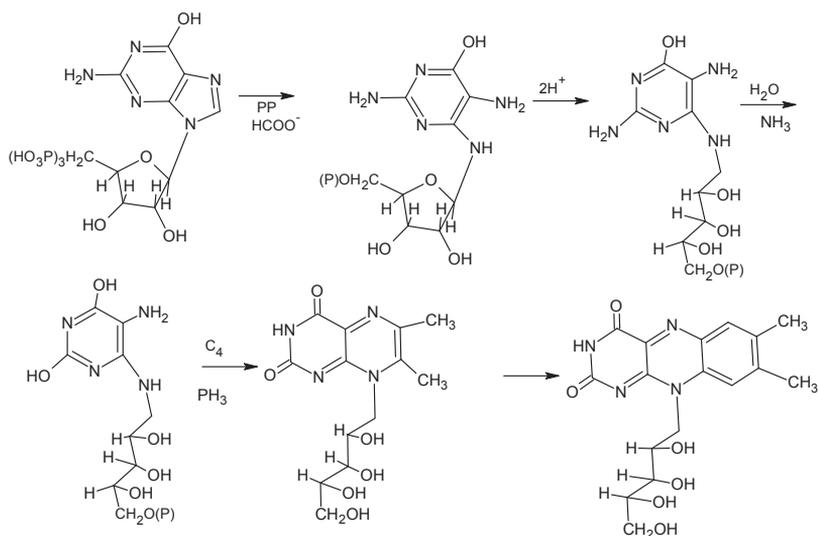
А. Промышленный способ [1]

Рибофлавин синтезируют путем конденсации 3,4-диметиланилина с D-рибозой. Полученный имин гидрируют, затем через реакцию азосочетания образуют арилрибамин и конденсируют его с аллоксаном:



Б. Микробиологический синтез (см. Приложение 1)

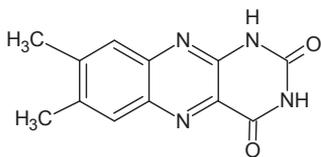
Путь синтеза рибофлавина установлен в результате исследований, выполненных с грибом *Eremothecium ashbyii*, на мутантах *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichiaguillier mondii* и мутантах бактерий *Vac. subtilis*. Расшифровке пути способствовали исследования с мечеными соединениями и осуществление ранних реакций биосинтеза *in vitro*. Предшественником рибофлавина служит гуанозинтрифосфат (ГТФ). Пуриновое кольцо ГТФ локализуется в гетероциклическом ядре рибофлавина, а рибозное ядро включается в его рибитильную цепь.



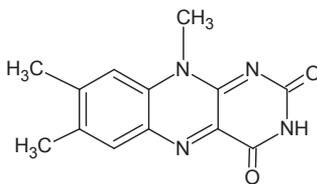
Химические свойства [1]

Характерная особенность рибофлавина — его светочувствительность. Под влиянием света происходят изменения в химической структуре рибофлавина. Они зависят как от интенсивности облучения, так и от pH среды. При действии света в нейтральной или слабокислой среде происходит частичное или полное отщепление остатка рибозы с образованием *люмикрома*, имеющего желтое окрашивание, но не флуоресцирующего. В щелочной среде при облу-

чении раствора рибофлавина образуется в основном *люмифлавин* (и частично люмихром) — реакция на азодиенную группу:



Люмихром



Люмифлавин

Подлинность рибофлавина

По ФС 42–2954–93: Около 1 мг препарата растворяют в 100 мл воды. Раствор имеет яркую зеленовато-желтую окраску. При просматривании в ультрафиолетовом свете обнаруживается интенсивная зеленая флуоресценция, исчезающая сразу после прибавления кислоты хлористоводородной разведенной или растворов натрия едкого или калия едкого. После прибавления натрия гидросульфата исчезают флуоресценция и окраска.

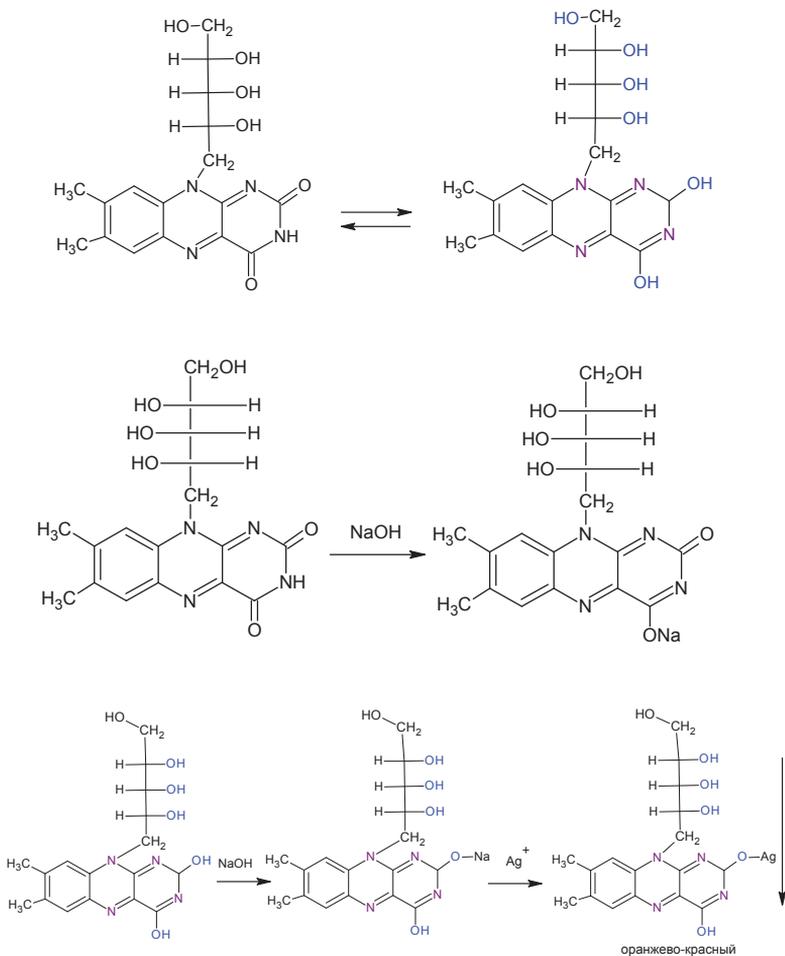
1. ИК спектр в таблетках с калия бромидом должен иметь полное совпадение полос поглощения с полосами поглощения спектра стандартного образца или спектра сравнения.

2. УФ спектр. Рибофлавин имеет 4 максимума поглощения 223, 267, 370 и 445 нм. В качестве растворителя используют воду с добавлением уксусной кислоты и ацетата натрия. Спектрофотометрическое определение проводят при длине волны 267 нм.

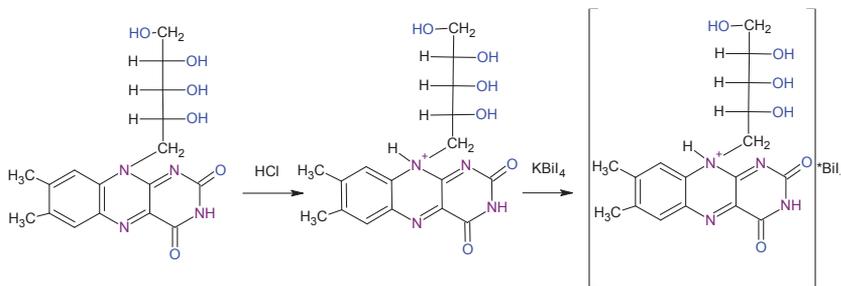
3. Флуоресценция при возбуждении УФ светом с частотой 254 нм.

4. ВЭЖХ и ТСХ.

Имидная группа обуславливает возможность таутомерных переходов, что лежит в основе кислотных свойств рибофлавина и взаимодействия с тяжелыми металлами (Ag^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+}). Например, с раствором нитрата серебра в нейтральной среде рибофлавин образует комплекс оранжево-красного цвета.

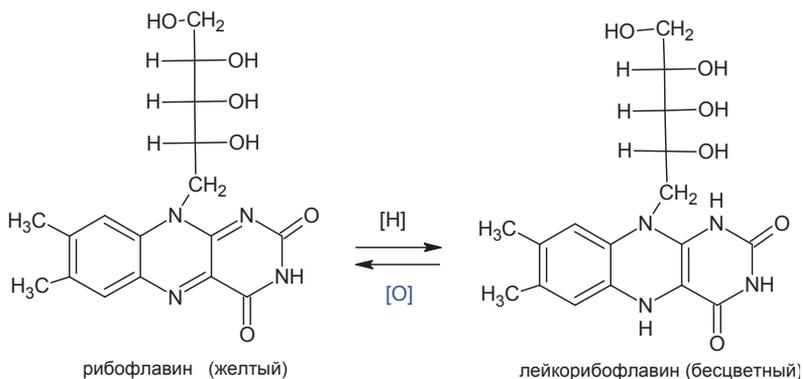


Третичный атом азота обуславливает основные свойства. Рибофлавин растворяется в ледяной уксусной кислоте и минеральных кислотах, образует осадки с общеалкалоидными осадительными реактивами:



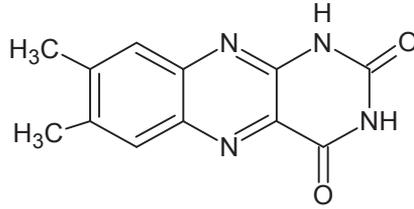
Таким образом, рибофлавин обладает амфотерными свойствами.

Азидиеновая группировка обуславливает окислительно-восстановительные свойства рибофлавина. Если к водному раствору рибофлавина прибавить гидросульфит натрия (сильный восстановитель), то окраска и флуоресценция исчезают вследствие образования лейкорибофлавина:

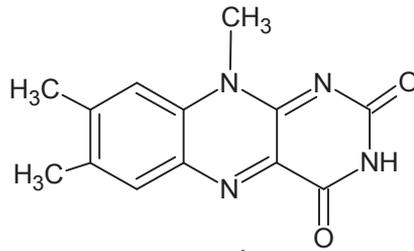


Светочувствительность (отщепление рибитильного фрагмента)

При действии света в нейтральной или слабокислой среде происходит частичное или полное отщепление остатка рибозы с образованием люмихрома, имеющего желтое окрашивание, но не флуоресцирующего. В щелочной среде при облучении раствора рибофлавина образуется в основном люмифлавин (и частично люмихром):



люмихром



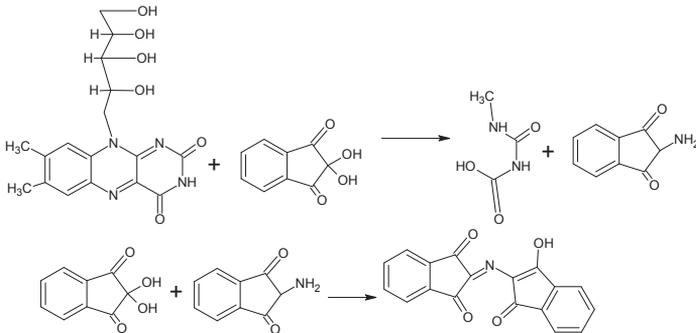
люмифлавин

Качественные реакции

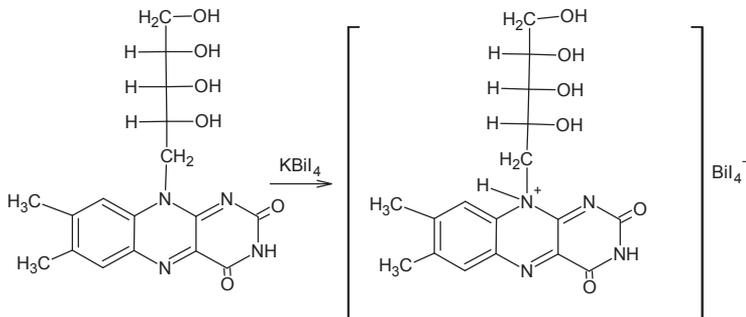
1. Растворить 1 мг вещества в 100 мл воды и наблюдать окраску раствора (зеленовато-желтая), флуоресценцию (зеленая). При добавлении щелочей и кислот флуоресценция исчезает. При добавлении натрия гидросульфита исчезают окраска и флуоресценция.

2. Качественная реакция с концентрированной серной кислотой. На часовом стекле к крупинке рибофлавина добавляют каплю серной кислоты — появляется вишнево-красное окрашивание.

3. Раствор нингидрина в щелочной среде — зеленое окрашивание:



4. Реакция с общеалкалоидными реактивами (на примере реактива Драгендорфа):



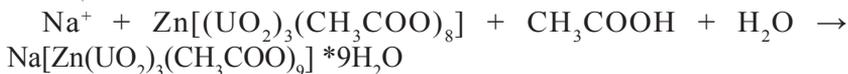
5. Образование комплексных солей с тяжелыми металлами (Ag^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Hg^{2+}). Эти реакции используют для фотоколориметрического определения рибофлавина в лекарственных формах.

Подлинность рибофлавина мононуклеотида

Все реакции на рибофлавин, а также дополнительно реакции на ион натрия и фосфат-ионы:

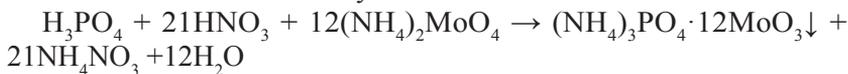
1. Ион натрия:

Взаимодействие с цинкуранилацетатом. Образуется осадок желтого цвета:



— пламя спиртовки окрашивается в желтый цвет.

2. Фосфат-ионы — после кипячения в концентрированной азотной кислоте в течение пяти минут:



— образуется желтый кристаллический осадок, растворимый в растворе аммиака.

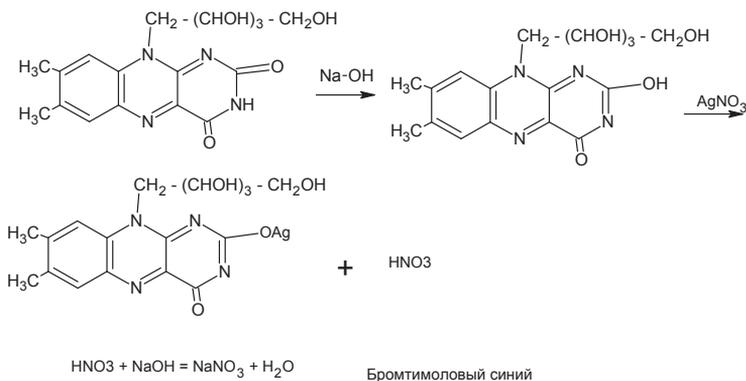
Количественное определение [1, 2]

1. УФ-спектрофотометрия в водном растворе с добавлением уксусной кислоты и ацетата натрия при 267 нм. Расчет осуществляют по удельному показателю поглощения рибофлавина 328.

2. Флуориметрический метод. При возбуждении УФ светом с длиной волны 254 нм.

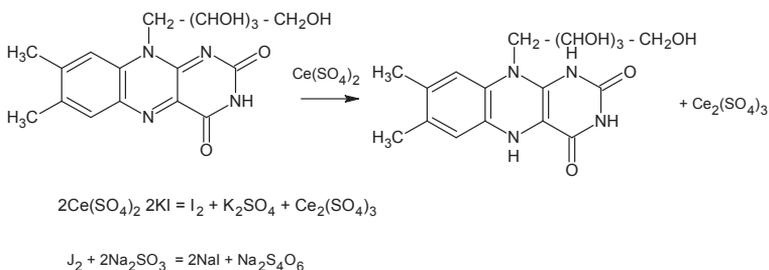
3. Алкалометрическое титрование после реакции с азотно-кислым серебром.

Предполагается, что происходит замещение водорода имино-группы с выделением эквимольного количества азотной кислоты, которую оттитровывают щелочью (индикатор бромтимоловый синий).

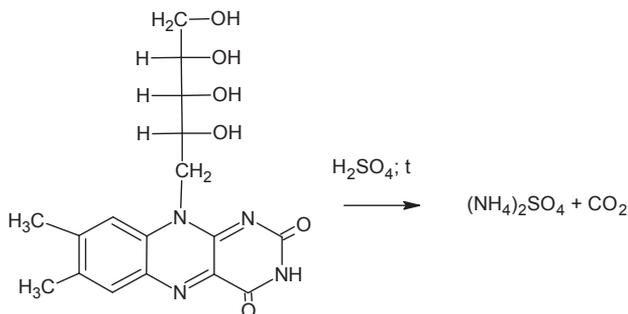


4. Цериметрический метод (по азодиеновой группе).

Избытком сульфата церия при кипячении окисляют рибофлавин. Затем после охлаждения добавляют йодид калия и оттитровывают выделившийся йод.

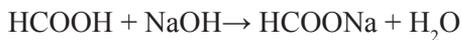
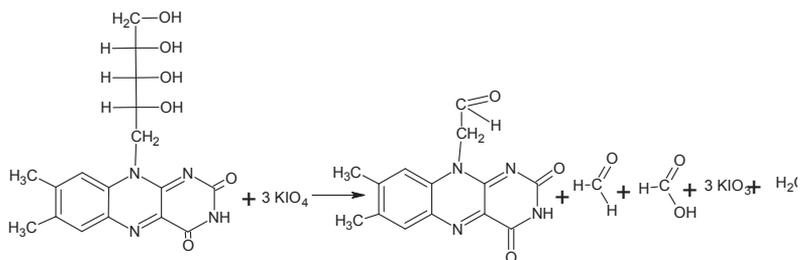


5. Метод Кьельдаля (содержание азота должно быть 14,5–15,2%).

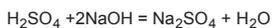
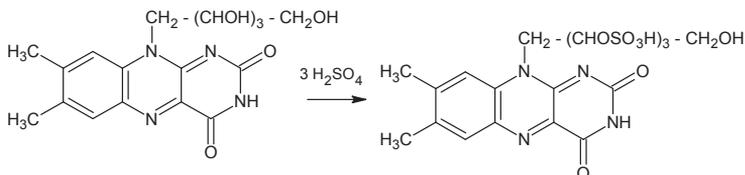


6. Реакции по рибитильному остатку.

6.1. Реакция Малапрада. Окисление рибофлавина периодатом калия с последующим оттитровыванием муравьиной кислоты стандартным раствором гидроксида натрия:



6.2. Этерификация конц. H_2SO_4 (сульфоокислотные эфиры по OH-группам), $f = 1/3$.



7. ВЭЖХ.

8. Колориметрические методы. В их основу положены цветные реакции: с реактивом Дениже (раствор сульфата ртути II) — оранжево-красное окрашивание, при pH 6,5–7,2 с раствором нитрата серебра — красное или розово-красное окрашивание (в зависимости от концентрации рибофлавина).

Для рибофлавина мононуклеотида — аналогично рибофлавину. Кроме того, возможно ацидиметрическое титрование.

Чистота [8]

1. Специфические примеси (предельное содержание):
 - Люмифлавин. Спектрофотометрический метод в видимой области спектра (по интенсивности поглощения примесей).
 - «Поглощающие примеси». Спектрофотометрический метод. Рассчитывают отношение оптических плотностей водного раствора при различных максимумах поглощения: $D_{373\text{ нм}} / D_{267\text{ нм}}$ должно быть от 0,31 до 0,33; $D_{444\text{ нм}} / D_{267\text{ нм}}$ должно быть от 0,36 до 0,39
2. Потеря в массе при высушивании.
3. Для рибофлавина мононуклеотида дополнительно проводят испытания:
 - Примесь водного раствора и его pH (5,8–6,5).
 - Примесь свободной фосфорной кислоты и фосфатов. Спектрофотометрический метод в видимой области спектра.

Хранение

Рибофлавин в хорошо укупоренных банках оранжевого цвета (на свету рибофлавин разрушается).

Рибофлавина мононуклеотид в сухом, защищенном от света месте.

Применение [7]

Основными признаками B_2 -авитаминоза у людей являются поражения слизистой оболочки полости рта, губ, особенно в уголках рта, поражения кожи около ушей и глаз. Одним из специфических симптомов B_2 -авитаминоза является заболевание глаз (зуд, жжение, слезотечение), которое переходит в воспаление глазного яблока с развитием катаракты. Часто результатом B_2 -авитаминоза является анемия, дерматиты. Поэтому рибофлавин широко применяется для лечения таких заболеваний, как стоматиты, дерматиты, конъюнктивиты, катаракты.

Форма выпуска

Рибофлавин: таблетки по 0,005 и 0,01 г.

Рибофлавина мононуклеотид: 2-процентный раствор для инъекций. 1-процентный раствор для глазных капель.

Список использованной литературы

1. Фармацевтическая химия: В 2-х ч. / В. Г. Беликов. — 4-е изд., перераб. и доп. — М.: МЕДпресс-информ, 2007. — С. 561–564.
2. Фармацевтическая химия: учебное пособие / под ред. А. П. Арзамасцева. — М.: Гэотар-Мед, 2004. — С. 470–475.
3. Государственная фармакопея СССР. — 10-е изд. — М.: Медицина, 1968.
4. Анализ лекарственных форм, изготавливаемых в аптеках: пособие / М. И. Кулешова, Л. Н. Гусева, О. К. Сивицкая. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 1989. — 288 с.
5. Морозкина, Т. С. Витамины: краткое руководство для врачей и студентов медицинских, фармацевтических и биологических специальностей / Т. С. Морозкина, А. Г. Мойсеёнок. — Мн.: ООО «Аскар», 2002. — 112 с.: ил.
6. Саушкина, А. С. Сборник задач по фармацевтической химии: учебное пособие по фармацевтической химии для студентов фармацевтических вузов и фармацевтических факультетов медицинских вузов / под ред. В. Г. Беликова. — Пятигорск: Изд-во ПятГФА, 2003. — 274.: ил. 5.
7. Мелентьева, Г. А. Фармацевтическая химия / Г. А. Мелентьева, Л. А. Антонова. — М.: Медицина, 1985—480 с.
8. Цикл лекций по фармацевтической химии для студентов IV курса очного факультета. Часть II / под ред. Т. И. Ярыгиной. — Пермь: ПГФА, 2010. — С. 53–58.

Способ микробиологического синтеза рибофлавина

Союз Советских
Социалистических
Республик



Государственный комитет
Совета Министров СССР
по делам изобретений
и открытий

Всероссийная
патентно-техническая
библиотека ИВА

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

389132

Зависимое от авт. свидетельства № —

Заявлено 01.III.1971 (№ 1631379/30-15)

с присоединением заявки № —

Приоритет —

Опубликовано 05.VII.1973. Бюллетень № 29

Дата опубликования описания 15.XI.1973

М. Кл. С 12d 5/04

УДК 663:577.164.12
(088.8)

Авторы
изобретения

С. И. Алиханян, А. И. Степанов, В. Г. Жданов
и Л. А. Минеева

Заявитель

Всероссийный научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов

СПОСОБ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО СИНТЕЗА РИБОФЛАВИНА

Известны способы многоступенчатого выращивания гриба *Eremothecium ashbyi* в микробиологическом производстве рибофлавина на питательных средах, содержащих мясной бульон.

Так, например, культуру гриба *Eremothecium ashbyi* (вторая генерация), выращенную на косяках с агаризованной соевой средой, засевают в колбы с мясным бульоном. До момента передачи культуры в посевные аппараты проходит пять—семь дней, что отрицательно влияет на ее качество и соответственно на уровень синтеза витамина. В процессе многократных пересевов культуры накапливаются низкоактивные формы, что снижает ее продуктивность. Указанный недостаток существующей технологии приготовления посевного материала для заводских аппаратов является одной из главных причин низкого уровня синтеза витамина в промышленных условиях. Кроме того, существующий способ не обеспечивает его стандартность и стерильность, что в значительной мере нарушает ритмичность работы микробиологических предприятий, производящих рибофлавин.

Предлагаемый способ микробиологического синтеза рибофлавина включает приготовление посевного материала, ферментацию, высушивание культуральной жидкости и мицелию гриба.

Приготовление посевного материала включает три стадии:

- 1) выращивание культуры гриба-продуцента на косяках с питательной агаризованной средой;
- 2) приготовление пшена и выращивание на нем гриба-продуцента;
- 3) засев посевных аппаратов суспензией спор, смываемых с пшена.

1. Выращивание культуры продуцента на косяках с питательной агаризованной средой. Суспензию спор гриба готовят с выращенной на соевых косяках культурой и засевают в чашки Петри с дрожжевой агаризованной средой, содержащей, г:

Дрожжевой экстракт	2
Пептон	3
Глюкоза	10
Агар	20.

На 1 л водопроводной воды рН среды 6,5—6,7. Стерилизуют при 0,5 атм в течение 30 мин. После семи-посьми дней инкубации в термостате при 30°C вырастает колония в количестве 10 шт. пересевают на косяки с соевой агаризованной средой, содержащей, г:

Соевая мука	50
Сахар	10
Агар	20.

На 1 л водопроводной воды рН 6,8—7,0. Стерилизуют при 0,5 атм 30 мин.

Культуру с каждого косяка проверяют на уровень образования рибофлавина. Для этого семисуточную культуру продуцента, выращенную на косяках, пересевает в колбы Эрленмейера на 750 мл, содержащих 100 мл питательной среды следующего состава, г/л водопроводной воды:

Соевая мука	25
Гидрол	30
Кукурузный экстракт	30
Сахар	5
Солод	2,5
Мел (CaCO_3)	5
NaCl	1
Дрожжи сухие	1
FeSO_4	0,05
ZnSO_4 , MnSO_4	0,025
MgSO_4	0,7
CaCl_2	0,5

рН 6,6—6,7

Среду стерилизуют при 1 атм в течение 3 мин.

Культуру в колбах выращивают в течение 96 час при 30°C на качалке 200—220 об/мин.

Синтез витамина определяют флуорометрическим методом. Лучшие по активности варианты используют для получения культуры второй генерации. Для этого косяки с соевой агаризованной средой засевают водной суспензией спор, и мицелия культуры первой генерации. Засев пшена производят водной суспензией спор и мицелия продуцента с косяков второй генерации после их инкубации (7—8 дней при 30°C).

2. Приготовление пшена и выращивание на нем гриба *E. ashbyii*.

Пшеничную крупу промывают холодной водой до полного удаления механических примесей и грязи в промывной воде. Промытое пшено заливают свежереприготовленной молочной сывороткой. Пшено выдерживают на кипящей водяной бане в закрытой эмалированной посуде 30 мин до полного набухания зерен. После 10—15 мин выдерживания пшено распределяют равным тонким слоем на пергаментную бумагу (не должно быть комков), подсушивают 10—15 мин и расфасовывают по 50 г в стерильные стеклянные флаконы объемом 500 мл. Приготовленное таким образом пшено трехкратно стерилизуют в автоклаве при 110°C по 1 час в течение трех дней. Пшено перед засевом культуры должно быть слабо разваренное, сыпучее, светлое. Перед засевом пшено проверяют на стерильность. Для засева пшена используют водную суспензию спор и мицелия культуры второй генерации. 5 мл суспензии спор и мицелия культуры стерильно переносят в каждый флакон, после чего пшено во флаконах встряхивают. Затем фла-

коны в горизонтальном положении помешают в термостат при 30°C на семь-восемь дней при ежедневном встряхивании. Пшено после прорастания гриба приобретает желтый цвет. Содержание спор в каждом флаконе равно 4—5 · 10⁸. Подсчет спор проводят в камере Горяева, а также рассевом в чашки Петри с дрожжевой агаризованной средой. Пшено со спорами гриба высушивают в вакууме при разрежении 0,3 атм в течение 10—12 час и температуре 20—25°C. Посевной материал должен быть проверен на отсутствие посторонней микрофлоры, жизнеспособность и способность к синтезу рибофлавина. Срок хранения высушенного пшена три месяца, без подсушивания — месяц, в запарафинированных флаконах при комнатной температуре, в темноте.

3. Засев посевных аппаратов суспензией спор гриба, смытых с пшена.

Культуру, выращенную на пшене, используют для засева питательной среды посевных аппаратов (среда аналогична составу среды, описанной в разделе 1). Засев производят водной суспензией спор гриба, смытых с пшена. Для активации прорастания спор водную суспензию обрабатывают 1,5%-ным раствором перекиси водорода (конечная концентрация) в течение 1 мин. Для нормального развития гриба в посевных аппаратах необходимо создать концентрацию спор порядка 100—200 спор на 1 мл среды. Например, в посевные аппараты объемом 1 м³ необходимо засеять 2 · 10⁸ спор. Таким образом, для засева одного аппарата объемом 1 м³ достаточно одного флакона с пшеном.

Предмет изобретения

1. Способ микробиологического синтеза рибофлавина на питательной среде, включающей в качестве основных источников углеводов, азота и фосфора гидрол, соевую муку и кукурузный экстракт соответственно, при аэробных условиях выращивания культуры продуцента и ферментации, отличающийся тем, что, с целью получения качественного и стандартного посевного материала продуцента рибофлавина аскомцета *Eremothecium ashbyii*, в качестве органического субстрата для выращивания культуры используют пшено, приготовленное на молочной сыворотке.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что для засева пшена используют культуру второй генерации, выращенную на косяках с соевой агаризованной средой.

3. Способ по пп. 1 и 2, отличающийся тем, что, с целью активации прорастания спор гриба, производят обработку водной суспензии спор перекисью водорода в конечной концентрации 1,5% в течение 1 мин, а засев осуществляют водной суспензией спор, смытых с пшена.

Расшифровка фармакопейной статьи

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАЩЕНИЯ РФ

ФАРМАКОПЕЙНЫЙ КОМИТЕТ

Утверждаю:

Начальник Управления по стандартизации и контролю качества лекарственных средств и медицинской техники с инспекцией по качеству

В.П. Палажкин В.П. Палажкин

"19" *Июль* 1993 г.

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Riboflavinum.

ФС 42- *2954-93*

Рибофлавин

ВЗАМЕН ст. 585 ГФ X изд.

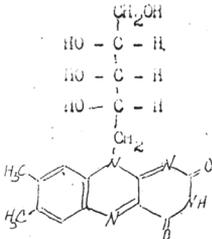
7,8-диметил-10-(2'-рибо-2,3,4,5-тетра-эксипентил) изаллоксазин

Срок введения установлен

с *19* июля 1993 г.

Срок действия

до *19* июля 1998 г.



$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$ М.м. 376,37

Препарат содержит не менее 98,0 и не более 102,0 % $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$ в пересчете на сухое вещество.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

1891-2000

л. 8-39

Описание. Желто-оранжевый кристаллический порошок со слабым специфическим запахом. На свету неустойчив.

Растворимость. Растворим в растворах щелочей, медленно растворим в 15000 - 20000 мл воды; практически нерастворим в спирте 95 % и хлороформе (ГФ XI, вып. I, с. 175).

Подлинность. Около 1 мг препарата растворяют в 100 мл воды. Раствор имеет яркую зеленовато-желтую окраску. При просматривании в ультрафиолетовом свете обнаруживается интенсивная зеленая флуоресценция, исчезающая после прибавления кислоты хлористоводородной разведенной или растворов натрия едкого или кали едкого. После прибавления натрия гидросульфита по ГОСТ 246-76 исчезают флуоресценция и окраска.

Поглощающие примеси. 25 мл раствора, полученного для измерения оптической плотности в разделе "Количественное определение", помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора водой до метки. Измеряют оптическую плотность полученного раствора в кювете с толщиной слоя 10 мм в максимумах при длинах волн: 267 нм; 373 нм; 444 нм.

Отношение $\frac{D \text{ при } 373 \text{ нм}}{D \text{ при } 267 \text{ нм}}$ должно быть от 0,31 до 0,33

$\frac{D \text{ при } 444 \text{ нм}}{D \text{ при } 267 \text{ нм}}$ должно быть от 0,36 до 0,39

Удельное вращение. От минус 110 до минус 135° (ГФ XI, вып. I, с. 30).

Около 0,1 г препарата (точная навеска) растворяют в 20 мл 0,05 М раствора натрия едкого, свободного от карбонатов.

Определение проводят в течение 30 мин после приготовления раствора.

Диметилфлавин. 0,025 г препарата встряхивают с 10 мл хлороформа, очищенного от спирта, в течение 5 мин и фильтруют. Измеряют оптическую плотность фильтрата на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм в максимуме при длине волны 440 нм. В качестве раствора сравнения используют тот же хлороформ. Оптическая плотность фильтрата должна быть не более 0,025.

Потеря в массе при высушивании. Около 0,5 г препарата (точная навеска) сушат при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы. Потеря в массе не должна превышать 1,5 % (ГФ XI, вып. 1, с. 176).

Сульфатная зола и тяжелые металлы. Сульфатная зола из 1 г препарата (точная навеска) не должна превышать 0,2 % (ГФ XI, вып. 2, с. 25) и должна выдерживать испытание на тяжелые металлы не более 0,001 % в препарате (ГФ XI, вып. 1, с. 166).

Микробиологическая чистота. Препарат должен выдерживать требования по микробиологической чистоте (ГФ XI, вып. 2, с. 193).

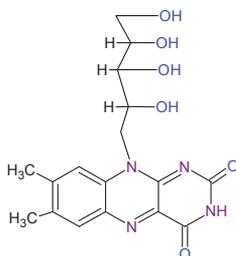
Количественное определение. Определение необходимо проводить при защите от попадания прямого солнечного света.

Около 0,07 г препарата (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 300 мл, прибавляют 5 мл воды и перемешивают до полного увлажнения пробы. Прибавляют по каплям (не более 5 мл) 1 М раствор натра едкого и перемешивают до полного растворения пробы. Сразу же приливают 100 мл воды и 2,5 мл кислоты уксусной ледяной, перемешивают и доводят объем раствора водой до метки.

20 мл этого раствора переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 3,5 мл 0,1 М раствора натрия ацетата, переме-

ФС 42–2954–93 (взамен ст. 585 ГФХ)

Riboflavinum



$C_{17}H_{20}N_4O_6$ М.м.376,37

Препарат содержит не менее 98,0–102,0% в пересчете на сухое вещество

Описание. Желто-оранжевый кристаллический порошок со слабым специфическим запахом. На свету не устойчив.

Растворимость. Растворим в растворах щелочей, медленно растворим в 15000–25000 мл воды; практически не растворим в спирте 95% и хлороформе.

Методика ГФ XI вып. 1, с. 176. Навеску препарата вносят в отмеренное количество растворителя и непрерывно встряхивают в течение 10 мин. при $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Предварительно препарат может быть растерт. Допускается также нагревание на водяной бане до 30°C . Препарат считают растворившимся, если в растворе при наблюдении в проходящем свете не обнаруживаются частицы вещества.

Условный термин	Количество растворителя (мл), необходимое для растворения 1 г вещества
Растворим	От 10 до 30 мл
Практически не растворим	Более 10000

Подлинность. Около 1 мг препарата растворяют в 100 мл воды. Раствор имеет яркую зеленовато-желтую окраску. При просматривании в ультрафиолетовом свете обнаруживается интенсивная зеленая флюоресценция, исчезающая после прибавления кислоты хлористоводородной разведенной или раствора натрия едкого или кали едкого. После прибавления натрия гидросульфита по ГОСТ 246–76 (массовая доля гидросульфита натрия — не менее 93%) исчезают флюоресценция и окраска.

Поглощающие примеси. Приготовление раствора для измерения оптической плотности. Около 0,07 г препарата (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 5 мл воды и перемешивают до полного увлажнения пробы. Прибавляют по каплям (не более 5 мл) 1М раствор натра едкого и перемешивают до полного растворения пробы. Сразу же приливают 100 мл воды и 2,5 мл кислоты уксусной ледяной, перемешивают и доводят объем раствора водой до метки. 20 мл этого раствора переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 3,5 мл 0,1М раствора натрия ацетата, перемешивают и доводят объем раствора водой до метки.

25 мл раствора, полученного для измерения оптической плотности, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора водой до метки. Измеряют оптическую плотность полученного раствора в кювете с толщиной слоя 10 мм в максимумах при длинах волн: 267 нм, 373 нм, 444 нм.

Отношение $\frac{D \text{ при } 373 \text{ нм}}{D \text{ при } 267 \text{ нм}}$ должно быть от 0,31 до 0,33;

$\frac{D \text{ при } 444 \text{ нм}}{D \text{ при } 267 \text{ нм}}$ должно быть от 0,36 до 0,39.

Удельное вращение. От минус 115 до минус 135°. Методика ГФ XI, вып. 1, С. 30–31.

Удельное вращение $[\alpha]$ определяют расчетным путем как угол поворота плоскости поляризации монохроматического света на пути длиной в 1 дм в среде, содержащей оптически активное вещество, при условном приведении концентрации этого вещества к значению, равному 1г/мл.

Определение оптического вращения проводят при температуре 20°C и при длине волны линии D спектра натрия (589,3 нм). Соответствующую величину удельного вращения обозначают. Иногда для измерения используют зеленую линию спектра ртути с длиной волны 546,1 нм.

Величина удельного вращения для веществ, находящихся в растворе:

$$[\alpha] = \frac{\alpha * 100}{l * c},$$

где α — измеренный угол вращения в градусах;
 l — толщина слоя в дм;
 c — концентрация раствора, выраженная в граммах вещества на 100 мл раствора.

Около 0,1 г препарата (точная навеска) растворяют в 20 мл 0,05М раствора натра едкого, свободного от карбонатов. Определение проводят в течение 30 минут после приготовления раствора.

Поляриметрическое определение проводится с расчетом по формуле:

$$C_{\%} = \frac{\alpha \cdot 100\%}{[\alpha]_D^{20} * l},$$

где $[\alpha]_D^{20}$ — удельное вращение;
 α — угол поворота плоскости поляризации в исследуемом растворе, определенный по прибору;
 l — длина кюветы поляриметра (1,902 дм).

Люмифлавин. 0,025 г препарата встряхивают с 10 мл хлороформа, очищенного от спирта, в течение 5 минут и фильтруют. Измеряют оптическую плотность фильтрата на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм в максимуме при длине волны 440 нм. В качестве раствора сравнения используют тот же хлороформ. Оптическая плотность фильтрата должна быть не более 0,025.

Потеря в массе при высушивании (ГФ XI, вып. 1, С. 176).

Точную навеску вещества помещают в предварительно высушенный и взвешенный бюкс и сушат до постоянной массы. Если высушивание проводилось при нагревании, открытый бюкс вместе с крышкой помещают в эксикатор для охлаждения на 50 минут, затем закрывают крышкой и взвешивают. Первое взвешивание проводят после сушки в течение 2-х часов. Последующие взвешивания проводят после каждого часа дальнейшего высушивания.

Около 0,50 г препарата (точная навеска) сушат при температуре от 100 до 105 °С до постоянной массы. Потеря в массе не должна превышать 1,5%.

Сульфатная зола (ГФ XI, вып. 2, С. 25) **и тяжелые металлы** (ГФ XI, вып. 1, С. 165).

Определение сульфатной золы. Точную навеску препарата (около 1 г) помещают в предварительно прокаленный и точно взвешенный

фарфоровый, кварцевый или платиновый тигель, смачивают 1 мл концентрированной серной кислоты и осторожно нагревают на сетке или песчаной бане до удаления паров серной кислоты. Затем прокаливают при слабом калении (около 500 °С) до постоянной массы, избегая сплавления золы и спекания ее со стенками тигля. По окончании прокаливания тигель охлаждают в эксикаторе и взвешивают. В случае трудного сгорания прибавление концентрированной серной кислоты и прокаливание повторяют.

Расчет содержания золы (остатка после прокаливания) в процентах проводят по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_0) \cdot 100}{(m_1 - m_0)},$$

где m_1 — масса тигля с лекарственным веществом до сжигания, г;
 m_2 — результат последнего взвешивания тигля с сырьем после прокаливания, г;

m_0 — масса тигля, г.

Испытания на примеси (тяжелые металлы). Для определения примесей в препаратах и приблизительной оценки их количества вводятся сравнения (колориметрические или нефелометрические) с эталонными растворами, устанавливающими предел содержания данной примеси. Навески для приготовления эталонных растворов отвешиваются с точностью до 0,001 г. Эталонные растворы готовят непосредственно перед применением. Прибавление реактивов к испытуемому и эталонному растворам проводят одновременно и в одинаковых количествах. К 10 мл испытуемого раствора прибавляют применяемые для каждой реакции реактивы, указанные в методике, кроме основного реактива, открывающего данную примесь. Затем раствор делят на две равные части: к одной из них прибавляют основной реактив, и оба раствора сравнивают между собой. Между ними не должно быть заметной разницы.

Сульфатная зола из 1 г препарата (точная навеска) не должна превышать 0,2% и должна выдерживать испытание на тяжелые металлы не более 0,001% в препарате.

Микробиологическая чистота. Методика ГФ XI, вып. 2, С. 194–197.

Испытание на микробиологическую чистоту включает количественное определение жизнеспособных бактерий и грибов, а также выявление определенных видов микроорганизмов, наличие которых недопустимо в нестерильных ЛС.

Испытание проводят в асептических условиях, применяя методы и питательные среды для контроля всех видов нестерильных ЛС.

От каждой серии ЛС отбирают среднюю пробу не менее 50 г, состоящую из равных разовых проб, взятых минимум из 10 разных упаковок. Для одного анализа ЛС используют отдельные образцы по 10 г для каждого исследования. Всего для проведения одного анализа используют 30 г ЛС.

Твердые лекарственные формы, которые трудно растворяются, измельчают и суспендируют в фосфатном буферном растворе рН 7,0 или соответствующей жидкой питательной среде. Приготовленные разведения образцов используют для определения общего числа бактерий и грибов в 1 г ЛС и установления отсутствия бактерий семейств *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*.

Количественное определение микроорганизмов. Испытания проводят двухслойным агаровым методом в чашках Петри диаметром 90–100 мм. Образец ЛС в количестве 10 г суспендируют в фосфатном буферном растворе рН 7,0 так, чтобы конечный объем суспензии был 100 мл. Посевы просматривают ежедневно.

Определение общего числа бактерий. Приготовленную суспензию образца вносят по 1 мл в каждую из двух пробирок с 4 мл расплавленной и охлажденной до температуры от 45 до 50 °С среды № 1. Быстро перемешивают содержимое пробирки и переносят в чашку Петри, содержащую 15–20 мл застывшей питательной среды № 1. Быстрым покачиванием чашки Петри равномерно распределяют верхний слой агара. После застывания среды чашки переворачивают и инкубируют в течение 5 суток при температуре 30–35 °С. Через 48 ч. и окончательно через 5 суток подсчитывают число бактериальных колоний на двух чашках, находят среднее значение и, умножая его на показатель разведения, вычисляют число бактерий в 1 г образца.

Препарат должен выдерживать требования по микробиологической чистоте.

Количественное определение. Определение необходимо проводить при защите от попадания прямого солнечного света.

Около 0,07 г препарата (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 500 мл, прибавляют 5 мл воды и перемешивают до полного увлажнения пробы. Прибавляют по каплям (не более 5 мл) 1М раствор натра едкого и перемешивают до полного растворения пробы. Сразу же приливают 100 мл воды и 2,5 мл кислоты уксусной ледяной, перемешивают и доводят объем раствора водой до метки. 20 мл этого раствора переносят в мерную колбу вместимостью 200 мл, прибавляют 3,5 мл 0,1М раствора натрия ацетата, перемешивают и доводят объем раствора водой до метки. Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм в максимуме при длине волны 444 нм.

Содержание $C_{17}H_{20}N_4O_6$ (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D * 5000}{a * 328},$$

где D — оптическая плотность испытуемого раствора;

a — навеска препарата в г;

328 — удельный показатель поглощения $E_{1\%}^{1\text{см}}$ 100% рибофлавина в максимуме при длине волны 444 нм.

Содержание $C_{17}H_{20}N_4O_6$ в препарате не должно быть от 98,0 до 102,0% в пересчете на сухое вещество.

Упаковка. По 1,5; 2,0 кг в два пакета из пленки полиэтиленовой по ГОСТ 10354–82 или пакет бумажный по ГОСТ 12302–83 из мешочной бумаги по ГОСТ 2228–81 с вкладышем из подпергамента по ГОСТ 1760–81.

По 8; 10 кг в пакет из пленки полиэтиленовой по ГОСТ 10354–82 только для кооперированных поставок.

Пакеты укладывают в банки металлические по ГОСТ 5981–88 или барабаны картонные навивные по ГОСТ 17065–77, или мешки бумажные по ГОСТ 2226–88 из бумаги по ГОСТ 2228–81 Е. Банки укупоривают крышками путем закатки, барабаны закрывают крышкой со специальным зажимом.

На каждую банку, барабан и мешок наклеивают и вкладывают вовнутрь каждой упаковки этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625–86 или писчей по ГОСТ 18510–87, на оборотной стороне которой проставляют условный номер фасовщицы.

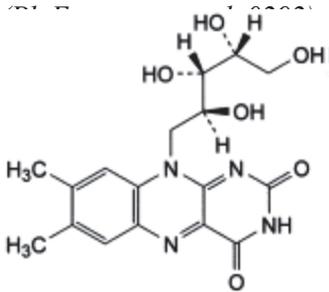
Транспортная тара в соответствии с ОСТ 64–034–87.

ФС из Британской фармакопеи

Browse: British Pharmacopoeia 2009
 British Pharmacopoeia Volume I & II
 Monographs: Medicinal and Pharmaceutical Substances
 Riboflavin

Riboflavin

General Notices



C₁₇H₂₀N₄O₆

11376.41183-88-5

Action and use

Vitamin B₂.

Ph Eur

DEFINITION 7,8-Dimethyl-10-[(2*S*,3*S*,4*R*)-2,3,4,5-tetrahydroxy]benzo[*g*]pteridine-2,4(3*H*,10*H*)-dione.

This monograph applies to riboflavin produced by fermentation.

Content

97.0 per cent to 103.0 per cent (dried substance).

CHARACTERS**Appearance**

Yellow or orange-yellow, crystalline powder.

Solubility

Very slightly soluble in water, practically insoluble in ethanol (96 per cent).

Solutions deteriorate on exposure to light, especially in the presence of alkali.

It shows polymorphism (5.9).

IDENTIFICATION

A. Specific optical rotation (see Tests).

B. Thin-layer chromatography (2.2.27).

Test solution Suspend 25 mg of the substance to be examined in 10 ml of *water R*, shake for 5 min and filter the suspension to remove the undissolved material.

Reference solution Suspend 25 mg of *riboflavin CRS* in 10 ml of *water R*, shake for 5 min and filter the suspension to remove the undissolved material.

Plate TLC silica gel plate *R* (2–10 μm).

Mobile phase *water R*.

Application As follows, drying in a current of cold air after each individual application:

— *1st application*: 2 μl of *methylene chloride R* then 2 μl of the test solution;

— *2nd application*: 2 μl of *methylene chloride R* then 2 μl of the reference solution.

Development Over a path of 6 cm.

Drying In a current of cold air.

Detection Examine in ultraviolet light at 365 nm.

Results The principal spot in the chromatogram obtained with the test solution is similar in position and size to the principal spot in the chromatogram obtained with the reference solution. **C.** Dissolve about 1 mg in 100 ml of *water R*. The solution has, by transmitted light, a pale greenish-yellow colour, and, by reflected light, an intense yellowish-green fluorescence which disappears on the addition of mineral acids or alkalis.

TESTS

Specific optical rotation (2.2.7)

– 115 to — 135 (dried substance).

Dissolve 50.0 mg in 0.05 M *sodium hydroxide* free from carbonate and dilute to 10.0 ml with the same alkaline solution. Measure the optical rotation within 30 min of dissolution.

Absorbance (2.2.25)

Test solution Dilute the final solution prepared for the assay with an equal volume of *water R*.

Absorption maxima At 223 nm, 267 nm, 373 nm and 444 nm.

Absorbance ratios:

— $A373/A267 = 0.31$ to 0.33 ;

— $A444/A267 = 0.36$ to 0.39 .

Related substances

Liquid chromatography (2.2.29). Prepare the solutions immediately before use and protect from light. from light.

Solution A 13.6 g/l solution of *sodium acetate R*.

Test solution With the aid of ultrasound, dissolve 0.120 g of the substance to be examined in 10 ml of $0.1 M$ *sodium hydroxide* and dilute to 100 ml with solution A.

Reference solution (a) Dilute 1.0 ml of the test solution to 10.0 ml with solution A. Dilute 1.0 ml of this solution to 100.0 ml with solution A.

Reference solution (b) With the aid of ultrasound, dissolve the contents of a vial of *riboflavin for peak identification CRS* (containing impurities C and D) in 1.0 ml of a mixture of 1 volume of mobile phase B and 9 volumes of mobile phase A.

Reference solution (c) In order to prepare in situ impurities A and B, dissolve 10 mg of the substance to be examined in 1 ml of $0.5 M$ *sodium hydroxide*. Expose to daylight for 1.5 h.

Add 0.5 ml of *acetic acid R* and dilute to 100 ml with *water R*.

Column:

— *size:* $l = 0.25$ m, $\varnothing = 4.6$ mm;

— *stationary phase:* *end-capped octadecylsilyl silica gel for chromatography R* ($5 \mu\text{m}$).

Mobile phase:

— *mobile phase A:* *phosphoric acid R*, *water R* (1:1000 *V/V*);

— *mobile phase B:* *acetonitrile R*;

Time (min)	Mobile phase A (per cent <i>V/V</i>)	Mobile phase B (per cent <i>V/V</i>)
0 - 5	90	10
5 - 20	90 → 80	10 → 20
20 - 25	80	20
25 - 35	80 → 50	20 → 50
35 - 45	50	50

Flow rate 1.0 ml/min.

Detection Spectrophotometer at 267 nm.

Injection 10 µl.

Identification of impurities Use the chromatogram supplied with riboflavin for *peak identification CRS* and the chromatogram obtained with reference solution (b) to identify the peaks due to impurities C and D.

Relative retention With reference to riboflavin (retention time = about 16 min): impurity C = about 0.2; impurity D = about 0.5; impurity A = about 1.4; impurity B = about 1.9.

System suitability:

— *resolution*: minimum 5 between the peaks due to impurities A and B in the chromatogram obtained with reference solution (c);

— the chromatogram obtained with reference solution (b) is similar to the chromatogram supplied with *riboflavin for peak identification CRS*.

Limits:

— *correction factors*: for the calculation of content, multiply the peak areas of the following impurities by the corresponding correction factor: impurity A = 0.7; impurity B = 1.4; impurity C = 2.3; impurity D = 1.4;

— *impurity A*: not more than 0.25 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.025 per cent);

— *impurities B, C, D*: for each impurity, not more than twice the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.2 per cent);

— *unspecified impurities*: for each impurity, not more than the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.10 per cent);

— *total*: not more than 5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.5 per cent);

— *disregard limit for peaks other than those due to impurity A*: 0.5 times the area of the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (a) (0.05 per cent).

Loss on drying (2.2.32)

Maximum 1.5 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C.

Sulphated ash (2.4.14)

Maximum 0.1 per cent, determined on the residue obtained in the test for loss on drying.

ASSAY

Carry out the assay protected from light.

In a brown-glass 500 ml volumetric flask, suspend 65.0 mg in 5 ml of *water R* ensuring that it is completely wetted and dissolve in 5 ml of *dilute sodium hydroxide solution R*. As soon as dissolution is complete, add 100 ml of *water R* and 2.5 ml of *glacial acetic acid R* and dilute to 500.0 ml with *water R*. Place 20.0 ml of this solution in a 200 ml brown-glass volumetric flask, add 3.5 ml of a 14 g/l solution of *sodium acetate R* and dilute to 200.0 ml with *water R*.

Measure the absorbance (2.2.25) at the absorption maximum at 444 nm.

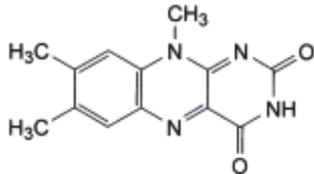
Calculate the content of C₁₇H₂₀N₄O₆ taking the specific absorbance to be 328.

STORAGE

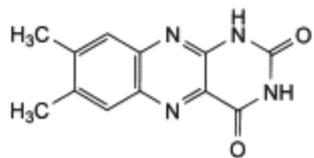
In an airtight container, protected from light.

IMPURITIES

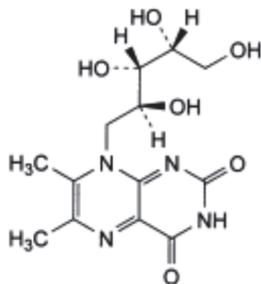
Specified impurities A, B, C, D.



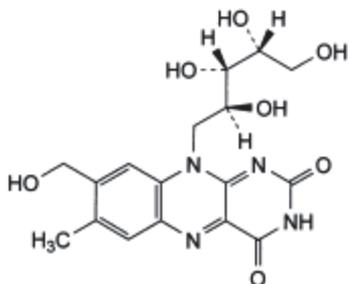
A. 7,8,10-trimethylbenzo[g]pteridine-2,4(3*H*,10*H*)-dione (lumiflavine),



B. 7,8-dimethylbenzo[g]pteridine-2,4(1*H*,3*H*)-dione,

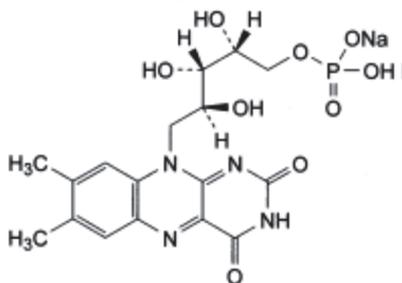


C. 6,7-dimethyl-8-[(2*S*,3*S*,4*R*)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl]pteridine-2,4(3*H*,8*H*)-dione,



D. 8-(hydroxymethyl)-7-methyl-10-[(2*S*,3*S*,4*R*)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl]benzo[*g*]pteridine-2,4(3*H*,10*H*)-dione.

Browse: British Pharmacopoeia 2009
 British Pharmacopoeia Volume I & II
 Monographs: Medicinal and Pharmaceutical Substances
 Riboflavin Sodium Phosphate
Riboflavin Sodium Phosphate
 General Notices
 (*Ph Eur monograph 0786*)



C₁₇H₂₀N₄NaO₉P₁₁478.31130-40-5

Action and use

Vitamin B₂.

Preparation

Vitamins B and C Injection

Ph Eur

DEFINITION

Mixture containing riboflavin 5 ϕ -(sodium hydrogen phosphate) as the main component and other riboflavin sodium monophosphates.

Content

73.0 per cent to 79.0 per cent of riboflavin (C₁₇H₂₀N₄O₆; *Mr* 376.4) (dried substance).

It contains a variable amount of water.

CHARACTERS

Appearance

Yellow or orange-yellow, crystalline, hygroscopic powder.

Solubility Soluble in water, very slightly soluble in ethanol (96 per cent).

IDENTIFICATION

A. Ultraviolet and visible absorption spectrophotometry (2.2.25).

Test solution Dissolve 50.0 mg in *phosphate buffer solution pH 7.0 R* and dilute to 100.0 ml with the same buffer solution. Dilute 2.0 ml of this solution to 100.0 ml with *phosphate buffer solution pH 7.0 R*.

Spectral range 230–350 nm.

Absorption maximum At 266 nm.

Specific absorbance at the absorption maximum 580 to 640.

B. Examine the chromatograms obtained in the test for related substances.

Results The principal peak in the chromatogram obtained with the test solution is similar in position and approximate size to the principal peak in the chromatogram obtained with reference solution (b).

C. Dissolve about 10 mg in *dilute sodium hydroxide solution R* and dilute to 100 ml with the same solution. Expose 1 ml of this solution to ultraviolet light at 254 nm for 5 min, add *sufficient acetic acid R* to make the solution acidic to *blue litmus paper R* and shake with 2 ml of *methylene chloride R*. The lower layer shows yellow fluorescence.

D. To 0.5 g add 10 ml of *nitric acid R* and evaporate the mixture to dryness on a water-bath. Ignite the residue until it becomes white, dissolve the residue in 5 ml of *water R* and filter. The filtrate gives reaction (a) of sodium and reaction (b) of phosphates (2.3.1).

TESTS

pH (2.2.3)

5.0 to 6.5.

Dissolve 0.5 g in *carbon dioxide-free water R* and dilute to 50 ml with the same solvent.

Specific optical rotation (2.2.7)

+ 38.0 to + 43.0 (dried substance).

Dissolve 0.300 g in 18.2 ml of *hydrochloric acid R1* and dilute to 25.0 ml with *water R*.

Impurity E

To about 35 mg add 10 ml of *methylene chloride R*, shake for 5 min and filter. The filtrate is not more intensely coloured than reference solution BY6 (2.2.2, *Method II*).

Related substances

Liquid chromatography (2.2.29). *Carry out the test protected from actinic light.*

Test solution Dissolve 0.100 g of the substance to be examined in 50 ml of *water R* and dilute to 100.0 ml with the mobile phase. Dilute 8.0 ml of this solution to 50.0 ml with the mobile phase.

Reference solution (a) Dissolve 60 mg of *riboflavin CRS* (impurity D) in 1 ml of *hydrochloric acid R* and dilute to 250.0 ml with *water R*. Dilute 4.0 ml of this solution to 100.0 ml with the mobile phase.

Reference solution (b) Dissolve 0.100 g of *riboflavin sodium phosphate CRS* in 50 ml of *water R* and dilute to 100.0 ml with the mobile phase. Dilute 8.0 ml of this solution to 50.0 ml with the mobile phase.

Column:

— *size:* $l = 0.25$ m, $\text{Ø} = 4.6$ mm;

— *stationary phase:* *octadecylsilyl silica gel for chromatography R* (5 μm).

Mobile phase *methanol R*, 7.35 g/l solution of *potassium dihydrogen phosphate R* (150:850 V/V).

Flow rate 2 ml/min.

Detection Spectrophotometer at 266 nm.

Injection 100 μl .

Run time 1 Until the peak due to riboflavin can be clearly evaluated.

Relative retention With reference to riboflavin 5 ϕ -monophosphate (retention time = about 20 min): impurity A = about 0.2; impurity B = about 0.3; impurity C = about 0.5; riboflavin 3 ϕ -monophosphate = about 0.7; riboflavin 4 ϕ -monophosphate = about 0.9; impurity D = about 2.

System suitability 1 Reference solution (b):

— *resolution:* minimum 1.5 between the peaks due to riboflavin 4 ϕ -monophosphate and riboflavin 5 ϕ -monophosphate.

Calculate the percentage content of free riboflavin (impurity D) and of riboflavin in the form of the diphosphates of riboflavin (impurities A, B, C) from the areas of the peaks in the chromatogram obtained with the test solution and the amount of free riboflavin in reference solution (a).

Limits:

— *impurity D*: maximum 6.0 per cent (dried substance);

— *sum of impurities A, B and C*: maximum 6.0 per cent (dried substance).

The thresholds indicated under Related substances (Table 2034.—1) in the general monograph *Substances for pharmaceutical use (2034)* do not apply.

Inorganic phosphate

Maximum 1.5 per cent.

Dissolve 0.10 g in *water R* and dilute to 100 ml with the same solvent. To 5 ml of this solution, add 10 ml of *water R*, 5 ml of *buffered copper sulphate solution pH 4.0 R*, 2 ml of a 30 g/l solution of *ammonium molybdate R*, 1 ml of a freshly prepared solution containing 20 g/l of *4-methylaminophenol sulphate R* and 50 g/l of *sodium metabisulphite R*, and 1 ml of a 3 per cent *V/V* solution of *perchloric acid R*. Dilute to 25.0 ml with *water R* and measure, within 15 min of its preparation, the absorbance (2.2.25) of the solution at 800 nm, using as the compensation liquid a solution prepared in the same manner but without the substance to be examined. The absorbance is not greater than that of a solution prepared as follows: to 15 ml of *phosphate standard solution (5 ppm PO₄) R*, add 5 ml of *buffered copper sulphate solution pH 4.0 R*, 2 ml of a 30 g/l solution of *ammonium molybdate R*, 1 ml of a freshly prepared solution containing 20 g/l of *4-methylaminophenol sulphate R* and 50 g/l of *sodium metabisulphite R*, and 1 ml of a 3 per cent *V/V* solution of *perchloric acid R*; dilute to 25.0 ml with *water R*.

Heavy metals (2.4.8)

Maximum 10 ppm.

To 2.0 g in a silica crucible add 2 ml of *nitric acid R*, dropwise, followed by 0.25 ml of *sulphuric acid R*. Heat cautiously until white fumes are evolved and ignite. Extract the cooled residue with 2 quantities, each of 2 ml, of *hydrochloric acid R* and evaporate the extracts to dryness.

Dissolve the residue in 2 ml of *dilute acetic acid R* and dilute to 20 ml with *water R*. 12 ml of the solution complies with test A. Prepare the reference solution using 10 ml of *lead standard solution (1 ppm Pb) R*.

Loss on drying (2.2.32)

Maximum 8.0 per cent, determined on 1.000 g by drying in an oven at 105 °C at a pressure not exceeding 0.7 kPa for 5 h.

ASSAY

Carry out the assay protected from light.

Dissolve 0.100 g in 150 ml of *water R*, add 2 ml of *glacial acetic acid R* and dilute to 1000.0 ml with *water R*. To 10.0 ml of this solution add 3.5 ml of a 14 g/l solution of *sodium acetate R* and dilute to 50.0 ml with *water R*. Measure the absorbance (2.2.25) at the absorption maximum at 444 nm.

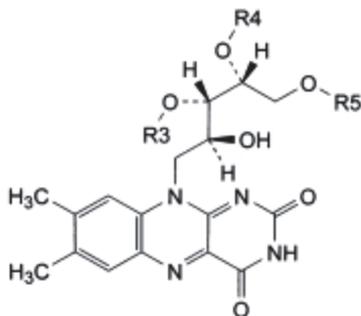
Calculate the content of C₁₇H₂₀N₄O₆ taking the specific absorbance to be 328.

STORAGE

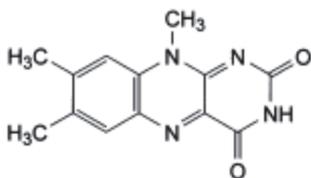
In an airtight container, protected from light.

IMPURITIES

Specified impurities A, B, C, D, E.



- A. R₃ = R₄ = PO₃H₂, R₅ = H: riboflavin 3 ϕ ,4 ϕ -diphosphate,
- B. R₃ = R₅ = PO₃H₂, R₄ = H: riboflavin 3 ϕ ,5 ϕ -diphosphate,
- C. R₃ = H, R₄ = R₅ = PO₃H₂: riboflavin 4 ϕ ,5 ϕ -diphosphate,
- D. R₃ = R₄ = R₅ = H: riboflavin,



- E. 7,8,10-trimethylbenzo[g]pteridine-2,4(3H,10H)-dione (lumiflavin).

Задачи [6]

1. Оцените качество рибофлавина по количественному содержанию (должно быть не менее 98,0% и не более 102,0% в пересчете на сухое вещество), если 0,06994 г анализируемого образца растворили и довели до метки соответствующим растворителем в мерной колбе вместимостью 500 мл (раствор А).

20,0 мл раствора А довели до метки соответствующим растворителем в мерной колбе вместимостью 200 мл. Оптическая плотность полученного раствора при 444 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм равна 0,460. Удельный показатель поглощения рибофлавина в указанных условиях — 328. Потеря в массе при высушивании анализируемого образца рибофлавина 1,6%.

2. Рассчитайте содержание рибофлавина в порошках: рибофлавина, тиамин бромид по 0,005, кислоты никотиновой 0,02, сахара 0,15, если 0,0285 г порошка растворили в 10,0 мл воды при нагревании на водяной бане (раствор А). Оптическая плотность раствора, полученного добавлением к 1,0 мл раствора А 9,0 мл воды, при длине волны 445 нм, в кювете с толщиной слоя 1,0 см составила 0,389. Оптическая плотность раствора, содержащего 2,5 мл 0,004% стандартного раствора рибофлавина и 7,5 мл воды, в тех же условиях равна 0,375.

3. Рассчитайте содержание рибофлавина в порошках: рибофлавина, тиамин бромид по 0,002, кислоты аскорбиновой 0,25, глюкозы 0,15, если оптическая плотность раствора, полученного растворением в 10,0 мл воды навески порошка 0,0232 г, при длине волны 445 нм, в кювете с толщиной слоя 1,0 см составила 0,283. Оптическая плотность раствора, содержащего 2,5 мл 0,004% стандартного раствора рибофлавина и 7,5 мл воды, равна 0,235

4. Рассчитайте содержание ингредиентов в глазных каплях: рибофлавина 0,01, натрия хлорида 0,9, воды для инъекций до 100,0 мл, если при определении рибофлавина оптическая плотность раствора, полученного добавлением к 1,0 мл испытуемого раствора 9,0 мл воды, при длине волны 445 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм, равна 0,369. Оптическая плотность стандартного раствора рибофлавина, содержащего 0,00001 г/мл, в тех же условиях равна 0,354.

На титрование натрия хлорида (M_r 58,44) по методу Фаянса в 1,0 мл глазных капель пошло 1,60 мл 0,1 моль/л раствора серебра нитрата ($K = 0,99$).

5. Рассчитайте удельный показатель поглощения рибофлавина (среднее значение), если навеску массой 0,1000 г растворили и довели водой до метки в мерной колбе вместимостью 500,0 мл (раствор А). В мерную колбу вместимостью 200,0 мл вносили последовательно 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 мл раствора А, доводили водой до метки. Оптическая плотность полученных растворов при длине волны 267 нм в кювете с толщиной слоя 10,1 мм равна соответственно: 0,091; 0,168; 0,254; 0,352; 0,437; 0,505.

Приложение 5

Ответы на задачи

1. 101, 89% соответствует.
2. Рибофлавина 0,0066 г.
3. Рибофлавина 0,0018 г.
4. Рибофлавина 0,010 г. Натрия хлорида 0,93 г.
5. 901,0; 831,7; 838,3; 871,3; 865,3; 833,3 Среднее — 856,8.

Прописи с рибофлавином [4]

Пропись 1

Рибофлавина 0,005 г

Сахара 0,1 г

Определение подлинности

Рибофлавин. 1. К 0,01 г порошка прибавляют 2–3 капли концентрированной серной кислоты. Появляется красное окрашивание, переходящее в желтое при добавлении 1 капли воды.

2. К 0,05 г порошка прибавляют 5–6 капель раствора серебра нитрата. Постепенно появляется оранжевое окрашивание.

Сахар. Промывают на фильтре 0,03 г порошка 0,5–1 мл воды. К фильтрату прибавляют 2–3 капли раствора натрия гидроксида и 1–2 капли раствора нитрата кобальта. Появляется сине-фиолетовое окрашивание.

Количественное определение

Около 0,02 г порошка (точная масса навески) растворяют в 10 мл воды при нагревании на водяной бане (раствор А). После охлаждения к 1 мл раствора А прибавляют точно 9 мл воды и измеряют оптическую плотность (D_1) полученного раствора при длине волны около 445 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения — вода.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора (D_2), содержащего 2,5 мл 0,004-процентного стандартного раствора рибофлавина (0,0001 г)¹ и 7,5 мл воды.

Содержание рибофлавина (X) в граммах вычисляется по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot 0,0001 \cdot 10 \cdot P}{D_2 \cdot a \cdot b},$$

где P — средняя масса порошка, г;

a — масса навески порошка, взятая для анализа, г;

b — объем раствора А, взятого для анализа, мл.

¹ Навеску рибофлавина (точная масса 0,0100 г) растворяют в 150 мл воды в мерной колбе вместимостью 250 мл при нагревании на водяной бане. После охлаждения объем раствора доводят водой до метки. В 1 мл стандартного раствора содержится 0,00004 г рибофлавина. Раствор устойчив в течение месяца при хранении в защищенном от света месте.

Пропись 2

Рибофлавина,

Тиамин бромид по 0,003 г

Сахара 0,2 г

Определение подлинности

Рибофлавин (см. пропись 1).

Тиамин бромид. К 0,02 г порошка прибавляют 2–3 капли воды, растворов натрия гидроксида и калия ферроцианида, 0,5 мл хлороформа и взбалтывают. Наблюдается сине-фиолетовое свечение хлороформного слоя в УФ-свете.

Сахар. 1. Промывают на фильтре 0,03 г порошка 0,5–1 мл воды. К фильтрату прибавляют 2–3 капли раствора натрия гидроксида и 1–2 капли раствора нитрата кобальта. Появляется сине-фиолетовое окрашивание.

2. Промывают на фильтре 0,03 г порошка 1–2 мл воды. К фильтрату прибавляют 1–2 мл разведенной соляной кислоты, несколько кристаллов резорцина и кипятят 1 мин. Появляется красное окрашивание.

Количественное определение

Рибофлавин. Около 0,02 г порошка (точная масса навески) растворяют в 10 мл воды при нагревании на водяной бане (раствор А). После охлаждения к 3 мл раствора А прибавляют точно 7 мл воды и далее определяют по методике, описанной в прописи 1.

Тиамин бромид. Растворяют 0,2 г порошка в 1–2 мл разведенной азотной кислоты, прибавляют 1 мл раствора железоммониевых квасцов, 0,2 мл 0,02 моль/л раствора аммония роданида и титруют 0,02 моль/л раствором серебра нитрата до перехода оранжевой окраски в желтую. Из объема 0,02 моль/л раствора серебра нитрата, израсходованного на титрование, вычитают 0,2 мл 0,02 моль/л раствора аммония роданида.

1 мл 0,02 моль/л раствора серебра нитрата соответствует 0,004352 г тиамин бромид.

Пропись 3

Рибофлавина 0,005 г
Кислоты аскорбиновой,
Сахара по 0,1 г

Определение подлинности

Рибофлавин (см. пропись 1).

Аскорбиновая кислота. 1. К 0,01 г порошка прибавляют 2–3 капли воды, по 1–2 капли раствора калия ферроцианида и окисного железа хлорида. Появляется синее окрашивание.

2. К 0,01 г порошка прибавляют 3–4 капель воды и 2–3 капли раствора серебра нитрата. Выделяется металлическое серебро в виде серого осадка.

Сахар (см. пропись 2).

Количественное определение

Рибофлавин. Около 0,02 г порошка (точная масса навески) растворяют в 10 мл воды при нагревании на водяной бане (раствор А). После охлаждения к 2 мл раствора А прибавляют точно 8 мл воды и далее определяют по методике, описанной в прописи 1.

Аскорбиновая кислота

1. Растворяют 0,05 г порошка в 2 мл воды и титруют 0,1 моль/л раствором йода до буро-синего окрашивания (индикатор-крахмал).

1 мл 0,1 моль/л раствора йода соответствует 0,0088 г аскорбиновой кислоты.

2. Растворяют 0,05 г порошка в 2 мл воды и титруют 0,1 моль/л раствором натрия гидроксида до оранжевого окрашивания (индикатор-фенофталеин).

1 мл 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида соответствует 0,0176 г аскорбиновой кислоты.

Пропись 4

Рибофлавина,
Тиамин бромид по 0,005 г
Кислоты аскорбиновой,
Сахара по 0,1 г

Определение подлинности

Рибофлавин (см. пропись 1, реакция 1).

Тиамин бромид (см. пропись 2).

Аскорбиновая кислота (см. пропись 3).

Сахар (см. пропись 2, реакция 2).

Количественное определение

Рибофлавин (см. пропись 3).

Тиамин бромид. Растворяют 0,2 г порошка в 5 мл разведенной азотной кислоты, прибавляют раствор железоммониевых квасцов до полного исчезновения появляющегося синего окрашивания (около 3,5 мл), 0,2 мл 0,02 моль/л раствора аммония роданида и далее определяют по методике, описанной в прописи 2.

Аскорбиновая кислота (см. пропись 3, метод 1).

Пропись 5

Рибофлавина,

Тиамин бромид по 0,002 г

Кислоты аскорбиновой 0,1 г

Глюкозы 0,25 г

Определение подлинности

Рибофлавин (см. пропись 1, реакция 1).

Тиамин бромид (см. пропись 2).

Аскорбиновая кислота (см. пропись 3).

Глюкоза. К 0,01 г порошка прибавляют 0,01 г тимола, 5–6 капель концентрированной серной кислоты и 1–2 капли воды. Появляется фиолетово-красное окрашивание.

Количественное определение

Рибофлавин. Около 0,02 г порошка (точная масса навески) растворяют в 10 мл воды при нагревании на водяной бане. После охлаждения измеряют оптическую плотность (D_1) полученного раствора и далее определяют по методике, описанной в прописи 1.

Содержание рибофлавина (X) в граммах вычисляется по формуле:

$$X = \frac{D1 \cdot 0,0001 \cdot P}{D2 \cdot a},$$

где P — средняя масса порошка, г;

a — масса навески порошка, взятая для анализа, г.

Аскорбиновая кислота (см. пропись 3, метод 1).

Глюкоза. К 0,14 г порошка добавляют 1–1,5 мл воды и встряхивают 1 мин. Затем объем раствора доводят водой до 2 мл, перемешивают, фильтруют через сухой фильтр определяют показатель преломления фильтрата (n) и воды (n₀) при 20С°.

Содержание глюкозы (X) в граммах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{n - (n_0 + 0,00160 \cdot C) \cdot P \cdot 2 \cdot 1,11}{0,00142 \cdot a \cdot 100},$$

где 0,00160 — фактор показателя преломления раствора аскорбиновой кислоты;

P — средняя масса порошка, г;

1,11 — коэффициент перерасчета на водную глюкозу при содержании 10% влаги в препарате;

0,00142 — фактор показателя преломления раствора безводной глюкозы;

a — масса навески порошка, взятой для анализа, г;

C — концентрация аскорбиновой кислоты в анализируемом растворе, вычисленная по формуле, %:

$$C = \frac{a \cdot b \cdot 100}{P \cdot 2},$$

где б — количество кислоты аскорбиновой, определенное химическим методом, г.

Пропись 6

Рибофлавина,

Тиамин бромид по 0,005 г

Кислоты никотиновой 0,01 г

Сахара 0,1 г

Определение подлинности

Рибофлавин (см. пропись 1, реакция 1).

Тиамин бромид. К 0,02 г порошка прибавляют 2–3 капли воды, растворов натрия гидроксида и калия ферроцианида, 0,5 мл хлороформа и взбалтывают. Наблюдается сине-фиолетовое свечение хлороформного слоя в УФ-свете.

Никотиновая кислота. К 0,01 г порошка прибавляют 2 капли раствора калия бихромата, 5 капель раствора пергидроля в ацетоне, 1–2 мл хлороформа и взбалтывают. Хлороформный слой окрашивается в фиолетовый цвет.

Сахар (см. пропись 2).

Количественное определение

Рибофлавин (см. пропись 1).

Никотиновая кислота и тиамин бромид. Растворяют 0,1 г порошка в 2–3 капли воды и титруют 0,1 моль/л раствором натрия гидроксида до оранжевого окрашивания (индикатор — фенолфталин) (А мл).

К оттитрованной жидкости прибавляют 1–2 мл разведенной азотной кислоты, 1 мл раствора железоммониевых квасцов, 0,2 мл 0,02 моль/л раствора аммония роданида и титруют 0,02 моль/л раствором серебра нитрата до перехода оранжевой окраски в желтую. Из объема 0,02 моль/л раствора серебра нитрата, израсходованного на титрование, вычитают 0,2 мл 0,02 моль/л раствора аммония роданида (Б мл) (тиамин бромид).

1 мл 0,02 моль/л раствора серебра нитрата соответствует 0,004352 г тиамин бромид

Количество 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида (Х) в мл, израсходованное на титрование никотиновой кислоты, вычисляют по разности:

$$X = A - \frac{B}{10}.$$

1 мл 0,1 моль/л раствора гидроксида натрия соответствует 0,01231 г никотиновой кислоты.

Пропись 7

Рибофлавина,

Тиамин бромид по 0,005 г

Кислоты никотиновой 0,02 г

Кислоты аскорбиновой 0,1 г

Сахара 0,2 г

Определение подлинности

Рибофлавин (см. пропись 1, реакция 1).

Тиамин бромид. К 0,02 г порошка прибавляют 2–3 капли воды, растворов натрия гидроксида и калия ферроцианида, 0,5 мл хлороформа и взбалтывают. Наблюдается сине-фиолетовое свечение хлороформного слоя в УФ-свете.

Никотиновая кислота. К 0,02 г порошка прибавляют 1 мл воды, 0,5 мл 0,1 моль/л раствора соляной кислоты и 1% раствора аммония роданида, 1 мл раствора хлорамина. Через 10 мин. добавляют 1 мл 96-процентного этанола, 1,5 мл 1-процентного раствора натрия барбитурата и нагревают на водяной бане при 75–80 °С в течение 10–15 мин. Появляется оранжево-красное окрашивание.

Аскорбиновая кислота (см. пропись 3).

Сахар (см. пропись 2, реакция 2).

Количественное определение

Рибофлавин (см. пропись 2).

Аскорбиновая кислота (см. пропись 3, метод 1) (А мл).

Аскорбиновая кислота, тиамин бромид и никотиновая кислота. Растворяют 0,3 г порошка в 2–3 мл воды и титруют 0,1 моль/л раствором натрия гидроксида до оранжевого окрашивания (индикатор — фенолфталеин) (Б мл).

К оттитрованной жидкости прибавляют 1 мл концентрированной азотной кислоты, раствор железомонийевых квасцов до полного исчезновения появляющегося синего окрашивания (около 3,5 мл), 0,2 мл 0,02 моль/л раствора аммония роданида и титруют 0,002 моль/л раствором серебра нитрата до перехода оранжевой окраски в желтую Из объема 0,02 моль/л раствора серебра нитрата, израсходованного на титрование, вычитают 0,2 мл 0,02 моль/л раствора аммония роданида (Б мл) (тиамин бромид).

1 мл 0,02 моль/л раствора серебра нитрата соответствует 0,004352 г тиамина бромид

Количество (X) 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида (X) в мл, израсходованное на титрование никотиновой кислоты, вычисляют по разности:

$$X = B - \left(\frac{A \cdot 6}{2} + \frac{B}{10} \right).$$

1 мл 0,1 моль/л раствора гидроксида натрия соответствует 0,01231 г никотиновой кислоты.

Пропись 8

Рибофлавина 0,01 г

Пиридоксина гидрохлорида 0,01 г

Кислоты никотиновой 0,04 г

Рутин 0,04 г

Кислоты аскорбиновой 0,25 г

Определение подлинности

Рибофлавин. К 0,03 г порошка прибавляют 305 мл воды, взбалтывают 1 мин. и фильтруют. Фильтрат имеет зеленовато-желтую окраску и зеленое свечение в УФ- свете.

Никотиновая кислота. К 0,03 г порошка прибавляют 1 мл воды, 0,5 мл 0,1 моль/л раствора соляной кислоты и 1% раствора аммония роданида, 1 мл раствора хлорамина. Через 10 мин. добавляют 1 мл 96-процентного этанола, 1,5 мл 1-процентного раствора натрия барбитурата и нагревают на водяной бане при 75–80 °С в течение 10–15 мин. Появляется оранжево-красное окрашивание.

Аскорбиновая кислота. К 0,01 г порошка прибавляют 3–5 капель воды и 1–2 капли 0,1 моль/л раствора йода. Наблюдается обесцвечивание раствора йода.

Количественное определение

Рибофлавин. Около 0,02 г порошка (точная масса навески) растворяют точно в 10 мл воды при нагревании на водяной бане (раствор А). После охлаждения к 1,7 мл раствора А прибавляют точно 8,3 мл воды и измеряют оптическую плотность (D_1) полученного

раствора при длине волны около 445 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения — вода.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора (D_2), содержащего 2,5 мл 0,004-процентного стандартного раствора рибофлавина (0,0001 г)¹ и 7,5 мл воды.

Содержание рибофлавина (X) в граммах вычисляется по формуле:

$$X = \frac{D1 * 0,0001 * 10 * P}{D2 * a * b},$$

где P — средняя масса порошка, г;

a — масса навески порошка, взятая для анализа, г;

b — объем раствора A, взятого для анализа, мл.

Рутин. Около 0,02 г порошка (точная масса навески) растворяют в 15 мл 96% этанола в мерной колбе вместимостью 25 мл при нагревании на водяной бане. После охлаждения объем раствора доводят 96-процентным этанолом до метки (раствор A).

К 1,1 мл раствора A прибавляют 3,9 мл 96-процентного этанола, 4,5 мл воды, 0,5 мл 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида и перемешивают. Через 15 мин. измеряют оптическую плотность (D_1) окрашенного раствора при длине волны около 440 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Раствор сравнения: смесь из 1,1 мл раствора A, 3,9 мл 96% этанола и 5 мл воды.

Параллельно проводят реакцию с 0,5 мл 0,02% стандартного раствора рутина (0,0001 г)² с добавлением 0,6 мл 0,1% свежеприготовленного раствора аскорбиновой кислоты и через 15 мин. измеряют оптическую плотность (D_2).

Раствор сравнения: смесь из 96-процентного этанола и воды (1:1).

Содержание рутина (X) в граммах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D1 * 0,0001 * 25 * P}{D2 * 1,1 * a},$$

¹ Навеску рибофлавина (точная масса 0,0100 г) растворяют в 150 мл воды в мерной колбе вместимостью 250 мл при нагревании на водяной бане. После охлаждения объем раствора доводят водой до метки. В 1 мл стандартного раствора содержится 0,00004 г рибофлавина. Раствор устойчив в течение месяца при хранении в защищенном от света месте.

² Навеску рутина стандартного или рутина (точная масса 0,0100 г) растворяют в 15 мл 96-процентного этанола в мерной колбе вместимостью 50 мл при нагревании на водяной бане. После охлаждения объем раствора доводят 96-процентным этанолом до метки. В 1 мл стандартного раствора содержится 0,0002 г рутина. Раствор устойчив месяца при хранении в защищенном от света месте.

где Р — средняя масса порошка, г;

а — масса навески порошка, взятая для анализа, г.

Аскорбиновая кислота и никотиновая кислота. Растворяют 0,05 г порошка в 2–3 мл воды и титруют 0,1 моль/л раствором гидроксида натрия до оранжевого окрашивания (индикатор — фенолфталеин) (А мл).

К оттитрованной жидкости прибавляют 3–5 капель раствора крахмала и титруют 0,1 моль/л раствора йода до буро-синего окрашивания (Б мл) (аскорбиновая кислота).

1 мл 0,1 моль/л раствора йода соответствует 0,0088 г аскорбиновой кислоты.

Количество (Х) в миллилитрах 0,1 моль/л раствора гидроксида натрия, израсходованное на титрование никотиновой кислоты, вычисляют по разности:

$$X = A - \frac{B}{2}$$

(количеством 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида в миллилитрах, израсходованным на титрование пиридоксина гидрохлорида, можно пренебречь).

1 мл 0,1 моль/л раствора гидроксида натрия соответствует 0,01231 г никотиновой кислоты.

Пропись 9

Рибофлавина 0,002 г

Раствора натрия хлорида 0,9% 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин. Раствор имеет зеленовато-желтый цвет и зеленое свечение в УФ- свете.

Натрия хлорид. 1. К 2–3 каплям раствора прибавляют по 2–3 капли разведенной азотной кислоты и раствора серебра нитрата. Образуется белый творожистый осадок, растворимый в растворе аммиака.

2. Часть раствора на графитовой палочке вносят в бесцветное пламя. Пламя окрашивается в желтый цвет.

Количественное определение

Рибофлавин. К 0,5 мл раствора прибавляют 9,5 мл воды и измеряют оптическую плотность (D_1) полученного раствора при длине волны около 445 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения — вода.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора (D_2), содержащего 2,5 мл 0,004% стандартного раствора рибофлавина (0,0001 г)¹ и 7,5 мл воды.

Содержание рибофлавина (X) в граммах вычисляется по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot 0,0001 \cdot 10}{D_2 \cdot 0,5}.$$

Натрия хлорид. К 0,5 мл раствора прибавляют 1 мл воды. К 1 мл полученного раствора прибавляют 1–2 капли раствора бромфенолового синего, по каплям разведенную уксусную кислоту до зеленовато-желтого окрашивания и титруют 0,1 моль/л раствором серебра нитрата до фиолетового окрашивания.

1 мл 0,1 моль/л раствора серебра нитрата соответствует 0,005844 г натрия хлорида.

Пропись 10

Рибофлавина 0,002 г

Раствор борной кислоты 2% 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин. Раствор имеет зеленовато-желтый цвет и зеленое свечение в УФ- свете.

Борная кислота. 1. Выпаривают 5–6 капель раствора на водяной бане. К сухому остатку прибавляют 1–2 мл 96-процентного этанола и поджигают. Спиртовой раствор горит пламенем с зеленой каймой.

2. К 2–3 каплям раствора прибавляют 1–2 капли раствора фенолфталеина и 4–5 капель 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида. Появляется ярко-розовое окрашивание, исчезающее после добавления 1–2 мл глицерина или 40–50-процентного раствора глюкозы.

¹ Навеску рибофлавина (точная масса 0,0100 г) растворяют в 150 мл воды в мерной колбе вместимостью 250 мл при нагревании на водяной бане. После охлаждения объем раствора доводят водой до метки. В 1 мл стандартного раствора содержится 0,00004 г рибофлавина. Раствор устойчив в течение месяца при хранении в защищенном от света месте.

Количественное определение

Рибофлавин (см. пропись 9).

Кислота борная. К 0,5 мл раствора прибавляют 2 мл свежепрокипяченной охлажденной воды, 5–6 мл глицерина, нейтрализованного по фенолфталеину, и титруют 0,1 моль/л раствором натрия гидроксида до оранжевого окрашивания.

1 мл 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида соответствует 0,006183 г борной кислоты.

Пропись 11

Рибофлавина 0,002 г

Раствора калия йодида 3% 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин. Раствор имеет зеленовато-желтый цвет и зеленое свечение в УФ- свете.

Калия йодид. 1. К 2–3 каплям раствора прибавляют 2–3 капли разведенной соляной кислоты, 3–5 капель раствора хлорамина, 1 мл хлороформа и взбалтывают. Хлороформный слой окрашивается в фиолетовый цвет.

2. К 4–5 каплям раствора прибавляют 1–2 капли раствора свинца ацетата. Образуется желтый осадок.

Количественное определение

Рибофлавин (см. пропись 9).

Калия йодид. К 0,5 мл раствора прибавляют 0,5–1 мл воды, 0,5 мл разведенной уксусной кислоты, 2 капли 0,1-процентного раствора натрия эозината и титруют 0,1 моль/л раствором серебра нитрата до ярко-розового окрашивания осадка.

1 мл 0,1 моль/л раствора серебра нитрата соответствует 0,0166 г калия йодида.

Пропись 12

Рибофлавина 0,002 г

Глюкозы 0,2 г

Раствора цитраля 0,01% 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин. Раствор имеет зеленовато-желтый цвет и зеленое свечение в УФ- свете.

Глюкоза. К 0,5 мл раствора прибавляют 1 мл реактива Фелинга и нагревают до кипения. Образуется красный осадок.

Цитраль. Органолептическое определение по специфическому запаху цитраля.

Количественное определение.

Рибофлавин (см. пропись 9).

Глюкоза. Определяют показатель преломления раствора при 20 °С (n).

Концентрацию глюкозы (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(n-n_0)*100}{0,00142*100},$$

где n_0 — показатель преломления контрольного 0,01% раствора цитраля при 20 °С (1,3334);

– 0,00142— фактор показателя преломления раствора безводной глюкозы.

Цитраль. Перед анализом капли взбалтывают. К 1 мл раствора прибавляют точно 9 мл воды и тщательно перемешивают (раствор А). К 2 мл раствора А добавляют 3 мл 96-процентного этанола¹, 2 мл воды, 1,8 мл 0,01-процентного раствора 2,4-динитрофенилгидразина и оставляют на 30 мин. Затем добавляют 1,2 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида и перемешивают. Через 30 мин. измеряют оптическую плотность окрашенного раствора (D1) при длине волны около 467 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Раствор сравнения: смесь из 3 мл 96-процентного этанола, 1 мл 0,004-процентного стандартного раствора рибофлавина, 3 мл воды, 1,8 мл реактива и 1,2 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора, приготовленного следующим образом: к 1 мл 0,002-процентного стандарт-

¹ Навеску цитраля (точная масса 0,1000 г) растворяют в 96-процентном этаноле в мерной колбе вместимостью 100 мл (раствор А). Разбавляют 0,5 мл раствора А 96-процентным этанолом в мерной колбе вместимостью 25 мл (раствор Б). В 1 мл раствора Б содержится 0,00002 г цитраля. Раствор А устойчив в течение 6 мес. при хранении в плотно закрытых флаконах в защищенном от света месте. Раствор Б устойчив в течение 2 нед. при хранении в плотно закрытых флаконах в защищенном от света месте.

ного раствора цитраля (0,00002 г) прибавляют 2 мл 96-процентного этанола, 4 мл воды, 1,8 мл реактива и оставляют на 30 мин. Затем добавляют 1,2 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида и перемешивают. Через 30 мин. измеряют оптическую плотность окрашенного раствора (D_2).

Раствор сравнения: смесь из 3 мл 96-процентного этанола, 4 мл воды, 1,8 мл реактива и 1,2 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида.

Содержание цитраля (X) в граммах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 * 0,00002 * 10 * 10}{D_2 * 1 * 2}.$$

Пропись 13

Рибофлавина 0,002 г

Калия йодида 0,3 г

Раствора борной кислоты 2% 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин. Раствор имеет зеленовато-желтый цвет и зеленое свечение в УФ- свете.

Калия йодид (см. пропись 11).

Борная кислота (см. пропись 10).

Количественное определение

Рибофлавин (смотри пропись 9).

Калия йодид (см. пропись 11).

Кислота борная (см. пропись 10).

Пропись 14

Рибофлавина 0,002 г

Кислоты аскорбиновой 0,03 г

Раствора натрия хлорида 0,9% 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин (см. пропись 9).

Аскорбиновая кислота. К 2–3 каплям раствора прибавляют 3–5 капель воды и 2–3 капли раствора серебра нитрата. Образуется металлическое серебро в виде серого осадка.

Натрия хлорид.

1. К 2–3 каплям раствора прибавляют по 2–3 капли разведенной азотной кислоты и раствора серебра нитрата. Образуется белый творожистый осадок, растворимый в растворе аммиака.

2. Часть раствора на графитовой палочке вносят в бесцветное пламя. Пламя окрашивается в желтый цвет.

Количественное определение

Рибофлавин (см. пропись 9).

Кислота аскорбиновая. К 0,5 мл раствора прибавляют 1 мл воды и титруют 0,02 моль/л раствором йода до буро-синего окрашивания (индикатор — крахмал).

1 мл 0,02 моль/л раствора йода соответствует 0,00617 г аскорбиновой кислоты.

Натрия хлорид. К 0,5 мл раствора прибавляют 1 мл воды. К 1 мл полученного раствора прибавляют 1–2 капли раствора бромфенолового синего, по каплям разведенную уксусную кислоту до зеленовато-желтого окрашивания и титруют 0,1 моль/л раствором серебра нитрата до фиолетового окрашивания.

1 мл 0,1 моль/л раствора серебра нитрата соответствует 0,005844 г натрия хлорида.

Пропись 15

Рибофлавина 0,002 г

Кислоты аскорбиновой 0,03 г

Раствора кислоты борной 2% 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин (см. пропись 9).

Аскорбиновая кислота. К 2–3 каплям раствора прибавляют 3–5 капель воды и 2–3 капли раствора серебра нитрата. Образуется металлическое серебро в виде серого осадка.

Борная кислота

1. Выпаривают 5–6 капель раствора на водяной бане. К сухому остатку прибавляют 1–2 мл 96-процентного этанола и поджигают. Спиртовой раствор горит пламенем с зеленой каймой.

2. К 2–3 каплям раствора прибавляют 1–2 капли раствора фенолфталеина и 4–5 капель 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида. Появляется ярко-розовое окрашивание, исчезающее после добавления 1–2 мл глицерина или 40–50-процентного раствора глюкозы.

Количественное определение

Рибофлавин (см. пропись 9).

Аскорбиновая кислота и борная кислота. К 0,5 мл раствора прибавляют 2 мл свежепрокипяченной охлажденной воды, 5–6 мл глицерина, нейтрализованного по фенолфталеину, и титруют 0,1 моль/л раствором натрия гидроксида до оранжевого окрашивания (А мл).

К оттитрованной жидкости добавляют 3–5 капель раствора крахмала и титруют 0,02 моль/л раствором йода до буро-синего цвета (Б мл) (кислота аскорбиновая).

1 мл 0,02 моль/л раствора йода соответствует 0,00176 г аскорбиновой кислоты.

Количество 0,1 моль/л раствора гидроксида натрия (X) в миллилитрах, израсходованное на титрование борной кислоты, вычисляют по разности:

$$X = A - \frac{B}{10}.$$

1 мл 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида соответствует 0,006183 г борной кислоты.

Пропись 16

Рибофлавина 0,002 г

Кислоты аскорбиновой 0,05 г

Раствора калия йодида 3% 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин (см. пропись 9).

Аскорбиновая кислота. К 4–5 каплям раствора прибавляют 1–2 капли раствора крахмала и 4–5 капель 0,02 моль/л раствора йода.

Наблюдается обесцвечивание раствора йода, буро-синее окрашивание не появляется.

Калия иодид (см. пропись 11).

Количественное определение

Рибофлавин (см. пропись 9).

Аскорбиновая кислота. К 0,5 мл раствора прибавляют 1 мл воды и титруют 0,02 моль/л раствором йода до буро-синего окрашивания (индикатор — крахмал).

1 мл 0,02 моль/л раствора йода соответствует 0,00617 г аскорбиновой кислоты.

Калия йодид (см. пропись 11).

Пропись 17

Рибофлавина 0,002 г

Кислоты борной 0,2 г

Раствора цитраля 0,01% 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин. Раствор имеет зеленовато-желтый цвет и зеленое свечение в УФ- свете.

Борная кислота. 1. Выпаривают 5–6 капель раствора на водяной бане. К сухому остатку прибавляют 1–2 мл 96% этанола и поджигают. Спиртовой раствор горит пламенем с зеленой каймой.

2. К 2–3 каплям раствора прибавляют 1–2 капли раствора фенолфталеина и 4–5 капель 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида. Появляется ярко-розовое окрашивание, исчезающее после добавления 1–2 мл глицерина или 40–50-процентного раствора глюкозы.

Цитраль. Органолептическое определение по специфическому запаху цитраля.

Количественное определение

Рибофлавин (смотри пропись 9).

Кислота борная. К 0,5 мл раствора прибавляют 2 мл свежепрокипяченной охлажденной воды, 5–6 мл глицерина, нейтрализованного по фенолфталеину, и титруют 0,1 моль/л раствором натрия гидроксида до оранжевого окрашивания.

1 мл 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида соответствует 0,006183 г борной кислоты.

Цитраль. Перед анализом капли взбалтывают. К 1 мл раствора прибавляют точно 9 мл воды и тщательно перемешивают (раствор А). К 2 мл раствора А добавляют 3 мл 96-процентного этанола¹, 2 мл воды, 1,8 мл 0,01% раствора 2,4-динитрофенилгидразина и оставляют на 30 мин. Затем добавляют 1,2 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида и перемешивают. Через 30 мин. измеряют оптическую плотность окрашенного раствора (D1) при длине волны около 467 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Раствор сравнения: смесь из 3 мл 96-процентного этанола, 1 мл 0,004-процентного стандартного раствора рибофлавина, 3 мл воды, 1,8 мл реактива и 1,2 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора, приготовленного следующим образом: к 1 мл 0,002-процентного стандартного раствора цитраля (0,00002 г) прибавляют 2 мл 96-процентного этанола, 4 мл воды, 1,8 мл реактива и оставляют на 30 мин. Затем добавляют 1,2 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида и перемешивают. Через 30 мин. измеряют оптическую плотность окрашенного раствора (D2).

Раствор сравнения: смесь из 3 мл 96-процентного этанола, 4 мл воды, 1,8 мл реактива и 1,2 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида.

Содержание цитраля (X) в граммах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D1 * 0,00002 * 10 * 10}{D2 * 1 * 2}.$$

Пропись 18

Рибофлавина 0,001 г

Кислоты аскорбиновой 0,02 г

Калия йодида 0,2 г

Раствора глюкозы 2% 10 мл

¹ Навеску цитраля (точная масса 0,1000 г) растворяют в 96-процентном этаноле в мерной колбе вместимостью 100 мл (раствор А). Разбавляют 0,5 мл раствора А 96-процентным этанолом в мерной колбе вместимостью 25 мл (раствор Б). В 1 мл раствора Б содержится 0,00002 г цитраля. Раствор А устойчив в течение 6 мес. при хранении в плотно закрытых флаконах в защищенном от света месте. Раствор Б устойчив в течение 2 нед. при хранении в плотно закрытых флаконах в защищенном от света месте

Определение подлинности

Рибофлавин (смотри пропись 9).

Аскорбиновая кислота. К 4–5 каплям раствора прибавляют 1–2 капли раствора крахмала и 4–5 капель 0,02 моль/л раствора йода. Наблюдается обесцвечивание раствора йода, буро-синее окрашивание не появляется.

Калия йодид. 1. К 2–3 каплям раствора прибавляют 2–3 капли разведенной соляной кислоты, 3–5 капель раствора хлорамина, 1 мл хлороформа и взбалтывают. Хлороформный слой окрашивается в фиолетовый цвет.

2. К 4–5 каплям раствора прибавляют 1–2 капли раствора свинца ацетата. Образуется желтый осадок.

Глюкоза. Помещают 0,5 мл раствора в фарфоровую чашку и выпаривают на водяной бане. После охлаждения к сухому остатку прибавляют 0,01 г тимола, 5–6 капель концентрированной серной кислоты и 1–2 капли воды.

Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Количественное определение

Рибофлавин. К 1 мл раствора прибавляют точно 9 мл воды и далее определяют по методике, описанной в прописи 9.

Содержание рибофлавина (X) в граммах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D1 \cdot 0,0001 \cdot 10}{D2 \cdot 1}.$$

Кислота аскорбиновая. Титруют 2 мл раствора 0,02 моль/л раствором натрия гидроксида до оранжевого окрашивания (индикатор — фенолфталеин).

1 мл 0,02 моль/л раствора натрия гидроксида соответствует 0,00352 г аскорбиновой кислоты.

Калия йодид (см. пропись 11).

Глюкоза. Определяют показатель преломления раствора (n) и воды (n₀) при 20 °С.

Концентрацию глюкозы (X) в процентах вычисляют формуле:

$$X = \frac{[n - (n_0 + 0,00160 \cdot C1 + 0,00130 \cdot C2)] \cdot 100}{0,00142 \cdot 100},$$

где 0,00160 — фактор показателя преломления раствора аскорбиновой кислоты;

C1 — концентрация аскорбиновой кислоты в растворе, определенная химическим методом, %;

0,00130 — фактор показателя преломления раствора калия йодида;

C2 — концентрация калия йодида в растворе, определенная химическим методом, %;

0,00142 — фактор показателя преломления раствора безводной глюкозы.

Пропись 19

Рибофлавина 0,002 г

Кислоты аскорбиновой 0,03 г

Калия йодида 0,3 г

Раствора борной кислоты 2% 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин (смотри пропись 9).

Аскорбиновая кислота. К 4–5 каплям раствора прибавляют 1–2 капли раствора крахмала и 4–5 капель 0,02 моль/л раствора йода. Наблюдается обесцвечивание раствора йода, буро-синее окрашивание не появляется.

Калия йодид (см. пропись 11).

Борная кислота (см. пропись 10).

Количественное определение

Рибофлавин (см. пропись 9).

Аскорбиновая кислота и борная кислота. К 0,5 мл раствора прибавляют 2 мл свежепрокипяченной охлажденной воды, 5–6 мл глицерина, нейтрализованного по фенолфталеину, и титруют 0,1 моль/л раствором натрия гидроксида до оранжевого окрашивания (А мл).

К оттитрованной жидкости добавляют 3–5 капель раствора крахмала и титруют 0,02 моль/л раствором йода до буро-синего цвета (Б мл) (кислота аскорбиновая).

1 мл 0,02 моль/л раствора йода соответствует 0,00176 г аскорбиновой кислоты.

Количество 0,1 моль/л раствора гидроксида натрия (X) в миллилитрах, израсходованное на титрование борной кислоты, вычисляют по разности:

$$X = A - \frac{B}{10}.$$

1 мл 0,1 моль/л раствора натрия гидроксида соответствует 0,006183 г борной кислоты.

Калия йодид (см. пропись 16).

Пропись 20

Рибофлавина 0,002 г

Аскорбиновой кислоты 0,02 г

Натрия хлорида 0,05 г

Раствора глюкозы 2% 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин (см. пропись 9).

Аскорбиновая кислота. К 2–3 каплям раствора прибавляют 3–5 капель воды и 2–3 капли раствора серебра нитрата. Образуется металлическое серебро в виде серого осадка.

Натрия хлорид.

1. К 2–3 каплям раствора прибавляют по 2–3 капли разведенной азотной кислоты и раствора серебра нитрата. Образуется белый творожистый осадок, растворимый в растворе аммиака.

2. Часть раствора на графитовой палочке вносят в бесцветное пламя. Пламя окрашивается в желтый цвет.

Глюкоза. Помещают 0,5 мл раствора в фарфоровую чашку и выпаривают на водяной бане. После охлаждения к сухому остатку прибавляют 0,01 г тимола, 5–6 капель концентрированной серной кислоты и 1–2 капли воды.

Появляется красно-фиолетовое окрашивание.

Количественное определение

Рибофлавин. К 0,5 мл раствора прибавляют 9,5 мл воды и измеряют оптическую плотность (D_1) полученного раствора при длине волны около 445 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения — вода.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора (D_2), содержащего 2,5 мл 0,004% стандартного раствора рибофлавина (0,0001 г)¹ и 7,5 мл воды.

Содержание рибофлавина (X) в граммах вычисляется по формуле:

$$X = \frac{D1 \cdot 0,0001 \cdot 10}{D2 \cdot 0,5}.$$

Кислота аскорбиновая. Титруют 2 мл раствора 0,02 моль/л раствором натрия гидроксида до оранжевого окрашивания (индикатор — фенолфталеин). 1 мл 0,02 моль/л раствора натрия гидроксида соответствует 0,00352 г аскорбиновой кислоты.

Натрия хлорид. К 0,5 мл раствора прибавляют 1 мл воды. К 1 мл полученного раствора прибавляют 1–2 капли раствора бромфенолового синего, по каплям разведенную уксусную кислоту до зеленовато-желтого окрашивания и титруют 0,1 моль/л раствором серебра нитрата до фиолетового окрашивания.

1 мл 0,1 моль/л раствора серебра нитрата соответствует 0,005844 г натрия хлорида.

Глюкоза. Определяют показатель преломления раствора (n) и воды (n₀) при 20 °С.

Концентрацию глюкозы (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{[n - (n_0 + 0,00160 \cdot C_1 + 0,00130 \cdot C_2)] \cdot 100}{0,00142 \cdot 100},$$

где 0,00160 — фактор показателя преломления раствора аскорбиновой кислоты;

C₁ — концентрация аскорбиновой кислоты в растворе, определенная химическим методом, %;

0,00130 — фактор показателя преломления раствора калия йодида;

C₂ — концентрация калия йодида в растворе, определенная химическим методом, %;

0,00142 — фактор показателя преломления раствора безводной глюкозы.

¹ Навеску рибофлавина (точная масса 0,0100 г) растворяют в 150 мл воды в мерной колбе вместимостью 250 мл при нагревании на водяной бане. После охлаждения объем раствора доводят водой до метки. В 1 мл стандартного раствора содержится 0,00004 г рибофлавина. Раствор устойчив в течение месяца при хранении в защищенном от света месте.

Пропись 21

Рибофлавина 0,002 г
Кислоты аскорбиновой 0,02 г
Натрия хлорида 0,086 г
Раствора цитраля 0,01% 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин (смотри пропись 9).

Кислота аскорбиновая (см. пропись 16).

Натрия хлорид (см. пропись 20).

Цитраль. Органолептическое определение по специфическому запаху цитраля.

Количественное определение

Рибофлавин (смотри пропись 9).

Аскорбиновая кислота (см. пропись 18).

Натрия хлорид. К 1 мл раствора прибавляют 2 мл разведенной азотной кислоты, 3 мл 0,1 моль/л раствора серебра нитрата и избыток серебра нитрата оттитровывают 0,1 моль/л раствором роданида аммония до желтовато-розового окрашивания (индикатор — железозаммониевые квасцы). 1 мл 0,1 моль/л раствора серебра нитрата соответствует 0,005844 г натрия хлорида.

Цитраль (см. пропись 12).

Пропись 22

Рибофлавина 0,002 г
Кислоты аскорбиновой 0,02 г
Кислоты никотиновой 0,03 г
Натрия хлорида 0,047 г
Воды 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин (смотри пропись 9).

Аскорбиновая кислота. К 2–3 каплям раствора прибавляют 3–5 капель воды и 2–3 капли раствора серебра нитрата. Образуется металлическое серебро в виде серого осадка.

Никотиновая кислота. К 0,03 г порошка прибавляют 1 мл воды, 0,5 мл 0,1 моль/л раствора соляной кислоты и 1% раствора аммония роданида, 1 мл раствора хлорамина. Через 10 мин. добавляют 1 мл 96-процентного этанола, 1,5 мл 1-процентного раствора натрия барбитулата и нагревают на водяной бане при 75–80 °С в течение 10–15 мин. Появляется оранжево-красное окрашивание.

Натрия хлорид.

1. К 2–3 каплям раствора прибавляют по 2–3 капли разведенной азотной кислоты и раствора серебра нитрата. Образуется белый творожистый осадок, растворимый в растворе аммиака.

2. Часть раствора на графитовой палочке вносят в бесцветное пламя. Пламя окрашивается в желтый цвет.

Количественное определение

Рибофлавин (смотри пропись 9).

Аскорбиновая кислота и никотиновая кислота. Титруют 1 мл раствора 0,02 моль/л раствором натрия гидроксида до оранжевого окрашивания (индикатор — фенолфталеин) (А мл).

К оттитрованной жидкости прибавляют 3–5 капель раствора крахмала и титруют 0,02 моль/л раствором йода до буро-синего окрашивания (Б мл) (аскорбиновая кислота).

1 мл 0,02 моль/л раствора йода соответствует 0,00176 г аскорбиновой кислоты.

Количество 0,02 моль/л раствора гидроксида натрия (X) в миллилитрах, израсходованное на титрование никотиновой кислоты, вычисляют по разности:

$$X = A - \frac{B}{2}.$$

1 мл 0,02 моль/л раствора натрия гидроксида соответствует 0,002462 г никотиновой кислоты.

Натрия хлорид. К 1 мл раствора прибавляют 1–2 капли раствора бромфенолового синего, по каплям разведенную уксусную кислоту до зеленовато-желтого окрашивания и титруют 0,1 моль/л раствором серебра нитрата до фиолетового окрашивания.

1 мл 0,1 моль/л раствора серебра нитрата соответствует 0,005844 г натрия хлорида.

Пропись 23

Рибофлавина

Тиамин бромид по 0,002 г

Кислоты аскорбиновой 0,05 г

Натрия хлорида 0,08 г

Воды 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин (смотри пропись 9).

Тиамин бромид. К 1–2 каплям раствора прибавляют по 2–3 капли раствора натрия гидроксида и калия феррицианида, 0,5 мл хлороформа и взбалтывают. Наблюдается сине-фиолетовое свечение хлороформного слоя в ультрафиолетовом свете.

Кислота аскорбиновая. К 2–3 каплям раствора прибавляют 3–5 капель воды и 2–3 капли раствора серебра нитрата. Образуется металлическое серебро в виде серого осадка.

Натрия хлорид. Часть раствора на графитовой палочке вносят в бесцветное пламя. Пламя окрашивается в желтый цвет.

Количественное определение

Рибофлавин (см. пропись 9).

Кислота аскорбиновая (см. пропись 14).

Натрия хлорид (см. пропись 22).

Пропись 24

Рибофлавина 0,001 г

Тиамин бромид 0,002 г

Натрия хлорида 0,09 г

Раствора цитраля 0,01% 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин (смотри пропись 9).

Тиамин бромид (см. пропись 23).

Натрия хлорид Часть раствора на графитовой палочке вносят в бесцветное пламя. Пламя окрашивается в желтый цвет.

Цитраль. Органолептическое определение по специфическому запаху цитраля.

Количественное определение

Рибофлавин. К 1 мл раствора прибавляют точно 9 мл воды и далее определяют по методике, описанной в прописи 9.

Содержание рибофлавина (X) в граммах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D1 \cdot 0,0001 \cdot 10}{D2 \cdot 1}.$$

Натрия хлорид (см. пропись 22).

Цитраль. Перед анализом капли взбалтывают. К 1 мл раствора прибавляют точно 9 мл воды и тщательно перемешивают (раствор А). К 2 мл раствора А добавляют 3 мл 96-процентного этанола¹, 2 мл воды, 1,8 мл 0,01% раствора 2,4-динитрофенилгидразина и оставляют на 30 мин. Затем добавляют 1,2 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида и перемешивают. Через 30 мин. измеряют оптическую плотность окрашенного раствора (D1) при длине волны около 467 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

При измерении оптической плотности анализируемого окрашенного раствора (D1) раствором сравнения служит смесь из 3 мл 96-процентного этанола, 0,5 мл 0,004-процентного стандартного раствора рибофлавина, 3,5 мл воды, 1,8 мл реактива и 1,2 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора, приготовленного следующим образом: к 1 мл 0,002% стандартного раствора цитраля (0,00002 г) прибавляют 2 мл 96-процентного этанола, 4 мл воды, 1,8 мл реактива и оставляют на 30 мин. Затем добавляют 1,2 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида и перемешивают. Через 30 мин. измеряют оптическую плотность окрашенного раствора (D2).

Раствор сравнения: смесь из 3 мл 96-процентного этанола, 4 мл воды, 1,8 мл реактива и 1,2 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида.

Содержание цитраля (X) в граммах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D1 \cdot 0,00002 \cdot 10 \cdot 10}{D2 \cdot 1 \cdot 2}.$$

¹ Навеску цитраля (точная масса 0,1000 г) растворяют в 96-процентном этаноле в мерной колбе вместимостью 100 мл (раствор А). Разбавляют 0,5 мл раствора А 96-процентным этанолом в мерной колбе вместимостью 25 мл (раствор Б). В 1 мл раствора Б содержится 0,00002 г цитраля. Раствор А устойчив в течение 6 мес. при хранении в плотно закрытых флаконах в защищенном от света месте. Раствор Б устойчив в течение 2 нед. при хранении в плотно закрытых флаконах в защищенном от света месте.

Пропись 25

Рибофлавина 0,002 г

Кислоты аскорбиновой 0,01 г

Левомецетина 0,02 г

Раствора кислоты борной 2% 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин (см. пропись 9).

Аскорбиновая кислота. К 2–3 каплям раствора прибавляют 3–5 капель воды и 2–3 капли раствора серебра нитрата. Образуется металлическое серебро в виде серого осадка.

Левомецетин. К 1 мл раствора прибавляют 8–10 капель концентрированной соляной кислоты, 0,1 г цинковой пыли и нагревают на водяной бане 5 мин. После охлаждения раствор фильтруют. К фильтрату добавляют 1–2 мл воды, 2–3 капли 0,1 моль/л раствора натрия нитрита и 0,3–0,5 мл полученной смеси вливают в 1–2 мл 1-процентного раствора β-нафтола, приготовленного на 10-процентном растворе натрия гидроксида. Появляется красно-оранжевое окрашивание.

Борная кислота (см. пропись 10).

Количественное определение

Рибофлавин (см. пропись 9).

Аскорбиновая кислота и борная кислота. К 1 мл раствора прибавляют 2 мл свежепрокипяченной охлажденной воды и далее определяют по методике, описанной в прописи 10.

Левомецетин. К 2 мл раствора прибавляют 1 мл концентрированной соляной кислоты и постепенно 0,5 г цинковой пыли. Затем добавляют еще 1 мл концентрированной соляной кислоты, 0,25 г цинковой пыли, оставляют на 15 мин. и жидкость фильтруют. Колбу и фильтр промывают 40 мл воды, присоединяя к основному фильтрату, добавляют 1 мл концентрированной соляной кислоты, 1 г калия бромида, 4 капли раствора тропеолина 00,2 капли раствора метиленового синего и при 18–20 °С титруют 0,02 моль/л раствором натрия нитрита, добавляя его в начале по 0,2–0,3 мл через 1 мин., а в конце титрования (за 0,1–0,2 мл до точки эквивалентности) — по 1–2 капли через 1 мин. до перехода темно-фиолетовой окраски в темно-зеленую.

Параллельно проводят контрольный опыт с добавлением 2 мл раствора аскорбиновой кислоты (0,01 г в 10 мл). Переход окраски в контроле — от красно-фиолетовой в голубую.

1 мл 0,02 моль/л раствора натрия нитрита соответствует 0,006462 г левомицетина.

Пропись 26

Рибофлавина 0,002 г

Кислоты аскорбиновой 0,01 г

Левомицетина 0,02 г

Калия йодида 0,2 г

Раствора кислоты борной 2% 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин (см. пропись 9).

Аскорбиновая кислота (см. пропись 16).

Левомицетин (см. пропись 25).

Калия йодид (см. пропись 11).

Кислота борная (см. пропись 10).

Количественное определение

Рибофлавин (смотри пропись 9).

Аскорбиновая кислота и борная кислота. К 1 мл раствора прибавляют 2 мл свежепрокипяченной охлажденной воды и далее определяют по методике, описанной в прописи 15.

Калия йодид. К 2 мл раствора прибавляют 0,5 мл разведенной уксусной кислоты, 2 капли 0,1-процентного раствора натрия эозината и титруют 0,1 моль/л раствором серебра нитрата до ярко-розового окрашивания осадка. Оттитрованную жидкость сохраняют для определения левомицетина.

1 мл 0,1 моль/л раствора серебра нитрата соответствует 0,0166 г калия йодида.

Левомицетин. Оттитрованную жидкость (см. «Определение калия йодида») фильтруют и осадок серебра йодида промывают водой 3 раза по 3 мл, присоединяя к основному фильтрату. К фильтрату прибавляют 5 мл разведенной серной кислоты, постепенно 0,5 г цинковой пыли и нагревают на водяной бане 15 мин. После охлаждения

жидкость фильтруют, колбу и фильтр промывают водой 3 раза по 3 мл, присоединяя к фильтрату. Затем добавляют 5 мл разведенной азотной кислоты, 5 мл 0,02 моль/л раствора серебра нитрата, перемешивают и фильтруют. Колбу и фильтр промывают водой 3 раза по 3 мл, присоединяя к фильтрату, добавляют 4 мл раствора железозаммониевых квасцов и избыток серебра нитрата оттитровывают 0,02 моль/л раствором роданида аммония до желтовато-розового окрашивания.

1 мл 0,02 моль/л раствора серебра нитрата соответствует 0,003231 г левомицетина.

Пропись 27

Рибофлавина,

Метилурацила по 0,001 г

Натрия хлорида 0,09 г

Раствора цитраля 0,01% 10 мл

Определение подлинности

Рибофлавин (см. пропись 9).

Метилурацил. К 3 мл раствора прибавляют 0,3–0,5 г активированного угля, взбалтывают 1 мин. и фильтруют. Фильтрат выпаривают на водяной бане. После охлаждения к сухому остатку добавляют 5–6 капель 96-процентного этанола и осторожно нагревают 30 с. После охлаждения добавляют 2–3 капли 1-процентного спиртового раствора кобальта нитрата и 1 каплю водно-спиртового раствора аммиака. Появляется фиолетовое окрашивание.

Натрия хлорид (см. пропись 22).

Цитраль. Органолептическое определение по специфическому запаху цитраля.

Количественное определение

Рибофлавин. К 1 мл раствора прибавляют точно 9 мл воды и далее определяют по методике, описанной в прописи 9. Содержание рибофлавина (X) в граммах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D1 \cdot 0,0001 \cdot 10}{D2 \cdot 1}.$$

Метилурацил. Помещают 5 мл раствора в колбу, нагревают на водяной бане 10 мин. и продувают резиновой грушей до удаления запаха цитраля. После охлаждения к раствору прибавляют 0,4 мл 0,5-процентного раствора натрия гидроксида, 3 мл 0,02 моль/л раствора йодмоноклорида и оставляют на 10 мин. в темном месте. Затем добавляют 2 мл 1-процентного раствора калия йодида и выделившийся йод титруют 0,02 моль/л раствором натрия тиосульфата (индикатор — крахмал). Параллельно проводят контрольный опыт.

1 мл 0,02 моль/л раствора йодмоноклорида соответствует 0,00126 г метилурацила.

Натрия хлорид. К 1 мл раствора прибавляют 1–2 капли раствора бромфенолового синего, по каплям разведенную уксусную кислоту до зеленовато-желтого окрашивания и титруют 0,1 моль/л раствором серебра нитрата до фиолетового окрашивания.

1 мл 0,1 моль/л раствора серебра нитрата соответствует 0,005844 г натрия хлорида.

Цитраль (см. пропись 12). При измерении оптической плотности анализируемого окрашенного раствора (D_1) раствором сравнения служит смесь из 3 мл 96-процентного этанола, 0,5 мл 0,004-процентного стандартного раствора рибофлавина, 3,5 мл воды, 1,8 мл реактива и 1,2 мл 1 моль/л раствора натрия гидроксида.

Учебно-методическое пособие

Составители:

Ольга Александровна Мельникова
Александр Юрьевич Петров
Барсукова Юлия Николаевна

**ПРОИЗВОДНЫЕ ИЗОАЛЛОКСАЗИНА
В КАЧЕСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

ISBN978–5–89895–800–8

*Редактор Е. Бортникова
Корректор Л. Моисеева
Оформление, верстка А. Шевела*

Оригинал-макет подготовлен:
Издательство УГМУ
г. Екатеринбург, ул. Репина, 3, каб. 310
Тел.: (343) 214–85–65
E-mail: pressa@usma.ru