МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

**Рибофлавин-5'-фосфат натрия ФС**

**Рибофлавин**

**Riboflavini natrii phosphas Взамен ФС 42-1305-89**

[(2*R*,3*S*,4*S*)-2,3,4-Тригидрокси-5-(7,8-диметил-2,4-диоксо-2,3,4,10-тетрагидробензо[*g*]птеридин-10-ил)пентил]фосфат натрия (1:1)



|  |  |
| --- | --- |
| C17H20N4NaO9P | М.м. 478,3 |

Cодержит не менее 93,0 % рибофлавин-5'-фосфата натрия C17H20N4NaO9P в пересчете на сухое вещество.

**Описание**. От жёлтого до оранжевого цвета кристаллический порошок со слабым запахом. \*На свету неустойчив. \*Гигоскопичен.

**Растворимость**. Растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 % и хлороформе.

**Подлинность**. *1. Спектрофотометрия*. Спектр поглощения 0,001 % раствора субстанции в фосфатном буферном растворе pH 7,0 в области длин волн от 230 до 350 нм должен иметь максимум при длине волны 266 нм с удельным показателем поглощения от 580 до 640. В качестве раствора сравнения используют фосфатный буферный раствор pH 7,0.

*2. ВЭЖХ*. Время удерживания основного вещества на хроматограмме испытуемого раствора должно соответствовать времени удерживания основного вещества на хроматограмме раствора стандартного образца (испытание «Родственные примеси»).

*3. Флуоресценция*. При облучении УФ светом раствора субстанции в воде (0,1 мг/мл) должна наблюдаться жёлто-зелёная флуоресценция, исчезающая при прибавлении 1 % раствора гидроксида натрия или хлористоводородной кислоты.

*4. Качественная реакция*. Субстанция даёт характерные реакции на натрий. (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

*5. Качественная реакция*. 50 мг субстанции растворяют в 3 мл концентрированной азотной кислоты, кипятят в течение 5 мин и выливают в 10 мл воды. Полученный раствор даёт характерную реакцию В на фосфаты. (ОФС «Общие реакции на подлинность»).

**Удельное вращение**. От +38 до +43 в пересчете на сухое вещество (1,5 % раствор субстанции в 5 М растворе хлористоводородной кислоты, ОФС «Поляриметрия»).

**Прозрачность раствора**. 2 % раствор субстанции в воде должен быть прозрачным (ОФС «Прозрачность и степень мутности жидкостей»).

**pH**. От 5,0 до 6,5 (1 % раствор, ОФС «Ионометрия», метод 3).

**Люмифлавин**. К 35,0 мг субстанции прибавляют 10 мл метиленхлорида, встряхивают в течение 10 мин и фильтруют. Фильтрат должен выдерживать сравнение с эталоном BY6 (ОФС «Степень окраски жидкостей», метод 2).

**Родственные соединения**. Определение проводят методом ВЭЖХ. Определение проводят в защищённом от света месте, все растворы защищают от света.

*Подвижная фаза (ПФ)*: Раствор калия дигидрофосфата в воде (7,35 г/л) – метанол 850:150.

*Испытуемый раствор.* Около 0,1 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл воды и доводят объём ПФ до метки. 8,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём ПФ до метки.

*Раствор стандартного образца*. Около 0,1 г (точная навеска) стандартного образца рибофлавин-5'-фосфата натрия помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в 50 мл воды и доводят объём ПФ до метки. 8,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объём ПФ до метки.

*Раствор сравнения*. Около 60 мг стандартного образца рибофлавина (примесь D) растворяют в 1 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 мл и доводят объём водой до метки. 4,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объём ПФ до метки.

Примечание:

примесь А: рибофлавин-3',4'-дифосфат (CAS 86108-27-2);

примесь B: рибофлавин-3',5'-дифосфат (CAS 86108-26-1);

примесь C: рибофлавин-3',5'-дифосфат (CAS 86108-25-0);

примесь D: рибофлавин (CAS 83-88-5);

рибофлавин-3'-фосфат (CAS 80400-93-7);

рибофлавин-4'-фосфат (CAS 60697-29-2);

*Хроматографические условия*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Колонка | – | 25,0 × 0,46 см, октадецилсилилсиликагель (С18), 5 мкм; |
| Скорость потока | – | 2,0 мл/мин; |
| Детектор | – | спектрофотометрический, 266 нм; |
| Объём пробы | – | 100 мкл; |
| Время хроматографирования | – | двукратное от времени удерживания основного пика |

Хроматографируют испытуемый раствор, раствор сравнения и раствор стандартного образца.

*Пригодность хроматографической системы*. Хроматографическая система считается пригодной, если на хроматограмме раствора стандартного образца:

– разрешение (*R*) между пиками рибофлавин-4'-фосфата и рибофлавин-5'-фосфата не менее 1,5.

*Относительные времена удерживания соединений*. Рибофлавин-5'-фосфат – 1,0 (около 20 мин), примесь A – около 0,2; примесь B – около 0,3; примесь C – около 0,5; рибофлавин-3'-фосфат – около 0.7; рибофлавин-4'-фосфат – около 0,9; примесь D – около 2,0.

Содержание примеси D и суммарное содержание примесей A, B и C в субстанции в процентах (*Х*) в пересчёте на сухое вещество вычисляют по формуле:

$$X=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙4∙100∙50∙100}{S\_{0}∙a\_{1}∙250∙100∙8∙(100-W)}=\frac{S\_{1}∙a\_{0}∙P∙10}{S\_{0}∙a\_{1}∙(100-W)}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *S*1 | – | площадь пика рибофлавина или суммарная площадь пиков примесей A, B и C на хроматограмме испытуемого раствора; |
|  | *S*0 | – | площадь пика рибофлавина на хроматограмме раствора сравнения; |
|  | *а*1 | – | навеска субстанции, мг; |
|  | *а*0 | – | навеска стандартного образца рибофлавина, мг; |
|  | *W* | – | потери в массе при высушивании, %; |
|  | *P* | – | содержание рибофлавина в стандартном образце рибофлавина, %. |

*Допустимое содержание примесей:*

­– примесь D – не более 6 %;

– суммарное содержание примесей A, B и C – не более 6 %.

**Потеря в массе при высушивании**. Не более 10 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют около 1,0 г (точная навеска) субстанции.

**Фосфаты**. Не более 1,5 %.

*Буферный раствор сульфата меди pH 4,0*. 0,25 г сульфата меди(II) и 4,5 г ацетата аммония помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, приливают 60 мл 12 % уксусной кислоты, перемешивают до растворения и доводят объём до метки тем же растворителем.

*Испытуемый раствор*. 0,1 г субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в воде и доводят объём тем же растворителем до метки. 5,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 10 мл воды, 5 мл буферного раствора сульфата меди pH 4,0, 2 мл раствора молибдата аммония в воде (30 г/л), 1 мл свежеприготовленного раствора метола (20 г/л) и метабисульфита натрия (50 г/л), 1 мл 3 % раствора хлорной кислоты и доводят объём водой до метки. Через 15 мин после приготовления раствора измеряют его оптическую плотность при длине волны 800 нм.

*Эталонный раствор*. 15 мл стандартного раствора 5 мкг/мл фосфат-иона (ОФС «Фосфаты») помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл буферного раствора сульфата меди pH 4,0, 2 мл раствора молибдата аммония в воде (30 г/л), 1 мл свежеприготовленного раствора метола (20 г/л) и метабисульфита натрия (50 г/л), 1 мл 3 % раствора хлорной кислоты и доводят объём водой до метки.

Оптическая плотность испытуемого раствора не должна превышать плотность эталонного раствора.

**Тяжёлые металлы**. Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Тяжёлые металлы», метод 2, в зольном остатке, полученном после сжигания 1,0 субстанции, с использованием эталонного раствора 1.

**Остаточные органические растворители.** Всоответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

**Микробиологическая чистота**.В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение**. Определение проводят методом УФ-спектрофотометрии. Определение проводят в защищённом от света месте, все растворы защищают от света.

*Испытуемый раствор*. 0,1 г (точная навеска) субстанции помещают в мерную колбу вместимостью 1 л, растворяют в воде, прибавляют 2,0 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объём раствора водой до метки. 10,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 3,5 мл раствора ацетата натрия с концентрацией 14 г/мл и доводят объём раствора водой до метки.

Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 444 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, в качестве раствора сравнения испоьзуюи смесь 3,5 мл раствора ацетата натрия с концентрацией 14 г/мл и 50 мл воды.

Содержание рибофлавин-5'-фосфата натрия C17H20N4NaO9P в субстанции в процентах (*X*) в пересчете на сухое вещество вычисляют по формуле:

$$X=\frac{D∙1000∙50∙100∙100∙478,3}{a∙328∙10∙(100-W)∙376,36}=\frac{D∙193730}{a∙(100-W)}$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *D* | – | оптическая плотность испытуемого раствора; |
|  | *а* | – | навеска субстанции, мг; |
|  | 328 | – | удельный показатель поглощения рибофлавина ($А\_{1см}^{1\%}$); |
|  | *W* | – | потери в массе при высушивании, %; |
|  | 478,3 | – | молекулярная масса рибофлавин-5'-фосфата натрия; |
|  | 376,36 | – | молекулярная масса рибофлавина. |

**Хранение**. В сухом защищённом от света месте при температуре не выше 15 °С.

\*Приводится для информации