**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
|  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Рибофлавин** |  | **ФС.2.1.0559** |
| **Рибофлавин** |  |  |
| **Riboflavinum** |  | **Взамен ФС 42-2954-93** |

|  |
| --- |
|  |

|  |
| --- |
|  |
| C17H20N4O6 | М.м. 376,36 |
| [83-88-5] |  |

ОПРЕДЕЛЕНИЕ

7,8-Диметил-10-[(2*S*,3*S*,4*R*)-2,3,4,5-тетрагидроксипентил]бензо[*g*]птеридин-2,4(3*H*,10*H*)-дион.

Субстанция представляет собой продукт ферментации.

Содержит не менее 97,0 % и не более 103,0 % рибофлавина C17H20N4O6 в пересчёте на сухое вещество.

СВОЙСТВА

**Описание.** Жёлтый или оранжево-жёлтый кристаллический порошок.

\*Проявляет полиморфизм. Растворы рибофлавина неустойчивы на свету, особенно в присутствии щелочей.

**Растворимость.** Очень мало растворим в воде, практически нерастворим в спирте 96 %.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

*1. Спектрофотометрия* (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

*Испытуемый раствор.* Смешивают равные объёмы испытуемого раствора, полученного в испытании «Количественное определение», и воды.

Спектр поглощения испытуемого раствора должен иметь максимумы при 223 нм, 267 нм, 373 нм и 444 нм. Отношение значений оптических плотностей A373/A267 должно быть от 0,31 до 0,33. Отношение значений оптических плотностей A444/A267 должно быть от 0,36 до 0,39.

2. Определение проводят методом ТСХ (ОФС «Тонкослойная хроматография»).

*Пластинка.* ТСХ пластинка со слоем силикагеля (2-10 мкм).

*Подвижная фаза (ПФ).* Вода.

*Испытуемый раствор.*К25 мг субстанции прибавляют 10 мл воды, встряхивают в течение 5 мин и фильтруют.

*Раствор стандартного образца рибофлавина.* К25 мг (точная навеска) фармакопейного стандартного образца рибофлавина прибавляют 10 мл воды, встряхивают в течение 5 мин и фильтруют.

На линию старта пластинки наносят:

- 1 точка: 2 мкл метиленхлорида и затем 2 мкл испытуемого раствора;

- 2 точка: 2 мкл метиленхлорида и затем 2 мкл раствора стандартного образца рибофлавина.

После каждого последовательного нанесения в точках 1 и 2 пластинку подсушивают в токе холодного воздуха, помещают в камеру с ПФ и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт ПФ пройдёт около 80–90 % длины пластинки от линии старта, её вынимают из камеры, сушат в потоке холодного воздуха до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

*Результат*. Основная зона адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора по положению, величине и цвету флуоресценции должна соответствовать зоне адсорбции рибофлавина на хроматограмме раствора стандартного образца рибофлавина.

*3. Качественная реакция.* Растворяют 1 мг субстанции в 100 мл воды. В проходящем свете раствор должен иметь бледно-зеленовато-жёлтый цвет, в отражённом свете − интенсивную желтовато-зелёную флуоресценцию, которая должна исчезать при добавлении минеральных кислот или щелочей.

ИСПЫТАНИЯ

**Удельное вращение.** От –115,0 до –135,0 в пересчёте на сухое вещество (ОФС «Оптическое вращение»).

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 50 мг субстанции, растворяют в натрия гидроксида растворе 0,05 М и доводят объём раствора тем же растворителем до метки. Раствор используют в течение 30 мин.

**Родственные примеси.** Определение проводят методом ВЭЖХ (ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»).

Все растворы используют сразу после приготовления и защищают от света.

*Подвижная фаза А (ПФА).* Фосфорная кислота концентрированная—вода 1:1000.

*Подвижная фаза Б (ПФБ).* Ацетонитрил.

*Растворитель.* Натрия ацетата раствор 0,1 М.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 0,12 г субстанции, растворяют в 10 мл натрия гидроксида раствора 0,1 М, при необходимости обрабатывая ультразвуком, и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор сравнения.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,0 мл испытуемого раствора и доводят объём раствора растворителем до метки. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 1,0 мл полученного раствора и доводят объём раствора растворителем до метки.

*Раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 10 мг субстанции, растворяют в 1 мл натрия гидроксида раствора 0,5 М, выдерживают в дневном свете в течение 1,5 ч, прибавляют 0,5 мл уксусной кислоты разведённой 30 % и доводят объём раствора водой до метки (содержит примеси A и B).

*Раствор для идентификации пиков.* Содержимое флакона фармакопейного стандартного образца рибофлавина для идентификации пиков, содержащего примеси С и D, растворяют в 1 мл смеси ПФБ—ПФА 1:9, при необходимости обрабатывая ультразвуком.

Примечание

Примесь А: 7,8,10-триметилбензо[*g*]птеридин-2,4(3*H*,10*H*)-дион [1088-56-8].

Примесь В: 7,8-диметилбензо[*g*]птеридин-2,4(1*H*,3*H*)-дион [1086-80-2].

Примесь С: 6,7-диметил-8-[(2*S*,3*S*,4*R*)-2,3,4,5-тетрагидроксипентил]птеридин-2,4(3*H*,8*H*)-дион [5118-16-1].

Примесь D: 8-(гидроксиметил)-7-метил-10-[(2*S*,3*S*,4*R*)-2,3,4,5-тетрагидроксипентил]бензо[*g*]птеридин-2,4(3*H*,10*H*)-дион [52134-62-0].

*Хроматографические условия*

|  |  |
| --- | --- |
| Колонка | 250 × 4,6 мм, силикагель октадецилсилильный эндкепированный для хроматографии, 5 мкм; |
| Температура колонки | 25 °С; |
| Скорость потока | 1,0 мл/мин; |
| Детектор | спектрофотометрический, 267 нм; |
| Объём пробы | 10 мкл. |

*Режим хроматографирования*

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время, мин | ПФА, % | ПФБ, % |
| 0–5 | 90 | 10 |
| 5–20 | 90 → 80 | 10 → 20 |
| 20–25 | 80 | 20 |
| 25–35 | 80 → 50 | 20 → 50 |
| 35–45 | 50 | 50 |

Хроматографируют раствор для идентификации пиков, раствор для проверки разделительной способности хроматографической системы, раствор сравнения и испытуемый раствор.

*Относительное время удерживания соединений.* Рибофлавин – 1 (около 16 мин); примесь С – около 0,2; примесь D – около 0,5; примесь А – около 1,4; примесь В – около 1,9.

*Идентификация примесей.* Для идентификации пиков примесей С и D используют относительное время удерживания соединений, хроматограмму раствора для идентификации пиков и хроматограмму, прилагаемую к стандартному образцу рибофлавина для идентификации пиков.

*Пригодность хроматографической системы.* На хроматограмме раствора для проверки разделительной способности хроматографической системы *разрешение (RS)* между пиками примеси А и примеси В должно быть не менее 5.

*Поправочные коэффициенты.* Для расчёта содержания примесей площади пиков следующих примесей умножают на соответствующие поправочные коэффициенты: примесь А – 0,7; примесь В и D – 1,4, примесь С – 2,3.

*Допустимое содержание примесей*. На хроматограмме испытуемого раствора:

- площадь пика примеси А не должна превышать 0,25 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,025 %);

- площадь пика каждой из примесей B, С и D не должна превышать двукратную площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,2 %);

- площадь пика любой другой примеси не должна превышать площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,1 %);

- сумма площадей пиков всех примесей не должна превышать пятикратную площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (не более 0,5 %).

Не учитывают пики, кроме пика примеси А, площадь которых составляет менее 0,5-площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (менее 0,05 %).

**Потеря в массе при высушивании.** Не более 1,5 % (ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1). Для определения используют 1 г (точная навеска) субстанции.

**Сульфатная зола.** Не более 0,1 % (ОФС «Сульфатная зола»). Для определения используют 1 г (точная навеска) субстанции.

**Тяжёлые металлы.** Не более 0,001 %. Определение проводят в соответствии с ОФС «Тяжёлые металлы» (метод 3А или 3Б), в зольном остатке, полученном в испытании «Сульфатная зола» с использованием эталонного раствора 1.

\*\***Бактериальные эндотоксины.** Не более 7,1 ЕЭ на 1 мг рибофлавина (ОФС «Бактериальные эндотоксины»).

**Остаточные органические растворители.** В соответствии с ОФС «Остаточные органические растворители».

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

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

Определение проводят методом спектрофотометрии (ОФС «Спектрофотометрия в ультрафиолетовой и видимой областях»).

Все растворы защищают от света.

*Раствор натрия ацетата.* В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 1,4 г натрия ацетата тригидрата, растворяют воде и доводят объём раствора водой до метки.

*Испытуемый раствор.* В мерную колбу из тёмного стекла вместимостью 500 мл помещают 65 мг (точная навеска) субстанции, суспендируют с 5 мл воды до полного смачивания, прибавляют 5 мл натрия гидроксида раствора 8,5 %, перемешивают до полного растворения, тотчас прибавляют 100 мл воды, 2,5 мл уксусной кислоты ледяной и доводят объём раствора водой до метки. В мерную колбу из тёмного стекла вместимостью 200 мл помещают 20,0 мл полученного раствора, прибавляют 3,5 мл раствора натрия ацетата и доводят объём раствора водой до метки.

Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 444 нм в кювете с толщиной слоя 1 см, используя в качестве раствора сравнения воду.

Содержание рибофлавина C17H20N4O6 в субстанции в пересчёте на сухое вещество в процентах (*Х*) вычисляют по формуле:

$$X=\frac{A∙500∙200∙100}{328∙a∙20·(100-W)},$$

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| где | *A* | − | оптическая плотность испытуемого раствора; |
|  | 328 | − | удельный показатель поглощения рибофлавина, ($А\_{1см}^{1\%}$); |
|  | $$a$$ | − | навеска субстанции, г; |
|  | $$W$$ | − | потеря в массе при высушивании, %. |

ХРАНЕНИЕ

В герметично укупоренной упаковке, в защищённом от света месте.

\*Приводится для информации.

\*\*Испытание проводят для субстанции, предназначенной для производства лекарственных препаратов для парентерального применения.