**ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ**

|  |
| --- |
| ФС.0.0.0000 |
| **РИБОФЛАВИН** |
| *Riboflavinum* |
| Riboflavin |
|  |
| C17H20N4O6 | *Mr* 376,4 |
| [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.

*Содержание:* от 97,0 % до 103,0 % в пересчёте на сухую субстанцию.

СВОЙСТВА

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

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

**Стабильность.** Растворы рибофлавина неустойчивы на свету, особенно в присутствии щелочей.

Проявляет полиморфизм *(ОФС «Полиморфизм»)*.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ

А.**Удельное оптическое вращение** (см. раздел *Испытания*).

Б. **Тонкослойная хроматография** *(ОФС «Тонкослойная хроматография»)*.

*Испытуемый раствор*. 25 мг испытуемого образца суспендируют в 10 мл *воды*, встряхивают в течение 5 мин и фильтруют.

*Раствор сравнения.* 25мг фармакопейного стандартного образца *рибофлавина* суспендируют в 10 мл *воды*, встряхивают в течение 5 мин и фильтруют.

*Условия хроматографирования:*

- *ТСХ пластинка со слоем* *силикагеля* (2–10 мкм);

- *подвижная фаза: вода*;

-*наносимый объём пробы*: после каждого последовательного нанесения пластинку подсушивают в потоке холодного воздуха:

- *1-е нанесение*: 2 мкл *метиленхлорида* и затем 2 мкл испытуемого раствора;

- *2-е нанесение*: 2 мкл *метиленхлорида* и затем 2 мкл раствора сравнения;

-*пробег фронта подвижной фазы*: более 6 см;

-*высушивание:* в потоке холодного воздуха;

- *детектирование*: просматривание в ультрафиолетовом свете при длине волны 365 нм.

*Требование*: на хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться основная зона адсорбции на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора сравнения, соответствующая ей по величине.

В.**Качественная реакция***.* 1 мг испытуемого образца растворяют 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 прибавлении минеральных кислот или щелочей.

ИСПЫТАНИЯ

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

50,0 мг испытуемого образца растворяют в *натрия гидроксида растворе 0,05 М*,свободном от карбонатов,и доводят объём раствора тем же растворителем до 10,0 мл. Измерение проводят в течение 30 мин после приготовления раствора.

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

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

*Максимумы поглощения*: 223 нм; 267 нм; 373 нм и 444 нм.

*Отношения поглощений:*

- *A373/A267*: от 0,31 до 0,33;

- *A444/A267*: от 0,36 до 0,39.

**Родственные примеси.** Метод ВЭЖХ (*ОФС «Высокоэффективная жидкостная хроматография»*).

Все растворы используют свежеприготовленными. Испытание проводят в защищённом от света месте.

*Раствор А*. *Натрия ацетата раствор 0,1 М*.

*Испытуемый раствор*. 0,120 г испытуемого образца растворяют в 10 мл *натрия гидроксида раствора 0,1 М*,обрабатывая ультразвуком,и доводят объём раствора раствором А до 100,0 мл.

*Раствор сравнения (а)*. 1,0 мл испытуемого раствора доводят раствором А до объёма 10,0 мл. 1,0 мл полученного раствора доводят раствором А до объёма 100,0 мл.

*Раствор сравнения (б)*. Содержимое флакона с фармакопейным стандартным образцом *рибофлавина для идентификации пиков,* содержащим примеси С и D,растворяют в 1,0 мл смеси подвижная фаза Б – подвижная фаза А (1:9), обрабатывая ультразвуком.

*Раствор сравнения (в)*. Для получения примесей А и В 10 мг испытуемого образца растворяют в 1 мл *натрия гидроксида раствора 0,5 М*, выдерживают при дневном свете в течение 1,5 ч, прибавляют 0,5 мл *уксусной кислоты разведённой 30 %* и доводят объём раствора *водой* до 100 мл.

Примечание

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

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

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.

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.

*Условия хроматографирования:*

- *колонка*: длиной 0,25 м и внутренним диаметром 4,6 мм; заполненная *силикагелем* *октадецилсилильным, эндкепированным, для хроматографии* с размером частиц 5 мкм;

- *подвижная фаза А*: *фосфорная кислота концентрированная – вода* (1:1000 *об/об*);

- *подвижная фаза Б*: *ацетонитрил*;

*- режим градиентного элюирования*:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Время(мин) | Подвижная фаза А(% *об/об*) | Подвижная фаза Б (% *об/об*) |
| 0–5 | 90 | 10 |
| 5–20 | 90 → 80 | 10 → 20 |
| 20–25 | 80 | 20 |
| 25–35 | 80 → 50 | 20 → 50 |
| 35–45 | 50 | 50 |
| 45–55 | 90 | 10 |

- *скорость подвижной фазы*: 1 мл/мин;

- *детектор*: спектрофотометрический, длина волны 267 нм;

- *вводимый объём пробы*: 10 мкл;

*Идентификация примесей*: для идентификации пиков примесей C и D используют хроматограмму, прилагаемую к фармакопейному стандартному образцу *рибофлавина для идентификации пиков*, и хроматограмму раствора сравнения (*б*).

*Относительное время удерживания* (время удерживания рибофлавина – около 16 мин): примесь С – около 0,2; примесь D – около 0,5; примесь A – около 1,4; примесь B – около 1,9.

*Пригодность хроматографической системы*:

*- разрешение (RS)*: не менее 5 между пиками примесей A и B на хроматограмме раствора сравнения (в);

- хроматограмма раствора сравнения (б) должна быть аналогична хроматограмме, прилагаемой к фармакопейному стандартному образцу *рибофлавина для идентификации пиков*.

*Пределы содержания примесей:*

*- поправочный коэффициент*: для расчёта содержания умножают площадь пика следующих примесей на соответствующий поправочный коэффициент: примесь А – 0,7; примесь B – 1,4; примесь C – 2,3;
примесь D – 1,4.

*- примесь A*: не более чем 0,25 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (а) (0,025 %);

*- примеси B, С, D*: для каждой примеси не более чем 2-кратная площадь основного пика на хроматограмме раствора сравнения (а) (0,2 %);

*- неидентифицированные примеси*: для каждой примеси не более чем площадь основного пика рибофлавина на хроматограмме раствора
сравнения (а) (0,10 %);

*- сумма примесей*: не более чем 5-кратная площадь основного пика рибофлавина на хроматограмме раствора сравнения (а) (0,5 %);

- *неучитываемый предел пиков, отличных от пика примеси А*: не более 0,5 площади основного пика на хроматограмме раствора сравнения (а) (0,05 %).

**Остаточные органические растворители** *(ОФС «Остаточные органические растворители»).*

**Потеря в массе при высушивании** *(ОФС «Потеря в массе при высушивании», способ 1)*. Не более 1,5 %.

1,000 г испытуемого образца высушивают в сушильном шкафу при температуре 105 °C.

**Сульфатная зола** *(ОФС «Сульфатная зола»)*. Не более 0,1 % на остаток, полученный в испытании на потерю в массе при высушивании.

**Тяжёлые металлы** (*ОФС «Тяжёлые металлы», метод 3А или 3Б*)**.** Не более 0,001 %.

**Бактериальные эндотоксины.** (*ОФС «Бактериальные эндотоксины»).* Менее 7,1 МЕ/мг, если субстанция предназначена для производства лекарственных препаратов парентерального применения без последующего удаления бактериальных эндотоксинов.

**Микробиологическая чистота.** Испытуемый образец должен выдерживать требования испытания на микробиологическую чистоту.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ

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

Испытание проводят в защищённом от света месте.

*Испытуемый раствор.* В мерной колбе из тёмного стекла вместимостью 500 мл суспендируют 65 мг испытуемого образца 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. 20,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу из тёмного стекла вместимостью 200 мл, прибавляют 3,5 мл раствора 14 г/л *натрия ацетата* и доводят объём раствора *водой* до метки.

Измеряют поглощение в максимуме поглощения при
длине волны 444 нм. Содержание C17H20N4O6 рассчитывают, используя значение удельного показателя поглощения 328.

Содержание рибофлавина C17H20N4O6 в испытуемом образце 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$\frac{1\%}{1см}$); |
|  | $$a$$ | − | навеска субстанции, г; |
|  | $$W$$ | − | потеря в массе при высушивании, %. |

ХРАНЕНИЕ

В герметичной упаковке в защищённом от света месте.