**Анализ препаратов производных птеридина и изоаллоксазина. Фармацевтические формы фолиевой кислоты и рибофлавина.**

Производные птерина делятся на две группы: а) витамины , производные птерина: б) производные фолиевой кислоты.

**Витамины производные птерина**

**Фолиевая кислота – Acidum folicum**

**(фолиевая кислота, витамин Bс, птероилглутаминовая кислота)**

Фолиевая кислота ( *фолиум* означает лист и указывает место, где в основном собирается этот витамин) содержится в овощных растениях, в почках и печени человека и животных . Вырабатывается микрофлорой кишечника. Фолиевую кислоту, используемую в медицине, получают путем синтеза.

Химическая структура фолиевой кислоты была определена в 1946 году. Основу молекулы фолиевой кислоты составляет птеридиновая гетероциклическая система. Птеридиновое ядро представляет собой конденсированную систему, состоящую из пиримидиновых и пиразиновых гетероциклов:



Птерин (2-амин 4-оксиптеридин), производное птеридина, также составляет основу молекулы птериновой кислоты:



 птериновая кислота

Птерин является компонентом молекулы фолиевой кислоты. Поэтому эту группу витаминов называют птеринами. Кроме птеридина, в состав молекулы фолиевой кислоты входят также *п* -аминобензойная кислота и один или несколько остатков глутаминовой кислоты. Птерин соединяется с *п* -аминобензойной кислотой через метиленовую группу, образуя птероевую кислоту:



птероевая кислота

Таким образом, химическая структура фолиевой (птероилглутаминовой) кислоты выглядит следующим образом:

*остаток п-аминобензоилглутаминовой кислоты*

C

O

O

H

6

5

C

H

2

8

9

7

1

0

1

2

3

4

C

H

2

N

2

H

N

O

H

N

N

N

/

1

2

3

4

5

/

/

/

/

6

C

O

O

H

/

C

H

2

N

H

C

O

N

H

C

H

*Pteroil qalığı*

N[4 / -[(2-Амино-4-окси-6-птеридил)-метил ]-амино] -бензоил-

-L(+)-глутаминовая кислота

Как видно, молекула фолиевой кислоты состоит из 3 частей: производного птеридина, п-аминобензойной кислоты и l-глутаминовой кислоты. Поэтому фолиевую кислоту также называют птероил- *1* (+)глутаминовой кислотой. Другими веществами с активностью фолиевой кислоты являются полипептиды фолиевой кислоты, содержащие от 3 до 7 остатков глутаминовой кислоты.

В организме фолиевая кислота превращается в кофермент под действием фермента фолатредуктазы в клетках. Важными представителями этих коферментов являются 7,8-дигидрофолиевая кислота, 5,6,7,8-тетрагидрофолиевая кислота, фолиновая кислота и другие.

**Синтез.**

Для синтеза препарата 2,5,6-триамин-4-оксипиримидин, 2,3-дибромпропионовый альдегид и п-аминобензоил- *L* (+)глутаминовую кислоту конденсируют и превращают в 5,6-дигидрофолиевую кислоту; фолиевую кислоту получают дегидрированием последнего вещества:



$$α,β$$

2,5,6-триамин- α,β-дибромпропион

4-оксипиримидиновый альдегид

C

N

H

C

H

C

O

O

H

C

H

2

C

H

2

C

O

O

H

N

2

H

O

+

п-аминобензоил L-(+) глутаминовая кислота

C

O

O

H

C

O

O

H

O

H

C

H

2

C

H

2

N

H

N

N

N

H

C

O

N

H

C

H

C

H

2

N

2

H

N

5,6-дигидрофолиевая кислота

[

O

]

F

o

l

t

u

r

ş

u

s

u

Фолиевая кислота представляет собой желтый или желто-оранжевый кристаллический порошок без запаха и вкуса. Разлагается под действием света и гигроскопичен. Практически нерастворим в воде, 95% спирте, ацетоне, бензоле, эфире и хлороформе. Он мало растворим в разбавленной соляной кислоте, умеренно растворим в разбавленной серной кислоте и легко растворим в щелочных растворах.

Его растворимость в кислых и щелочных растворах обусловлена амфотерной природой фолиевой кислоты (за счет аминных и карбоксильных групп).

**Определение подлинности.**

Реакции, основанные на окислении, комплексообразовании, а также амфотерные свойства растворов фолиевой кислоты, используются для определения идентичности препарата.

1) 0,1 г препарата растворяют в 5 мл 0,1 М раствора NaOH, к нему добавляют 5 мл 0,1 М соляной кислоты и 1 мл раствора перманганата калия. Раствор помещают на водяную баню с температурой 80-85 ° С на 3 минуты . Для нейтрализации избыточного количества перманганата калия к охлажденному раствору по каплям добавляют 0,2 мл раствора перекиси водорода и фильтруют. Фильтрат дает синюю флуоресценцию в ультрафиолетовом свете. Причиной этого является образование п-аминобензоилглутаминовой и птериновой кислот, являющихся продуктами окисления фолиевой кислоты:

F

o

l

t

u

r

ş

u

s

u

K

M

n

O

4

O

H

N

2

H

N

N

N

N

C

O

O

H

+

териновая кислота



2) УФ-спектрофотометрия: 0,001% раствор *п -аминобензоилглутаминовой кислоты в 0,1 М NaOH имеет 3 характерных максимума при длинах волн 256, 283 и 365 нм* и 3 характерных минимума при 235, 265 и 332 нм. Отношение оптических плотностей (D) в 1-й и 3-й ду, т.е. $\frac{D\left(256 nm\right)}{D\left(365 nm\right)}$= 2,8-3,0

3) 0,02 г препарата взбалтывают с 2-3 мл 0,1 М раствора NaOH в течение 2-3 мин и фильтруют. Поместите 2-3 капли полученного фильтрата в часовое стекло и добавьте к нему 1-2 капли соли тяжелых металлов. В это время с ацетатом свинца получается лимонный цвет, с нитратом кобальта темно-желтый, с нитратом серебра желто-оранжевый, с 2-сульфатом меди зеленый, с 3-хлоридом железа красновато-желтый. При добавлении щелочи смесь фильтруют для предотвращения образования гидроксидов металлов и проводят испытания капельным методом на часовом стекле. Общая формула водонерастворимых окрашенных внутренних комплексных солей:



Комплексные соединения образуются за счет наличия активного атома водорода гидроксильной группы в птериновом остатке молекулы и триплетного атома азота в 5-м положении.

4) 0,01 г препарата растворяют в 1 мл 0,1 М раствора гидроксида натрия, добавляют к нему 0,02-0,03 г порошка цинка, смесь встряхивают 2-3 мин и фильтруют, затем раствор подкисляют соляной кислоты, добавляют несколько капель нитрита натрия, добавляют раствор. При добавлении полученного раствора к раствору β-нафтола (а) в щелочи образуется красный азокраситель. Для получения азокрасителя также могут быть использованы растворы N-(1-нафтил)-этилендиамин-дигидрохлорида (б), N-фенил-α-нафтиламина (С) и N-фенил-β-нафтиламина (Ч).

***Примечание.*** Для устранения избытка нитритной кислоты берут раствор аммиачно-сульфаминовой кислоты или мочевины.

C

O

N

H

2

+

2

H

C

l

2

H

N

+

2

O

N

a

N

2

2

N

2

+

C

O

2

+

2

N

a

C

l

+

3

H

2

O

F

o

l

t

u

r

ş

u

s

u

K

M

n

O

4

+

C

O

O

H

N

H

2

+

q

l

ü

t

a

m

i

n

t

u

r

ş

u

s

u

R

p

-

a

m

i

n

b

e

n

z

o

y

t

u

r

ş

u

s

u

N

2

H

C

O

N

H

p

-

a

m

i

n

b

e

n

z

o

i

l

q

l

ü

t

a

m

i

n

C

H

C

O

O

H

C

H

2

C

H

2

C

O

O

H

t

u

r

ş

u

s

u

+

K

2

H

P

O

4

H

C

l

+

Z

n

R

+ *0*-metilpterin

*0*-metilpterin

N

a

N

O

2

+

2

H

C

l

-

(

N

a

C

l

+

2

H

2

O

)

R

N

N

R

+

C

l

N

N

R

+

C

l

O

a

N

+

N

a

O

H

-

(

N

a

C

l

+

H

2

O

)

a)

$ β$-нафтол

O

a

N

N

N

R

азокраситель (красный)

N

N

R

+

C

l

+

N

H

C

H

2

C

H

2

N

H

2

2

H

C

l

.

-

H

C

l

b)

N-(1-нафтил)-этилендиамин-

дигидрохлорид

N

H

C

H

2

C

H

2

N

H

2

N

N

R

азокраситель (фиолетовый)

N

N

R

+

C

l

+

N

H

C

6

H

5

-

H

C

l

c)

N-фенил- $α$-нафтиламин

N

N

R

N

H

C

6

H

5

азокраситель (фиолетовый)

N

N

R

+

C

l

+

N

H

C

6

H

5

-

H

C

l

ç)

N-фенил- $β$-нафтиламин

N

H

N

R

N

C

6

H

5

Азокраситель (красно-фиолетовый)

Следует отметить, что первую стадию этой реакции - стадию гидролиза препарата - Международная фармакопея рекомендует проводить с порошком цинка в разбавленной соляной кислоте.

5) Определяется NTX. Растворы исследуемого и стандартного образца хроматографируют в системе растворителей этанол-пропанол-аммиак (60:20:20). Размер и положение пятен должны быть одинаковыми.

**Определение чистоты**

Примесь свободных аминов в препарате не должна превышать 91%).

**Количественная оценка**

Это можно сделать несколькими способами:

2) Метод полярографии. Определение здесь основано на том факте, что фолиевая кислота легко восстанавливается до 7,8-дигидрофолиевой кислоты в присутствии Na2 CO3 . Обратный процесс происходит даже под действием кислорода воздуха:



фолиевая кислота 7,8-дигидрофолиевая кислота

3) Способ обезвреживания. Около 0,15 г препарата растворяют в избытке (20 мл) 0,1 М раствора NaOH и титруют 0,1 М соляной кислотой. В качестве индикатора берут смесь из 4 капель фенолфталеина и 2 капель метиленового синего. Титрование проводят от сине-фиолетовой окраски до зеленой окраски. В качестве индикатора можно использовать также 5-6 капель тимолфталеина. В это время титрование проводят от голубовато-красной окраски до желто-зеленой окраски.

Параллельно определяют свободную парааминобензоилглутаминовую кислоту. Для этого 0,15 г фолиевой кислоты (дк) на 5 мл фенолфталеина дважды встряхивают с нейтрализованным спиртом в течение 5 минут. Спиртовые экстракты объединяют, фильтруют и титруют 0,01 М раствором NaOH (индикатор-фенолфталеин). Чтобы перейти от 0,01 млн лет к 0,1 М, объем раствора NaOH, используемого для этого титрования, соответствует 10-кратному объему 0,1 М NaOH, используемому для титрования фолиевой кислоты.

Каждый 1 мл 0,1 М раствора NaOH в сочетании с препаратом соответствует 0,01471 г фолиевой кислоты (Е=Mk/3).

4) Метод фотоколориметрии, основанный на получении азокрасителя. Суть назначения заключается в том, что фолиевая кислота под действием KMnO 4 в слабощелочной среде превращается в п-аминобензоилглутаминовую кислоту , диазотируется и проводится реакция азокрасителя. Интенсивность полученной окраски измеряют фотоколориметром (см. 4-ю реакцию определения идентичности).

Поскольку полученная фолиевая кислота содержит небольшое количество свободной п-аминобензоилглутаминовой кислоты, часть раствора препарата диазотируют без обработки KMnO 4 и азокрасят.Полный ход работы показан в «Руководящих лабораторных занятиях».

1) Спектрофотометрия. Максимум длины волны поглощения 365 нм в 0,1 М растворе натрия гидроксида.

Фолиевая кислота вместе с витамином В 12 ускоряет эритропоэз (процесс образования эритроцитов), участвует в синтезе аминокислот, нуклеиновых кислот, пуриновых и пиримидиновых производных, холиновом обмене. Фолиевую кислоту в таблетках по 0,001 г применяют внутрь как средство, повышающее активность органов свертывания крови, при анемиях и хронических заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Фолиевую кислоту (0,0008 г) вместе с аскорбиновой кислотой (0,1 г) выпускают также в таблетках и поливитаминных препаратах.

Препарат хранят в плотно закрытой таре, в сухом, защищенном от света месте. При несоблюдении условий хранения препарат быстро разлагается под действием света, особенно под действием УФ-лучей с длиной волны 365 нм в кислой среде. В результате разложения образуются *п-аминобензоилглутаминовая кислота и 6-формилптерин, последний под действием кислорода воздуха окисляется до птериновой кислоты:*



6-формилптериновая кислота

 В результате этого процесса фолиевая кислота теряет свою активность.

**Производные фолиевой кислоты**

 Химическая структура фолиевой кислоты характерна для биологической активности против анемии. Незначительные изменения молекулярной структуры вещества приводят к утрате им витаминной активности или даже к возникновению антивитаминного действия.

 Метотрексат, один из метаболитов фолиевой кислоты, используется в качестве противоопухолевого средства. Принцип поиска противоопухолевых веществ, сходных с природными метаболитами, использован при создании метотрексата, структурно сходного с фолиевой кислотой и ее антагонистом.

**Метотрексат – Метотрексат**

**(Триксилем)**

C

H

3

6

5

C

H

2

8

9

7

1

0

1

2

3

4

C

H

2

N

2

H

N

N

H

2

N

N

N

O

C

H

2

C

C

O

O

H

C

H

N

H

N

6'

5'

1'

3'

4'

2'

4-амино-4-дезокси-10-метилптероил-L-глутаминовая кислота или 4-дезокси-

-4-амино-N 10 -метилфолиевая кислота.

Метотрексат представляет собой смесь 4-дезокси-4-амино-N-10-метилфолиевой кислоты и других птериновых соединений.

**Синтез.**

Синтез основного ингредиента метотрексата аналогичен синтезу фолиевой кислоты. Тетрааминопиримидин, трихлорацетон и N-[4-(N-метиламинобензоил)] барий-глутамат конденсируют для синтеза:

 тетрааминопиримидин N-[4-(Nметиламинобензоил)]-трихлорацетон

глутамат бария



4-дезокси-4-амино-N-10-метилфолиевая кислота

Желтый или оранжево-желтый гранат представляет собой кристаллический порошок. Практически нерастворим в воде, дихлорэтане и спирте. Легко растворим в щелочах и разбавленных растворах карбонатов.

**Определение подлинности.**

1) УФ-спектрофотометрия: 0,001% раствор препарата в 0,1 М NaOH дает три максимума поглощения при длинах волн 258±1 нм, 303±1 нм и 370±2 нм. Отношение оптических плотностей, определенных при 303 нм и 370 нм du, должно быть 2,8-3,3.

2) Хроматографию проводят на бумаге. На бумагу для хроматографии наносят пятно 1% раствора препарата в 0,05 М Na2CO3 и проводят хроматографию восходящим методом.В качестве растворителя взят фосфатный буфер с рН 5,8. На хроматограмме должно быть пятно метотрексата с Rf 0,63-0,75 и 3 других пятна (птерина), которые дают флуоресценцию.

3) ИК-спектроскопия: ИК-спектр метотрексата должен соответствовать спектрам, приведенным в НС.

4) Окисляясь перманганатом калия, дает синюю флуоресценцию в УФ-свете (см. 1-ю реакцию тождества в фолиевой кислоте). Хлорат калия также можно использовать в качестве окислителя.

**Количественная оценка**

1. Его определяют спектрофотометрически. Для этого перед приемом фолиевой кислоты и

метотрексат хроматографируют на бумаге (см. определение идентичности 2); их пятна промывают 0,1 М раствором NaOH и измеряют их оптическую плотность. По результату оптической плотности рассчитывают количество метотрексата.

1. Согласно Международной фармакопее проводится методом YEMX. Движущийся

В качестве фазы используют систему ацетонитрил-фосфат-цитратный буфер (8:92). Расчеты производятся по площади пика стандартного и исследуемого растворов.

Это один из антиметаболитов, являющихся аналогами фолиевой кислоты.

Останавливает развитие злокачественных опухолей, применяется при лечении лейкемии (лейкоциты). Препарат 0,0025; 0,05; В таблетках по 0,01 г натриевой соли 0,02; 0,05; 1 для инфузий во флаконах в количестве 0,1 г; 2; 4; 8; 10; 20; 40; Выпущено 200 мл.

Препарат хранят в плотно закрытой таре, в сухом, защищенном от света месте, $℃$при температуре до +5.

**ПРОИЗВОДНЫЕ ИЗОАЛЛОКСАЗИНА**

 Изоаллоксазиновая гетероциклическая система химически подобна птеридину и состоит из двух гетероциклов: пиразинового и пиримидинового, а также дополнительного бензольного ядра, иными словами, является частично гидрированным производным бензптеридина. Пиримидиновое ядро в молекуле изоаллоксазина похоже на лактам:



Изоаллоксазин Бензптеридин

Лекарственные вещества с производными изоаллоксазина включают природные соединения с активностью витамина В 2 (рибофлавина). Витамины группы В 2 также называют флавинами (« *flavum* » — «желтые») витаминами. *Лактофлавин* , полученный из молока , *овофлавин,* полученный из яичного белка , и *цитрофлавин,* полученный из лимона , имеют одинаковую химическую структуру и представляют собой *рибофлавин* , состоящий из остатков изоаллоксазинового гетероциклина и рибозы .

**Рибофлавин (витамин В 2 )**

3

H

C

3

H

C

N

N

O

O

N

H

N

C

H

2

(

C

H

O

H

)

3

C

H

2

O

H

4

6

5

3

8

9

7

2

1

6,7-диметил-9-(D-1-рибитилизоаллоксазин)

Мк376,37

В2 широко распространен в растительноми животном мире. Этот витамин человек получает с молоком и мясными продуктами. Некоторые пищевые продукты окрашиваются рибофлавином, например, молочные продукты, яичные желтки, печень, почки, зародыши и шелуха злаков (ячмень, пшеница), горох, овощи (шпинат, помидоры) и др.

Рибофлавин входит в состав флавиновых ферментов в организме и обеспечивает выполнение реакций дегидрирования. Недостаток рибофлавина в организме (гиповитаминоз) и дефицит (авитаминоз) вызывают арибофлавиноз, при котором повреждается кожа вокруг рта и, в тяжелых случаях, глаза. Кроме того, снижается масса тела, возникает потеря аппетита, нарушается процесс зрения. Рибофлавин преобразует видимые ультрафиолетовые и синие лучи в длинноволновые лучи, когда глаза более чувствительны. Таким образом, он выражает роль сенсибилизатора (повышает чувствительность к свету), создавая батохромный эффект в зрении. Сетчатка некоторых животных (рыб, обезьян) содержит рибофлавин. Поступающий в организм рибофлавин фосфатируется под влиянием АТФ (за счет моноспирта –группы CH 2 OH в остатке рибита) и образуются два кофермента – флавинмононуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД). Витаминная активность рибофлавина связана с наличием в его молекуле лабильной азадеиновой группы и рибитильного радикала. Группа азадеина придает ему окислительно-восстановительные свойства. Благодаря этим свойствам флавины участвуют в метаболических реакциях сахаров, липидов и белков и выполняют различные биологические функции в организме. Рибофлавин восстанавливается и теряет желтую окраску и становится бесцветным лейкорибофлавином:



рибофлавин (желтый) лейкорибофлавин (бесцветный)

və ya

C

C

N

N

C

C

N

H

H

N

окисление до восстановленной формы

форма

Причиной окраски производных изоаллоксазина $-$является группировка хромофора азометина (=C=N–). Одним из характерных свойств рибофлавина является его светочувствительность. Под влиянием света изменяется химическая структура рибофлавина, и это изменение зависит от рН среды, а также от интенсивности света. Под действием света в нейтральной или слабокислой среде отделяется остаток рибозы, в результате чего образуется *люмихром , не излучающий желтой флуоресценции* . При облучении рибофлавина в щелочной среде получают *люмифлавин . Растворы люмифлавина* имеют желтый цвет и дают желто-зеленую флуоресценцию:

3

H

C

3

H

C

N

N

H

O

O

N

H

N

R

i

b

o

f

l

a

v

i

n

N

N

O

C

H

3

N

H

N

l

ü

m

i

x

r

o

m

(

6

,

7

-

d

i

m

e

t

i

l

a

l

l

o

k

s

a

z

i

n

)

l

ü

m

i

f

l

a

v

i

n

(

6

,

7

,

9

-

t

r

i

m

e

t

i

l

i

z

o

a

l

l

o

k

s

a

z

i

n

)

p

H

<

6

p

H

>

9

H3C

H3C

Люмихром и Люмифлавин не проявляют витаминной активности.

В отличие от рибофлавина, люмифлавин растворим в хлороформе. Используя это свойство, они определяют наличие люмифлавина в виде смеси рибофлавина и мононуклеотида рибофлавина:

**Приобретение**

Рибофлавин может быть получен из растительного или животного сырья. Однако этот процесс требует больших трудозатрат, а выход получаемого продукта очень низок. Так, для получения 1 грамма рибофлавина необходимо переработать 5,4 тонны молочной сыворотки.

В промышленности рибофлавин получают методом синтеза. Для синтеза рибофлавина 3,4-диметиланилин конденсируют с *D -рибозой, гидрируют полученный имин, а арилрибамин, образующийся в результате реакции азосочетания (восстановления азогруппы), конденсируют с аллоксаном и превращают в рибофлавин:*





В настоящее время наиболее удобным способом получения рибофлавина является *микробиологический синтез* . Здесь за основу берут физиологию микроорганизмов и генную инженерию, в результате чего выход рибофлавина увеличивается в 4-5 тысяч раз.

Рибофлавин представляет собой желто-оранжевый кристаллический порошок со слабым характерным запахом и горьким вкусом. Он устойчив к свету. Мало растворим в воде, в щелочах, практически не растворим в 95% спирте, эфире, ацетоне, бензоле и хлороформе.

**Определение подлинности.**

Для определения идентичности изоаллоксазиновых производных, в том числе рибофлавина, химических реакций, основанных на окислительно-восстановительных реакциях на основе двойных связей, окисления и этерификации рибитольной части молекулы, комплексообразования и гидролиза, наличия тройного атома азота, иона натрия и фосфатный остаток, находящийся в молекуле.

1) *Флуоресценция:* 0,01 г препарата растворяют в 100 мл воды, раствор светло-зеленовато-желтого цвета. При осмотре в УФ-лучах наблюдается зеленая флуоресценция. Флуоресценция исчезает при добавлении соляной кислоты и щелочного раствора, а флуоресценция и окраска теряются при добавлении гипосульфита натрия. Это связано с превращением рибофлавина в лейкорибофлавин (см. стр. 22).

2) красное окрашивание образуется при добавлении к 0,001 г препарата 2-3 капель серной кислоты; добавление нескольких капель воды меняет цвет на желтый.

3) При добавлении к препарату 3-4 капель раствора AgNO 3 образуется оранжево-красно-красное комплексное соединение (рибофлавин соединяется с ионами серебра в соотношении 1:1; соединение находится в имидной группе в 3-й позиция).

обработке раствора рибофлавина реактивом Дениже (0,5 г желтой окиси ртути + 2 мл концентрированной H2SO4 + 10 мл воды) получается оранжевая окраска:

N

O

N

A

g

O

4

v

ə

N

O

N

3

O

N

O

O

N

H

g

3

5) 0,001 г препарата растворяют в воде, к полученному раствору добавляют 1-2 капли 0,1 М раствора NaOH и 3-4 капли 0,25% раствора нингидрина и нагревают до кипения; образуется зеленый цвет.

6) Рибофлавин, как азотсодержащее органическое соединение, реагирует с реактивом Драгендорфа и другими осаждающими общеалкалоидными реактивами.

7) Специальное вращение препарата должно быть от -110 0 до -130 0 . 0,125 г препарата (мин) растворяют в 5 мл 0,1 М раствора калия гидроксида в спирте в мерной колбе вместимостью 25 мл. Измеряют объем раствора с водой и определяют угол поворота. Затем $[α]\_{D}^{20}=\frac{α ∙100}{l ∙c}$рассчитывают удельный поворот по формуле.

8) ИК-спектроскопия: ИК-спектр рибофлавина должен совпадать со спектрами, приведенными в НС.

9) УФ-спектрофотометрия: водный раствор рибофлавина должен давать 4 максимума поглощения при 223, 267, 370 и 445 нм ду.

**Определение чистоты**

Он не должен содержать люмифлавин. Для этого 0,025 г препарата встряхивают в течение 5 мин с 10 мл чистого хлороформа и фильтруют. Цвет фильтрата не должен быть темнее цвета этанольного раствора бихромата калия. Для приготовления стандартного раствора 3 мл 0,0167 М раствора бихромата калия разбавляют водой до 1 л.

**Количественная оценка**

Это делается несколькими способами.

1) Метод УФ-спектрофотометрии. 0,06 г препарата растворяют в смеси 2 мл ледяной уксусной кислоты и 500 мл воды при нагревании на водяной бане в мерной колбе вместимостью 1000 мл. Раствор охлаждают и доводят до объема водой. Берут 10 мл этого раствора, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 3,5 мл 0,1 М раствора натрия уксуснокислого и доводят объем водой. Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 267 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. Процентное количество рибофлавина (х) рассчитывается по следующей формуле:

$$x=\frac{D ·10000}{a ·850}$$

Здесь,

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

а – навеска

850 - удельная абсорбция чистого рибофлавина при 267 нм.

Препарат должен содержать 98,0-102% рибофлавина в пересчете на сухое вещество.

2) Алкалиметрия.

К 10 мл 0,02%-ного раствора препарата добавить 5-10 капель 0,02 М раствора AgNO3, 3-4 капли бромтимолового спирта и титруют 0,01 М раствором NaOH до кирпично-красного окрашивания (Т = 0,0037637 г/мл).

Параллельно проводится контрольный опыт.

3) Проводится методом флуориметрии.

4) Определение по остатку рибитила.

Рибофлавин окисляют 0,02 М раствором перйодата калия при комнатной температуре в нейтральной среде (реакция Малапрада); в результате получается муравьиная кислота, которую также определяют методом алкалиметрии:



6,7-диметил-9-изоаллоксазин-

ацетальдегид

+

2

H

C

O

O

H

+

C

H

O

H

+

3

K

I

O

3

2HCOOH + 2NaOH →2HCOONa + 2H 2 O

Остаток рибитила рибофлавина можно определить по реакции этерификации с твердой серной кислотой. Избыток серной кислоты титруют гидроксидом калия.

Рибофлавин участвует в метаболизме сахаров, белков и жиров, в синтезе гемоглобина. С лечебной целью рибофлавин применяют при гипо- и арибофлавинозах, заболеваниях глаз (0,01% раствор). Внутрь назначают в виде порошка, таблеток (0,002, 0,005 и 0,01 г). Он входит в состав некоторых поливитаминных препаратов.

Препараты рибофлавина хранят в плотно укупоренной таре, предохраняющей от действия света.

**Рибофлавин-мононуклеотид - Рибофлавинмононуклеотид**

**(рибофлавинфосфат)**



Рибофлавин-5'-монофосфат натрия

Это желто-оранжевый кристаллический порошок без запаха и горького вкуса. Умеренно растворим в воде, практически не растворим в спирте. Разлагается под воздействием света. Водные растворы флюоресцируют под действием УФ-лучей.

**Определение подлинности**

1) Желто-зеленая флуоресценция наблюдается при осмотре 10 мл раствора препарата, приготовленного в соотношении 0,02:20, в УФ-лучах. Теряет флуоресценцию из-за щелочи и кислоты (рибофлавин).

2) Когда стеклянную палочку погружают в раствор препарата и подвергают воздействию бесцветного пламени, она желтеет (натрий).

3) Фосфат-ионная реакция: к 5 мл раствора на стадии 1 добавить 3 мл твердой HNO 3 , кипятить 5 мин, охладить, добавить 10 мл воды, 0,5 г аммиачной селитры и 2 мл раствора молибдата аммония. готовить и разогревать; раствор становится желтым, а затем выпадает желтый кристаллический осадок:

H3PO4 + 12(NH4)2 MoO4 + 21HNO3 → 21NH4NO3 + 12H2O +

+ (NH4 )3 PO4 · 12MoO3 ↓

4) УФ-спектрофотометрия: оптическую плотность раствора, приготовленного для определения количества препарата, определяют при длине волны 266, 373 и 445 нм, в кювете с толщиной слоя 1 см. Отношение оптических плотностей (D) должно находиться в следующих пределах:

$$\frac{D\left(373 nm\right)}{D\left(445 nm\right)}=0,83-0,86; \frac{D\left(266 nm\right)}{D\left(445 nm\right)}=2,3-2,75$$

**Определение чистоты**

Он не должен содержать люмифлавин (см. рибофлавин).

**Количественная оценка**

Его проводят методом спектрофотометрии с длиной волны 445 нм. (дан для 1% раствора препарата для инъекций). 1 мл (dh) препарата помещают в мерную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 0,5 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем водой. Берут 10 мл этого раствора и помещают его в мерную колбу вместимостью 25 мл. 9 мл 0,1 М раствора ацетата натрия а.е. и довести объем до измерения водой. Оптическую плотность полученного раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 445 нм при толщине слоя 1 см. Количество мононуклеотида рибофлавина в 1 мл препарата рассчитывают по следующей формуле:

$$x=\frac{D ∙250 ∙25 ∙1,2709}{1 ∙10 ∙323 ∙100}=D ∙ 0,02459;$$

Здесь,

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

$E\_{1sm}^{1\%}$323;

1,2709 – коэффициент перевода в рибофлавинмононуклеотид.

Количество мононуклеотида рибофлавина должно быть 0,0095-0,0105 г.

Рибофлавин-мононуклеотид – коферментный препарат, в организме образуется из рибофлавина. В сочетании с белком входит в состав ферментов, участвующих в окислительно-восстановительных процессах. Наряду с рибофлавином применяется при гипо- и авитаминозах, дерматозах, хронической экземе, нейродермитах, кератитах и др. Используется в случаях. Препарат вводят подкожно и в мышцу. 1% раствор выпускается для инъекций в количестве 1 мл. Он входит в состав « **Компливита** », который является поливитаминным препаратом.

Препарат хранят в сухом, защищенном от света месте.