МФБГОУ ВО
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

# СПЕЦИАЛЬНАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

СОЛОДУНОВА Г.Н.
НОВИКОВ М.С.

## ВИТАМИНЫ – ПРОИЗВОДНЫЕ ИЗОАЛЛОКСАЗИНА КОРРИНОВЫЕ ВИТАМИНЫ

IV курс VII семестр
Занятие 17

Волгоград, 2023

Солодунова Г.Н.

ДИСЦИПЛИНА

# СПЕЦИАЛЬНАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

VII семестр

## Занятие 17

## ВИТАМИНЫ – ПРОИЗВОДНЫЕ ИЗОАЛЛОКСАЗИНА КОРРИНОВЫЕ ВИТАМИНЫ

### ВОПРОСЫ К ЗАНЯТИЮ

1. Витамины, производные изоаллоксазина. Флавины. Основу химической структуры рибофлавина.
2. Рибофлавин. Промышленный синтез. Фармацевтический анализ.
3. Фосфорные эфира рибофлавина – рибофлавина мононуклеотид. Получение и полный фармацевтический анализ.
4. Корриновые витамины. Структурные элементы витамина $B_{12}$. строение молекулы цианкобаламина.
5. Получение цианокобаламина из культуральной жидкости актиномицета *Steptomyces griseus*. Подлинность и количественное определение.

## ВИТАМИНЫ – ПРОИЗВОДНЫЕ ИЗОАЛЛОКСАЗИНА

К витаминам комплекса «В» относятся так называемые флавиновые витамины. Впервые в 1932 г. из молока было выделено вещество типа желтого пигмента, названный *лактохромом.* Затем из дрожжей был выделен желтый дыхательный фермент *Варбурга*, состоящий из белка и желтого красителя. Аналогичные желтые пигменты (флавины) были получены из яичного белка (овофлавин), лимонов (цитрофлавин), печени (лиохром). Все указанные вещества оказались соединениями идентичными по химической структуре, содержащими в молекуле гетероциклическую систему – изоаллоксазин и сахар – рибозу. Современное название этого витамина – рибофлавин слагается из представлений об окраске данного вещества и наличии в его молекуле остатка сахара рибозы.

Строение рибофлавина было установлено в 1935 г. Каррером.

Рибофлавин – это групповое название, объединяющее все флавины с $B_2$-витаминной активностью и сходные по структуре.

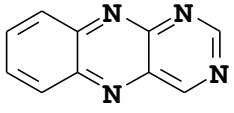
Рибофлавин содержится в дрожжах, молочной сыворотке, мясе, рыбе, печени, почках, яичном белке, зародышах и оболочках зерновых культур (ячмене, пшенице), горохе, овощах (шпинате, томатах). В организм

человека рибофлавин попадает главным образом с мясными и молочными продуктами.

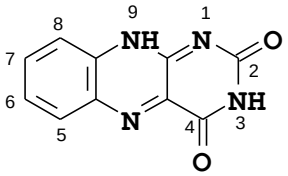
В свободном виде рибофлавин встречается лишь в молоке, моче и сетчатке глаза. Во всех других природных источниках он находится в виде моно- или динуклеотидов. В виде кофермента входит в состав ряда ферментных систем, регулирующие окислительные процессы в клетках.

Рибофлавин участвует в синтезе белков и жиров, оказывает влияние на ЦНС, процессы обмена в роговице и сетчатке глаза. При недостатке витамина $B_2$ в организме в первую очередь поражается слизистая оболочка рта и глаз.

Составляющая основу химической структуры рибофлавина гетероциклическая система изоаллоксазина подобно птеридину включает два гетероциклина – пиразин и пиримидин. Однако в отличие от птеридина эта система содержит бензольный цикл, т.е. представляет собой бензоптеридин. Пиримидиновое ядро изоаллоксазина имеет характер лактамного цикла, так как включает две кето-группы:




*Бензоптеридин*




*Изоаллоксазин*

Молекула рибофлавина имеет сходство со структурными фрагментами других витаминов комплекса В. Наличие птеридиновой гетероциклической системы объединяет с витаминами группы фолиевой кислоты.

Химическая структура рибофлавина высокоспецифична, даже незначительные ее изменения вызывают потерю витаминной активности или образование антагонистов.

Решающее значение для проявления витаминной активности флавинов имеет наличие чрезвычайно лабильной группировки с двумя сопряженными двойными связями в изоаллоксазиновом ядре. Эта группировка обусловливает окислительно-восстановительные свойства рибофлавина.

Благодоря наличию указанных химических свойств рибофлавин активно участвует в окислительно-восстановительных процесах, происходящих в организме. Эти свойства используют для анализа рибофлавина, их необходимо учитывать при получении и хранении препарата.

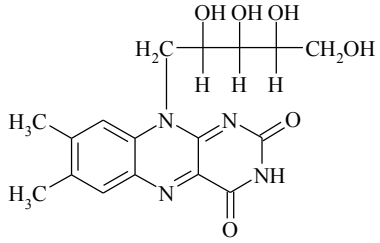
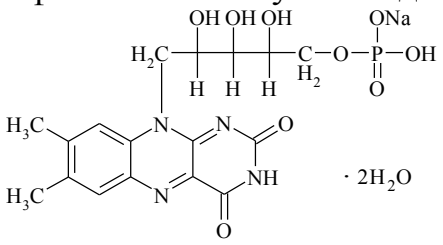
В медицинской практике применяют ***рибофлавин*** и ***рибофлавина мононуклеотид***. Оба препарата сходны по внешнему виду, но различаются по удельному вращению (см. таблицу).

Рибофлавин мало растворим в воде, а рибофлавина мононуклеотид растворим в воде. Оба препарата практически нерастворимы в этаноле и хлороформе. Рибофлавин растворим в растворах щелочей и кислот.

Солодунова Г.Н.

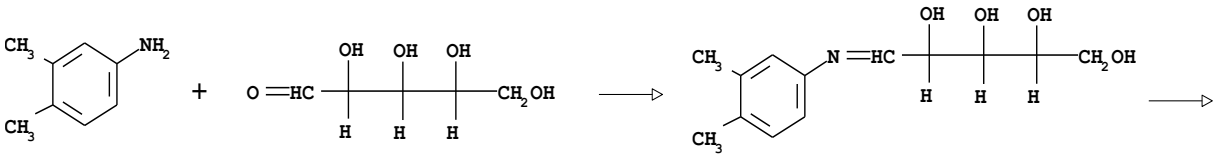
Таблица

Свойства препаратов,
производных изоаллоксазина

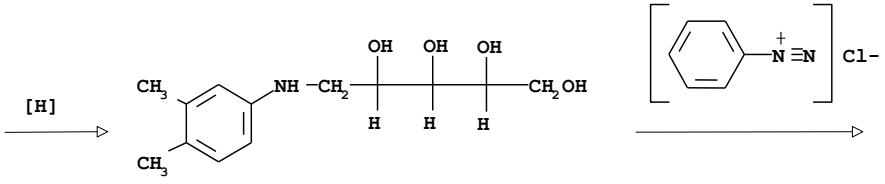
| Препарат | Описание |
|---|---|
| *Riboflavinum* – рибофлавин  *6,7-диметил-9-(D-1-рибитил) изоаллоксазин* | Желто-оранжевый порошок со слабым специфическим запахом, горького вкуса. На свету не устойчив. Удельное вращение от -110 до -130 $^{o}$ (0,5 %-ный раствор препарата в спиртовом растворе гидроксида калия) |
| *Riboflavinum-mononucleotidum* - рибофлавина мононуклеотид  *натриевая соль 6,7-диметил-9-(D-1-рибитил)-изоаллоксазин-5'-монофосфата дигидрат* | Желто-оранжевый порошок без запаха. На свету не устойчив. Гигроскопичен. Удельное вращение от +37 до +43 $^{o}$ (1,5 %-ный раствор препарата в 5 М растворе соляной кислоты). |

# Получение

Получать рибофлавин можно из животного или растительного сырья. Однако процесс этот тудоемок и дает очень низкий выход. Для того чтобы получить 1 г рибофлавина нужно переработать 5,4 т молочной сыворотки. Поэтому рибофлавин синтезируют в промышленном масштабе из о-ксилидина, D-рибозы и аллоксана (или барбитуровой кислоты) по общей схеме:

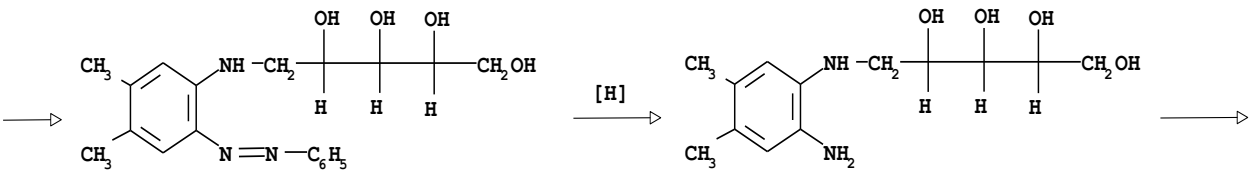


*о-Ксилидин* *D-Рибоза* *основание Шиффа*

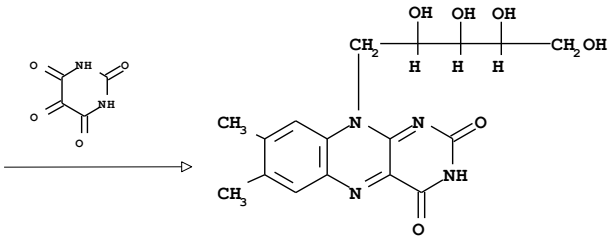


*3,4-Диметилфенилрибамин*

Солодунова Г.Н.



*2-Фенилазо-4,5-диметилрибамин*

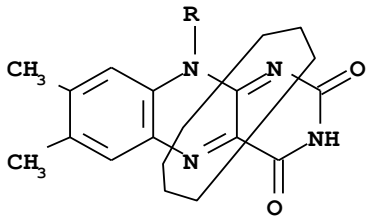


*Аллоксан* *Рибофлавин*

# Подлинность

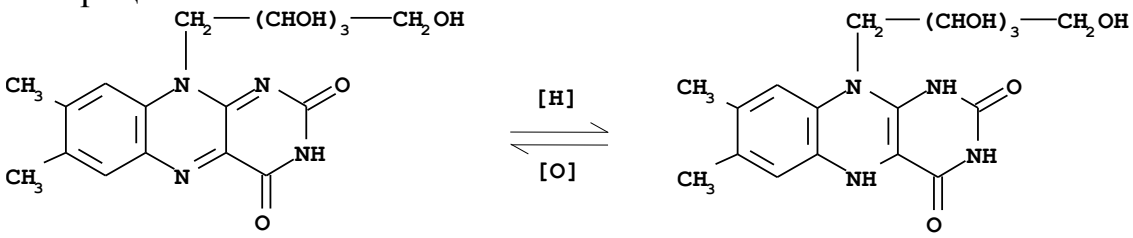
## 1. *Изменение окраски в различных средах*

- Подлинность рибофлавина устанавливают по характерной яркой зеленовато-желтой окраске и интенсивной зеленой флюоресценции водного раствора (в ультрафиолетовом свете), обусловленную наличием в молекуле хромофорной (азометиновой) группировкой:



Флюоресценция исчезает при добавлении растворов соляной кислты или щелочи.

- При восстановлении ***рибофлавин***, теряя желтую окраску, переходит в бесцветный лейкорибофлавин: если к водному раствору рибофлавина прибавить гидросульфит натрия (сильный восстановитель), то окраска и флюоресценция исчезают вследствие образования лейкорибофлавина: Последующее окисление обусловливает обратный процесс:



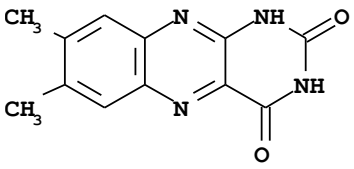
*Рибофлавин (желтый цвет)* *Лейкорибофлавин (бесцветный)*

- Желто-зеленую флуоресценцию устанавливают в ультрафиолетовом свете при длине волны 254 нм у водного 0,1 %-ного раствора ***рибо-***

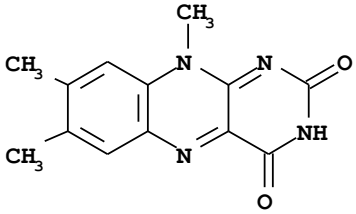
Солодунова Г.Н.

***флавина-мононуклеотида***. Она исчезает при добавлении 1 %-ного раствора гидроксида натрия или разведенной соляной кислоты.

- Характерная особенность рибофлавина – его высокая чувствительность к свету. Под влиянием света происходят изменения в химической структуре рибофлавина. Они зависят как от интенсивности облучения, так и от pH Среды. *Под действием 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*:



*Люмихром*
*(6,7-диметилаллоксазин)*
*желтый, не флуоресцирующий*

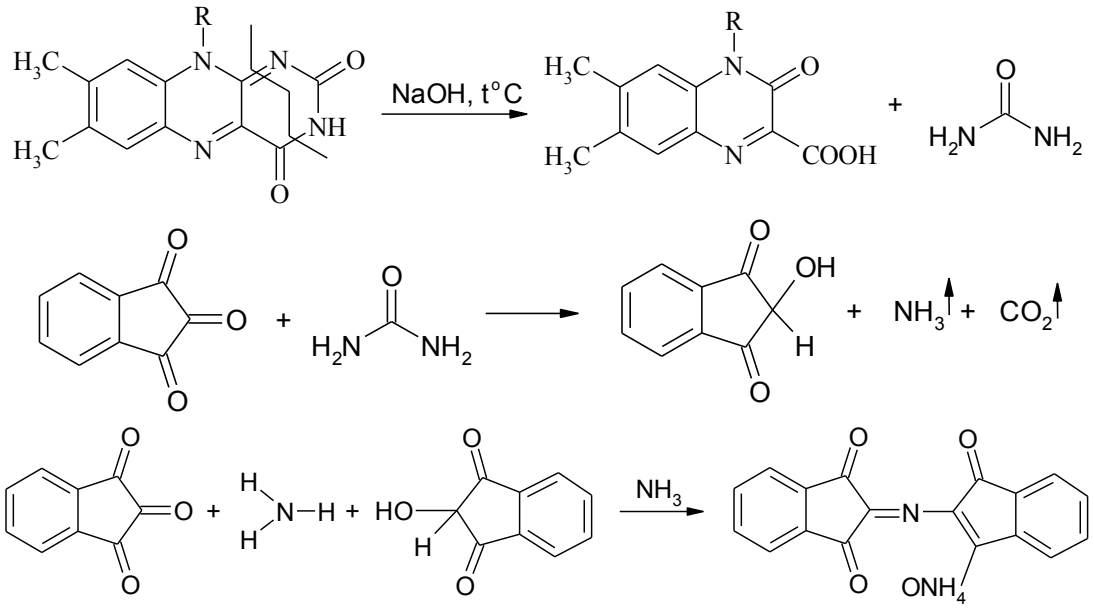


*Люмифлавин*
*(6,7,9триметилизоаллоксазин)*
*желтый, флуоресцирующий*

Люмифлавин в растворах имеет окрашивание и флуоресценцию, аналогичные рибофлавину, но отличается от него тем, что растворяется в хлороформе. Это свойство используют для обнаружения люмифлавина в рибофлавине и в рибофлавина мононуклеотиде.

## 2. *Реакция с нингидрином*

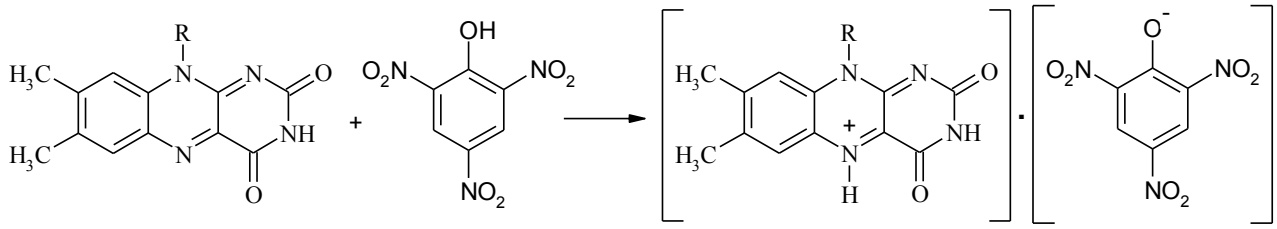
Раствор нингидрина при кипячении в щелочной среде в присутствии рибофлавина образует зеленую окраску:




Солодунова Г.Н.

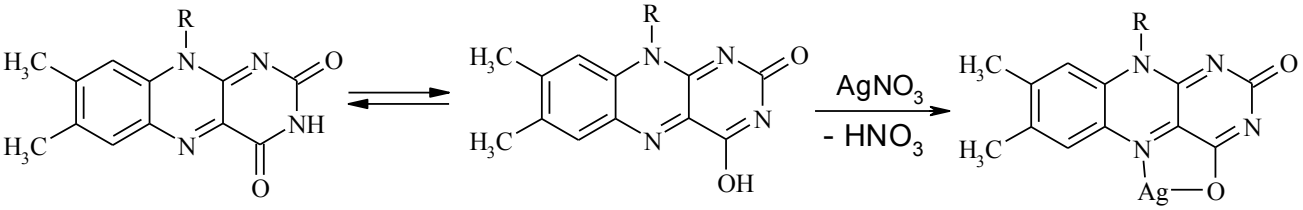
### *3. Взаимодействие с общеалкалоидными реактивами*

Рибофлавин, как азотистое основание, дает положительную реакцию с реактивом Драгендорфа, пикриновой кислотой и другими общеалкалоидными (осадительными) реактивами.



### *4. Образование солей тяжелых металлов*

С солями двухвалентных металлов (серебра, кобальта, меди, ртути, железа, никеля, цинка и др.) рибофлавин образует нерастворимые окрашенные комплексные соединения. Например, с раствором нитрата серебра образуется осадок оранжево-красного цвета, переходящий в красный, а с солями ртути (II) – оранжевого цвета.



*<u>Рибофлавина-мононуклеотид в отличие от рибофлавина дает положительную реакцию на ион натрия и на фосфаты, которые образуются после кипячения препарата в течение 5 мин в концентрированной азотной кислоте.</u>*

### *4. Обнаружение катионов натрия*

- Окрашивание пламени:

  Соль натрия, внесенная в бесцветное пламя, окрашивает его в желтый цвет.

- Реакция с цинкауранилацетатом :

  Соли натрия образуют желтый кристаллический осадок с цинка уранил ацетатом в разбавленной уксусной кислоте, который не растворим в уксусной кислоте

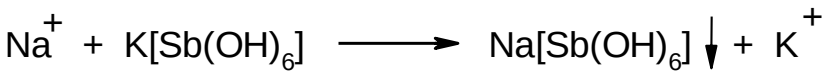
$$Na^+ + Zn[(UO_2)_3(CH_3COO)_8] + CH_3COOH + 6H_2O \longrightarrow$$

$$\longrightarrow NaZn[(UO_2)_3(CH_3COO)_9]\cdot 6H_2O\downarrow + H^+$$

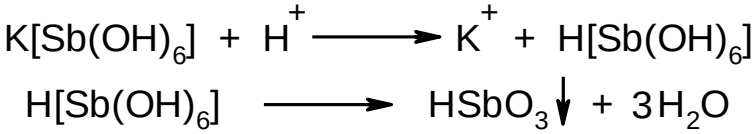
- Реакция с антимонатом калия.

Солодунова Г.Н.

Гексагидроксостибат-*ион* в строго нейтральной среде образует с ионами натрия белый кристаллический осадок гексагидроксостибата натрия:

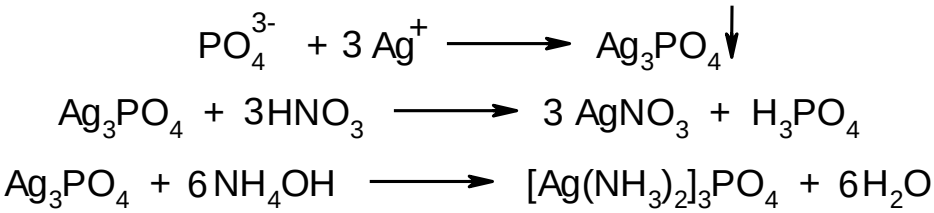


В щелочной среде осадок не образуется, в кислой - образуется осадок сурьмяной кислоты:

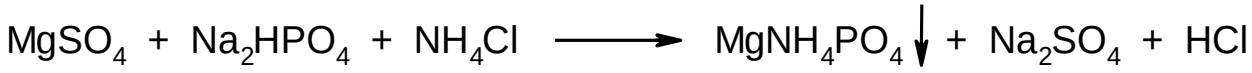


***5. Обнаружение фосфат-иона***

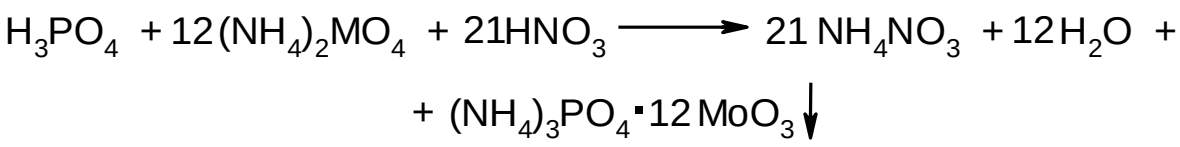
- Фосфат-ион осаждается из растворов нитратом серебра с образованием желтого осадка, растворимого в разведенной азотной кислоте и растворе аммиака:



- Ион $PO_4^{3-}$, в присутствии хлорида аммония, образует с солями магния белый кристаллический осадок магний-аммоний фосфата, растворимый в уксусной кислоте:



- Препарат дает положительную реакцию на фосфаты, которые образуются при гидролизе препарата в течении 5 мин в концентрированной азотной кислоте.



***6. Окрашивание серной кислотой***

В качестве реактива на рибофлавин также используют концентрированную серную кислоту, от смачивания которой образец препарата приобретает вишнево-красное окрашивание.

# Количественное определение

***1. Спектрофотометрия в УФ-области***

Солодунова Г.Н.

Для количественного определения применяют спектрофотометрию в УФ-области, используя в качестве растворителя воду с добавлением уксусной кислоты и ацетат натрия, при длине волны 267 нм. Тот же растворитель берут для количественного определения рибофлавина-мононуклеотида.

$$X = \frac{D \cdot 10\,000}{a \cdot 850},$$

где:

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

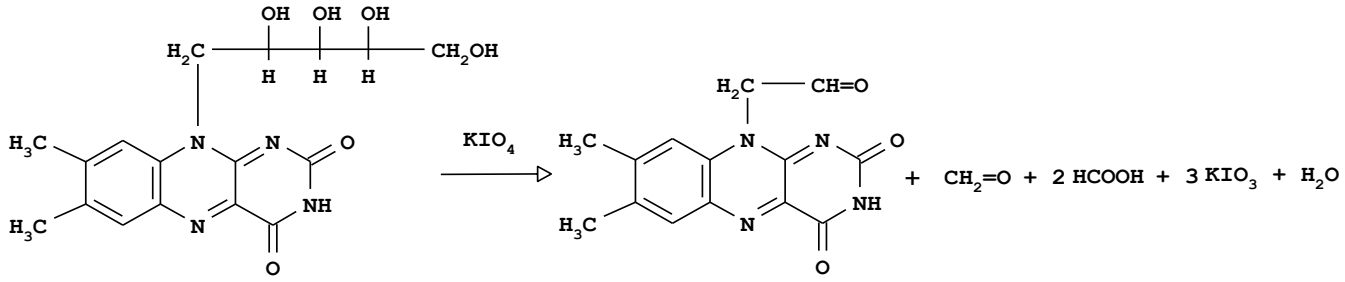
a – навеска в граммах;

850 – удельный показатель поглощения E % см чистого рибофлавина при длине волны 267 нм.

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

### 2. *Алкалиметрическое определение*
*(после окисления периодатом калия)*

Существуют методы количественного определения рибофлавина в препаратах и лекарственных формах, которые основаны на реакциях по рибитильному остатку. Одна из таких методик заключается в окислении рибофлавина 0,02 М раствором периодата калия в нейтральной среде при комнатной температуре с образованием муравьиной кислоты.




*Рибофлавин* *6,7-Диметил-9-изоаллоксазинацетальдегид*

$$HCOOH + NaOH \longrightarrow HCOONa + H_2O$$

Муравьиная кислота отитровывается 0,1 М NaOH в присутствии индикатора фенолфталеина, который в точке эквивалентности окрашивает раствор в малиновый цвет.

### 3. *Алкалиметрия после этерификации*

Другой способ определения рибофлавина по рибитильному остатку основан на этерификации концентрированной серной кислотой с последующим потенциометрическим титрованием избытка серной

Солодунова Г.Н.

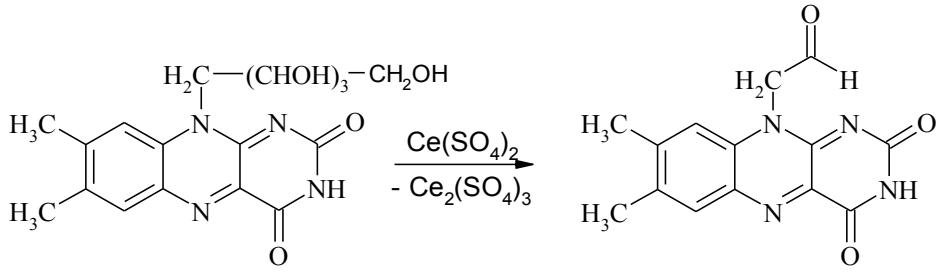
кислоты раствором гидроксида калия. Реакция протекает стехиометрически в соотношении 1 : 3.

### *4. Алкалиметрия по заместителю*

После образования серебрянной соли полученной реакцией взаимодействия рибофлавина с 0,1 М раствором нитрата серебра (см. реакцию образования солей), образовалась азотная кислота, которую титруют 0,1 М раствором гидроксида натрия (индикатор фенолфталеин).

### 5. Цериметрия

Обратное титрование: Рибофлавин окисляют избытком раствора сульфата церия (IV), а затем его избыток оттитровывают йодометрически:




$$2\,Ce(SO_4)_2 + 2\,KI \longrightarrow Ce_2(SO_4)_3 + I_2 + K_2SO_4$$

$$2\,I_2 + Na_2S_2O_3 \longrightarrow 2\,NaI + Na_2S_4O_6$$

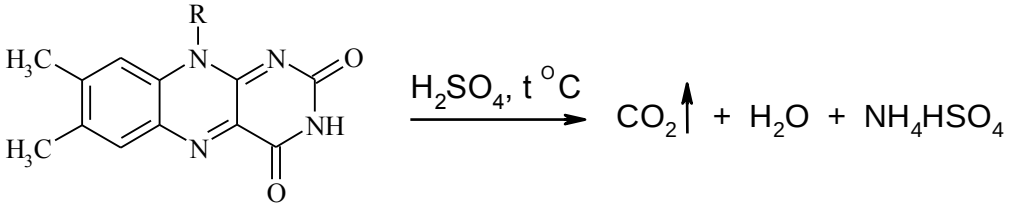
Титрование ведут в присутствии индикатора крахмала; в точке эквивалентности раствор из синего переходит в бесцветный.

### *6. Метод Кьельдаля*

*(определение органически связанного азота)*

Метод основан на предварительной минеррлизации рибофлавина до гидросульфата аммония. Определение выполняют с помощью колбы Къельдаля, парообразователя, холодильника и приёмника. Оно состоит из нескольких стадий.

- Минерализация – нагревание с концентрированной серной кислотой:

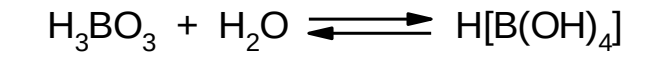


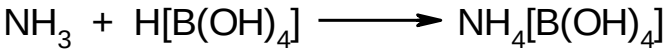

- Разложение гидросульфата аммония щёлочью до аммиака и отгонка его в приёмник:

$$NH_4HSO_4 + 2\,NaOH \longrightarrow NH_3\uparrow + 2\,H_2O + Na_2SO_4$$

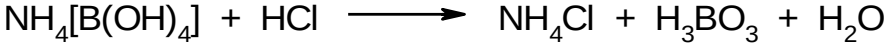
Солодунова Г.Н.

- Взаимодействие аммиака в приёмнике с борной кислотой с образование тетрагидроксобората аммония:





- Титрование тетрагидроксобората аммония 0,1 М раствором хлористоводородной кислот



Титруют в присутствии индикатора метилового-оранжевого или смеси индикаторов метилового-оранжевого и метилового-красного до перехода окраски из желтой к розово-красной. Содержание азота 14,5-15,2 %.

### *7. Фотоколориметрическое определение*

Известны также способы качественного фотоколориметрического количественного определения рибофлавина, основанные на использовании цветных реакций с ионами серебра (розовое окрашивание), двухвалентной ртути (оранжевое окращивание); (реакцию образования окрашенных солей см. выше).

### *8. Флюорометрическое определение*

Флуориметрия (или флуоресцентная спектрофотометрия) является методом анализа, основанным на измерении флуоресценции. Флуоресценция (один из видов люминесценции) – испускание света химическим веществом, находящимся в возбуждённом состоянии, при переходе в основное состояние. Первоначальный переход вещества из основного в возбуждённое состояние происходит при этом виде люминесценции за счёт поглощения им световой энергии при облучении ультрафиолетовым, видимым или иным электромагнитным излучением.

Способность образовывать флюоресцирующие растворы лежит в основе флюорометрического определения рибофлавина в лекарственных формах и биологических объектах.

## Хранение

Хранить рибофлавин необходимо в хорошо укупоренных банках оранжевого стекла, учитывая его свойство разлагаться под действием света с образованием биологически неактивных люмихрома и люмифлавина. Рибофлавина-мононуклеотид более устойчив, поэтому его хранят в сухом, защищенном от света месте.

# Применение

В медицине обусловлено участием рибофлавина в окислительно-восстановительных процессах, в процессах углеводного, белкового и жирового обмена, в поддержании нормальной зрительной функции глаза.

Суточная потребность взрослого человека в рибофлавине 2,5-3,5 мг.

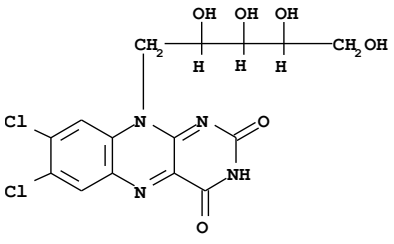
Назначают препарат при гипо- и авитаминозе, различных глазных заболеваниях, длительно не заживающих ранах и язвах, лучевой болезни, общих нарушениях питания, болезни Боткина и т.д. Вводят внутрь в порошках, таблетках, драже по 0,005-0,01 г, реже в виде глазных капель (0,01% раствор). Рибофлавина-мононуклеотид при тех же заболеваниях вводят внутримышечно по 1 мл 2 %-ного раствора, а в офтальмологии применяют 1 %-ные растворы.

# Зависимость «структура-активность».

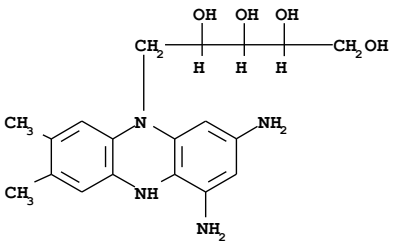
Для проявления $B_2$-витаминной активности молекула рибофлавина должна быть специфична. Даже незначительные изменения в структуре ее молекулы влекут за собой снижение или полное исчезновение его активности.

- Так, удаление метильных групп из положений 6 и 7 или их перемещение в положение 5 и 8 уничтожает биологическую активность.
- Для проявления $B_2$-витаминной активности существенное значение имеет также наличие свободной иминогруппы в положении 3 пиримидинового цикла. Метилирование этой имино-группы уничтожает витаминные свойства, что, по-видимому, связано со способностью фосфорного эфира рибофлавина образовывать фермент с протеином только по иминной группе. Наличие иминной группы в молекуле рибофлавина важно и потому, что физиологическая активность находится в прямой зависимости от флюоресценции, обусловленной этой группой.
- Важную роль играет также характер углеводной цепи в положении 9 молекулы. Замена рибитильного остатка на другую углеводную цепь уничтожает активность соединения. Для сохранения витаминной активности необходим сахар типа метилпентоз.

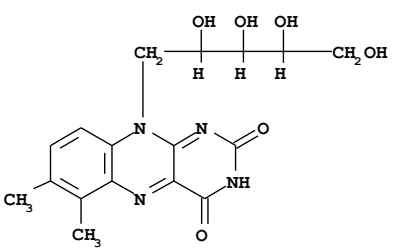
Основными антагонистами (антивитаминами) витамина $B_2$ являются:



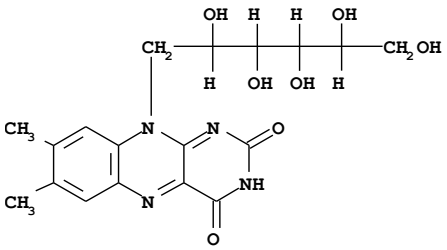
*6,7-Дихлор-9-(D-1-рибитил)-изоаллоксазин*



*2,4-Диамино-6,7-диметил-9-рибитилдигидрофеназин*



*Изорибофлавин*



*6,7- Диметил-9-(D-1-галактол)изоаллоксазин (галактофлавин)*

# КОРРИНОВЫЕ ВИТАМИНЫ

Дефицит витамина $B_{12}$ приводит к развитию злокачественной анемии, которая в середине XIX века звучала, как приговор и не подлежала лечению. Способы избавления от данного заболевания были обнаружены случайно, в ходе эксперимента на собаках. Американский врач, Джордж Уиппл (George Whipple) провоцировал развитие пернициозной анемии (злокачественного малокровия) у подопытных животных, вызывая кровотечение, а затем кормил собак разнообразными продуктами с целью выявления, какая еда ускоряет выздоровление. Во время эксперимента, ученый обнаружил, что поедание сырой печени в большом количестве быстро излечивает болезнь, вызванную потерей крови. На основании этих данных, Джордж Уиппл предположил, что ежедневный прием данного продукта ведет к устранению злокачественной анемии.

В 1928 году, впервые, химиком Эдвином Коном был выделен печеночный экстракт, который в 100 раз концентрированнее субпродукта животного происхождения. Полученная вытяжка стала первым действующим средством в борьбе с беспощадным заболеванием у человека. В 1929 г. благодаря исследованиям Касла было установлено, что для излечения от злокачественного малокровия необходимы два фактора. Один из них (внутренний) содержится в нормальном желудочном соке, а второй (внешний) был в 1948 г. выделен одновременно в США и в Англии и назван *цианокобаламином*, или витамином $B_{12}$.

Цианокобаламин в тканях животных не образуется. Он синтезируется в природе микроорганизмами, главным образом бактериями, актиномицетами, сине-зелеными водорослями. В организме человека и животных биосинтез цианокобаламина осуществляется микрофлорой кишечника. Затем он накапливается в печени, почках, стенке кишечника жвачных животных. Биосинтезом в кишечнике потребность человека в витамине $B_{12}$ полностью не обеспечивается, так как в растительной пище он отсутствует. Именно поэтому людям, отказывающимся от мяса (веганам и вегетарианцам), рекомендуется принимать витамин $B_{12}$ в виде добавок. Цианокобаламин содержится не только в печени, почках, но и в рыбной муке, яйцах, молоке.

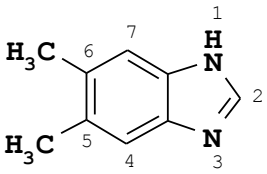
Солодунова Г.Н.

Без витамина $B_{12}$ не обходится образование нуклеиновых кислот, усвоение аминокислот, процессы кроветворения, биосинтез защитной оболочки нервных волокон. Благодаря ему происходит стимуляция свертывающей системы крови, уменьшается уровень холестерина.

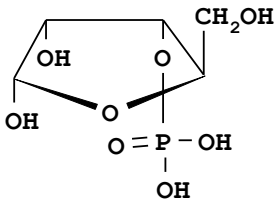
Происхождение названия *"цианокобаламин"* обязано наличию в его молекуле кобальта, циано-группы и большого числа атомов азота. Это пока единственный известный витамин, являющийся комплексным соединением, содержащий в молекуле атом металла.

Цианокобаламин представляет собой сложное соединение, эмпирическая формула которого следующая: $C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$. Структура цианокобаламина была установлена в 1953 - 1955 гг., а затем подтверждена синтезом, осуществленным в 1972 г. Р. Вудвордом в США и Н. Эшенмозером в Швейцарии. По химическому строению он может быть отнесен к производным внутреннего кобальтового комплекса нуклеотида бензимидазола и макроциклической корриновой системы.

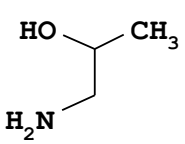
Таким образом, молекула цианокобаламина состоит из двух связанных между собой частей: нуклеотида бензимидазола и корриновой системы. Нуклеотид включает следующие связанные между собой структурные элементы: 5,6-диметилбензимидазол, α-D-рибофуранозу (фосфорный эфир α-D-рибозы) и D-1-аминопропанол-2:




5,6-Диметилбензимидазол




α-D-Рибофуранозы фосфат




D-1-Аминопропанол-2

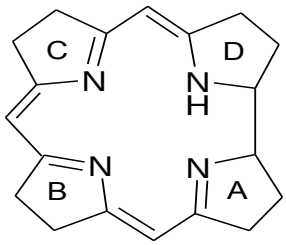
Нуклеотид с корриновой системой соединен пептидной связью. Атом азота 5,6-диметилбензимидазола в положении 3 связан координационной связью с атомом кобальта. Атом кобальта образует хелатное (внутрикомплексное) соединение с циано-группой и с атомами азота пиррольных циклов корриновой системы. Таким образом, создается замкнутая циклическая система, в центре которой находится координационный атом кобальта.

Положительный заряд иона кобальта нейтрализует отрицательно заряженным анионом фосфорной кислоты (содержащейся в D-рибофуранозе). Поэтому цианокобаламин представляет собой не только хелатное соединение, но и внутреннюю соль.

Макроциклическая планарная корриновая система включает четыре частично или полностью гидрированных пиррольных цикла. Они соединены между собой по α,α- положениям циклов A - B, B - C и C - D тремя мезо-углеродными атомами и одной непосредственной α,α-связью между

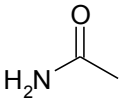
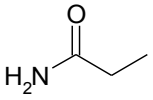
Солодунова Г.Н.

циклами A и D. Корриновая система имеет шесть сопряженных двойных связей и девять асимметрических атомов углерода:




*Коррин*

Корриновая система цианокобаламина имеет заместителями шесть амидных групп:

три ацетамидные  и три пропионамидные  , а также восемь метильных групп.

Кроме цианокобаламина, содержащего *циано*-группу (CN), известны кобаламины, которые включают в молекулу *другие анионы*. Из природных источников или синтетическим путем получены *оксикобаламин, нитритокобаламин, сульфатокобаламин, хлорокобаламин, бромокобаламин* и др. Они проявляют $B_{12}$-витаминную активность и сходны с цианокобаламином по физическим свойствам и антианемической активности.

# Получение

Получение цианокобаламина из печени животных неэкономично вследствие ничтожного выхода (из 1 т около 0,02 г). В настоящее время в промышленности получают цианокобаламин как побочный продукт в производстве спрептомицина из культуральной жидкости актиномицета *Steptomyces griseus*. Выход того и другого вещества можно направленно регулировать, меняя условия проведения ферментативного процесса (температура, pH среды, компоненты и т.д.). Повышает выход цианокобаламина внесение в культуральную жидкость солей кобальта.

Извлекают цианокобаламин из культуральной жидкости тремя способами:

- экстракцией органическими растворителями,
- осаждением в виде труднорастворимых соединений,
- сорбцией на *ионо*-обменных смолах с использованием карбоксильного катионита (чаще всего).

Из природных источников выделены вещества, родственные по химическому строению кобаламинам, но не обладающие $B_{12}$ - витаминной активностью. Они продуцируются микроорганизмами подобно кобаламинам и называются псевдовитаминами $B_{12}$, или *псевдокобаламинами*. По химическому строению псевдокобаламины отличаются тем, что содержат в молекуле не 5,6-диметилбензимидазолнуклеозид, а *другие основания*. Кобаламины и псевдокобаламины различаются также по физическим свойствам, в частности растворимостью в некоторых органических растворителях.

В ГФ включен препарат **цианокобаламин** (см. таблицу). Он отличается по внешнему виду от всех других препаратов витаминов комплекса В характерной темно-красной окраской, обусловленной присутствием в моле-

куле атома кобальта. Препарат умеренно растворим в воде и этаноле, практически не растворим в эфире и хлороформе.

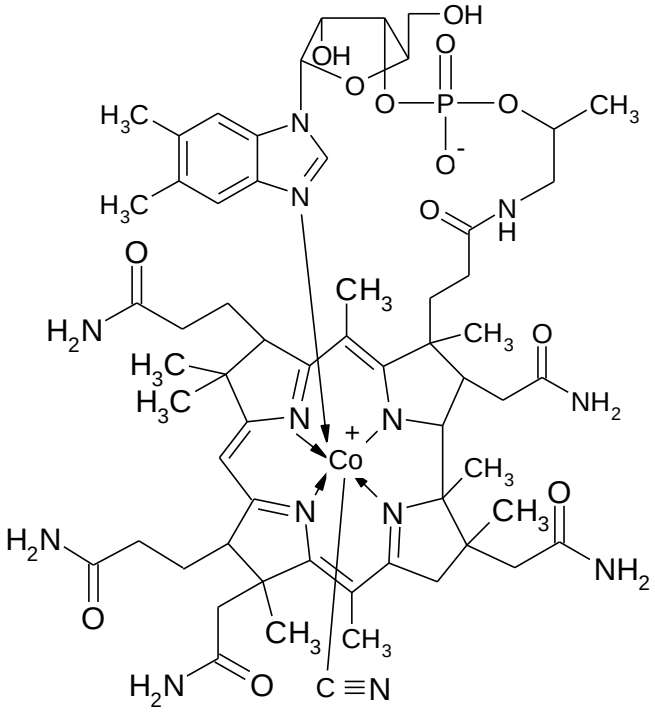


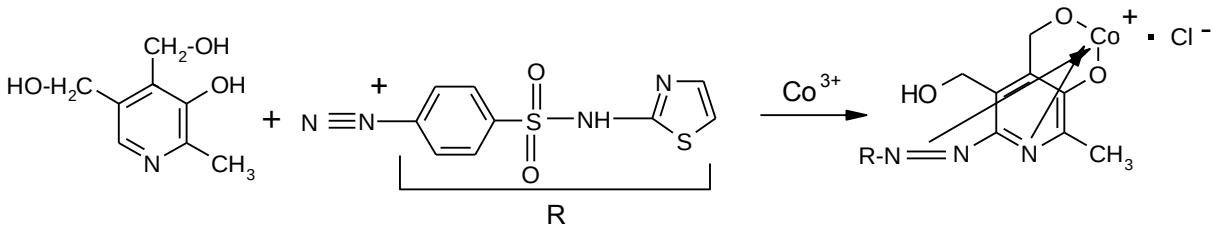
**Таблица**. Свойства цианокобаламина

| Препарат | Описание |
|---|---|
| Cyanocobalaminum - цианокобаламин | Кристаллы или кристаллический порошок темно-красного цвета, без запаха. Гигроскопичен. |

## Подлинность

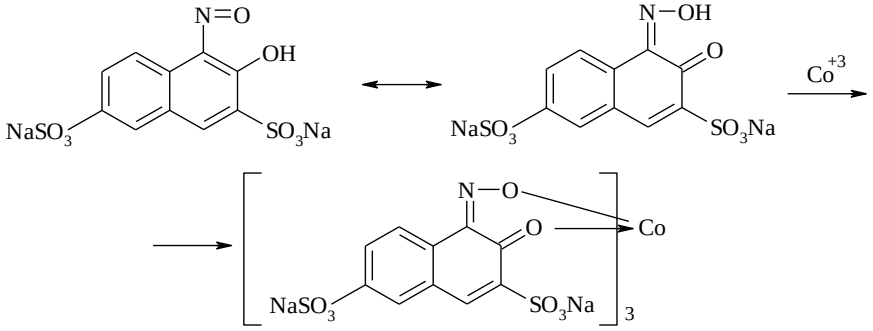
1. ***Обнаружение атома кобальта***

- Цианокобаламин, как и другие кобальтсодержащие препараты, можно идентифицировать по ***атому кобальта***. Поскольку кобальт довольно прочно удерживается в составе координационного комплекса и не диссоциирует в растворах, то необходимо предварительно препарат подвергнуть минерализации. Минерализацию можно осуществить в присутствии азотной кислоты. Полученный при этом нитрат кобальта образует окрашенный продукт ***с азокрасителем пиридоксина*** в водно-ацетоновой среде при pH 7 с максимум поглощения при 515-520 нм.



Солодунова Г.Н.

- Обнаружить кобальт можно после предварительного разрушения препарата путем сплавления с гидросульфатом калия. Затем, после нейтрализации полученной смеси открывают в нейтральной среде *ион* кобальта с помощью раствора нитрозо-R-соли по образованию характерного красного окрашивания, сохраняющегося в кислой среде и при кипячении. Это реакция основана на получении внутрикомплексного соединения ***кобальта с нитрозо-R-солью***, представляющий собой динатриевую соль 1-нитрозо-2-нафтол-3,6-дисульфокислоты:




Окраска сохраняется после добавления хлороводородной кислоты и кипячения в течении 1 мин.

- ***Ион кобальта 2***$^{+}$ можно обнаружить после выпаривания и прокаливания 0,25 мг цианкобаламина с 10 мг сульфита калия и 2 каплями 15% серной кислоты. К остатку прибавляют насыщенный раствор ***роданида аммония в*** ацетоне; появляется *сине-зеленое* окрашивание:

$$Co^{2+} + 2NH_4NCS \longrightarrow Co(NCS)_2 + 2NH_4^{+}$$

***2. Обнаружение фосфат-иона:***

- Фосфат-*ион* осаждается из растворов нитратом серебра с образованием желтого осадка, растворимого в разведенной азотной кислоте и растворе аммиака

$$PO_4^{3-} + 3\,Ag^{+} \longrightarrow Ag_3PO_4\downarrow$$

$$Ag_3PO_4 + 3HNO_3 \longrightarrow 3\,AgNO_3 + H_3PO_4$$

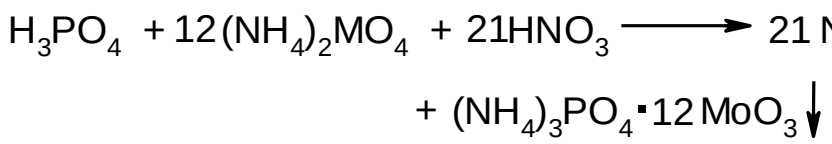
$$Ag_3PO_4 + 6\,NH_4OH \longrightarrow [Ag(NH_3)_2]_3PO_4 + 6\,H_2O$$

- Ион $PO_4^{3-}$, в присутствии хлорида аммония, образует с солями магния белый кристаллический осадок магний-аммоний фосфата, растворимый в уксусной кислоте:

$$MgSO_4 + Na_2HPO_4 + NH_4Cl \longrightarrow MgNH_4PO_4\downarrow + Na_2SO_4 + HCl$$

Солодунова Г.Н.

- Препарат дает положительную ***реакцию на фосфаты***, которые образуются при гидролизе препарата в течении 5 мин в концентрированной азотной кислоте.



$$H_3PO_4 + 12(NH_4)_2MO_4 + 21HNO_3 \longrightarrow 21\,NH_4NO_3 + 12\,H_2O + (NH_4)_3PO_4 \cdot 12\,MoO_3\downarrow$$

# Доброкачественность

Для испытания подлинности и доброкачественности, а также количественного определения цианокобаламина используют *УФ-спектрофотометрию*. При испытании подлинности устанавливают наличие максимумов поглощения 0,002 %-ного водного раствора препарата при 278, 361 и 548 нм. Для установления доброкачественности устанавливают наличие примесей методом ТСХ (не более 4%). Выполняют на пластинках «Силуфол УФ-254» в системе**:** хлороформ : 10% метанол : аммиака раствор (15:10:3). При испытании доброкачественности устанавливают содержание в препарате ***примеси псевдоцианокобаламина***, который извлекают из препарата смесью крезола и четытеххлористого углерода.

# Количественное определение

- ***Спектрофотометрическое определение***

Готовят раствор препарата в воде с концентрацией 20 – 25 мкг/мл. Измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 361 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца цианокобаламина. В качестве раствора сравнения используют воду.

При анализе субстанций содержание цианокобаламина *(X)* в субстанции в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot C_0 \cdot N \cdot 100}{A_0 \cdot a},$$

где:

$A$ – оптическая плотность испытуемого раствора;

$A_0$ – оптическая плотность раствора стандартного образца цианокобаламина;

$C_o$ – концентрация раствора стандартного образца цианокобаламина (в пересчете на 100 % вещество), г/мл;

$a$ – навеска цианокобаламина (в пересчете на 100 % вещество),

Солодунова Г.Н.

$N$ – разведение испытуемой субстанции

- ***Фотоколориметрическое определение***

  Это реакция основана на получении внутрикомплексного соединения кобальта с нитрозо-R-солью, представляющий собой динатриевую соль 1-нитрозо-2-нафтол-3,6-дисульфокислоты (реакцию см выше).

- ***Хроматографический метод***

  Подвижная фаза “метанол-вода”
  Инжектируемый объем не менее 50 мкл.
  Последовательно хроматографируют стандартный (цианокобаламина в воде с концентрацией около 0,5 мкг/мл) и испытуемый растворы, проводя детектирование при 361 нм.
  Время удерживания витамина $B_{12}$ около 5 мин.

- ***<u>Микробиологический метод</u>***

Определение количественного содержания цианкобаламина проводят чашечным методом. Для определения содержания цианокобаламина ($C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$) использую штамм *Escherichia coli* .

В чашки Петри (6 чашек для построения стандартной кривой и 3 чашки для раствора испытуемого препарата) разливают по 10–12 мл расплавленной и охлажденной до температуры 48 – 50 °С основной среды, засеянной суспензией *Escherichia coli*. После застывания среды в каждой чашке стерильным бором по трафарету делают лунки в агаре: 6 лунок диаметром 8 мм.

В 3 лунки (через одну) каждой из 6 чашек, используемых для построения стандартной кривой, и 3 чашек — для раствора испытуемого препарата, вносят по 0,1 мл раствора контрольной концентрации. В 3 лунки (через одну) каждой из 3 чашек препарата вносят по 0,1 мл одной из концентраций остальных растворов, а также раствора испытуемого препарата. Чашки инкубируют при температуре 37 °С в течение 16-18 ч. По окончании инкубации измеряют и сравнивают диаметры зон стимуляции роста тест-микроорганизма для каждой концентрации растворов.

# <u>Хранение</u>

Хранят препарат, учитывая гигроскопичность, в хорошо укупоренной таре, соблюдая асептические условия, ибо микрофлора поглощает витамин $B_{12}$. Необходимо также предохранять его от действия света. Водные растворы цианокобаламина устойчивы при pH 4,0 - 6,0. В более кислой (pH 2,0)

или щелочной (pH 9,0 - 12,0) среде происходит разрушение препарата, особенно при повышенной температуре. Независимо то pH среды цианокобаламин неустойчив в растворах в присутствии окислителей, восстановителей, в том числе солей тяжелых металлов.

# Применение

Применение цианокобаламина в медицинской практике связано с его активным влиянием на функцию кроветворения, созревание эритроцитов, свертывающую систему крови. Он оказывает положительное действие на функцию печени и нервной системы, обмен липидов и углеводов. В случае недостатка цианокобаламина образовывается болезнь анемия, которую также называют малокровием. Злокачественную анемию сопровождает ряд симптомов – боль в ногах, проблемы при ходьбе, желудочные болезни, которые обуславливаются недостатком сока желудка, жжение языка, слабость, усталость.

Суточная потребность взрослого человека 10 - 20 мкг витамина $B_{12}$.

Цианокобаламин обычно назначают по следующим причинам: после полного или частичного хирургического удаления желудка или кишечника. Кроме того, назначают цианокобаламин для лечения злокачественного малокровия, различных видов анемии, при лучевой болезни, заболевание печени, нервной системы, кожных и других заболеваниях.

Вводят цианокобаламин обычно внутримышечно, подкожно, внутривенно по 10 - 200 мкг, реже до 500 мкг. При приеме внутрь он плохо всасывается.

При пероральном применении цианокобаламина может возникать ряд аллергических реакций, таких как крапивница, затрудненное дыхание, отек лица, губ, языка или горла. Менее серьезные побочные эффекты могут включать в себя головную боль, тошноту, расстройство желудка, диарею, боли в суставах, зуд или сыпь.

Выпускают в виде ампулированных растворов, содержащих по 30, 100, 200 или 500 мкг цианокобаламина в 1 мл изотонического раствора хлорида натрия.

В МФ включен препарат ***гидроксокобаламин*** *(Hydroxocobalaminum),* который в нашей стране выпускается под названием ***оксикобаламин*** *(Oxycoba-laminum).* От цианокобаламина гидроксокобаламин отличается тем, что вместо циано-группы в его молекуле к иону кобальта присоединен гидроксил. По физическим свойствам, растворимости и способам испытаний препараты очень сходны между собой.

В случаях отравления цианидом пациенту дают гидроксикобаламин, предшественник цианокобаламина. Гидроксикобаламин связывается с циан*ид-ионом* и формирует цианокобаламин, который затем может выделяться через почки.

Растворенный в ацетатном буфере (pH 4,5) гидроксокобаламин имеет три максимума поглощения при 274, 351 и 525 нм.

Для отличия от цианокобаламина используют специфичную на гидроксокобаламин реакцию с раствором карбоната лития в пикриновой кислоте.

Количественное определение выполняют спектрофотометрическим методом в ацетатном буфере при длине волны 351 нм.

Солодунова Г.Н.