



Визначення рибофлавіну в драже «Ревіт» за допомогою високоефективної рідинної хроматографії

Б. О. Варинський^{ID}*^{A,B,C,D}, М. Ю. Зеленюк^{B,C,D}, А. Г. Каплаушенко^{ID}^{A,E,F}

Запорізький державний медичний університет, Україна

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті; F – остаточне затвердження статті

Мета роботи – розроблення експресної, вибіркової, відтворюваної методики визначення рибофлавіну за допомогою високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) у полівітамінному препараті – драже «Ревіт».

Матеріали та методи. Застосували дегазатор, бінарний насос, автосамплер, термостат колонки, діодно-матричний детектор (Agilent Technologies, Germany); колонку хроматографічну Zorbax SB-C18, 30 мм × 4,6 мм, 1,8 мкм. Підготовку зразків здійснили за допомогою ваг аналітичних електронних Kern ABT 100-5M, ультразвукової бані Ultrasonic XUBA 3, ультрафільтрів нейлонових 0,12 мкм.

Результати. Як буферний розчин в елюенті обрали 0,1 % мурашину кислоти. Встановили максимальне значення logD інтервалу для рибофлавіну при pH 2–4. Тому максимальне утримання рибофлавіну спостерігали при використанні елюенту, pH якого відповідає цьому інтервалу. Значення pH для 0,1 % розчину мурашиної кислоти дорівнює 2,7, тому такий буфер обрали в складі елюенту. Як органічний модифікатор взяли ацетонітрил. Оптимальне утримання сполуки спостерігали при 10 % ацетонітрилу.

Висновки. Вивчили хроматографічну поведінку рибофлавіну на підставі хіміко-аналітичних властивостей. Встановили оптимальні умови хроматографічного визначення та розробили специфічну, експресну методику визначення рибофлавіну в драже «Ревіт». Опрацювали методику на реальному зразку драже «Ревіт». Методику рекомендовано для використання в роботі контрольно-аналітичних і дослідних лабораторій.

Ключові слова: рибофлавін, драже, аналіз вітамінів, рідинна хроматографія, ВЕРХ.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2022. Т. 15, № 2(39). С. 140–144

Determination of riboflavin in dragee “Revit” by HPLC

B. O. Varynskyi, M. Yu. Zeleniuk, A. H. Kaplaushenko

The aim of the work is development of express, selective, reproducible methods for the determination of riboflavin by HPLC in a multivitamin preparation, dragee “Revit”.

Materials and methods. Degasser, binary pump, autosampler, thermostated column compartment, diode array detector. Chromatographic column Zorbax SB-C18, 30 mm × 4.6 mm, 1.8 μm. Samples were prepared using analytical electronic scales Kern ABT 100-5M, ultrasonic bath Ultrasonic XUBA 3, nylon ultrafilters 0.12 μm.

Results. 0.1 % formic acid was selected as a buffer solution in the eluent. The maximum values of logD were observed at intervals for riboflavin at pH from 2 to 4. Therefore, the maximum retention of the riboflavin was observed when using the eluent, pH which corresponds to this interval. The pH value for 0.1 % formic acid solution was 2.7. Therefore, such a buffer was chosen by us as part of the eluent. Acetonitrile was selected as the organic modifier. The optimal content of the compound was observed at 10 % acetonitrile.

Conclusions. The chromatographic behavior of riboflavin on the basis of chemical-analytical properties was studied. The optimal conditions for chromatographic determination were determined and a specific, express method for the determination of riboflavin in “Revit” dragee was developed. The technique on a real sample of “Revit” dragee was elaborated. The method was recommended for use in control and analytical and research laboratories.

Key words: riboflavin, dragee, vitamins, analysis, liquid chromatography, HPLC.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (2), 140–144

ARTICLE INFO



<http://pharmed.zsmu.edu.ua/article/view/258888>

UDC 543.544.5.068.7:615.356:577.164.12:615.453.1

DOI: [10.14739/2409-2932.2022.2.258888](https://doi.org/10.14739/2409-2932.2022.2.258888)

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2022; 15 (2), 140–144

Key words: riboflavin, dragee, vitamins, analysis, liquid chromatography, HPLC.

*E-mail: varinsky@zsmu.zp.ua

Received: 23.05.2022 // Revised: 03.06.2022 // Accepted: 10.06.2022

Рибофлавін (вітамін В₂) входить до складу комплексу вітамінів В і полівітамінних препаратів. Грунтуючись на даних щодо поглинання світла, флуоресценції та електровідновлення, розробили спектрометричні, флуориметричні, електрохімічні, хроматографічні й електрофоретичні методи аналізу рибофлавіну в фармацевтичних препаратах і клінічних зразках. Крім того, для аналізу вітаміну використовують ферментативні та мікробіологічні методи. Перевагою хроматографічних методів є розділення, одночасне визначення рибофлавіну й інших компонентів вітамінних препаратів.

Спектрофотометричний метод запропонували для аналізу рибофлавіну та інших водорозчинних вітамінів у фармацевтичних препаратах із використанням багатокомутованої проточної системи [1]. Повідомляли про спектрофотометричний аналіз рибофлавіну та його фотопродуктів (формілметилфлавін, люміхром і люміфлавін) [2]. Симплексний метод гнучкої толерантності (FTSM) застосували для спектрометричного визначення рибофлавіну, тіаміну, ніацину та піридоксину [3]. Розробили метод аналізу водорозчинних вітамінів у полівітамінних, полімінеральних дієтичних добавках, що використовують багатореакційний режим LC/UV/MS-MRM [4]. Державна фармакопея України регламентує спектрофотометричне кількісне визначення рибофлавіну. Визначення здійснюють при ослабленому освітленні. Оптичну густину одержаного розчину вимірюють за довжини хвилі 444 нм [5,6]. Фармакопея США регламентує флуориметричний кількісний аналіз рибофлавіну; довжина хвилі збудження – 444 нм [7].

Розроблено методики хроматографічного визначення рибофлавіну в біологічних зразках, як-от у плазмі крові. Білки видаляють із плазми шляхом кислотного осадження. Аліквоту супернатанту, що отримали, аналізують за допомогою оберненофазової високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Домішки відокремлюють від рибофлавіну ізократично, детектують флуориметрично (збудження – 450 нм; випромінювання – 520 нм). Метод ВЕРХ дає змогу розділити та виміряти рибофлавін у плазмі за 7 хвилин. Результати аналізу можуть бути використані для клінічної діагностики дефіциту та для моніторингу терапевтичних режимів приймання вітамінних добавок [8].

Мета роботи

Розроблення експресної, вибіркової, відтворюваної методики визначення рибофлавіну за допомогою ВЕРХ у полівітамінному препараті – драже «Ревіт».

Матеріали і методи дослідження

ВЕРХ обладнання: дегазатор G4225A 1260 Hip Degasser (Agilent Technologies, Japan); бінарний насос G1312B 1260 Bin Pump (Agilent Technologies, Germany). Автосамплер G1329B 1260 ALS (Agilent Technologies, Germany); термостат колонки G1316C 1290 TCC (Agilent Technologies, Germany); діодно-матричний детектор G4212B 1260 DAD

(Agilent Technologies, Germany); колонка хроматографічна Zorbax SB-C18, 30 мм × 4,6 мм, 1,8 мкм.

Підготовку зразків здійснили за допомогою ваг аналітичних електронних Kern ABT 100-5M, ультразвукової бані Ultrasonic XUBA 3, ультрафільтрів нейлонових 0,12 мкм виробництва Agilent Technologies.

Розчинники: ацетонітрил для ВЕРХ «HPLC Super Gradient» (Avantor Performance Materials Poland S. A., Poland), мурашина кислота «чиста для аналізу» «For analysis» (98 %) (AppliChem GmbH, Germany); вода високого ступеня очищення (18 МΩ при 25 °С), підготована на пристрої Direct Q 3UV Millipore (Molsheim, France).

Характеристика об'єкта дослідження – Ревіт® драже № 80.

Склад (діючі речовини): retinol (vit A), thiamine (vit B1), riboflavin (vit B2), ascorbic acid (vit C). Одне драже містить ретинолу ацетату (вітаміну А) – 0,86 мг (2500 МЕ), тіаміну гідрохлориду (вітаміну В1) – 1 мг, рибофлавіну (вітаміну В2) – 1 мг, аскорбінової кислоти (вітаміну С) – 35 мг. Допоміжні речовини: борошно пшеничне, патока крохмальна, цукор, олія м'яти перцевої, віск жовтий, олія соняшникова, тальк. Форма випуску – драже. Температура зберігання – не вище ніж +25 °С. Фармацевтична форма – драже.

Результати

Для визначення умов хроматографічного визначення рибофлавіну в драже «Ревіт» передусім потрібно було обрати розчинник для субстанції, що досліджували. У воді сполука погано розчинна [5], в розчинах лугів добре розчинна, але руйнується, в кислому середовищі краще розчинна, ніж у воді, стійка [9]. Як розчинник і буферний розчин в елюенті обрали 0,1 % розчин мурашиної кислоти. Це дає змогу уникнути системних піків і покращити форму піка рибофлавіну.

У роботі [10] під час визначення елюенту відповідно до рН запропоновано використовувати logD. На рис. 1 наведено розрахований logD за допомогою онлайн сервісу LogD Predictor [11]. Визначили максимальне значення logD в інтервалі рН від 2 до 4. Тому максимальне утримання рибофлавіну спостерігатиметься при використанні елюенту, рН якого відповідає цьому інтервалу. Значення рН для 0,1 % розчину мурашиної кислоти дорівнює 2,7 [10], тому такий буфер обрали в складі елюенту. Як органічний модифікатор обрали ацетонітрил. Оптимальне утримання сполуки спостерігали при 10 % ацетонітрилу.

Для визначення довжини хвилі встановили спектр у потоці елюенту (рис. 2).

Максимуми світлопоглинання становили 222 нм, 268 нм, 368 нм, 444 нм. Як оптимальний визначили 444 нм, оскільки він більший за довжиною хвилі, а тому більш специфічний, і ширший, а отже забезпечує більшу робастність.

На підставі оптимальних умов запропонували методику визначення рибофлавіну в драже «Ревіт».

Метод ВЕРХ із діодно-матричною детекцією є основою цієї методики.

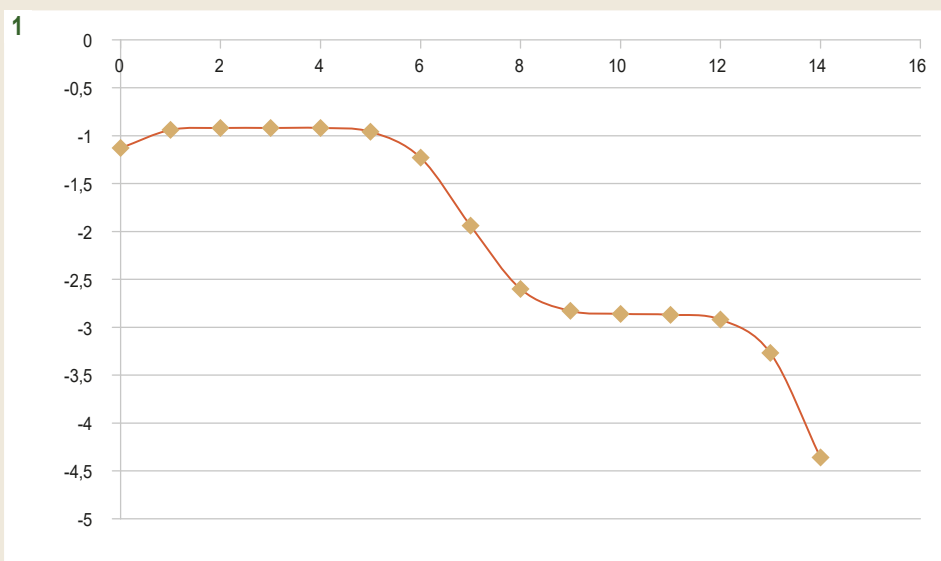
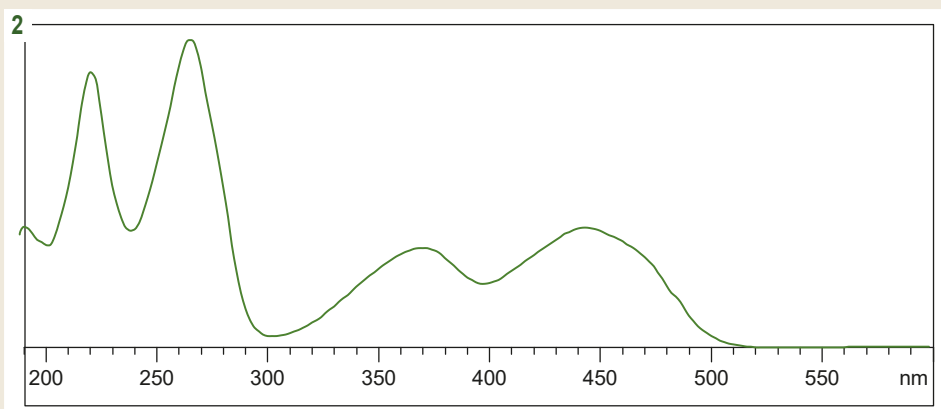


Рис. 1. Залежність $\log D$ від рН для рибофлавіну.

Рис. 2. УФ-спектр рибофлавіну в потоці елюенту (10 % ацетонітрилі (0,1 % HCOOH)).



Реактиви: ацетонітрил, кислота мурашина, високоочищена вода.

Робочий стандартний зразок: рибофлавін.

Умови хроматографування:

- колонка – $\varnothing 4,6 \times 30$ мм, заповнена силікагелем для хроматографії октадецилсиліліним, 1,8 мкм;
- температура колонки – 40°C ;
- рухома фаза А – H_2O – 0,1 % HCOOH ;
- рухома фаза В – CH_3CN – 0,1 % HCOOH ;
- швидкість потоку – 1 мл/хв;
- ізократичний режим – рухома фаза А – рухома фаза В (90:10);
- об'єм проби – 1 мкл;
- детектор – діодно-матричний ($\lambda = 444$ нм).

Виготовлення рухомої фази А. 1,00 мл мурашиної кислоти розбавляють до 1000,0 мл водою. **Виготовлення рухомої фази В.** 1,00 мл мурашиної кислоти розбавляють до 1000,0 мл ацетонітрилом. **Виготовлення розчину порівняння.** 10 мг (точна наважка) робочого стандартного зразка рибофлавіну вносять у мірну колбу місткістю 100,0, розчиняють в 0,1 % мурашиної кислоти, нагріваючи при 80°C на водяному огрівнику, та доводять до 100,0 мл цим самим розчинником; ретельно перемішують.

Виготовлення досліджуваного розчину. 4,7 г (точна наважка) розтертих у ступці драже «Ревіт» вносять у мірну колбу місткістю 100,0, розчиняють в 0,1 % мурашиної кислоти, нагріваючи при 80°C на водяному огрівнику, та доводять до 100,0 мл цим самим розчинником; ретельно перемішують. Розчин для хроматографування фільтрують через нейлоновий фільтр з розміром пор 0,12 мкм.

Розчин стандартного зразка та розчин дослідження вводять у хроматографічну систему по черзі шість разів.

Вміст рибофлавіну в грамах (табл. 1) розраховують, використовуючи вміст речовини в розчині порівняння за формулою:

$$X = \frac{S_x \times m_{st} \times b \times P}{S_{st} \times m_x \times 100},$$

де S_x – середнє значення площі піків рибофлавіну для хроматограм розчину дослідження;

S_{st} – середнє значення площі піка рибофлавіну для хроматограм розчину стандартного зразка;

m_{st} – маса наважки стандартного зразка рибофлавіну, г;

m_x – маса наважки порошку розтертих драже, г;

P – вміст основної речовини в стандартному зразку, %;

b – середня маса драже, г.

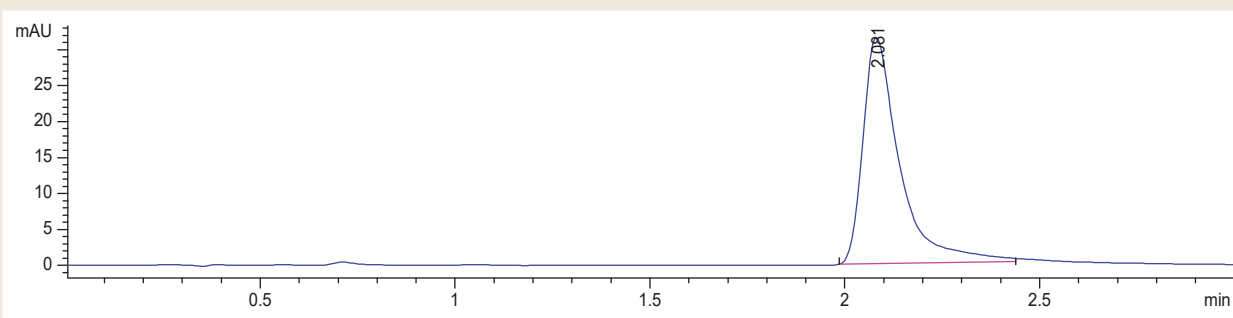


Рис. 3. Типова хроматограма розчину порівняння.

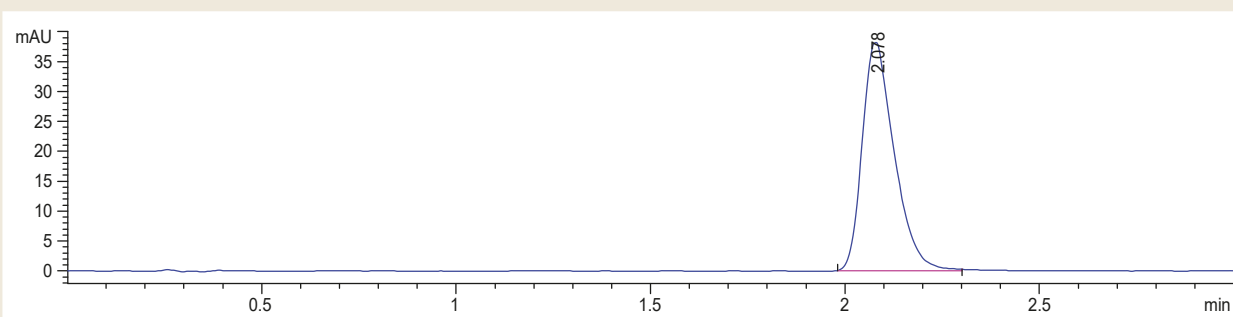


Рис. 4. Типова хроматограма випробовуваного розчину.

Таблиця 1. Результати кількісного визначення рибофлавіну в драже «Ревіт»

№	Площа піка, $\lambda = 444$ нм		Знайдено рибофлавіну, %	Метрологічна характеристика, n-1 = 5, $p = 0,95$
	Розчин порівняння	Досліджуваний розчин		
1	206,96222	218,75368	0,001259	$\bar{X} = 0,001325$ $S = 0,00004418$ $RSD\%^* = 3,334 \%$ $S_x = 1,804 \cdot 10^{-5}$ $\Delta\bar{X} = 4,636 \cdot 10^{-5}$ $\bar{\epsilon} = 3,498 \%$
2	202,53259	221,2494	0,001302	
3	199,36902	219,7515	0,001313	
4	197,89124	221,37413	0,001332	
5	190,92824	221,23091	0,001380	
6	191,22501	219,11237	0,001365	

Дослідили драже «Ревіт» серії BR170521 (АТ Київський вітамінний завод), наважка стандартного зразку – 0,0121 г, наважка порошку драже «Ревіт» – 4,759 г, середня маса драже – 0,4686 г; *: RSD – relative standard deviation (відносне стандартне відхилення).

Обговорення

Здійснили аналіз відомостей фахової літератури, як-от ДФУ, USP. З'ясували, що нині бракує хроматографічних методик аналізу рибофлавіну.

Відомо, що для фармакопейних методик якості лікарських засобів притаманне використання стаціонарних фаз із розміром зерна сорбента 5 мкм. Впровадження сучасних ультрависокоєфективних високотехнологічних сорбентів із розміром 1,8 мкм – важливе завдання у модернізації фармацевтичного аналізу. Раніше такі сорбенти для визначення рибофлавіну в драже «Ревіт» не використовували.

Теоретично на підставі гідрофільно-гідрофобних властивостей обґрунтовано умови визначення рибофлавіну на оберненофазовому сорбенті. Вивчення хроматографічних властивостей рибофлавіну, а також спектра

поглинання стали підґрунтям для встановлення оптимальних умов хроматографічного визначення цієї сполуки в його лікарських формах, зокрема в драже «Ревіт».

На рис. 4 наведена типова хроматограма дослідженого розчину драже «Ревіт». Піки інших компонентів і допоміжних речовин полівітамінного препарату не виявлено, тобто методика є специфічною.

Пропонуємо впровадити розроблену методику в практичну фармацію, а саме в роботу лабораторій фармацевтичних підприємств. Результати дослідження мають істотну практичну цінність, оскільки є підґрунтям для розроблення інших методик визначення рибофлавіну, зокрема в інших лікарських формах. Ці результати можна використовувати в лабораторіях відділів з контролю якості фармацевтичних виробництв, а також контролювальних і дослідних лабораторій.

Висновки

1. Вивчили хроматографічну поведінку рибофлавіну на підставі хіміко-аналітичних властивостей. Встановили оптимальні умови хроматографічного визначення рибофлавіну.

2. Розробили специфічну, експресну методику визначення рибофлавіну в драже «Ревіт». Встановили вміст рибофлавіну в реальному зразку драже «Ревіт».

3. Розроблену методику запропонували до використання в роботі контрольно-аналітичних і дослідних лабораторій.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Відомості про авторів:

Варинський Б. О., д-р фарм. наук, доцент каф. фізикоїдної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0002-1551-8879](https://orcid.org/0000-0002-1551-8879)

Зеленюк М. Ю., студент-магістр V курсу фармацевтичного факультету, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Каплаушенко А. Г., д-р фарм. наук, професор, зав. каф. фізикоїдної хімії, Запорізький державний медичний університет, Україна.

ORCID ID: [0000-0003-3704-5539](https://orcid.org/0000-0003-3704-5539)

Information about authors:

Varynskyi B. O., PhD, DSc, Associate Professor of the Department of Physical and Colloidal Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Zeleniuk M. Yu., Master student of the 5th course of Pharmaceutical Faculty, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Kaplaushenko A. H., PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Physical and Colloidal Chemistry, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

Список літератури

- [1] Rocha F. R. P., Filho O. F., Reis B. F. A multicommutated flow system for sequential spectrophotometric determination of hydrosoluble vitamins in pharmaceutical preparations. *Talanta*. 2003. Vol. 59, Iss. 1. P. 191-200. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00477-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00477-0)
- [2] Ahmad I., Rapson H. D. Multicomponent spectrophotometric assay of riboflavine and photoproducts. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 1990. Vol. 8, Iss. 3. P. 217-223. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(90\)80029-o](https://doi.org/10.1016/0731-7085(90)80029-o)
- [3] Spectrophotometric determination of multicomponent vitamins by flexible tolerance simplex method / H. L. Wu, S. F. Li, B. W. Zeng, R. Q. Yu. *Yao Xue Xue Bao = Acta Pharmaceutica Sinica*. 1991. Vol. 26, Iss. 3. P. 214-218.
- [4] Chen P., Atkinson R., Wolf W. R. Single-laboratory validation of a high-performance liquid chromatographic-diode array detector-fluorescence detector/mass spectrometric method for simultaneous determination of water-soluble vitamins in multivitamin dietary tablets. *Journal of AOAC International*. 2009. Vol. 92, Iss. 2. P. 680-687.
- [5] Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Харків: PIPEГ, 2001. 556 с.
- [6] Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. Харків: PIPEГ, 2001. Доповнення 1. 2004. 520 с.
- [7] United State Pharmacopoeia / USP 43-NF 38. 2020.
- [8] Petteys B. J., Frank E. L. Rapid determination of vitamin B (riboflavin) in plasma by HPLC. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2011. Vol. 412, Iss. 1-2. P. 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.037>
- [9] CRC Handbook of Food Additives / ed. T. E. Furia. 2nd ed. Cleveland: The Chemical Rubber Co, 1972. 89. p.
- [10] Варинський Б. О. Хроматографічне та мас-спектрометричне визначення активних фармацевтичних інгредієнтів похідних

3-тіо-1,2,4-тріазолу в лікарських засобах та біологічних об'єктах: дис... д-ра фармац. наук: 15.00.02 / Запорізький держ. мед. ун-т. Запоріжжя, 2021, 410 с.

- [11] LogD Predictor // ChemAxon. URL: <https://disco.chemaxon.com/calculators/demo/plugins/logd/>

References

- [1] Rocha, F. R. P., Filho, O. F., & Reis, B. F. (2003). A multicommutated flow system for sequential spectrophotometric determination of hydrosoluble vitamins in pharmaceutical preparations. *Talanta*, 59(1), 191-200. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00477-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00477-0)
- [2] Ahmad, I., & Rapson, H. D. (1990). Multicomponent spectrophotometric assay of riboflavine and photoproducts. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 8(3), 217-223. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(90\)80029-o](https://doi.org/10.1016/0731-7085(90)80029-o)
- [3] Wu, H. L., Li, S. F., Zeng, B. W., & Yu, R. Q. (1991). Spectrophotometric determination of multicomponent vitamins by flexible tolerance simplex method. *Yao Xue Xue Bao = Acta Pharmaceutica Sinica*, 26(3), 214-218.
- [4] Chen, P., Atkinson, R., & Wolf, W. R. (2009). Single-laboratory validation of a high-performance liquid chromatographic-diode array detector-fluorescence detector/mass spectrometric method for simultaneous determination of water-soluble vitamins in multivitamin dietary tablets. *Journal of AOAC International*, 92(2), 680-687.
- [5] State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality (2001). *Derzhavna Farmakopeya Ukrainy* [The State Pharmacopoeia of Ukraine] (1st ed.). Kharkiv: State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality [in Ukrainian].
- [6] State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality (2001). *Derzhavna Farmakopeya Ukrainy. Dopovnennia 2* [The State Pharmacopoeia of Ukraine] (1st ed., Suppl 1). Kharkiv: State Enterprise Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center of Medicines Quality [in Ukrainian].
- [7] *United State Pharmacopoeia* (2020). USP 43-NF 38.
- [8] Petteys, B. J., & Frank, E. L. (2011). Rapid determination of vitamin B₂ (riboflavin) in plasma by HPLC. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 412(1-2), 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.08.037>
- [9] Furia, T. E. (Ed.). (1972). *CRCHandbook of Food Additives* (2nd ed.). The Chemical Rubber Co.
- [10] Varynskyi, B. O. (2021). *Khromatohrafichne ta mas-spektrometrychne vyznachennia aktyvnykh farmatsevtichnykh ingredientiv pokhidnykh 3-tio-1,2,4-triazolu v likarskykh zasobakh ta biolohichnykh ob'iektakh* [Chromatographic and mass spectrometric determination of active pharmaceutical ingredients – derivatives of 3-thio-1,2,4-triazole in medicinal products and biological objects (Doctoral dissertation)]. Zaporizhzhia State Medical University, Zaporizhzhia. [in Ukrainian].
- [11] ChemAxon. (n.d.). *LogD Predictor*. <https://disco.chemaxon.com/calculators/demo/plugins/logd/>