

Методологический подход к планированию эксперимента при выборе качественных реакций для подтверждения подлинности...
A Methodological Approach to Designing Experiments when Dealing with Identification Tests for Medicinal Product Components...

УДК 615.456:615.014.425:615.011.5:615.074:543.2
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-193-200>



Методологический подход к планированию эксперимента при выборе качественных реакций для подтверждения подлинности компонентов лекарственного средства (на примере аскорбиновой кислоты)

Ю. Б. Пурим, М. Л. Круглякова, Л. Н. Буланова, М. В. Агапкина, Л. А. Стронова,
Т. Н. Боковикова*, Е. П. Герникова

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский бульвар, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Необходимость подтверждения подлинности действующих или вспомогательных веществ многокомпонентных лекарственных средств, в том числе с использованием качественных реакций, влечет за собой необходимость проведения исследований по выбору реакций и условий их проведения с учетом мешающего влияния других компонентов лекарственного средства и количества используемого образца. **Цель работы:** разработка методологического подхода к планированию эксперимента при выборе качественных реакций для подтверждения подлинности определяемого компонента лекарственного средства на основании результатов исследований возможности использования известных качественных реакций (на примере аскорбиновой кислоты в многокомпонентном лекарственном средстве — 0,4 мг аскорбиновой кислоты / 100 мг содержимого флакона) с учетом мешающего влияния других компонентов лекарственного средства и количества используемого образца. **Материалы и методы:** в качестве объекта исследования было выбрано многокомпонентное лекарственное средство — лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения с лекарственным веществом, обладающим противовоспалительным действием, в состав которого входит аскорбиновая кислота в качестве стабилизатора (антиоксиданта). В результате анализа данных литературы выбраны качественные реакции для проведения исследований возможности их использования для подтверждения подлинности аскорбиновой кислоты в изучаемом лекарственном средстве. Проведена экспериментальная проверка реакций, основанных на кислотных и восстановительных свойствах аскорбиновой кислоты. **Результаты:** установлено, что в изучаемом многокомпонентном лекарственном средстве для подтверждения подлинности аскорбиновой кислоты могут быть применимы несколько известных качественных реакций: реакции образования аскорбината железа и восстановления нитрата серебра до металлического серебра после предварительного отделения аскорбиновой кислоты от других компонентов лекарственного средства, а также реакция образования берлинской лазури, йодная проба и реакция с раствором перманганата калия, не требующие дополнительной пробоподготовки. Использование реакций с раствором метиленового синего и реактивом Фелинга применительно к данному лекарственному средству нецелесообразно, так как результат указанных реакций слабо выражен. **Выводы:** на примере многокомпонентного лекарственного средства разработан методологический подход к выбору качественных реакций для подтверждения подлинности одного из компонентов лекарственного средства (например, аскорбиновой кислоты). Алгоритм действий включает в себя выбор реакций, определение их чувствительности и целесообразности применения для конкретного лекарственного средства, изучение влияния других его компонентов на результат химической реакции, а также необходимость или отсутствие дополнительной пробоподготовки. Совокупность проведенных исследований позволяет сделать выбор качественных реакций и оптимальных условий их проведения для достижения поставленной цели — подтверждения подлинности определяемого вещества.

Ключевые слова: методологический подход; качественные реакции; условия проведения испытания; аскорбиновая кислота; антиоксидант; парентеральные лекарственные средства

Для цитирования: Пурим ЮБ, Круглякова МЛ, Буланова ЛН, Агапкина МВ, Стронова ЛА, Боковикова ТН, Герникова ЕП. Методологический подход к планированию эксперимента при выборе качественных реакций для подтверждения подлинности компонентов лекарственного средства (на примере аскорбиновой кислоты). *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(3):193–200. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-193-200>
***Контактное лицо:** Боковикова Татьяна Николаевна; Bokovikova@expmed.ru

A Methodological Approach to Designing Experiments when Dealing with Identification Tests for Medicinal Product Components (as Illustrated by Ascorbic Acid)

Yu. B. Purim, M. L. Kruglyakova, L. N. Bulanova, M. V. Agapkina, L. A. Stronova,
T. N. Bokovikova*, E. P. Gernikova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

The need for identification testing of active substances or excipients in multi-component medicinal products, including the use of qualitative tests, calls for research substantiating the choice of tests and test conditions with due regard to interference effects caused by other components of medicinal products and the amount of the sample used. **The aim of the study** was to develop a me-

thodological approach to designing experiments while selecting qualitative reactions for identification testing of a medicinal product component based on the results of studies investigating the possibility of using known qualitative tests (as illustrated by ascorbic acid in a multi-component product — 0.4 mg of ascorbic acid per 100 mg of the vial contents) with due regard to interference on the part of other medicinal product components and the amount of the sample used. **Material and methods:** the study focused on a multi-component medicinal product — lyophilisate for solution for intravenous and intramuscular injections containing an anti-inflammatory active substance and ascorbic acid as a stabilizing agent (antioxidant). The analysis of literature sources helped to determine qualitative tests that were assessed for potential use for identification testing of ascorbic acid as a component of the analysed medicinal product. The study involved experimental testing of the qualitative reactions based on acidic and reducing properties of ascorbic acid. **Results:** it was demonstrated that several well-known qualitative tests could be used for identification testing of ascorbic acid as a component of the analysed medicinal product, namely, the reaction of ferrous ascorbate formation and the reaction of silver nitrate reduction to metallic silver after preliminary separation of ascorbic acid from the other medicinal product components, as well as the reaction of Prussian blue formation, iodine test and reaction with a potassium permanganate solution, which do not require additional sample preparation. It is not practicable to use the reaction with a methylene blue solution and the Fehling's reagent reaction for this particular medicinal product, since their results are feeble. **Conclusions:** the analysis of the multi-component medicinal product helped to develop a methodological approach to choosing qualitative reactions for identification testing of one of the medicinal product's components (e.g., ascorbic acid). The suggested algorithm includes the choice of reactions, determination of their sensitivity and applicability for a particular medicinal product, analysis of the other components' effects on the results of the chemical reaction, and the need for additional sample preparation. The whole complex of the studies performed helped to determine qualitative reactions and optimal conditions for identification testing of the analysed substance. **Key words:** methodological approach; qualitative reactions; test conditions; ascorbic acid; antioxidant; parenterals

For citation: Purim YuB, Bulanova LN, Agapkina MV, Stronova LA, Bokovikova TN, Gernikova EP. A methodological approach to designing experiments when dealing with identification tests for medicinal product components (as illustrated by ascorbic acid). *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2018;8(3):193–200. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-3-193-200>
***Corresponding author:** Tatiana N. Bokovikova; Bokovikova@expmed.ru

Парентеральные лекарственные средства (ЛС) представляют собой твердые и жидкие стерильные лекарственные формы, стабильность которых достигается как строгим соблюдением асептических условий их приготовления, так и использованием стабилизаторов [1, 2] — веществ, позволяющих сохранять физико-химические свойства и фармакологическую активность, предусмотренные требованиями фармакопеи или нормативной документации (НД), в течение установленного срока годности.

Около 90 % лекарственных веществ, входящих в состав инъекционных ЛС, требуют применения стабилизаторов или особых условий приготовления, так как в результате химических реакций они могут претерпевать различные изменения: гидролиз, окисление-восстановление, полимеризацию, фотохимическую деструкцию и др.

Механизм действия стабилизаторов сводится как к улучшению растворимости лекарственных веществ (солюбилизации), созданию определенного значения рН среды, так и предупреждению окислительно-восстановительных процессов. При этом вещества, применяющиеся в качестве стабилизаторов, должны быть безопасными как в чистом виде, так и в составе лекарственного препарата и разрешены к применению в медицинской практике. Стабилизаторы должны выполнять функциональное назначение — обеспечивать устойчивость ЛС. Количество добавляемого стабилизатора указывается в НД [1, 2].

Лекарственные вещества, имеющие в своей молекуле спиртовые, фенольные, карбонильные радикалы и другие функциональные группы с подвижным атомом водорода, легко разлагаются, окисляясь под воздействием кислорода воздуха. С целью стабилизации ЛС используют антиоксиданты, окисляющиеся значительно легче подобных лекарственных веществ, тем самым предотвращая их

окисление. К числу антиоксидантов относится, например, аскорбиновая кислота [1].

При стабилизации ЛС, как правило, используется комплексный подход, осуществляемый путем введения различного типа стабилизаторов, например: нескольких прямых антиоксидантов; прямого и косвенного (комплексообразователя) антиоксидантов; антиоксиданта и вещества, обеспечивающего рН среды; антиоксиданта и консерванта (антимикробная стабилизация).

Таким образом, для стабилизации окисляющихся соединений необходимо создать оптимальные значения рН растворов, исключить влияние на лекарственное вещество кислорода и катализаторов в процессе приготовления, стерилизации и хранения лекарственного препарата.

Примером такого способа стабилизации ЛС является многокомпонентный препарат (лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного и внутримышечного введения) с лекарственным веществом, обладающим противовоспалительным (обезболивающим, жаропонижающим) действием и вспомогательными веществами: маннитол, динатрия эдетат, аскорбиновая кислота, трометамол, натрия гидроксид / хлористоводородная кислота.

Для идентификации и количественного определения аскорбиновой кислоты (АСК) известны и широко используются различные химические, физические и физико-химические методы анализа, например: рамановская спектроскопия или другие спектральные методы анализа в инфракрасной и ультрафиолетовой области спектра [3, 4]. Для обнаружения аскорбиновой кислоты применимы разные виды хроматографии (хроматография в тонком слое сорбента, высокоэффективная жидкостная или газовая хромато-масс-спектрометрия). В литературе представлены результаты исследований по разработке методики пробоподготовки образцов, содержащих АСК;

показано влияние состава подвижных фаз на хроматографические характеристики АСК при использовании вышеуказанных методов анализа [3, 5–7].

Цель работы — разработка методологического подхода при планировании эксперимента для выбора реакций, подтверждающих подлинность определяемого компонента в изучаемом ЛС, основанного на результатах исследований возможности использования известных качественных реакций.

В основе качественного анализа АСК, как правило, лежат ее кислотные и восстановительные свойства. В результате реакций появляется или исчезает окрашивание, а также может образовываться осадок [8–11].

К реакциям кислотного характера относится реакция с солью двухвалентного железа с образованием темно-фиолетового окрашивания — аскорбината железа, которое исчезает при добавлении серной кислоты [12].

Указанная качественная реакция первоначально была проведена с водными растворами АСК разной концентрации. Светлое фиолетовое окрашивание было получено с 2 мл раствора, содержащего 1 мг/мл АСК, после прибавления к нему 0,1 г гидрокарбоната натрия и около 0,02 г железа (II) сульфата (при стоянии окрашивание бледнело). Выраженное фиолетовое окрашивание, исчезающее при добавлении серной кислоты разведенной 16 %, было получено только при увеличении концентрации раствора АСК в два раза.

При воспроизведении описанной реакции непосредственно с водным раствором ЛС, содержащим 1 мг/мл АСК (содержимое пяти флаконов растворяли в 2 мл воды), характерное фиолетовое окрашивание не образовывалось, а наблюдалось коричневое окрашивание (со временем выпадал осадок коричневого цвета), и после прибавления серной кислоты разведенной 16 % никаких изменений не происходило. Проведение реакции с испытуемым раствором большей концентрации было нецелесообразно.

Следующим этапом наших исследований было изучение возможности проведения данной реакции с раствором АСК после отделения других компонентов ЛС. Для этого содержимое пяти флаконов ЛС встряхивали в течение 3 мин с 2 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты, после чего смесь центрифугировали в течение 3 мин при 3000 об/мин, надосадочную жидкость отфильтровывали через фильтр «синяя лента», к полученному фильтрату прибавляли 2 мл метилхлорида, встряхивали и снова центрифугировали. При проведении испытания с полученным экстрактом АСК наблюдалось темно-серое окрашивание. С увеличением концентрации АСК вдвое раствор окрашивался в темно-фиолетовый цвет, который исчезал после добавления 5 мл серной кислоты разведенной 16 %.

Для подтверждения подлинности АСК чаще используются окислительно-восстановительные реакции, чем реакции, основанные на ее кислотных свойствах. АСК легко окисляется в связи с наличием в молекуле ендиольной группировки с подвижными атомами водорода. Окисление может проходить

в две стадии: с обратимым процессом окисления, при котором АСК окисляется до дегидроаскорбиновой кислоты (кетонная форма), способной снова восстанавливаться до АСК, или более глубоким окислением (вторая стадия) с разложением дегидроаскорбиновой кислоты [12].

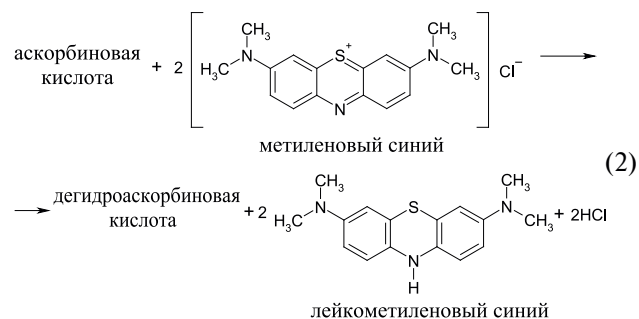


Окисление АСК легко происходит в нейтральной и щелочной среде, оно катализируется ионами тяжелых металлов (меди, железа, серебра), при этом соли окислов металлов восстанавливаются в соли закиси, а в щелочной среде, например, соли меди и серебра восстанавливаются до металлов. В кислой среде восстанавливающие свойства аскорбиновой кислоты выражены значительно слабее [12].

Изучена возможность подтверждения подлинности АСК по реакции с раствором нитрата серебра, в результате которой происходит восстановление ионов серебра до металлического серебра. При добавлении к пробе, содержащей 4 мг АСК, 0,5 мл серебра нитрата раствора 1 % (серебра нитрата раствор 2 % разбавляли водой вдвое) выпадал осадок темно-серого цвета.

С целью уменьшения влияния других компонентов препарата на результат указанной качественной реакции определение проводили с экстрактом АСК из раствора ЛС, после чего доводили рН среды до необходимой величины (около 8) аммиака раствором 10 % (1–2 капли). Раствор, содержащий 2 мг АСК, приобретал светло-серую окраску. При увеличении содержания АСК до 4 мг раствор становился темно-серого цвета, со временем выпадал осадок серого цвета (серебро).

Изучена возможность использования окислительно-восстановительной реакции с раствором метиленового синего для подтверждения подлинности АСК, в результате которой метиленовый синий восстанавливается и переходит в бесцветную лейкоформу [12].



В качестве испытуемого раствора использовали 2 мл экстракта АСК (1 мг/мл) с добавлением 1 капли метиленового синего спиртового раствора 0,05 % (метиленового синего спиртового раствор 0,1 % разбавляли вдвое спиртом 96 %). Испытуемый раствор после добавления индикатора имел голубой цвет.

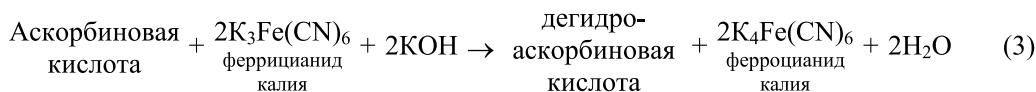
Для сравнительной оценки результата реакции определение проводили параллельно с раствором сравнения и контрольным раствором. Раствор сравнения — тот же объем испытуемого раствора (практически бесцветный раствор с едва заметным желтоватым оттенком); контрольный раствор (голубого цвета) — смесь 2 мл 0,1 М раствора хлористоводородной кислоты и 1 капли метиленового синего спиртового раствора 0,05 %. Все растворы подвергали нагреванию на водяной бане при 40 °С в течение 3 мин, после чего цвет испытуемого раствора практически не изменялся. При проведении данной реакции в тех же условиях с 2 мл водного раствора АСК (1 мг/мл) раствор обесцвечивался. Дополнительно были проведены испытания с разбавленным в пять раз раствором метиленового синего, но и в этих условиях испытуемый раствор не обесцвечивался (имел голубой оттенок).

Другая качественная реакция на АСК с реактивом Фелинга основана на восстановлении окисной меди (CuO) до закисной меди красного цвета (Cu₂O).

При проведении реакции с 4 мл реактива Фелинга и 2 мл водного раствора ЛС, содержащего 1 мг/мл АСК, испытуемый раствор приобретал вид студенистой массы бирюзового цвета с желтоватыми разводами (при длительном отстаивании наблюдали образование незначительного количества

осадка оранжевого цвета). Выделение АСК из раствора ЛС существенно не повлияло на результат реакции. Проведение испытания с 2 мл водного раствора АСК (1 мг/мл) показало, что содержание АСК в реакционной смеси недостаточно (раствор мутнел, приобретая буровато-зеленый цвет). При увеличении содержания АСК в два раза раствор становился желтовато-зеленого цвета, и лишь со временем выпадал оранжевый осадок, то есть для получения характерного результата описанной реакции необходимо использовать растворы АСК большей концентрации. В рамках наших исследований это нецелесообразно, так как требует использования большого количества ЛС с учетом малого содержания в нем АСК.

Для подтверждения подлинности АСК также была использована реакция образования берлинской лазури (уравнения (3) и (4)), в результате которой в щелочной среде происходит восстановление феррицианида калия (железосинеродистого калия) до ферроцианида калия (железистосинеродистого калия), который при взаимодействии с хлорным железом (III) в кислой среде образует плохо растворимую в воде соль трехвалентного железа (раствор окрашивается в синий цвет, затем выпадает темно-синий осадок, цвет которого при осторожном насливании воды становится более отчетливым) [12].



Реакцию проводили как непосредственно с раствором ЛС, так и с экстрактом АСК. Содержимое одного флакона растворяли в 10 мл воды. К 2 мл полученного раствора прибавляли 0,1 мл калия гидроксида раствора 10 %, 0,2 мл калия феррицианида раствора 5 % и энергично встряхивали; после чего добавляли 1 мл хлористоводородной кислоты раствора 10 % и 0,1 мл железа (III) хлорида раствора 1 %. Мгновенно образовывалось интенсивное синее окрашивание. При взбалтывании раствор приобретал сине-зеленое окрашивание (цвет морской волны); со временем выпадал осадок темно-синего цвета (берлинская лазурь) и осадок желтого цвета (действующее вещество). При проведении реакции с 2 мл экстракта АСК (1 мг/мл) образовывалось характерное сине-зеленое окрашивание и выпадал темно-синий осадок, цвет которого при осторожном насливании воды становился более отчетливым.

Йодная проба на АСК и реакция с раствором перманганата калия, при которых должно происходить обесцвечивание прибавляемых по каплям реактивов, были проведены с раствором ЛС (содержимое 1 флакона растворяли в 2 мл воды) и с 2 мл экстракта АСК (1 мг/мл).

После прибавления одной капли йода раствора 0,05 М или трех капель калия перманганата раствора 3 % к раствору ЛС окраска от прибавляемых реактивов обесцвечивалась, при этом окраска самого испытуемого раствора (желтоватого цвета) первоначально не изменялась (при дальнейшем прибавлении указанных реактивов испытуемый раствор приобретал оранжевый, а затем коричневатый оттенок). При проведении реакций с экстрактом АСК pH раствора довели до величины 7–8 прибавлением калия гидроксида раствора 0,5 % (калия гидроксида раствор 10 % разбавляли водой в 20 раз). Прибавляемые по каплям растворы йода и перманганата калия обесцвечивались (испытуемый раствор оставался практически бесцветным).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований на примере АСК предложен методологический подход к выбору качественных реакций для идентификации одного из компонентов ЛС. Алгоритм исследований включает в себя определение перечня возможных химических реакций и установление их чувствительности, определение влияния других компонентов ЛС на получение ожидаемого

результата реакции, а также разработку конкретных условий выбранных реакций для данного ЛС, учитывая, в случае необходимости, проведение дополнительной пробоподготовки. Установлено, что в изучаемом многокомпонентном ЛС для подтверждения подлинности АСК могут быть применимы несколько известных качественных реакций на АСК: реакции образования аскорбината железа и восстановления нитрата серебра до металлического серебра (после предварительной экстракции АСК из раствора ЛС), а также реакция образования берлинской лазури, йодная проба и реакция с раствором перманганата калия, не требующие дополнительной пробоподготовки (отделения АСК от других компонентов ЛС). Использование реакций с раствором метиленового синего и реактивом Фелинга, применительно к данному ЛС, нецелесообразно, так как результат указанных реакций слабо выражен, что отчасти можно объяснить малой концентрацией АСК в испытуемых растворах или мешающим влиянием других компонентов ЛС. В случае включения в нормативную документацию качественных реакций для подтверждения подлинности определяемого компонента ЛС методики должны быть валидированы в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15 Государственной фармакопеи Российской Федерации XIII изд.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Parenteral medicinal products are solid and liquid sterile dosage forms whose stability is ensured by scrupulous observance of aseptic preparation conditions and the use of stabilizing agents [1, 2] — substances that help preserve physico-chemical properties and pharmacological activity required by the pharmacopoeial monograph or manufacturer's specification during the established shelf-life.

About 90 % of pharmaceutical substances that are found in injectable dosage forms require the use of stabilizing agents or special preparation conditions since chemical reactions may produce various changes in them: hydrolysis, oxidation-reduction, polymerisation, photochemical degradation, etc.

The mechanism of action of stabilizing agents consists in the improvement of the active substance solubility (solubilisation), maintenance of a particular pH value and prevention of oxidation-reduction processes. In addition, substances used as stabilizers have to be safe both when unformulated and when a part of a medicinal product, and be authorised for medical use. Stabilizing agents have a functional role to play — they ensure the stability of a medicinal product. The required amount of the stabilizing agent is indicated in the product specification [1, 2].

Active substances whose molecule includes alcohol, phenolic, carbonyl chemical groups and other functional

groups with a labile hydrogen atom, easily degrade as a result of air oxidation. In order to ensure stability of such medicinal products one may use antioxidants that are oxidized much easier than these active substances and, therefore, prevent their oxidation. One such antioxidant is ascorbic acid [1].

Stability of a medicinal product can usually be achieved by using a complex approach involving the use of different types of stabilizing agents, e.g. several direct antioxidants; a direct and an indirect (complexing agent) antioxidants; an antioxidant and an agent ensuring the required pH; an antioxidant and a preservative agent (antimicrobial stabilization).

Thus, the stability of oxidizable compounds can be achieved by ensuring optimal pH values of solutions, and ruling out the effects of oxygen and catalysts during preparation, sterilization and storage of medicinal products.

This method of achieving stability may be illustrated by a multi-component medicinal product (lyophilisate for solution for intravenous and intramuscular injections) containing an anti-inflammatory (anaesthetic, antipyretic) active substance and excipients — mannitol, disodium edentate, ascorbic acid, trometamol, sodium hydroxide/hydrochloric acid.

Ascorbic acid (AsA) identification and assay can be carried out using such widely used chemical, physical and physico-chemical methods as Raman spectrometry or other IR and UV spectroscopic methods [3, 4]. Ascorbic acid can be detected by various types of chromatography (thin-layer chromatography, high-performance liquid chromatography or gas chromatography-mass spectrometry). Literature sources report results of studies devoted to sample preparation techniques for AsA-containing products, they also illustrate the effect of mobile phase composition on AsA chromatographic characteristics when using the analytical methods mentioned above [3, 5–7].

The aim of the study was to develop a methodological approach to designing experiments while selecting qualitative reactions for identification testing of a medicinal product component based on the results of studies investigating the possibility of using known qualitative tests.

Qualitative analysis of AsA is usually based on its acidic and reducing properties. Chemical reactions produce a colour change and may also lead to precipitation [8–11].

Acidic reactions include the reaction with ferrous salt, which results in dark purple coloration, caused by ferrous ascorbate, which disappears upon addition of sulfuric acid [12].

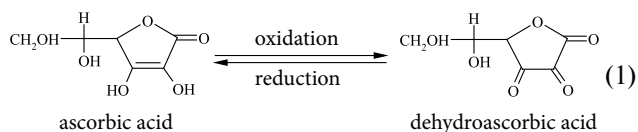
This qualitative reaction was first carried out with AsA aqueous solutions of different concentrations. Light purple colour was obtained with 2 ml of 1 mg/ml AsA solution after addition of 0.1 g of sodium hydrocarbonate and approximately 0.02 g of iron (II) sulfate (when left to stand the colour turned pale). The intense purple colour that disappeared upon addition of sulfuric acid solution 16 % was achieved only after doubling the AsA solution concentration.

When this reaction was reproduced with the drug aqueous solution containing 1 mg/ml AsA (the contents of five vials were diluted in 2 ml of water), the character-

istic purple colour was not observed, instead the solution turned brown (and after some time a brown precipitate was formed), and the addition of sulfuric acid solution 16 % did not produce any changes. It was considered impractical to carry out the reaction with the test solution of higher concentration.

At the next stage we studied the possibility of carrying out this reaction with an AsA solution after removing all other components of the medicinal product. For that purpose the contents of five vials were shaken for 3 minutes together with 2 ml of 0.1 M hydrochloric acid solution, after that the mixture was centrifuged for 3 minutes at 3000 rpm, the supernatant was filtrated through "blue ribbon" filter, and 2 ml of methylene chloride were added to the obtained filtrate, then the mixture was shaken and centrifuged once again. The reaction with the obtained AsA extract produced dark grey colour. When the AsA concentration was doubled, the solution turned dark purple, and this colour disappeared upon addition of 5 ml of sulfuric acid solution 16 %.

Oxidation-reduction reactions are more often used for AsA identification testing than acidic reactions. AsA is readily oxidized due to the presence of the enediol group with labile hydrogen atoms in its molecule. There may be two stages of oxidation: when AsA undergoes reversible oxidation to dehydroascorbic acid (ketonic form) which can be restored to AsA, or more severe oxidation (second stage) with decomposition of dehydroascorbic acid [12].



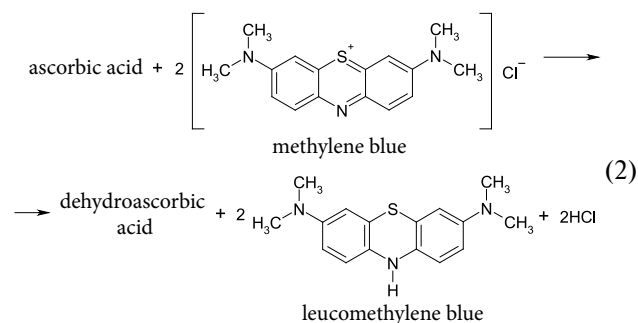
AsA is easily oxidized at neutral and alkaline pH, oxidation is catalyzed by heavy metal ions (copper, iron, silver), in which case metal oxide salts are reduced to protoxide salts, and at alkaline pH, for instance, copper salts and silver salts are reduced to metals. The reducing properties of ascorbic acid are much less prominent at acidic pH [12].

The present study investigated the possibility of AsA identification testing by using the reaction with silver nitrate solution, which results in the reduction of silver ions to silver metal. When 0.5 ml of silver nitrate solution 1 % (silver nitrate solution 2 % diluted with water to half the concentration) was added to the sample containing 4 mg of AsA, a dark grey precipitate was formed.

In order to minimize the effect of the other medicinal product components on the result of the above-mentioned test, the reaction was carried out using an AsA extract obtained from the medicinal product solution whose pH value was adjusted as required (to about 8) by ammonia solution 10 % (1–2 drops). The solution containing 2 mg of AsA turned light grey. When the AsA concentration was increased to 4 mg, the solution turned dark grey, and after some time a grey precipitate was formed (silver).

The study investigated the practicability of AsA identification testing by using the oxidation-reduction reaction with a methylene blue solution, which results in the

reduction of methylene blue to colourless leucomethylene blue [12].



The test solution was prepared by adding 1 drop of methylene blue alcohol solution 0.05 % (methylene blue alcohol solution 0.1 % was diluted to half the concentration by alcohol 96 %) to 2 ml of the AsA extract (1 mg/ml). The test solution turned blue after the addition of the indicator.

In order to perform comparative assessment of the reaction outcomes, parallel tests were carried out with the blank solution and the reference solution. The blank solution was represented by the same volume of the test solution (practically colourless solution with a very slight yellowish tint); and the reference solution (blue solution) was a mixture of 2 ml of 0.1 M hydrochloric acid solution and 1 drop of methylene blue alcohol solution 0.05 %. All the solutions were heated in the water bath at 40°C for 3 minutes, and the colour of the test solution did not show any changes. When the same reaction was performed for 2 ml of the AsA aqueous solution (1 mg/ml), the solution was discoloured. Additional tests were carried out using a methylene blue solution diluted to one fifth of its concentration, but even after that the test solution did not lose its colour (it still had a blue tint).

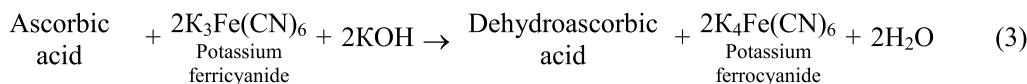
Another AsA identification test using Fehling's reagent is based on cupric copper (CuO) reduction to red cuprous copper (Cu₂O).

As a result of reaction with 4 ml of Fehling's reagent and 2 ml of drug aqueous solution containing 1 mg/ml of AsA, the test solution turned into a jelly-like turquoise substance with yellowish stains (when it was left to stand for a long time a small amount of orange precipitate was observed). The removal of AsA from the medicinal product solution did not have any significant impact on the result of the reaction. The reaction with 2 ml of the AsA aqueous solution (1 mg/ml) demonstrated that the AsA content in the reaction mixture was insufficient (the solution grew turbid and acquired a brownish-green colour). When the amount of AsA was doubled, the solution turned yellowish-green, and only after some time an orange precipitate was formed, which means that solutions with higher AsA concentrations should be used in order to obtain a representative result of the reaction in question. This is not practical for this study, since it requires the use of a large amount of the medicinal product, which contains a rather small amount of AsA.

AsA identification testing was also performed using the reaction of Prussian blue formation (formulas (3) and (4)), which leads to the reduction of potassium

ferricyanide at alkaline pH to potassium ferrocyanide which upon interaction with iron (III) chloride at acidic pH forms a ferric salt poorly soluble in water (the solu-

tion acquires blue colour and forms a dark blue precipitate whose colour becomes more intense upon accurate overlaying with water) [12].



The reaction was carried out using both the medicinal product solution and the AsA extract. The contents of one vial were diluted in 10 ml of water. Two ml of the obtained solution were mixed with 0.1 ml of potassium hydroxide solution 10 % and 0.2 ml of potassium ferricyanide solution 5 % and shaken vigorously; after that 1 ml of hydrochloric acid solution 10 % and 0.1 ml of iron (III) chloride solution 1 % were added. An intense blue colour was instantly observed. Upon stirring the solution it acquired a blue-green (sea-green) colour; after some time a dark blue precipitate (Prussian blue) and a yellow precipitate (active substance) were observed. When the reaction was carried out using 2 ml of the AsA extract (1 mg/ml), a characteristic green-blue colour and dark blue precipitate were observed; the colour of the precipitate became more intense upon accurate overlaying with water.

The iodine test and the reaction with a potassium permanganate solution, that should result in discoloration of reagents added by drops, were carried out using the medicinal product solution (contents of 1 vial diluted in 2 ml of water) and with 2 ml of the AsA extract (1 mg/ml).

Upon addition of one drop of 0.05 M iodine solution or three drops of potassium permanganate solution 3 % to the medicinal product solution, the reagents being added lost their colour, and the (yellowish) colour of the test solution did not change (upon further addition of the reagents the test solution turned orange and then brownish). When carrying out this reaction with the AsA extract, pH of the solution was adjusted to 7–8 by adding potassium hydroxide solution 0.5 % (potassium hydroxide solution 10 % diluted 20 times with water). The solutions of iodine and potassium permanganate added by drops were discolored (the test solution remained practically colourless).

CONCLUSION

The present study used AsA to illustrate the development of a methodological approach to the selection of qualitative reactions for identification testing of a medicinal product component. The suggested algorithm includes the choice of potential chemical reactions, determination of their sensitivity, analysis of the other components' effects on the expected results of the chemical reaction, and planning of specific conditions for the reactions chosen for a particular medicinal product, including, where necessary, additional sample preparation. It was demonstrated that several well-known qualitative tests could be used for identification testing of AsA as a component of the analysed medicinal product, namely,

the reaction of ferrous ascorbate formation and the reactions of silver nitrate reduction to metallic silver (after preliminary extraction of AsA from the medicinal product solution), as well as the reaction of Prussian blue formation, iodine test and reaction with a potassium permanganate solution, which do not require additional sample preparation (i.e. separation of AsA from the other medicinal product components). It is not practicable to use the reaction with a methylene blue solution and the Fehling's reagent reaction for this particular medicinal product, since their results are feeble, which can be accounted for by low AsA concentration in the test solutions and interference on the part of the other medicinal product components. In case manufacturers include qualitative reactions aimed at identification testing of medicinal product components into their product specifications, all the test methods have to be validated according to monograph OFS.1.1.0012.15 of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 13th edition.

Acknowledgements. The study reported in this publication was supported by the FSBI "SCEEMP" of the Ministry of Health of Russia and was carried out as part of a publicly funded research project (R&D public accounting No. AAAA-A18-118021590049-0).

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1–3. М.; 2015. [The State pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed. V. 1–3. Moscow; 2015 (In Russ.)]
2. Авдеева ЖИ, Солдатов АА, Алпатова НА, Киселевский МВ, Лыскова СЛ, Бондарев ВП и др. Биоаналоговые (биоподобные) лекарственные препараты рекомбинантного гранулоцитарного-колониестимулирующего фактора. Оценка качества. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2015;(1):4–14. [Avdeeva ZhI, Soldatov AA, Alpatova NA, Kiselevsky MV, Lysikova SL, Bondarev VP, et al. Recombinant granulocyte colony stimulating factor biosimilars. Quality assessment. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2015;(1):4–14 (In Russ.)]
3. Hima V, Rubesh Kumar S, Duganath N, Devanna N. Quantization of ascorbic acid in ayurvedic amla capsule by various analytical techniques. *Der Pharma Chemica*. 2013;5(3):8–17.
4. Neuberger S, Jooß K, Flottmann D, Scriba G, Neusüß C. Raman spectroscopy and capillary zone electrophoresis for the analysis of degradation processes in commercial effervescent tablets containing acetylsalicylic acid and ascorbic acid. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;134:122–9. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.020>
5. Shanawany AE, Neugebauer M, El-Sadek M, Rucker G. HPLC method for quantitative determination of ascorbic acid, phenylephrine, paracetamol and caffeine mixture. *Indian J Pharm Sci*. 1990;52(4):182–5.

6. Goodpaster JV, Keto RO. Identification of ascorbic acid and its degradation products in black powder substitutes. *J Forensic Sci.* 2004;49(3):523–8.
7. Sadamasu Y, Morikawa M, Sakamaki N, Monma K, Kobayashi C. Quantitative analysis of L-ascorbic acid and erythorbic acid in foods by HPLC, and confirmation method by LC-MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi.* 2018;59(1):11–7 (In Jap.). <https://doi.org/10.3358/shokueishi.59.11>
8. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII изд. Часть 1. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения; 2007. [The State pharmacopoeia of the Russian Federation. 12th ed. Part 1. Moscow: Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products; 2007 (In Russ.)]
9. European Pharmacopoeia online. European Directorate for the Quality of Medicines. Available from: <http://online.edqm.eu>
10. United States Pharmacopeia. 39th ed. 2016. Available from: <http://www.uspnf.com/uspnf>
11. Погодина ЛИ. Анализ многокомпонентных лекарственных форм. Минск: Вышэйшая школа; 1985. [Pogodina LI. *Analysis of multicomponent dosage forms.* Minsk: Vysheyschaya shkola; 1985 (In Russ.)]
12. Файгель Ф. Капельный анализ органических веществ. М.: Госхимиздат; 1962. [Feigl F. *Spot tests in organic analysis.* Moscow: Goskhimizdat; 1962 (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ

Пурим Юлия Борисовна, канд. фарм. наук, ведущий эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6295-6292>

Крулякова Марина Леонидовна, эксперт 2-й категории лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-7601-6031>

Буланова Людмила Николаевна, эксперт 1-й категории лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-9923-7355>

Агапкина Маргарита Васильевна, эксперт 1-й категории лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Стронова Лариса Александровна, канд. фарм. наук, главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-5598-5132>

Боквинова Татьяна Николаевна, д-р фарм. наук, начальник лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1560-3424>

Герникова Евгения Петровна, канд. фарм. наук, главный эксперт лаборатории химико-фармацевтических препаратов № 1 Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-0942-7049>

Статья поступила 09.01.2018
Принята к печати 22.08.2018

AUTHORS

Yulia B. Purim, Cand. Sci. (Pharm.), Leading Expert of the Laboratory of Chemical Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-6295-6292>

Marina L. Kruglyakova, 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Chemical Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-7601-6031>

Lyudmila N. Bulanova, 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Chemical Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-9923-7355>

Margarita V. Agapkina, 1st Professional Category Expert of the Laboratory of Chemical Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia

Larisa A. Stronova, Cand. Sci. (Pharm.), Chief Expert of the Laboratory of Chemical Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-5598-5132>

Tatiana N. Bokovikova, Dr. Sci. (Pharm.), Head of the Laboratory of Chemical Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-1560-3424>

Evgenia P. Gernikova, Cand. Sci. (Pharm.), Chief Expert of the Laboratory of Chemical Pharmaceutical Preparations No. 1 of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the FSBI «SCEEMP» of the Ministry of Health of Russia, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-0942-7049>

Article was received 9 January 2018
Accepted for publication 22 August 2018